

3. Materialien und Methoden

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die Experimente wurden mit zwei Zellarten durchgeführt:

1. Osteoblasten der Osteosarkomzelllinie MG-63
2. primäre humane Osteoblasten (phOB)

Nach erfolgter Kultivierung und Passagierung wurden die Zellen in erforderlicher Zellzahl und in geeigneten Kulturgefäßen ausgesät und 48 h im BSA-haltigen, aber FCS-freien Medium präinkubiert. Nach 48 h Präinkubation wurden Dexamethason 10^{-8} M als Positivkontrolle, Celecoxib (SC-58635; 10 μ M oder 50 μ M) oder DMSO (Negativkontrolle) zugesetzt.

Aus den Zelllysaten der MG-63 Osteoblasten wurden die OPG- und GLUT-1-Expressionen nach den jeweiligen Inkubationszeiten (2h, 6h, 24 h) auf mRNA-Ebene bestimmt. In Abbildung 4 ist der Versuchsablauf zur Bestimmung der OPG-Expression bei phOB beispielhaft skizziert.

Bei den phOB wurde darüber hinaus die Proteinsekretion von OPG aus den Zellkulturüberständen ermittelt.

Weiterhin erfolgten Untersuchungen zur Expression von HIF-1 α aus den zellulären Proteinlysaten in Westernblottechnik sowie Messungen des Sauerstoffverbrauches mittels Clark-Elektrode bei der Osteosarkomzelllinie.

Die jeweils unterschiedlichen Kulturbedingungen der beiden Zellpopulationen und die Isolierung der phOB werden in Kapitel 3.2.4 detaillierter beschrieben.

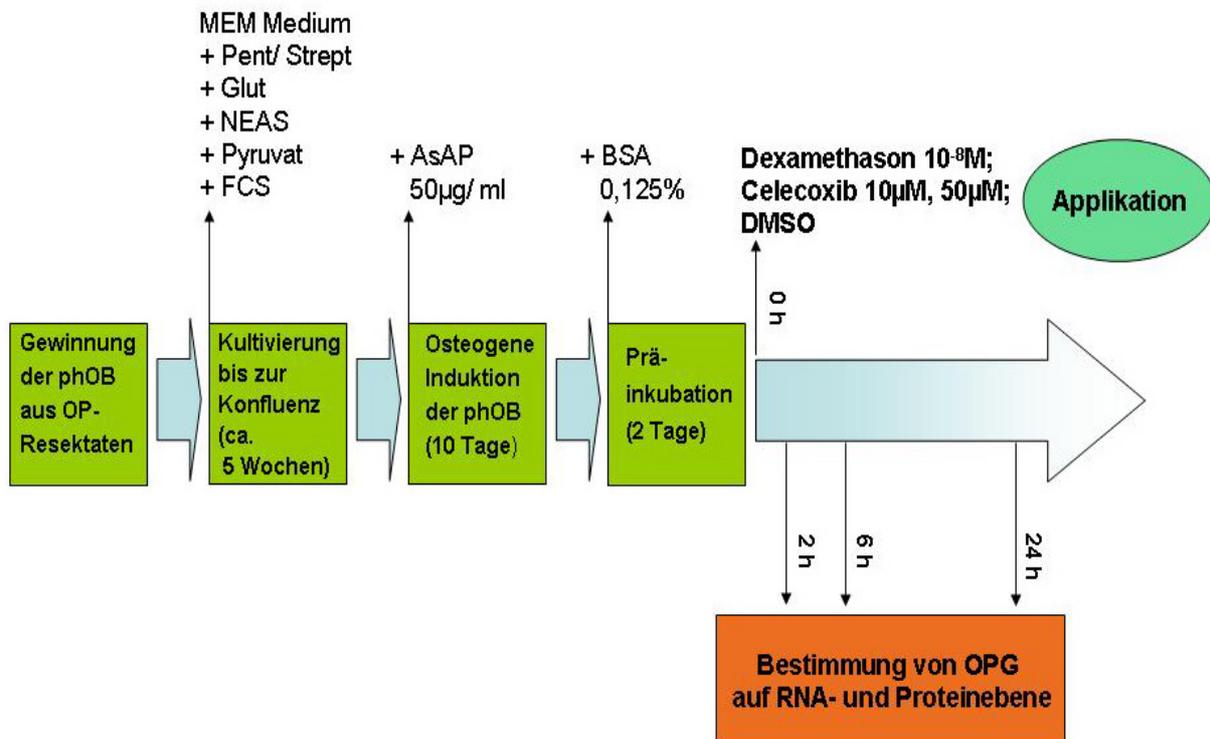


Abb. 4: Schematischer Versuchsablauf der Experimente mit phOB; modifiziert nach Siggelkow et al. (85)

3.2 Zellkultur

3.2.1 Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

In den beiden nachfolgenden Tabellen 1 und 2 sind die Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien aufgeführt, welche für die experimentelle Durchführung der Untersuchungen erforderlich waren.

Tab. 1: Geräte und Instrumente der Zellkultur

Geräte, Instrumente	Hersteller, (Stadt), Land
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heraeus, Berlin, D
Feinwaage	Sartorius, Berlin, D
Hämozytometer	Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg, D
Mikroküvette 200 µl	Shimadzu, Japan
Mikroskop CK 40	Olympus, Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Neubauer Feinoptik, D
Pipetten (0,5-10 µl; 5-20 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)	Glisson, Frankreich
Pipettierhilfe – easypet	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, D
Stickstofftank (-196 °C)	Messer, Griesheim, D
Tiefkühler (-20 °C)	Liebherr, Österreich
Tiefkühler (-80 °C)	Heraeus, Hanau, D
UV-Spectrometer (UV-160A)	Shimadzu, Japan
Vortexer	JKA Labortechnik, Staufen, D
Wasserbad (heizbar)	Huber, Offenburg, D
Zentrifugen 5416/ 5415C	Eppendorf, Hamburg, D

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien der Zellkultur

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, (Stadt), Land
Cellscraper 25 cm	Sarstedt, Newton, USA
Einmal-Kanülen	B. Braun, Melsungen, D
Einmal-Spritzen	B. Braun, Melsungen, D
Falcon Zentrifugenöhrchen (15 ml; 50 ml)	Falcon, Heidelberg, D
Kryoröhrchen 2 ml	Nunc Cryotube Vials, Dänemark
Multi-Well-Platten (6, 24, 96)	Falcon, Heidelberg, D
Pipettenspitzen (50-1000 µl; 0,5-20 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Puderfreie Latexhandschuhe	Kimberley-Clark, USA

Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Sterile Einmal-Skalpelle	NEOX Mearsk Medical, UK
Sterile Pinzetten	Melag, Berlin, D
Sterilfilter FP30/0, 2CA-2	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	BD Falcon, USA
Pipettenspitzen gestopft (0,5-10 µl; 0-20 µl; 0-200 µl; 100-1000 µl)	Nerbe plus, Winsen, D

3.2.2 Medien, Puffer, Reagenzien und Supplemente

In Tabelle 3 sind alle Medien, Puffer, Reagenzien und Supplemente, die für die Zellkultur verwendet wurden, aufgeführt.

Tab. 3: Medien, Puffer, Reagenzien und Supplemente der Zellkultur

Medien, Puffer, Reagenzien, Supplemente	Hersteller, Stadt, Land
Alkalische Phosphatase: NBT/BCIP Tabletten	Boehringer, Mannheim, D
Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfullingen, D
AsAP (A8960)	Sigma, Deisenhofen, D
BSA (30 % Lösung)	PAA, Pasching, Österreich
FCS	Gibco BRL, Eggenstein, D
L-Glutamin 200 mM	Gibco BRL, Eggenstein, D
MEM (+ Earl's, - L-Glutamin) mit Phenolrot	Gibco BRL, Eggenstein, D
MEM (+ Earl's, - L-Glutamin) ohne Phenolrot	Gibco BRL, Eggenstein, D
Natriumpyruvat 100 mM	Gibco BRL, Eggenstein, D
NEAS	Gibco BRL, Eggenstein, D
PBS	Biochrom, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, Deisenhofen, D
Trypsin/EDTA Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS	Biochrom, Berlin, D

3.2.3 Applizierte Substanzen und deren Herstellung

In Tabelle 4 sind die eingesetzten Substanzen, mit denen die Zellen behandelt wurden, aufgelistet.

Tab. 4: eingesetzte Substanzen der Zellkultur

Substanzen	Hersteller, Stadt, Land
Celecoxib (SC-58635)	Pfizer, Kalamazoo, USA
Dexamethasone (D4902-25MG)	Sigma, Deisenhofen, D
FCCP (C2920)	Sigma, Deisenhofen, D
DMSO (99,5 %)	Roth, Karlsruhe, D

Das verwendete Dexamethason, welches ein Molekulargewicht von 392,46 g/mol aufwies, wurde in einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-8} M untersucht. Es wurde eine Stammlösung in 1000facher Konzentration hergestellt, da die eingesetzte Substanz nur in einem Volumenverhältnis von 1:1000 dem Medium zugesetzt werden konnte. Grund dafür war, dass die Substanzen in DMSO gelöst wurden. Die Konzentration an DMSO darf dabei nicht mehr als 0,1 % des Volumens zum Gesamtvolumen ausmachen, da es bei höheren Konzentrationen zellschädigende Wirkungen zeigt (95, 116). Zur Herstellung der Dexamethasonstammlösung wurden 25 mg dieser Substanz in 6,37 ml DMSO gelöst. Man erhielt somit eine 10^{-2} molare Lösung. Von dieser Lösung wurden nach kräftigem Durchmischen 10 µl entnommen. Diesen 10 µl wurden nochmals 9990 µl DMSO zugegeben. Somit war die Stammlösung von 10^{-5} M hergestellt, die im Verhältnis von 1:1000 mit dem Medium gemischt und anschließend den Zellen verabreicht wurde.

Für die Substanz Celecoxib (SC-58635), mit dem Molekulargewicht von 381,38 g/mol, wurde ebenfalls eine Stammlösung in 1000facher Konzentration hergestellt. Die eingesetzten Endkonzentrationen betragen 10 µM und 50 µM. Für die 50 mM Stammlösung wurden 190,69 mg Reinsubstanz in 10 ml DMSO gelöst. Durch 1:5 Verdünnung dieser Lösung entstand die Stammlösung (10 mM). Analog zu den Dexamethasonexperimenten wurden die Stammlösungen im Verhältnis von 1:1000 mit dem Medium gemischt und dann den Zellen zugesetzt.

Die Stammlösungen wurden jeweils über Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße gereinigt.

DMSO konnte im Verhältnis von 1:1000 mit dem Medium gemischt und den Zellen zugeführt werden. Es diente somit einerseits als Vehikel und andererseits als Negativkontrolle per se.

3.2.4 Experimentelle Kulturbedingungen und angewandte Zellkulturtechniken

Herkunft der Ausgangsmaterialien

Die Zelllinie MG-63 wurde von ATCC bezogen. Sie war nach initialem Auftau den Zellkulturexperimenten zugänglich.

Die Knochenfragmente der einzelnen Patienten wurden nach chirurgischen Interventionen aus der Klinik für Orthopädie von Herrn Prof. Dr. med. Perka bezogen. Die Verwendung des entnommenen Knochens und die Behandlung der daraus gewonnenen Daten gehen mit den Richtlinien der Ethikkommission konform (Stellungnahme der Zentralen Ethikkommission; 20.02.2003).

Von vier verschiedenen weiblichen Individuen mit einem Durchschnittsalter von 74 Jahren konnte das Ausgangsmaterial für anschließende Zellkulturarbeiten genutzt werden.

Die nachfolgende Tabelle 5 gibt die wichtigsten Informationen über die jeweiligen Patienten wieder.

Tab. 5: Patientendatenübersicht

Geschlecht des Patienten	Patientenalter zum OP-Termin	Diagnose	Therapie	gewonnenes Knochenmaterial
Weiblich	76 Jahre	Primäre Vagusgonarthrose links	Implantation einer zementierten Kniegelenks-endoprothese	Spongiosa des distalen Femur
Weiblich	78 Jahre	Prothesenlockerung einer unikondylären Knieprothese (Primärimplantation 1992)	Wechsel auf eine zementierte Kniegelenks-endoprothese	Spongiosa des distalen Femur
Weiblich	84 Jahre	Varusgonarthrose beidseits	Implantation einer zementierten Kniegelenks-endoprothese rechts	Spongiosa des distalen Femur
Weiblich	59 Jahre	Sekundäre Koxarthrose bei Koxa valga	Implantation einer zementierten Hüftendo-prothese links	Spongiosa des proximalen Femur

Ansatz der Kulturmedien

Grundsätzlich wurde bei Herstellung und Verwendung von Zellkulturmedien steril gearbeitet, um jegliche Kontaminationen zu vermeiden.

Die Seren wurden vor ihrem Gebrauch im Wasserbad aufgetaut, für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert, anschließend unter der Sterilarbeitsbank in 50-ml-Aliquots in Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bei -20 °C eingefroren.

Es wurden die folgenden Medien und Supplemente verwendet:

1. Kulturmedium :

α -MEM Medium (phenolrot, mit Earl's Salzen)

- + 10 % FCS
- + 200 μ M L-Glutamin
- + 100 μ M NEAS
- + Penicillin (10 i. E./ml)

+ Streptomycin (10 µg/ml)

2. Osteogenes Medium der phOB (modifiziert nach Siggelkow et al.) **(85)**:

α-MEM Medium (phenolrot, mit Earl's Salzen)

+ 10 % FCS

+ 200 µM L-Glutamin

+ 100 µM NEAS

+ Penicillin (10 i. E./ml)

+ Streptomycin (10 µg/ml)

+ AsAP (50 µg/ml)

3. Inkubationsmedium **(45, 46)**:

α-MEM Medium (phenolrotfrei, mit Earl's Salzen)

+ 0,125 % BSA

+ 200 µM L-Glutamin

+ 100 µM NEAS

+ Penicillin (10 i. E./ml)

+ Streptomycin (10 µg/ml)

+ AsAP (50 µg/ml) nur für phOB

4. Einfriermedium:

80 % FCS

+ 10 % α-MEM Medium (phenolrot, mit Earl's Salzen)

+ 10 % DMSO

Sämtliche Medienzusätze und Reagenzien (Penicillin/Streptomycin, NEAS, Natriumpyruvat, L-Glutamin, BSA, FCS, AsAP) wurden über Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße in die Medienflasche gegeben.

Auftauen der MG-63 Zellen

Die Zellen lagen kryokonserviert vor und mussten für die Untersuchungszwecke in Kultur gebracht werden. Hierbei wurden sie zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml Kulturmedium versetzt. Danach wurden die Bestandteile des Einfriermediums von den Zellen getrennt. Dabei wurden sie für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und das gewonnene Pellet im Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl und die Vitalität wurden bestimmt und die Zellen in der gewünschten Zahl in ein Kulturgefäß ausgesät.

Isolierung der humanen Osteoblasten und Gewinnung der phOB

Um die phOB zu gewinnen, mussten die erhaltenen Knochenfragmente in bestimmter Weise verarbeitet werden. Die Etablierung dieser Technik stützte sich auf verschiedene Publikationen **(6, 7, 88)**.

Zunächst musste die Spongiosa mit einem sterilen Skalpell in circa 1 mm³ kleine Stücke geschnitten werden. Anschließend wurden die zerschnittenen Fragmente in ein 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen gebracht und mit 20 ml PBS gewaschen. Die Suspension wurde kräftig geschüttelt. Nach diesem

Vorgang setzten sich die Fragmente auf dem Boden des Röhrchens ab und PBS konnte dekantiert werden. Diese Prozedur wurde viermal wiederholt. Nun waren die Spongiosastückchen und der Überstand makroskopisch frei von Fetttropfen und Erythrozyten. Sie wurden danach mit einer sterilen Pinzette in eine Kulturflasche von 75 cm² Bodenfläche, in welche bereits Kulturmedium gefüllt worden war, hineingebracht. Danach wurde die Flasche verschlossen und die Spongiosafragmente unter vorsichtigem Hin- und Herschwenken vereinzelt. Anschließend wurden sie im Brutschrank inkubiert. Nach circa 7 Tagen wuchsen Zellen aus den Spongiosafragmenten heraus. Als der Boden der Kulturflasche subkonfluent bewachsen war, wurden die Zellen passagiert und ihre Vitalität mit der Trypanblau Ausschlussfärbung bestimmt. Daraufhin konnten die Zellen in 6-Well-Platten mit einer Dichte von 4×10^3 Zellen/cm² ausgesät. Zu diesem Zeitpunkt, d.h. also nach der ersten Passage, werden sie als primäre humane Osteoblasten bezeichnet **(85)**.

Kulturbedingungen und Mediumwechsel

Die Standardbedingungen aller Inkubationen waren eine Temperatur von 37 °C bei einer wasserdampfgesättigten 5 %igen CO₂-Atmosphäre. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit Kulturmedium in Zellkulturflaschen von 75 cm² bzw. 175 cm² Bodenfläche und in 6-Well-Platten. Um die Vitalität der Zellen zu gewährleisten, wurde alle 48-72 h das Medium gewechselt. Bei den schnell wachsenden Zellen der MG-63 Zelllinie wurde das Medium vollständig abgesaugt und durch neues ersetzt. Der Mediumwechsel erfolgte bei humanen Osteoblasten nur zweimal pro Woche, indem hier die Hälfte des alten Mediums durch frisches Medium ausgetauscht wurde **(98)**. Insgesamt wurde der Mediumwechsel solange wiederholt bis die Zellen ein konfluentes Erscheinungsbild zeigten. Danach wurden sie passagiert.

Die Kulturen der MG-63 Zelllinie waren, wegen ihres schnellen Wachstums, bereits nach ungefähr 7 Tagen der Präinkubation zugänglich. Im Gegensatz dazu erstreckte sich die Kultivierungszeit der phOB auf ungefähr 6 Wochen, bedingt durch das relativ langsame Wachstum der Zellen. Darüber hinaus wurde den phOB nach Erreichen der Konfluenz ein osteogenes Inkubationsmedium mit AsAP (50 µg/ml) verabreicht, in welchem sie sich für weitere 10 Tage befanden **(85)**. Die gemeinsame Endstrecke der Behandlung beider Zellpopulationen war die 48 stündige Präinkubation mit FCS-freiem Inkubationsmedium, welchem 0,125 % BSA zugesetzt worden war **(45, 46, 48)**.

In Abbildung 1, Kapitel 3.1, wird der schematische Versuchsablauf der Zellkultur am Beispiel der phOB gezeigt.

Passagieren der Zellen

Eine Konfluenz ist erreicht, wenn der Boden des Zellkulturgefäßes vollständig mit Zellen besiedelt ist. Diese können jetzt nicht mehr weiter als Monolayer wachsen. Um optimale Wachstumsbedingungen der Zellen zu garantieren, wurden diese nach Erreichen der Konfluenz passagiert.

Zum Passagieren wurde das Medium aus den Kulturflaschen komplett entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturflaschen, wurden diese mit Trypsin/EDTA- Lösung überschichtet. Die zugegebene Trypsinmenge betrug bei 75 cm² großen Zellkulturflaschen 5 ml und bei 175 cm² Oberfläche 10 ml. Die behandelten Zellen wurden nun für 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend waren die noch anhaftenden Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Flaschenboden ablösbar. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Unverzüglich

erfolgte die Zugabe der dreifachen Menge serumhaltigen MEM-Mediums, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Die Suspension wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischen Mediums resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer konnten die Zellen mit einer Dichte von $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ in neue Kulturgefäße mit dem entsprechenden Medium überführt werden. Bei dieser Aussattdichte erreichten die MG-63 Zellen nach etwa 6 Tagen eine erneute Konfluenz.

Kryokonservierung der Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden trypsiniert, die Reaktion des Trypsins mit Hilfe von serumhaltigen Medium gestoppt, die Zellsuspension in 50 ml Falconröhrchen gefüllt und diese anschließend für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Überstände verworfen und die Zellen in einer definierten Menge frischen Mediums resuspendiert. Nun erfolgte das Auszählen in der Neubauer-Kammer. Bis zu 10^6 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium überführt und die Suspension in ein Kryoröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen wurden zunächst bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ und später in Flüssigstickstoff bei $-196\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die phOB wurden nicht eingefroren.

Enzymaktivitätsnachweis mit alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist ein Oberflächenenzym, welches bei Osteoblasten eine erhöhte Aktivität aufweist. Die Aktivität wird über die Umsetzung eines Substratersatzstoffes zu einem blauen indigofarbenen Niederschlag ermittelt. Zur Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase wurden NBT/BCIP-Tabletten verwendet und in 10 ml Aqua dest. gelöst. BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) dient dabei als Substratersatz, dessen Dephosphorylierung durch das Enzym katalysiert wird. Als Oxidationsmittel fungiert das gelbliche NBT (Nitroblau-Tetrazolsalz), welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert **(117)**.

10 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz und der Kultivierung im osteogenen Medium wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen **(85)**.

Dazu wurden die Proben zunächst fixiert. Dabei wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurde der Zellrasen mit eiskaltem Methanol ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) überschichtet und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min fixiert. Bis zur Färbung wurden die Zellen im Kühlschrank in destilliertem Wasser gelagert. Für den histochemischen Farbnachweis wurden die fixierten Zellen unter Lichtabschluss 10 min mit einer NBT/BCIP-Lösung inkubiert. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Proben mit autoklaviertem Wasser gewaschen und bis zum Mikroskopieren und Fotografieren im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.5 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung

Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Membran vitaler Zellen zurückgehalten wird. Tote Zellen mit poröser Zellmembran sind für den Farbstoff permeabel und färben sich blau. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer können die Gesamtzellzahl ermittelt und gleichzeitig die Zellen auf ihre Vitalität überprüft werden **(98)**.

Methodisch wurden gleiche Volumina (20 µl) Zellsuspension und 0,4 % Trypanblau-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Kammer rasch ausgezählt, da Trypanblau nach kurzer Zeit auch lebende Zellen anfärbt. Die Vitalität wurde folgendermaßen bestimmt:

Berechnung:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times V_f \times V \times 10^4$$

$$\text{Lebendzellzahl} = m \times V_f \times V \times 10^4$$

$$\begin{aligned} \text{Vitalität [\%]} &= \text{Lebendzellzahl} / \text{Gesamtzellzahl} \times 100 [\%] \\ &= n / m \times 100 [\%] \end{aligned}$$

n und m sind die mittleren Zellzahlen von 4 ausgezählten Großquadraten, V_f ist der Verdünnungsfaktor, V das Volumen der Suspension und 10^4 der Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer.

3.3 Genexpressionsanalyse

3.3.1 Zellgewinnung für die RNA-Isolation

In Tabelle 6 sind die Substanzen, die für die RNA-Isolation notwendig waren, aufgeführt.

Tab.6: Verwendete Kits und Substanzen für die RNA-Isolation

Kits und Substanzen für die RNA-Isolation	Hersteller, Stadt, Land
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, D
RLT-Puffer für RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAshredder™	Qiagen, Hilden, D
RNase Free DNase Set	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D

Um die Zellen der Expressionsbestimmung zugänglich zu machen, wurden diese unter Standardbedingungen für 48 h in einem BSA-haltigen Medium ohne FCS-Zusatz auf 6-Well-Platten kultiviert (45, 46). Im Anschluss wurden die Experimente durchgeführt und die Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten nach folgendem Protokoll gewonnen:

Zunächst wurden die Überstände abgesaugt und bei -80 °C für die spätere Proteinbestimmung eingefroren. Danach wurde der Zellrasen mit kaltem PBS (2 °C - 8 °C) zweimal gewaschen, wobei das PBS anschließend immer verworfen wurde. Nun erfolgte das Benetzen der Zellen mit 1500 µl Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 %). Es schloss sich dann ein Inkubationszeitraum von 5 min bei der MG-63 Zelllinie und von 10 min bei den humanen Osteoblasten an, da diese stärker an der Oberfläche hafteten. Auf die trypsinisierten Zellen wurde nun die doppelte Menge an PBS mit 0,125 % BSA Zusatz gegeben, um den Stoffwechsel der Zellen minimal aufrecht zu erhalten. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt. Der Boden der Kulturplatte wurde noch dreimal mit PBS-BSA gespült, wobei die Spüllösungen immer in dasselbe Falconröhrchen gegeben wurde, um einen möglichen Zellverlust zu reduzieren. Im nächsten Schritt erfolgte das Zentrifugieren der Suspensionen bei 4 °C

und 13000 rpm für 1 min. Die resultierenden Überstände wurden verworfen, so dass nur noch das Zellpellet übrig blieb. Zuletzt wurden 350 µl RLT-Puffer mit vorher frisch addiertem β -Mercaptoethanol in einem Mischungsverhältnis von 1:100 (β -Mercaptoethanol: RLT-Puffer) auf das Zellpellet gegeben. Die Lösung wurde drei- bis viermal resuspendiert und die so gewonnenen Zellysate in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, welches vorerst bei -80 °C eingefroren wurde.

3.3.2 RNA-Isolation

Zur Aufbereitung der RNA-Proben, wurde das RNeasy Minikit mit Homogenisierungssäulen (QIAshredder™, Qiagen) und DNase nach Herstellerprotokoll verwendet (**118**). Diese Methode beruht auf dem Prinzip der spezifischen Bindung von Nukleinsäuren an eine Silicat-Gel-Matrix unter hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen. In Abhängigkeit der verwendeten Silikatmembran und der Pufferbedingungen ist diese Bindung selektiv für RNA oder DNA (**119, 120**).

Um die mit RLT-Puffer versetzten Proben zu homogenisieren, mussten diese zunächst aufgetaut und danach direkt auf eine Qiashredder Säule pipettiert werden, welche sich in einem 2 ml Eppendorfgefäß befand. Anschließend wurden die Lysate für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Durch diesen Schritt konnte die genomische DNA entfernt und die Viskosität der Lysate verringert werden. Dem gewonnenen Durchfluss wurde 70 %iger Ethanol in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben, um die Bindungsaffinität der RNA an die folgende Säule zu optimieren. Nun wurde die gesamte Suspension (700 µl) auf eine RNeasy-Mini-Spin-Säule gegeben und für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert, um die RNA an die Säulenmembran zu binden. Der Durchfluss wurde verworfen. Im nächsten Waschschrift konnte mit Puffer RW1 die Säule von möglichen Kontaminationen befreit werden. Um restliche DNA Fragmente zu beseitigen, schloss sich nun ein DNA-Verdau mittels DNase (DNase I von Qiagen) an. Diese wurde direkt auf die Silikat-Gel-Membran gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein erneuter Waschschrift mit RW1-Puffer und eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 s. Das Eluat wurde wieder verworfen und die gleiche Säule mit ethanolversetztem RPE-Puffer aus dem Kit gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 s wurde der RPE-Puffer Waschschrift wiederholt, jedoch mit einer zweiminütigen Zentrifugationszeit bei 10000 rpm, um die Membran zu trocknen. Nach diesem Schritt wurde die Säule in einem zusätzlichen Trocknungsschritt auf ein neues 1,5-ml-Eppendorfgefäß gesetzt und für 1min bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die vollständige Trocknung der Membran ist hierbei sehr wichtig, da Restgehalte von Ethanol nachfolgende Reaktionen stören können. Die Säule wurde anschließend auf ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß gesetzt und die RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser durch Zentrifugation von einer Minute bei 10000 rpm ausgewaschen. Durch diese Prozedur werden nur RNA-Moleküle isoliert, die länger als 200 Basen sind. Es kommt dementsprechend zu einer Anreicherung von mRNA, da kleinere RNAs wie tRNA oder rRNA, welche 15 – 20 % der Gesamt-RNA ausmachen, nicht an die Silikatmembran binden. Zum Schluss wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

3.3.3 Quantifizierung der RNA-Konzentration und Reinheitsbestimmung

Eine wesentliche Voraussetzung für die reverse Transkription und Untersuchung zur Genexpression ist, dass die RNA in ausreichend hoher Konzentration und Reinheit vorliegt.

Die RNA-Konzentration in den Eluaten wurde mittels Bioanalyzer auf der Grundlage der 18S und 28S RNA Banden und eines Standards quantifiziert. Hierzu werden in einem elektrophoretischen Prozess die Stärke der 28S und 18S Banden, welche charakteristisch für humane RNA sind, gegen einen Standard mit bekannter RNA-Konzentration abgeglichen. Hieraus ergaben sich totale RNA-Mengen zwischen 150 ng und 560 ng in jeweils 30 µl Endvolumen.

Über die Reinheit der RNA kann durch die Bildung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} eine Aussage getroffen werden. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird das Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren erreicht. Das Messen der Absorption bei 280 nm gibt Aufschluss über etwaige aromatische Molekülringe (z.B. Phenol), aber auch aromatische Aminosäuren, so dass sich Phenol- bzw. Proteinverunreinigungen nachweisen lassen. Der Wert des Quotienten OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte unter 1,8 lassen auf aromatische Verbindungen schließen. Werte über 2,0 geben Auskunft über Kontaminationen mit Salzen oder Nucleotiden aufgrund eines Abbaus der RNA durch RNasen.

3.3.4 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Zur weiteren Untersuchung wurden von den isolierten mRNA-Proben DNA-Kopien (cDNA) erstellt. Diese stabileren Kopien sind für die PCR-Analyse erforderlich, da DNA-Polymerase verwendet wurde. Die Reaktion wurde von der Reversen Transkriptase katalysiert, welche als Matrizenstrang RNA-Moleküle erkennt. Reverse Transkriptasen sind DNA-Polymerasen viralen Ursprungs.

Es wurden jeweils 400 ng RNA mit dem TaqMan[®] Kit von Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben. Random Hexamere als Nucleotidhexamere mit zufälliger Sequenz und Oligo-dTs wurden als unspezifische Primeräquivalente der cDNA Synthese im Mischungsverhältnis 1:1 eingesetzt, um möglichst die gesamte RNA in cDNA umzuschreiben. Setzt man Oligo-dTs, also eine Abfolge von Desoxythymidinbausteinen allein ein, so erhält man nur die cDNA, welche aus mRNA mit ausreichend langen Polyadenylierungssequenzen umgeschrieben wird. Random Hexamere ermöglichen auch das Umschreiben von RNA mit fehlender (t-RNA, r-RNA) oder zu kurzer Poly-A-Sequenz (in Degradation befindliche mRNA).

Es wurde folgender Ansatz zum Umschreiben in cDNA verwendet:

20µl Ansatz:	-	x µl RNA (400 ng)
	-	2 µl TaqMan [®] 10x Puffer
	-	4,4 µl MgCl ₂
	-	4 µl dNTPs
	-	0,5 µl Random Hexamers
	-	0,5 µl Oligo-dTs
	-	0,4 µl RNase Inhibitor
	-	0,5 µl Reverse Transkriptase
	-	y µl RNase freies Wasser
	Σ	20 µl (x + y = 7,7 µl)

Die folgende Schrittabfolge wurde im Thermocycler programmiert:

Schritt 1:	25 °C	10 min
Schritt 2:	48 °C	40 min

Schritt 3: 95 °C 5 min

Schritt 4: 4 °C Pause

Deckeltemperatur: 100 °C.

Dieses Programm ermöglicht zunächst das Anlagern der Oligo-dTs und der Random Hexamere (Schritt 1) an die RNA. Anschließend werden alle markierten Fragmente mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Schritt 2). Schließlich wird die Reverse Transkriptase durch Denaturierung bei 95 °C zerstört (Schritt 3).

Die gewonnene cDNA wurde mittels einer β -Actin-PCR im Thermocycler hinsichtlich ihrer Qualität überprüft, bevor eine Analyse im Lightcycler stattfand. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz pro 20 μ l verwendet:

- 1 μ l cDNA
- 2 μ l 10 x PCR Puffer
- 1 μ l MgCl₂ (25 mM)
- 0,2 μ l dNTPs (25 mM)
- 2 μ l forward Primer
- 2 μ l reverse Primer
- 0,5 μ l Taq- Polymerase (5 units/ μ l)
- 11,3 μ l Aqua bidest

Mit folgendem Programm wurden die Fragmente im Thermocycler amplifiziert:

- | | | | |
|----|-------|--------|-----------------------------|
| 1. | 95 °C | 10 min | } 32 x zyklisch durchlaufen |
| 2. | 95 °C | 1min | |
| 3. | 64 °C | 1min | |
| 4. | 72 °C | 1min | |
| 5. | 72 °C | 10 min | |
| 6. | 4 °C | Pause | |

Deckeltemperatur: 100 °C.

Nach dem Umschreiben und erfolgreicher Qualitätsüberprüfung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

3.3.5 Primerauswahl

Für die Auswahl der Primer wurden die Computerprogramme „Primerselect“ und „MegAlign“ ausgewählt. Die zugrunde liegenden humanen Gensequenzen wurden dem Internet entnommen (Seite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Wichtig bei der Auswahl der Primer war zunächst ihre Speziespezifität für das menschliche Genom. Hierzu wurde der Internet-Dienst NCBI-Blast genutzt, um die Primer mit der Gen-Datenbank zu vergleichen (Seite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>).

Weiterhin wurden für die Auswahl der Primer folgende Kriterien gesetzt:

- Annealing Temperatur zwischen 55 °C und 65 °C
- Amplikonlänge zwischen 100 bp und 250 bp
- Lage des Amplikons bevorzugt im 3'-Bereich des Gens
- GC-Gehalt der Primer zwischen 40 % und 60 %

- Länge des Primers zwischen 18 bp und 24 bp
- keine Dimerbildung der Primer und keine internen Rückfaltungen **(121)**

Bezogen wurden die Primer von der Firma TIBMOL.

In der nachfolgenden Tabelle sind die für die Lightcycler-PCR verwendeten Primer aufgelistet.

Tab. 7: verwendete Primer der Genexpressionsanalyse

Name (Länge des Amplikons)	Nummer aus der internationalen Gendatenbank	Primersequenzen
β-Actin (142 bp)	NM_001101	Forward Primer 5' GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATC ACT 3'
		Reverse Primer 5' TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T 3'
OPG (195 bp)	NM_002546.2	Forward Primer 5' AGC ACC CTG TAG AAA ACA CAC 3'
		Reverse Primer 5' ACA CTA AGC CAG TTA GGC GTA A 3'
GLUT-1 (212 bp)	NM_006516	Forward Primer 5' ACG CTC TGA TCC CTC TCA GT 3'
		Reverse Primer 5' GCA GTA CAC ACC GAT GAT GAA G 3'

3.3.6 Lightcycler-PCR im SYBR Green Format

Der Polymerasekettenreaktion (PCR) liegt eine spezifische Bindung und Verlängerung zweier Oligonukleotide zugrunde, die komplementär an die zu amplifizierende DNA oder cDNA binden. Diese Oligonukleotide (Primer) flankieren am 5'- und 3'- Ende den zu amplifizierenden DNA-Bereich und dienen als Start der DNA-Amplifikation. Nach der Denaturierung der DNA hybridisiert jeder Primer komplementär mit je einem der beiden DNA-Stränge. In der anschließenden DNA-Synthese durch die thermostabile Taq-Polymerase (aus *thermophilus aquaticus*) werden die Primer gemäß des Matrizenstranges verlängert, wobei die Syntheserichtungen der beiden Primer gegeneinander gerichtet sind. Diese drei Schritte stellen einen PCR-Zyklus dar. Durch Wiederholung der Zyklen wird theoretisch eine exponentielle Amplifikation des durch die Primer flankierten DNA-Abschnittes erzielt **(122)**.

Das Lightcycler System basiert auf der Detektion eines in doppelsträngige Konstrukte (Membranen) interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR Green). Ungebundenes SYBR Green, wie es noch zum Zeitpunkt der Denaturierung der DNA vorliegt, weist eine nur geringe Fluoreszenz auf. Durch die Primeranlagerung im Elongationsschritt zum Zeitpunkt der Annealing-Temperatur, bindet SYBR Green jedoch vermehrt an diese doppelsträngigen Konstrukte. Im nachfolgenden Schritt der Polymerisation werden immer mehr Farbstoffmoleküle gebunden. Dies resultiert in einer circa

ein Hundertfach stärkeren Emission von Licht durch Anregung mit einem Laserstrahl. Die Erhöhung der Kopienzahl nach jedem PCR-Zyklus steigert die Leuchtintensität des Farbstoffes weiterhin. Diese Leuchtintensität ist proportional zur Menge an gebildetem Amplikon (123). Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 5 das Prinzip der Lightcycler PCR im SYBR Green Format dargestellt.

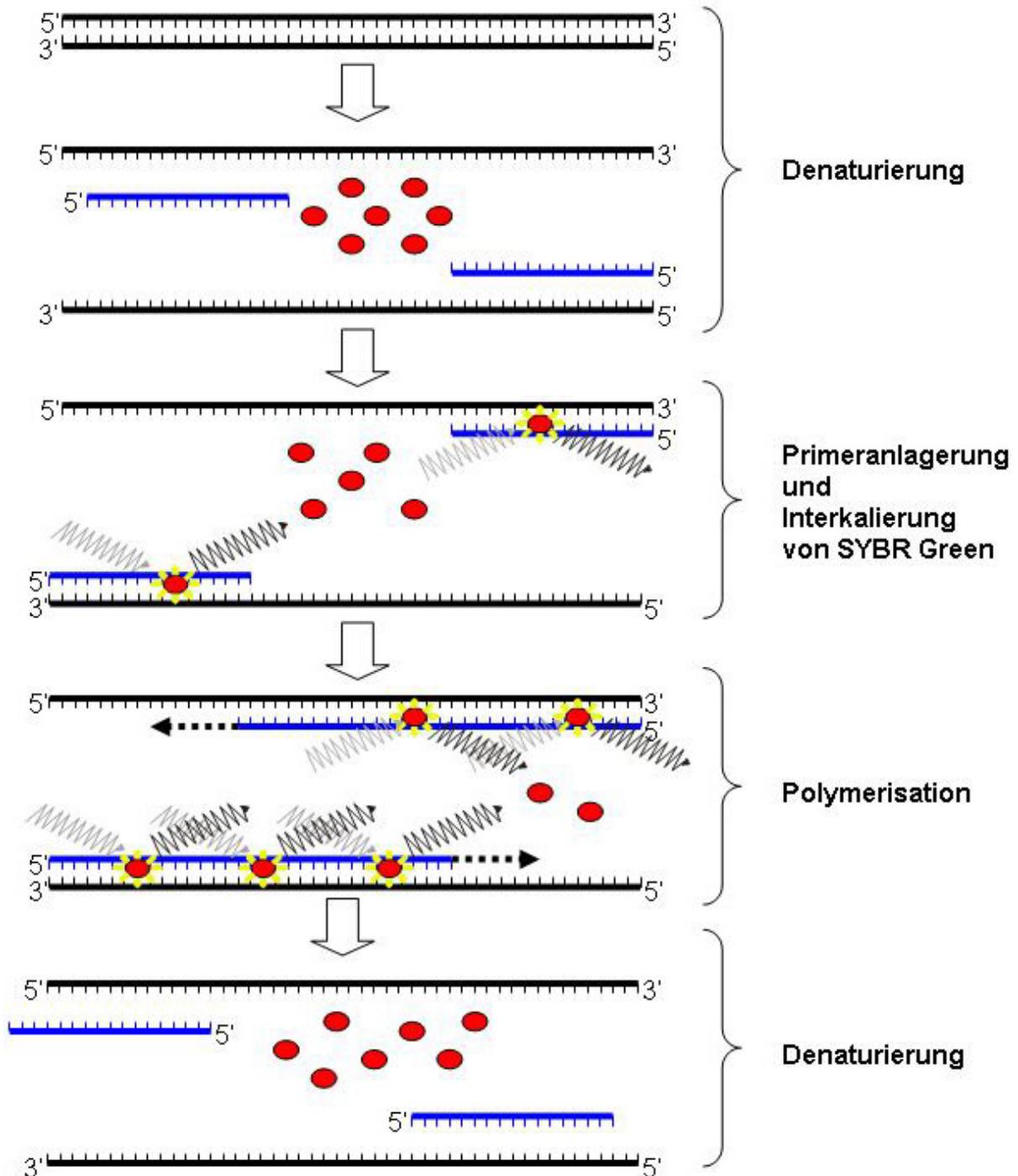


Abb. 5: Darstellung des Lightcycler Prinzips im SYBR Green Format nach Bustin SA (124); Einzelheiten siehe Text

Über einen Computer wird eine virtuelle Zahl cp (crossing point) berechnet. Sie ist definiert als der Punkt, bei dem die gemessene Leuchtintensität erstmals höher als die Hintergrundfluoreszenz ist.

Als nicht reguliertes „housekeeping gene“ wurde für die Quantifizierung β -Actin eingesetzt (**125**). Auf dieses wurden die zu untersuchenden Proben normalisiert. Die Expressionsunterschiede entsprachen dem Wert Δ cp und wurden als relatives Verhältnis der Konzentration des Zielgens („target gene“) zur Konzentration des „housekeeping genes“ angegeben. Der errechnete Wert wurde dann zum jeweiligen Zeitpunkt auf die Negativkontrolle (DMSO) bezogen und als relative Ratio ausgedrückt.

Bevor die eigentliche Quantifizierung jedoch erfolgen konnte, mussten die optimalen $MgCl_2$ -Konzentrationen sowie die Annealing-Temperaturen der einzelnen Primerpaare etabliert werden. Die Zeiten der PCR-Programme richten sich nach der Fragmentlänge der Gene und den eingesetzten Primerpaaren. Für den Synthesevorgang des Enzyms wurde von einer Rate von 25 bp pro Sekunde ausgegangen. Dadurch unterscheiden sich die Zeiten des Kopiervorganges untereinander (Transkription). In Tabelle 8 sind diese etablierten Werte als Übersicht dargestellt.

Tab. 8: etablierte Annealing- Temperatur- und $MgCl_2$ - Konzentrationswerte

Gen	$MgCl_2$- Konzentration	Programm: Denaturierung – Annealing – Transkription	optimale Annealing Temperatur	Produktlänge
β -Actin	7 mM	5 s – 5 s – 9 s	64 °C	142 bp
OPG	6 mM	8 s – 5 s – 10 s	61 °C	195 bp
GLUT-1	7 mM	5 s – 5 s – 9 s	64 °C	212 bp

Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen die Effizienz der PCR bestimmt. Eine optimale Kopieneffizienz des Systems ist Voraussetzung für die spätere Quantifizierung. Sie sollte möglichst zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ausgehend von den „crossing points“ erfolgte die Effizienzberechnung.

Folgender 20 μ l PCR-Ansatz wurde für das Lightcycler System verwendet:

- 6 μ l Aqua_{bidest}
- 1 μ l (50 μ M) forward Primer (TIBMOL)
- 1 μ l (50 μ M) reverse Primer (TIBMOL)
- 5 μ l (x mM) $MgCl_2$
- 2 μ l „SYBR-Green Reaction Mix“ (inklusive Taq Polymerase)
- 5 μ l Probe (cDNA 1:50 bzw. Aqua_{bidest})

Der „SYBR-Green Reaction Mix“ wurde von der Firma Roche (Penzberg, D) bezogen. Er wurde unmittelbar vor Verwendung für die PCR frisch hergestellt, indem das Enzym, Taq Polymerase, dem SYBR-Green Mix zugegeben wurde.

Ein Nachteil der Methode ist die mangelnde Spezifität des Farbstoffes, da SYBR-Green in jede doppelsträngige DNA interkaliert. Wenn bei der PCR ein Nebenprodukt gebildet wird, führt dies auch zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Die PCR wäre somit nicht auswertbar, jedoch wird jede „Real-Time PCR“ deshalb auf Nebenprodukte untersucht. Dies geschieht über eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei

werden die entstandenen Produkte am Ende der gesamten Reaktion bei 95 °C denaturiert. Es folgen ein „Reannealing“ bei 55 °C für 30 s und der weitere sukzessive Anstieg der Temperatur um je 0,5 °C für jeweils 6 s bis 95 °C. Jedes DNA-Fragment hat einen charakteristischen Schmelzpunkt, der vom GC-Gehalt abhängt. Bei der Schmelzkurvenanalyse drückt sich dies in einer einzelnen Spitze, sog. Peak, aus. Die PCR ist nur auswertbar, wenn die Schmelzkurvenanalyse ausschließlich einen Peak bei der für das Produkt typischen Temperatur zeigt **(124)**.

3.4 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Um sicher zu stellen, dass die amplifizierten PCR Produkte auch den gesuchten Zielsequenzen entsprechen, wurden diese kloniert und sequenziert. Das Prinzip der Klonierung besteht darin, die isolierte Fremd-DNA (PCR-Produkt) mit einer geeigneten Träger-DNA (Vektor) zu verknüpfen. Dieses rekombinante DNA-Molekül wird anschließend in Bakterienzellen (*E. coli*) transfiziert und vermehrt, um anschließend sequenziert zu werden **(126)**.

Die aus den PCR gewonnenen Produkte für OPG, GLUT-1 und β -Actin wurden mit dem TOPO-TA 2.1 Cloning Kit von Invitrogen in chemokompetente *E. coli* kloniert. Hierzu wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

Parallel zur Klonierung wurden Petrischalen mit Ampicillin (100 μ g/ml) versetztem Agar-Agar (1,5 %)-LB Medium unter sterilen Bedingungen gegossen. Nach der Inkubation im Brutschrank wurden 200 μ l der transformierten Bakterien auf die hergestellten Petrischalen ausplattiert und über 12 Stunden inkubiert. Um positive Klone zu identifizieren, wurden jeweils zehn einzeln stehende Bakterienkolonien pro Platte einer so genannten „Screening-PCR“ unterzogen. Diese positiven Klone hatten den Vektor zusammen mit dem PCR-Produkt in ihr Zytoplasma inkorporiert. Jeweils zwei positive Klone wurden für 10 Stunden in mit Ampicillin versetztem LB Flüssigmedium bei 37 °C vermehrt. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Plasmid-DNA-Isolation aus den im Flüssigmedium gewachsenen Kolonien. Dabei wurde nach dem Protokoll des Plasmid-DNA Purification Kit (Macherey/Nagel) vorgegangen. Die schließlich gewonnene Plasmid-DNA konnte einem Restriktionsverdau durch das Restriktionsenzym *ECO*-I unterzogen werden. Zur Kontrolle des Klonierungserfolges wurde das Verdauprodukt neben unverdaulichem Plasmid auf ein Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht fotografiert. War die Klonierung erfolgreich, wurden die DNA-Konzentrationen der gewonnenen Plasmide mit Hilfe eines Bioanalyzers ermittelt. Nach diesem Schritt wurden 1 μ g an Plasmid-DNA in ein Eppendorfgefäß pipettiert und dieses in eine Vakuumzentrifuge gegeben. Anschließend wurde so lange zentrifugiert bis die DNA getrocknet vorlag. Sie konnte nun sequenziert werden.

Die Sequenzierung übernahm die Firma „MWG-Biotech AG“. Es wurde nach der Methode von Sanger et al verfahren, welche auf den nachfolgend beschriebenen Schritten beruht: Zunächst wird der zu sequenzierende DNA-Abschnitt an seinem 3'-Ende mit einem komplementären DNA-Oligonucleotid hybridisiert. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird danach ein zum sequenzierenden DNA-Abschnitt komplementärer Strang synthetisiert. Setzt man dem Ansatz in einer PCR-ähnlichen Amplifikationsreaktion die fluoreszenzfarbstoffmarkierten Abbruchnukleotide (ddNTPs) in geringer Konzentration zu, kommt es zu einem basenspezifischen Kettenabbruch. Es werden dem Zufall nach unterschiedlich lange Amplifikate erzeugt, deren endständiges Nukleotid mit einem basenspezifischen

Farbstoff markiert ist. Die dabei entstehenden Fragmente werden in einem Elektrophoresegel ihrer Größe nach aufgetrennt und die fluoreszenzmarkierten Nukleotide mit einem Laserstrahl angeregt. Anhand der Farbabfolge im Gel kann man die Basenabfolge der Sequenz herleiten (127).

3.5 Proteinquantifizierung mittels ELISA-Technik

Nach der Präinkubationsperiode von 48 h wurden die Experimente, entsprechend dem in Abbildung 4 gezeigten Schema, durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt gewonnen und vorerst bei -80 °C für die spätere Proteinanalyse eingefroren.

Für die OPG-Proteinquantifizierung aus den Mediumüberständen der phOB wurde ein ELISA-Testkit von der Firma Immundiagnostik (Bensheim, D) bezogen. Hierbei wird OPG in einem „Sandwich-Enzymimmunoassay“ direkt gemessen. Verwendet werden zwei spezifische Antikörper gegen OPG, von denen der eine an die Mikrotiterplatte bindet (Bindeantikörper) und der zweite mit Biotin markiert ist (Detektionsantikörper). Nachfolgend soll das Testprinzip beschrieben werden:

Im ersten Schritt werden die Probe und der biotinylierte Antikörper gegen OPG in eine Mikrotiterplatte überführt. Es bildet sich nun ein „Sandwich“, in dem das gebundene OPG zwischen dem Bindeantikörper auf der Platte und dem Detektionsantikörper (biotinyliert) eingefasst ist. Nach einem Waschvorgang, der nicht spezifisch gebundenes Material entfernt, wird über ein Streptavidin-Peroxidase/TMB System OPG schließlich quantifiziert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von Blau nach Gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge proportional und wird anschließend in einem ELISA-Reader quantifiziert. Über eine Standardkurve kann die jeweilige Konzentration ermittelt werden (128).

Die Testdurchführung beinhaltete im Einzelnen die folgenden Pipettierschritte:

Zuerst wurde eine OPG-Stammlösung (500 pmol/l) mit Zellkulturmedium 1:20 vorverdünnt (S1). Es folgten vier weitere 1:2 Verdünnungsschritte, so dass schließlich fünf verschiedene Stammlösungen hergestellt worden waren (S1, S2, S3, S4, S5). Aus diesen wurde die Standardkurve ermittelt. Als Standard 0 pg/ml wurde Zellkulturmedium eingesetzt. Danach konnte mit dem eigentlichen Pipettieren begonnen werden. Dabei wurden zunächst 100 µl Assaypuffer aus dem Kitsystem in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Danach wurden 50 µl Standard (S1 - S5) und Proben (Mediumüberstände) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl des biotinylierten Antikörpers. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und 24 h bei 4 °C inkubiert. Dann konnte der Inhalt der Platte verworfen und fünfmal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen werden. Es erfolgte nun die Zugabe von 200 µl mit Peroxidase markiertem Streptavidin-Konjugat mit einer nachfolgenden einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde der Inhalt der Platte wiederum verworfen und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden 200 µl TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettiert und im Anschluss 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Pipettierschritt erfolgte die Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Vertiefung und ein kurzes Mischen. Sofort wurde die Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm gemessen.

In einem initialen Testdurchlauf wurde das optimale Mischungsverhältnis der Proben bestimmt, welches für die nachfolgende Quantifizierung eingesetzt werden konnte. Wichtig war, dass die ermittelten Extinktionen der Proben innerhalb der kleinsten und größten Extinktion der Standards

lagen. Nach diesem Vorversuch wurde ein Mischungsverhältnis der Proben mit einem Verdünnungspuffer aus dem Testkit von 1:10 für eine optimale Quantifizierung eingesetzt. Sämtliche Proben und Standards wurden als Doppelansätze pipettiert und quantifiziert.

3.6 Messung des Sauerstoffverbrauches mit der Clark-Elektrode

Das Messprinzip der amperometrischen Sauerstoffmessung beruht auf der Reduktion von molekularem Sauerstoff an einer Goldelektrode (Kathode) zu Wasser. Als Gegenelektrode (Anode) dient eine Silberelektrode als Elektronenquelle.

Die entsprechenden Reaktionsgleichungen lauten:

1. $O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \Rightarrow H_2O$
2. $4 Ag \Rightarrow 4Ag^+ + 4 e^-$

Die entstehenden Silberionen werden mit einer KCl-Lösung, in welcher sich die Elektroden befinden, gefällt. Eine mit KCl gefüllte Messkammer beinhaltet die Elektrode. Sie ist von der die Zellsuspension enthaltenden Versuchskammer durch eine für molekularen Sauerstoff permeable Polypropylenmembran getrennt. Der messbare Stromfluss zwischen den Elektroden ist dem Sauerstoffgehalt im Messmedium proportional.

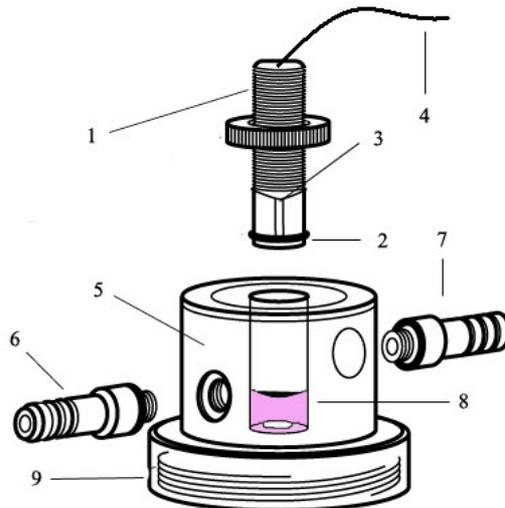


Abb. 6: Versuchsaufbau der Sauerstoffverbrauchsmessung. [1] Stopfen mit Clark-Elektrode, [2] Polypropylenmembran, befestigt mit O-Ring, [3] Kanal zur Wirkstoffzugabe, [4] Kabel zum Sauerstoffmessgerät, [5] Inkubationsgefäß mit Wassermantel, [6] Wasserzu- und [7] -ablauf vom Thermostat, [8] Zellsuspension (rosa) mit Magnetrührstäbchen (weiß), [9] Magnetrührplatte. (129)

Initial wurde die Elektrode mittels Luftsauerstoff- gesättigtem Zellkulturmedium (MEM mit 0,125 % v/v BSA) auf 100 % Sauerstoffgehalt equilibriert. Anschließend wurde die auf 37 °C erwärmte Versuchskammer mit 700 µl Zellsuspension ($0,3 - 0,4 \times 10^7$ Zellen/ml) befüllt und 3 min mit Luftsauerstoff durch Rühren (300 U/min, Magnetrührer Typ Ikamag Reo) equilibriert. Weitere wichtige Effekte des Rührens waren die kontinuierliche Durchmischung und die Gewährleistung der optimalen Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode. Durch Aufstecken der Elektrode war die Zellsuspension

luftdicht abgeschlossen. Ein angeschlossenes Amperometer (Typ 781, Strathkelvin Instruments, Bearsden Glasgow) mit integriertem Schreiber (Schreibgeschwindigkeit 0,1 mm/s) registrierte den sich infolge der Zellatmung kontinuierlich vermindernenden Sauerstoffgehalt der Messlösung als Anstieg einer Kurve.

Die Auswertung der Schreiberaufzeichnungen erfolgte manuell. Dazu wurden die Anstiege der aufgezeichneten Geraden im jeweiligen Experiment ermittelt. Unter Einbeziehung der Schreibgeschwindigkeit konnte bei sinkender Sauerstoffsättigung der Zellsuspension der Sauerstoffverbrauch in $\text{nmol}/\text{min}/10^7$ Zellen errechnet werden. Für die Berechnungen wurde ein Sauerstoffgehalt des Messbereiches von 147,7 nmol zugrunde gelegt und die folgende Formel verwendet:

$$\text{Sauerstoffverbrauch [nmol/ min/ } 10^7 \text{ Zellen]} = \frac{D_x [\text{cm/ min}] \cdot 147,7 [\text{nmol}]}{D_{100\%} [\text{cm}] \cdot c}$$

c = Zellzahl, $D_{100\%}$ = Messbereich, D_x = Anstieg der Kurve

Für die Experimente der Sauerstoffmessungen fanden ausschließlich MG-63 Osteoblasten Verwendung. Die Zellen wurden nach erfolgter Präinkubation und anschließender Inkubation mit einem „Cellscrapper“ vom Boden abgeschabt und ihre Zahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um für die Sauerstoffmessungen mit der Clark-Elektrode die Ausgangsbedingungen so konstant wie möglich zu halten, wurden für jedes einzelne Experiment immer die gleichen Zellzahlen eingesetzt. Die Experimente teilten sich in zwei große Gruppen auf:

1. Im ersten Teil wurden native unbehandelte Zellen verwendet und deren Sauerstoffverbrauch gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Celecoxib 10 μM oder 50 μM bzw. DMSO (Kontrollgruppe) über einen kanalförmigen Zugang in die Elektrodenapparatur. Der veränderte Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde als ‚Soforteffekt‘ nach Celecoxibapplikation bezeichnet. Parallel dazu wurden Zellen mit den jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen behandelt und unter Kulturbedingungen gehalten. Nach jeweils einer Stunde und nach 24 Stunden Inkubationsdauer wurden diese abgeschabt, gezählt und der Sauerstoffverbrauch in der Elektrode bestimmt. Somit konnte eine Aussage über den Langzeiteffekt getroffen werden.
2. Im zweiten Teil der Experimente wurden wiederum native Zellen zur Sauerstoffverbrauchsmessung eingesetzt. Danach erfolgte die Zugabe von Celecoxib 50 μM bzw. DMSO (Kontrollgruppe). Nach dieser Applikation wurde erneut die Veränderung des Sauerstoffverbrauches registriert und anschließend derselben Zellsuspension der Entkoppler (Protonophore) FCCP 0,5 μM hinzugegeben. Es ergab sich eine weitere Änderung des Sauerstoffverbrauches, welche vom Schreiber registriert wurde.

Aus einer anderen Zellpassage wurden für die nächste Prozedur wiederum Zellen abgeschabt und gezählt. Nach erfolgter Equilibrierung erfolgte die Applikation der o.g. Substanzen in umgekehrter Reihenfolge zu den vorherigen Experimenten. Entsprechend wurde zuerst FCCP 0,5 μM in die Zellsuspension gegeben, der Sauerstoffverbrauch registriert und im Anschluss

Celecoxib 50 μM derselben Lösung appliziert. Die jeweiligen Substanzkombinationen sind nachfolgend zusammengefasst:

1. Zugabe von FCCP 0,5 μM ohne Celecoxib 50 μM
2. Zugabe von Celecoxib 50 μM mit anschließender FCCP 0,5 μM -Applikation
3. Zugabe von Celecoxib 50 μM ohne FCCP 0,5 μM
4. Zugabe von FCCP 0,5 μM mit anschließender Celecoxib 50 μM -Applikation

3.7 Nachweis von HIF-1 α in Westernblottechnik

Um spezifische Proteine in Zellen bzw. Zelllysaten nachzuweisen, bedient man sich der Westernblottechnik. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden dazu die Zellen nach dem im Kapitel 3.3.1 beschriebenen Verfahren mittels Trypsinierung gewonnen. Eine parallel eingesetzte Methode zur Trypsinierung war die Zellgewinnung durch so genannte „Cellscrapers“. Mit ihnen wurden die Zellen nach den entsprechenden Inkubationszeiten vom Boden abgeschabt. Die separierten Zellpellets wurden mit fünffachem Laemmli-Puffer (100 mg Bromphenolblau; 3,5 ml Glycerin; 2,5 ml β -Mercaptoethanol; 1,5 g SDS, 1 M Tris-HCl pH 6,8) versetzt und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Auftrennung der lysierten Proteine aus den gewonnenen Zellpellets erfolgte in einer Elektrophoresekammer. In diese wurde eine Trenngelmischung, bestehend aus 4 ml Aqua dest.; 3,3 ml 30 % Acrylamidmix (Roth, Karlsruhe, D); 2,5 ml 1,5 M Trispuffer (pH 8,8) und 0,1 ml 10 % SDS (Roth, Karlsruhe, D); 0,1 ml frisches 10 % APS (Roth, Karlsruhe, D) und 5 μl TEMED (Roth, Karlsruhe, D), gegossen und bis zum Abschluss der Polymerisierung mit Aqua dest. überschichtet. Nach Dekantieren des Wassers wurde dann eine Sammelgelmischung, bestehend aus 1,45 ml Aqua dest.; 0,5 ml 30 % Acrylamidmix; 2,5 ml 0,25 M Trispuffer (pH 6,8); 0,05 ml SDS 10 %; 0,025 ml 10 % APS und 6 μl TEMED, auf das Trenngel geschichtet, ein Kamm eingesteckt und bis zum Abschluss der Polymerisierung der Sammelgele nach Bedarf Sammelgelmischung nachpipettiert, um die Taschenform optimal zu halten. Nach Abschluss der Polymerisation der Sammelgele wurden dann der Kamm entfernt und die Taschen mittels Kanüle mit einem Tris-Glycinpuffer (25 mM Tris; 250 mM Glycin (pH 8,3); 0,1 % SDS) ausgespült. Dadurch konnten nicht polymerisierte Reste entfernt werden. Nun wurden die aus den Experimenten im Puffer befindlichen Proteine für 10 min bei $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock erwärmt. In jede Tasche wurde eine definierte Menge Probe geladen, deren Proteingehalt dem von 2×10^6 Zellen des jeweiligen Experimentes entsprach (zwischen 15 und 25 μl). Zusätzlich wurde ein Proteinmarker (Precision Plus Protein Standards von Bio-Rad) mit 10 Banden, zwischen 250 und 10 kDa, mit einem Volumen von 10 μl auf das Gel aufgetragen. Danach wurde für 30 min eine Stromstärke von 15 mA dem Gel angelegt, welche nach dem Durchlauf der Bandenfront durch das Sammelgel auf 30 mA für weitere 90 Minuten erhöht wurde. Nach dieser Proteinauftrennung wurde das Gel auf eine Blottingmembran aus PVDF, welche zuvor mit Methanol equilibriert worden war, übertragen. Die Blottingmembran wurde nun in eine passende Blottingvorrichtung gesteckt. Die mit der Membran und dem Gel bestückte Blottingvorrichtung wurde in einer Kammer mit Blottingpuffer befestigt. Zusätzlich wurden vier Eisakkus und ein Rührmagnet in dieselbe Kammer gesteckt, welche dann auf einen Magnetrührer gestellt wurde. Über einer angelegten Spannung von 30 V erfolgte in einem Kühlraum die kontinuierliche Kühlung über 12 Stunden. Danach wurden die Eisakkus ausgewechselt und die angelegte Spannung für eine weitere Stunde auf 100 V erhöht. Anschließend

erfolgte die Kontrolle des Proteintransfers vom Gel auf die Membran. Dafür wurden die Membranen für 5 Minuten mit Ponceau-S inkubiert und mit Aqua dest. gewaschen. Nach dieser Kontrolle wurden die Membranen in eine mit Magermilchpulverlösung befindliche Schale gelegt und auf einem Schüttler mit langsamer Geschwindigkeit für zwei Stunden geschüttelt. Dieses Magermilchpulver bestand aus 5 % Magermilchpulverlösung (2,5 g Magermilchpulver in 50 ml TBS-Tween20 (Tweenanteil 0,05 %)). Es sollte die unspezifischen Bindungsstellen für die im nächsten Schritt zugegebenen Antikörper blockieren. Nach dieser Prozedur wurden die Membranen dreimal mit TBS-Tween gewaschen, bevor der spezifische murine IgG₁-Antikörper (BD) gegen ein Epitop von humanem HIF-1 α in einer Verdünnung von 1:300 (in TBS-Tween) mit einem Volumen von 15 ml auf die Membran gegeben wurde. Diese Antikörperinkubation umfasste einen Zeitraum von 90 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit TBS-Tween. Nun konnte ein zweiter, an eine Peroxidase gekoppelter Antikörper (anti murine IgG_{Heavy and light} (HRP-gekoppelt PROMEGA)) in einer Verdünnung von 1:10000 und einem Volumen von 15 ml auf die Membran gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert werden. Danach wurde wieder dreimal gewaschen, die Membran auf eine Folie gelegt und mit ECL-Lösung (Amersham Biosciences) für 5 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurde sie in eine Filmkassette (Hypercassette; Amersham) gelegt und in einer Dunkelkammer für 10 min dem Film ausgesetzt. Die Filmentwicklung erfolgte in einer Kodak Maschine (X-OMAT 1000 Prozessor).

Um ein gleichmäßiges Auftragen der Proteinproben zu überprüfen, wurde ein Abgleich mit dem unregulierten Strukturprotein β -Actin durchgeführt. Dabei wurden die gesammelten Blots einer Behandlung mit β -Mercaptoethanolösung (100 mM) für 20 min bei 50 °C unterzogen. Hiermit konnten die auf den Blots gebundenen Antikörper der ersten Prozedur denaturiert und ihre Bindung zerstört werden. Nach mehreren Waschstschritten schloss sich eine, wie bereits beschriebene, zweite Immunoblottingprozedur an. Der erste Antikörper, der im Verhältnis von 1:10000 eingesetzt wurde, war ein muriner anti- β -Actin-IgG₁-Antikörper (Sigma). Der Peroxidase gekoppelte Antikörper war wiederum ein anti-murine-IgG-Antikörper, der 1:10000 eingesetzt wurde. Aufgrund des schnellen Substratumsatzes durch die Peroxidase wurde bei der Filmbelichtung die ECL-Lösung erst in der Dunkelkammer zugesetzt. Die Belichtungszeit betrug deshalb nur 10 s. Im letzten Schritt wurden die Filme eingescannt und mit dem Computerprogramm „Adobe Photoshop 6.0“ übereinander projiziert. Somit konnte einerseits die Auftragsqualität und andererseits die HIF-1 α -Expression der einzelnen Proben beurteilt werden.

3.8 Datenerfassung und statistische Auswertung

Die Experimente aus den Genexpressionsanalysen wurden für jedes Zielgen jeweils viermal durchgeführt. Bei den MG-63 Osteoblasten wurden die Zellen aus vier verschiedenen Passagen zur Analyse ihrer Genexpression herangezogen. Bei den phOB wurde die Genexpression von vier Patienten untersucht. Die Lightcycler-Software 3.5 ermittelte die „crossing points“ und quantifizierte, über einen intern mitgeführten Standard, die relative Menge des untersuchten Gens der jeweiligen Probe.

Die Messungen erfolgten für jede einzelne Passage oder jeden Patienten in Dreifachbestimmung (Triplicates). Die einzelnen Mittelwerte aus den Dreifachmessungen gingen in die Gesamtberechnung

ein. Hierbei wurden die Mittelwerte der Kontrollgruppen (DMSO-behandelte Zellen) gleich 100 Prozent gesetzt. Die Mittelwerte der Untersuchungsgruppen wurden zu diesen Werten prozentrelativiert und als relative Ratio angegeben. Die relative Ratio einer Untersuchungsgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt ist somit der Faktor, um den die Genexpression des untersuchten Gens zum gleichen Zeitpunkt im Verhältnis zur Kontrollgruppe größer oder kleiner wird. Sie wurde für jede Untersuchungsgruppe als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes ermittelt und graphisch im Ergebnisteil wie folgt angegeben: „Mittelwert \pm S.E.M.“.

Außerdem wurde für jeden untersuchten Parameter eine Varianzanalyse mit dem ANOVA-Test durchgeführt und nach Bonferroni korrigiert. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle (DMSO). Auch innerhalb einer Untersuchungsgruppe wurde der Verlauf über die verschiedenen Zeitpunkte einer Varianzanalyse unterzogen. Abweichungen von der Kontrolle oder innerhalb der Kinetik einer Untersuchungsgruppe mit einem $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet und im Ergebnisteil mit dem Symbol „*“ über der entsprechenden Säule im Graphen gekennzeichnet. Ein p-Wert kleiner 0,01 wurde über der entsprechenden Säule mit dem Symbol „†“ markiert.

Für die statistische Auswertung der Zellvitalitätsbestimmungen mit Trypanblau wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt.

In Hinblick auf die mRNA-Expression von OPG erfolgte ein Vergleich der MG-63 Osteoblasten mit den phOB. Für diesen Vergleich wurde der „Mann-Whitney-U-Test“ angewandt.

Die OPG-Proteinmessungen im ELISA erfolgten aus den Zellkulturüberständen von 4 verschiedenen Individuen. Die jeweiligen Mittelwerte ergaben sich aus Doppelbestimmungen (Duplicates). Analog zur Genexpressionsanalyse erfolgte die Prozentrelativierung mit Angabe der relativen Ratio zur Kontrolle. Anschließend wurde mit dem ANOVA-Test die Signifikanz überprüft.

Die Messungen an der Sauerstoffelektrode und die Vitalitätsbestimmungen wurden mit den Zellen der MG-63 Zelllinie aus jeweils sechs verschiedenen Passagen durchgeführt. Die Vitalitätsmessungen wurden zur Kontrolle prozentrelativiert und die Signifikanz nach dem Wilcoxon-Test bestimmt. Die Sauerstoffelektrodenmessungen für Celecoxib 10 μ M und 50 μ M wurden in absoluten Zahlen, die Ergebnisse zu den Experimenten mit FCCP als prozentuale Änderung des Sauerstoffverbrauches angegeben. Auch hier erfolgte die Errechnung der Signifikanz mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.

Sämtliche Daten dieser Arbeit wurden auf einem PC mit dem Programm „Microsoft Office Excel 2003“ bzw. „GraphPad Prism 3.03“ zusammengetragen und mit „SPSS 12.0“ statistisch ausgewertet.