

4. Ergebnisse

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung und Wachstumscharakteristik der MG-63 Osteoblasten

Nach dem Auftauen der Zellen erfolgte das Aussäen von 4×10^3 Zellen/cm² in entsprechende Kulturgefäße. Das benutzte Medium, in welchem die Zellen proliferieren sollten, war α -MEM Medium. Im Vergleich zu den phOB zeigte die MG-63 Zelllinie ein erheblich schnelleres Wachstum. Bereits zwei Tage nach dem Auftauen begannen die ersten Zellen adhärent zu werden (Abb. 7A). Die Zellsomata zeigten eine fibroblastoide Morphologie mit dendritischen Ausläufern. Zellen, welche zu diesem Zeitpunkt noch nicht adhärent waren, imponierten lichtmikroskopisch als rundliche helle Strukturen mit prominentem, dunkel angefärbten Zellkern. Diese wurden jedoch bei den kontinuierlichen Medienwechseln ausgewaschen.

Nach vier Tagen war fast der gesamte Boden der Zellkulturgefäße mit adhären Zellen bedeckt. Morphologisch sah man eine relativ uniforme Zellpopulation von fusiformen Zellen, die noch in Monolayer-Formation vorlagen (Abb. 7B).

Nach sieben Tagen war ein vollständiger, die Oberfläche bedeckender, Zellrasen zu sehen (Abb. 7C). Diese hundertprozentige Konfluenz war die Ausgangssituation für die nachfolgenden Inkubationsschritte mit phenolrotfreiem Inkubationsmedium. Die Zellen selbst wiesen Kaliberschwankungen bezüglich ihrer Größe und Form auf. Es zeigten sich sehr schmale wie auch breitere Zellen mit polygonaler Morphologie. Die dendritischen Ausläufer der Zellkörper verschwanden durch die ansteigende Zelldichte scheinbar.

Sobald die Zellen Konfluenz erreichten, richteten sich einige auf und wuchsen in mehreren Schichten als Multilayer-Formation übereinander (Abb. 7D). Es zeigten sich vereinzelt dicht bewachsene Areale von Zellen, welche als knötchenartige Inseln oder so genannte Nodules imponierten.

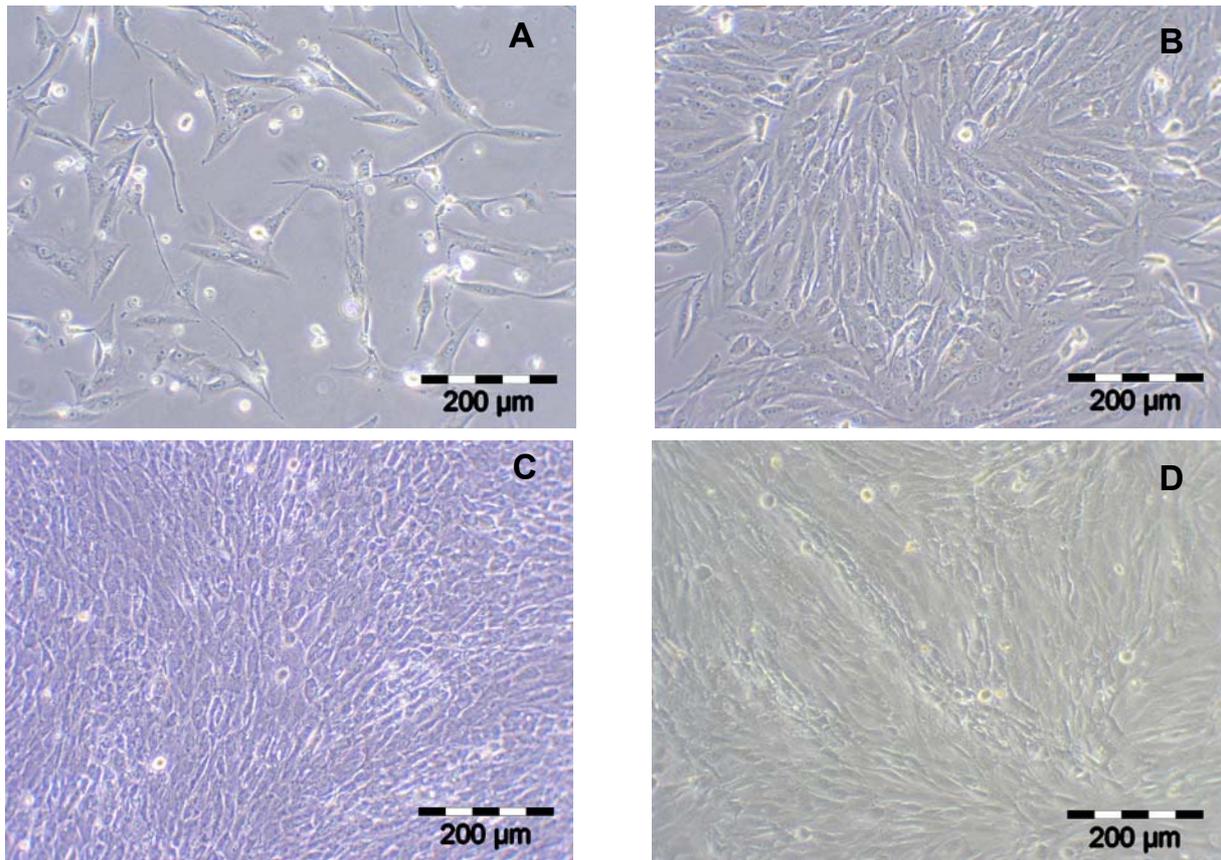


Abb. 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der MG-63 Osteoblasten, kultiviert in α -MEM zu verschiedenen Zeitpunkten nach deren Auftau bei 10facher Vergrößerung (A: Tag 2; B: Tag 4; C: Tag 7; D: Tag 10)

4.1.2 Kultivierung und Wachstumscharakteristik der primären humanen Osteoblasten

Die Kultivierung der phOB wurde in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

In Abbildung 8A erkennt man im oberen Teil der lichtmikroskopischen Aufnahme undeutlich ein Spongiosastückchen, aus welchem nach circa 7 bis 10 Tagen die ersten Zellen wuchsen. Die Wachstumsgeschwindigkeit war im Gegensatz zu den MG-63 Osteoblasten um ein Vielfaches verlangsamt. Schon von Patient zu Patient zeigten sich erhebliche interindividuelle Unterschiede bezüglich der Zellproliferation über die Zeit. Aus diesem Grunde werden nachfolgend nur ungefähre Zeiträume benannt. Die mikroskopische Morphologie der Zellen war innerhalb des Patientenkollektivs jedoch einheitlich. Bei 10facher Vergrößerung erkennt man auch hier fibroblastoide Zellen mit dendritischen Ausläufern. Nach dem Erreichen der fast vollständigen Konfluenz wurden die Zellen passagiert und in 6-Well-Platten ausgesät. Die jetzt proliferierenden Zellen werden als phOB bezeichnet. Nach etwa fünf weiteren Tagen hafteten die Zellen wieder an den Kulturgefäßen und demonstrierten ein fibroblastenartiges, zunehmend polygonales Aussehen mit multiplen Ausläufern (Abb. 8B). Mit zunehmender Kultivierungsdauer wurden die Zellen länglicher und stärker konfluent (Abb. 8C). Nach circa 25 Tagen war Konfluenz erreicht. Das Kultivierungsmedium wurde durch osteogenes Medium ersetzt. Diesem war 50 $\mu\text{g/ml}$ ASAP zugesetzt, welches die Ausdifferenzierung der Zellen in die osteogene Richtung lenkte. Die Inkubation mit diesem Medium erfolgte über 10 Tage. Die Osteoblasten verdichteten sich weiter und zeigten ein noch stärker gestrecktes Aussehen. Sie begannen nun auch übereinander zu wachsen und lagen somit in Multilayer-Formation vor. Es

imponierten netzartige Geflechte übereinander wachsender Zellen (Abb. 8D). Zwischen den einzelnen Geflechten konnten auch freie Bereiche beobachtet werden, in denen keine Zellen wuchsen. Nach zehntägiger Inkubation mit osteogenem Medium wurde den Zellen phenolrotfreies, BSA-haltiges Inkubationsmedium für zwei weitere Tage verabreicht. Anschließend wurden die Experimente durchgeführt. Die Zellmorphologie zeigte in dieser Zeit keine weitere Veränderung.

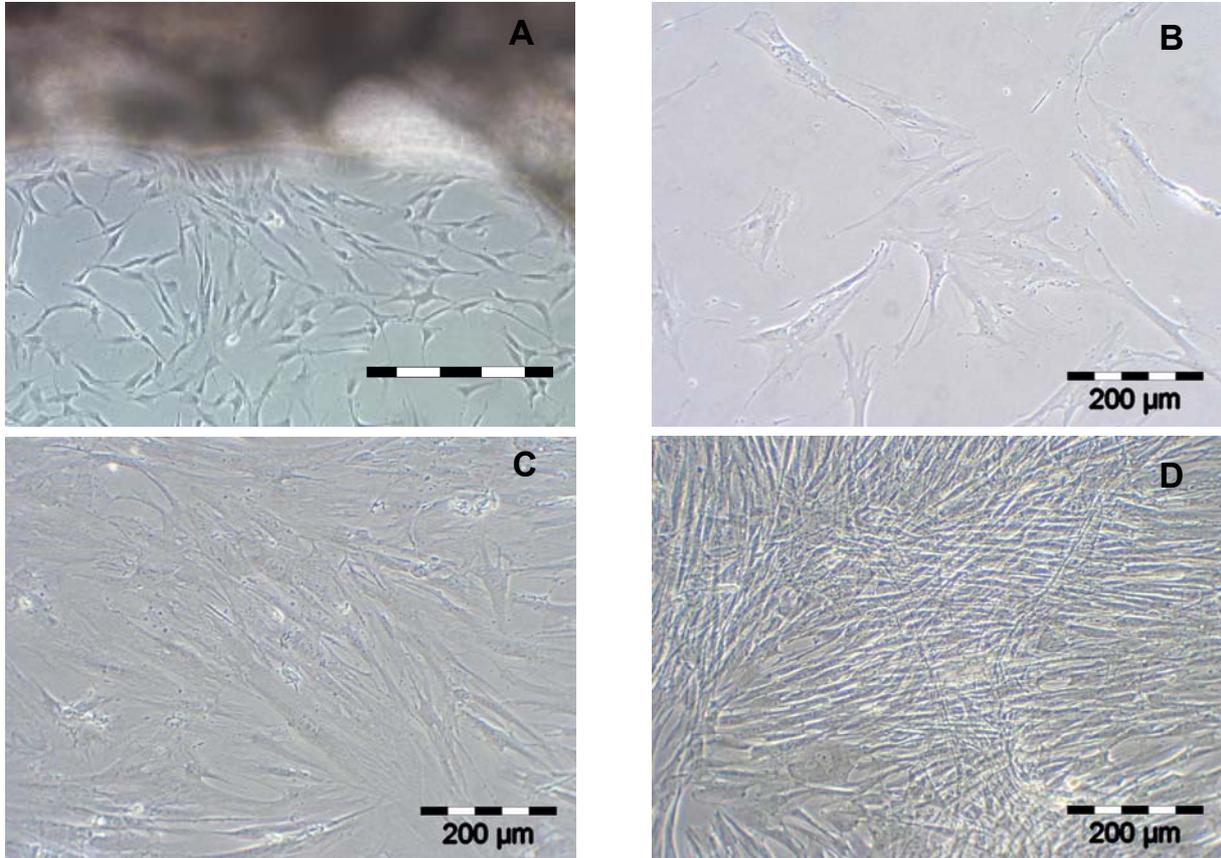


Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der phOB, kultiviert in α -MEM zu verschiedenen Zeitpunkten bei 10facher Vergrößerung (A: Tag 14, Balken = 200 μ m; B: Tag 19; C: Tag 25; D: Tag 35 mit AsAP 50 μ g/ml Zusatz)

4.1.3 Nachweis der alkalischen Phosphatase in primären humanen Osteoblasten

Vorversuche zeigten, dass erst nach der Behandlung der phOB mit AsAP 50 μ g/ml eine zunehmend positive AP-Färbung sichtbar wurde. Erfolgte keine Zugabe von AsAP, blieb die bläuliche Zellfärbung fast vollständig aus. Nur circa 1 % der Zellen zeigten einen positiven Substratumsatz mit entsprechender Färbung.

In Abbildung 9 erkennt man blau angefärbte Zellen aus der Kultur der phOB, welche für 7 Tage mit osteogenem Medium kultiviert wurden. Stärker angefärbte Areale lassen auf übereinander liegende Zellen schließen. Die Färbung konzentriert sich auf diese Geflechte, und somit sind die zellfreien Areale mikroskopisch gut abgrenzbar. Betrachtet man die einzelne Zelle, so lässt sich eine erhöhte AP-Färbung im Bereich der Zellmembran, der Kernmembran und des Nukleolus erkennen. Aufgrund dieses zellulären Erscheinungsbildes konnte von dem osteogenen Potential der Zellen ausgegangen werden.

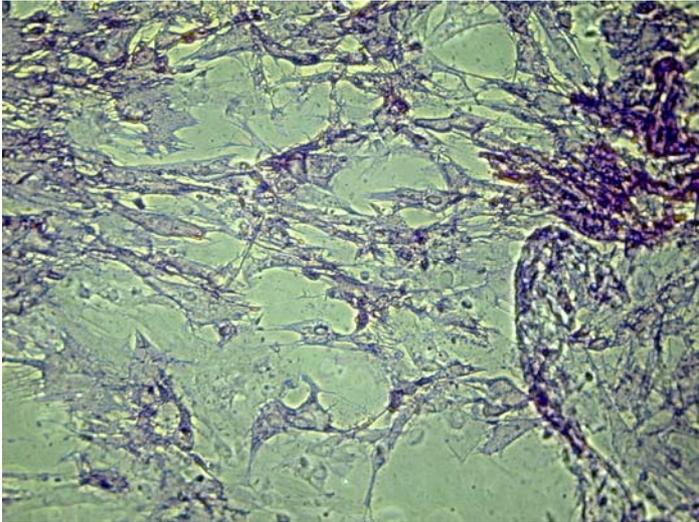


Abb. 9: Enzymaktivitätsnachweis der alkalischen Phosphatase von phOB nach 7tägiger Inkubation in α -MEM mit AsAP 50 μ g/ml bei 10facher lichtmikroskopischer Vergrößerung

4.2 Zellvitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung

Wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, wird Trypanblau als Farbstoff durch die intakte Zellmembran vitaler Zellen zurückgehalten. Zellen, deren Zellmembranen durch bestimmte Einflüsse porös werden, lagern Trypanblau ein und färben sich blau.

Über die Bestimmungen der Zellvitalität soll der Einfluss der applizierten Substanzen auf die Überlebensrate der Zellen zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten geklärt werden.

Für die Vitalitätsuntersuchungen wurden ausschließlich MG-63 Osteoblasten verwendet, da sie in ausreichender Menge vorhanden waren. Im Gegensatz dazu waren die phOB nur in begrenzter Anzahl vorhanden.

In Abbildung 10 ist das Großquadrat einer Neubauer-Zählkammer mit MG-63 Zellen dargestellt, welche zuvor mit Celecoxib 50 μ M für 24 h behandelt wurden. Deutlich sind 18 ungefärbte vitale Zellen zu erkennen, deren Zellkerne dunkelblau erscheinen. Abgrenzbar ist eine einzige Zelle, die sich vollständig und homogen dunkelblau anfärbt. Sie wurde als tote Zelle für die Erfassung der Vitalitätsstatistik gewertet.

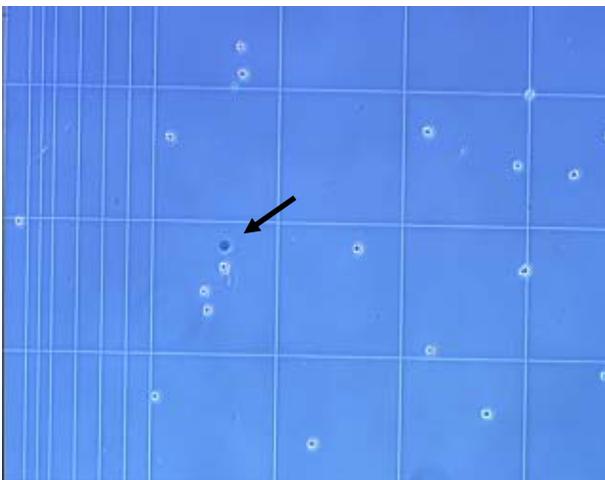


Abb. 10: Vitalitätsbestimmung der MG-63 Osteoblasten mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung nach 24stündiger Inkubation mit Celecoxib 50 μ M (Pfeil verweist auf einen Trypanblau gefärbten Osteoblasten)

Ergebnisse

Es wurden bei der Bestimmung der Zellvitalität die gleichen Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen untersucht, wie sie auch in den späteren Experimenten den Zellen verabreicht wurden. Ebenso erfolgte die genaueste Einhaltung der in Kapitel 3.1 beschriebenen Inkubationszeitpunkte. Insgesamt wurde jedes Einzelexperiment sechs Mal wiederholt, um eine statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test zu ermöglichen.

Zum Startzeitpunkt 0 h und nach 2 h zeigten sowohl die mit DMSO als Negativkontrolle als auch mit Dexamethason 10^{-8} M als Positivkontrolle sowie die mit beiden Celecoxibkonzentrationen behandelten MG-63 Osteoblasten eine 100 %ige Vitalität. In keinem der Einzelexperimente waren die Zellen Trypanblau positiv.

In Abbildung 11 sind die Effekte der jeweiligen Substanzen auf die MG-63 Osteoblasten zu den Inkubationszeitpunkten 6 h und 24 h ersichtlich. Die Kontrollgruppe (DMSO) zeigte auch nach 24stündiger Inkubation eine 100 %ige Vitalität. Es fanden sich dementsprechend zum Zeitpunkt 6 h und 24 h absolut keine (0 %) avitalen Zellen innerhalb dieser Gruppe.

Bei den mit Dexamethason 10^{-8} M behandelten Zellen sind zum Zeitpunkt 6 h 0,47 % avital. Nach 24 h Inkubation kommt es circa zur Versechsfachung des 6 h Wertes. Es sind 2,82 % der Zellen Trypanblau positiv gefärbt und als nicht mehr vital anzusehen. Zusätzlich ergibt sich mit $p = 0,031$ ein signifikanter Unterschied zur DMSO-behandelten Kontrollgruppe nach 24 h.

Eine sehr viel stärkere Zunahme hinsichtlich der Letalitätsrate der Zellen ist bei Celecoxib $10 \mu\text{M}$ zu beobachten. Nach einem 6 h Wert von 0,1 % toten Zellen sind nach 24 h bereits 1,47 % der Zellen dieser Behandlungsgruppe nicht mehr vital. Auch diese Behandlungsgruppe unterscheidet sich signifikant ($p = 0,031$) zur Kontrollgruppe nach 24 h.

Bei der mit Celecoxib $50 \mu\text{M}$ behandelten Gruppe verhält sich die Zunahme der optisch toten Zellen ähnlich der mit Dexamethason behandelten Gruppe. Bei einem diskret höheren 6 h Wert von 0,97 % kommt es nach 24 h zur Versechsfachung mit 5,9 % toten Zellen. Bezüglich der DMSO behandelten Kontrollgruppe wird wiederum Signifikanzniveau erreicht ($p = 0,031$).

Insgesamt zeigt sich bei allen behandelten Gruppen ein Anstieg der toten Zellen über die Zeit. Celecoxib ist dabei in der Konzentration von $50 \mu\text{M}$ am stärksten toxisch.

Ergebnisse

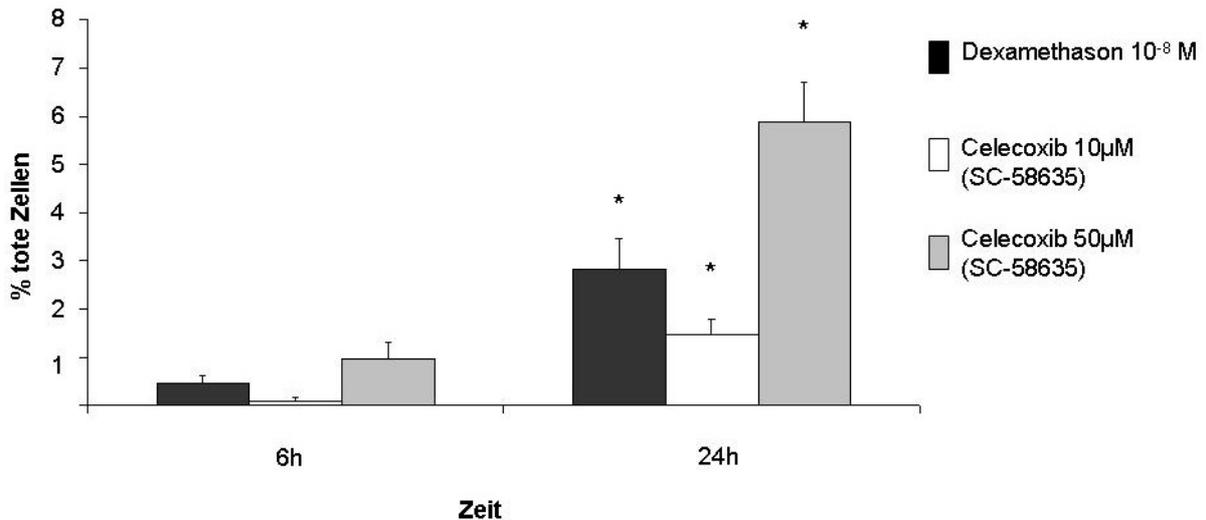


Abb. 11: Zellvitalität nach Applikation von Dexamethason 10^{-8} M oder Celecoxib (10 μ M; 50 μ M) bei MG-63 Osteoblasten im angegebenen Untersuchungszeitraum. Die Säulen spiegeln die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten wider. Die Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.; Signifikanzberechnungen nach Wilcoxon-Test (* $p < 0,05$ versus DMSO-Kontrollgruppe). In der DMSO behandelten Kontrollgruppe zeigten sich keine avitalen Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.3 Genexpressionen von OPG und GLUT-1

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression für die Gene OPG und GLUT-1 wurde genutzt, um den Einfluss von Celecoxib auf den Knochenstoffwechsel (OPG) und den Energiestoffwechsel (GLUT-1) in humanen Osteoblasten zu untersuchen.

Nach Ermittlung der optimalen Primerkombinationen und $MgCl_2$ -Konzentrationen sowie Bestimmung der Annealing-Temperaturen wurden für die einzelnen Gene deren Amplifikationseffizienzen errechnet. Die Messungen erfolgten aus Doppelwerten einer Standardverdünnungsreihe. In Abbildung 12 ist die Effizienzbestimmung für das OPG-Gen exemplarisch dargestellt.

Ergebnisse

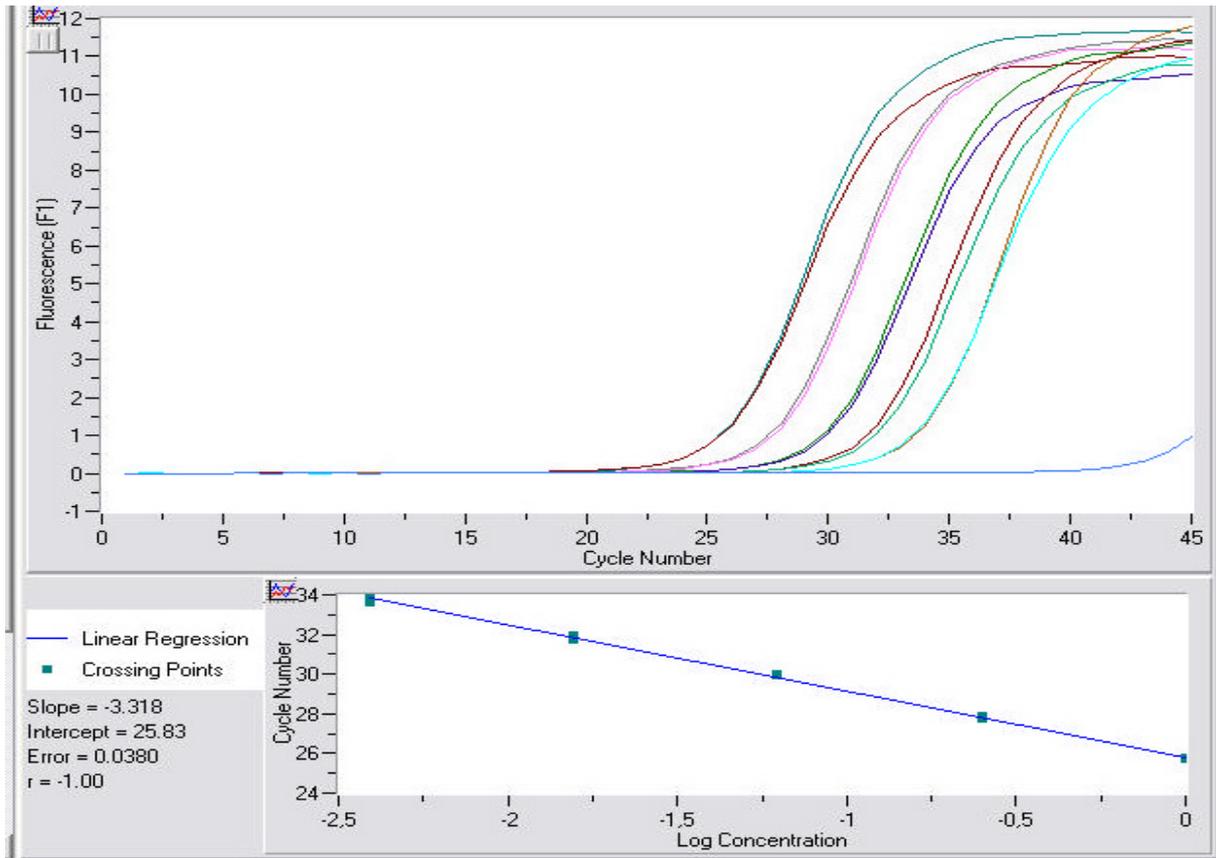


Abb. 12: Effizienzbestimmung von OPG im Lightcycler System; Effizienz = 2,001

Die „crossing points“ wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Verdünnungskonzentrationen einander zugeordnet und als Anstieg einer Geraden (blaue Gerade in Abbildung 12) ausgedrückt. Die Effizienz errechnet sich unter Berücksichtigung des ermittelten Anstieges („slope“) nach folgender Formel:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Die optimale Effizienz von 2,00 konnte für OPG ermittelt werden. Dies entsprach einer Verdopplung der Kopien des zu amplifizierenden Produktes pro PCR-Zyklus. Bei GLUT-1 erreichte die Effizienz einen Wert von 1,93. Für β -Actin konnte eine Effizienz von 1,92 bestimmt werden.

Zur Bewertung der Effizienzläufe wurden Schmelzkurven für die einzelnen Gene ermittelt. Beurteilt wurde, ob in den einzelnen Proben tatsächlich nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Dieses konnte durch einen einzigen Peak in der Kurve bei spezifischer Schmelztemperatur bewiesen werden. In Abbildung 13 sind die Schmelzkurven der OPG-Effizienzbestimmung beispielhaft dargestellt. Man erkennt einen deutlichen und einheitlichen Peak bei circa 84 °C. Die spezifische Schmelztemperatur von GLUT-1 lag bei etwa 89 °C und die von β -Actin bei circa 90 °C.

Ergebnisse

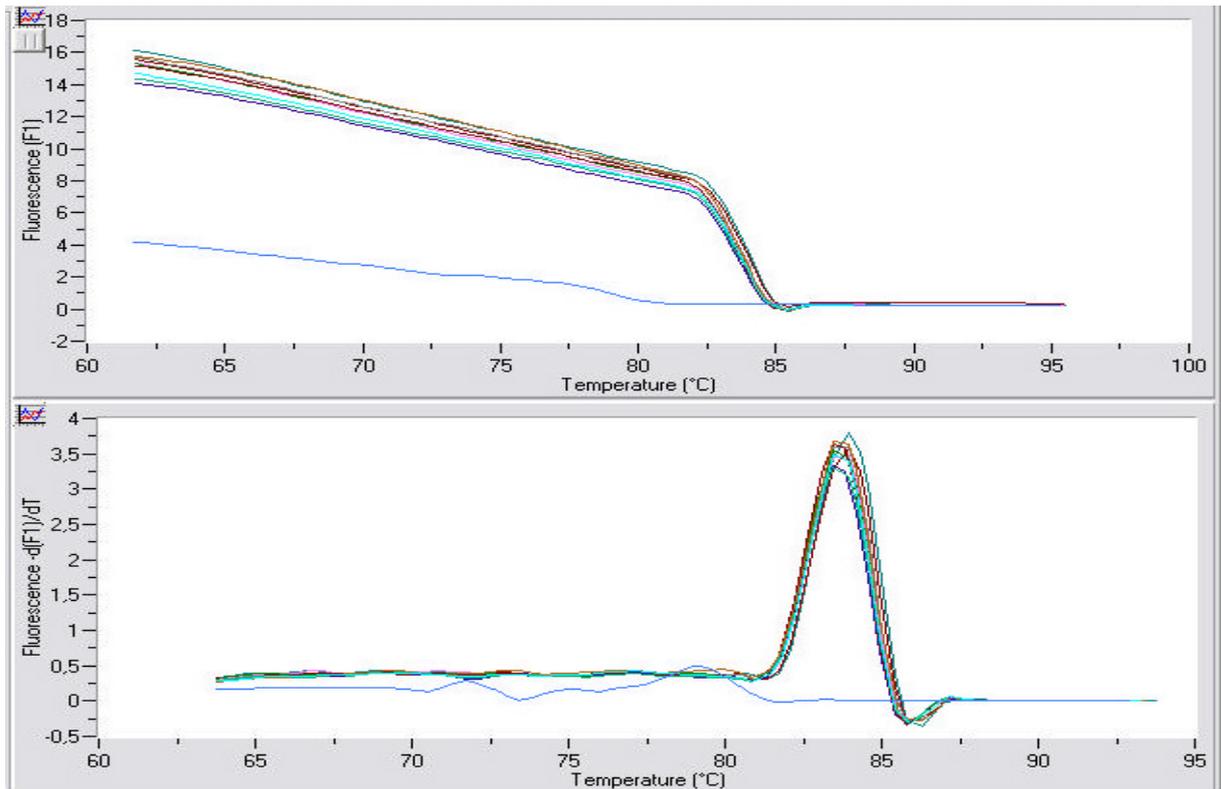


Abb. 13: Schmelzkurvenanalyse zur Effizienzbestimmung von OPG. Zu erkennen ist ein spezifisches Produkt mit einer Schmelztemperatur von circa 84 °C. In der Wasserkontrolle (blaue Linie) zeigen sich zwei unspezifische Produkte, die jedoch keine Bedeutung für die Effizienzbestimmung der Proben haben.

Zur Überprüfung der amplifizierten Produkte wurden diese nach erfolgreicher Klonierung sequenziert. Die folgenden Abbildungen 14 und 15 zeigen exemplarisch die Sequenzierungsergebnisse von OPG und β -Actin. Alle Sequenzen entsprachen den gesuchten Amplikons. Somit konnten die Ergebnisse der „Realtime PCR“ als gültig betrachtet werden.

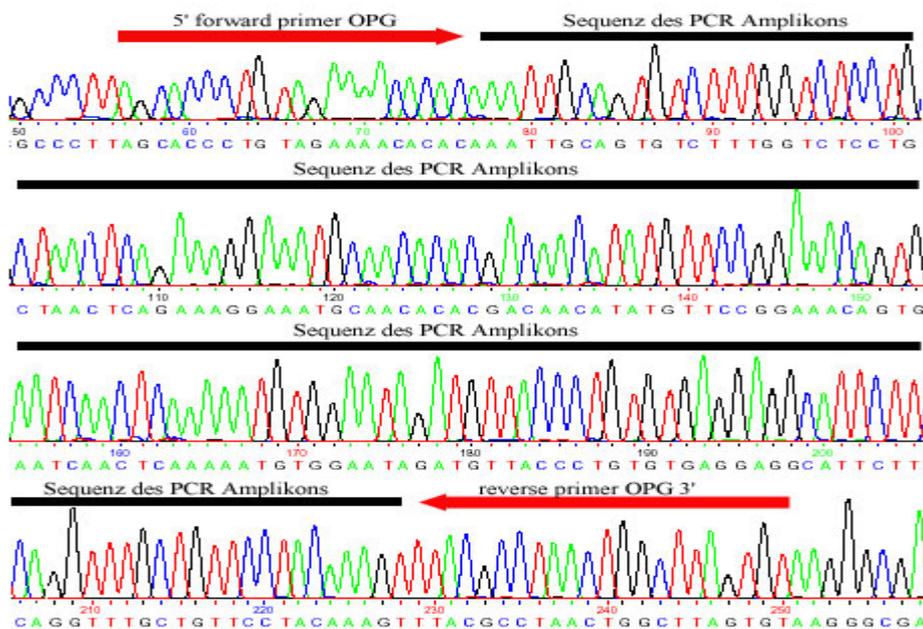


Abb. 14: Sequenzierungsergebnis für das OPG-Amplikon mit 195 bp

Ergebnisse

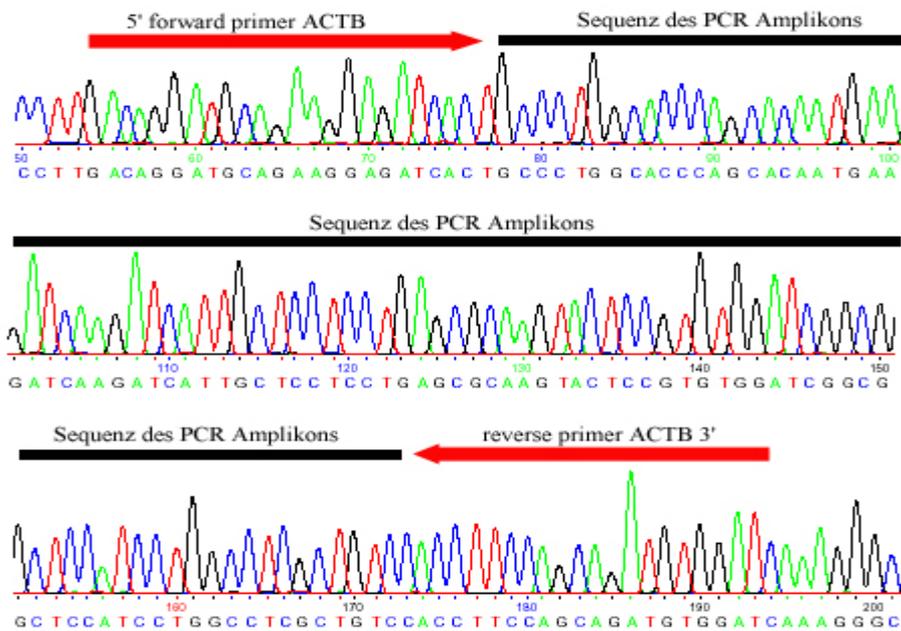


Abb. 15: Sequenzierungsergebnis für das β -Actin Amplikon mit 141 bp

Die folgenden drei Abbildungen spiegeln die Ergebnisse der untersuchten Gene in ihrer relativen Expression zur Negativkontrolle (DMSO) wider.

In Abbildung 16 wird die Genexpression von OPG in MG-63 Osteoblasten nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason 10^{-8} M, Celecoxib $10 \mu\text{M}$ und Celecoxib $50 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Folgende Aussagen lassen sich treffen:

Die mRNA-Expression für OPG sinkt nach dem Einfluss von Dexamethason 10^{-8} M bereits nach 2 h auf eine relative Ratio von 0,67. Nach 6 h fällt die OPG-Expression noch weiter ab (0,24) und erreicht Signifikanzniveau ($p = 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO). Bezieht man diesen Wert (0,24) auf die Negativkontrolle (DMSO), so ergibt sich nach 6 h eine Hemmung der Expression von OPG um ein viertel. Bis zum Zeitpunkt von 24 h zeigt sich ein nur noch minimal weiter abfallender OPG-Expressionswert auf 0,22, der, bezogen auf die Kontrolle, signifikant ($p = 0,004$) ist.

Betrachtet man die mit Celecoxib $10 \mu\text{M}$ behandelten Zellen, so lassen sich keine wesentlichen Veränderungen in der OPG-Expression erkennen. Nach initial leichter Verminderung erreicht die Expression zum Zeitpunkt von 6 h den tiefsten Wert (0,89). Anschließend erkennt man eine moderate Steigerung von OPG zum Zeitpunkt der 24 h Messung. Jedoch erreicht Celecoxib $10 \mu\text{M}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO) zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede. Celecoxib $10 \mu\text{M}$ verursacht dementsprechend bei den MG-63 Osteoblasten keine nennbaren Effekte auf die mRNA-Expression für OPG im untersuchten Zeitraum.

In der mit Celecoxib $50 \mu\text{M}$ behandelten Gruppe ist ein deutlicher Effekt der OPG-Expression über die Zeit erkennbar. Celecoxib $50 \mu\text{M}$ stimuliert anfänglich die OPG-Expression, welche zum Zeitpunkt von 6 h bei einer relativen Ratio von 1,28 gipfelt. Nach 24 h kommt es dann zu einer circa 3,6fachen signifikanten ($p < 0,001$) Reduzierung von OPG, bezogen auf die Negativkontrolle (DMSO) zum selben Zeitpunkt. Vergleicht man den 2 h Wert mit dem 24 h Wert der mit Celecoxib $50 \mu\text{M}$

Ergebnisse

behandelten Zellen, ergibt sich wiederum eine Verringerung der OPG-Expression mit Signifikanzniveau ($p = 0,039$).

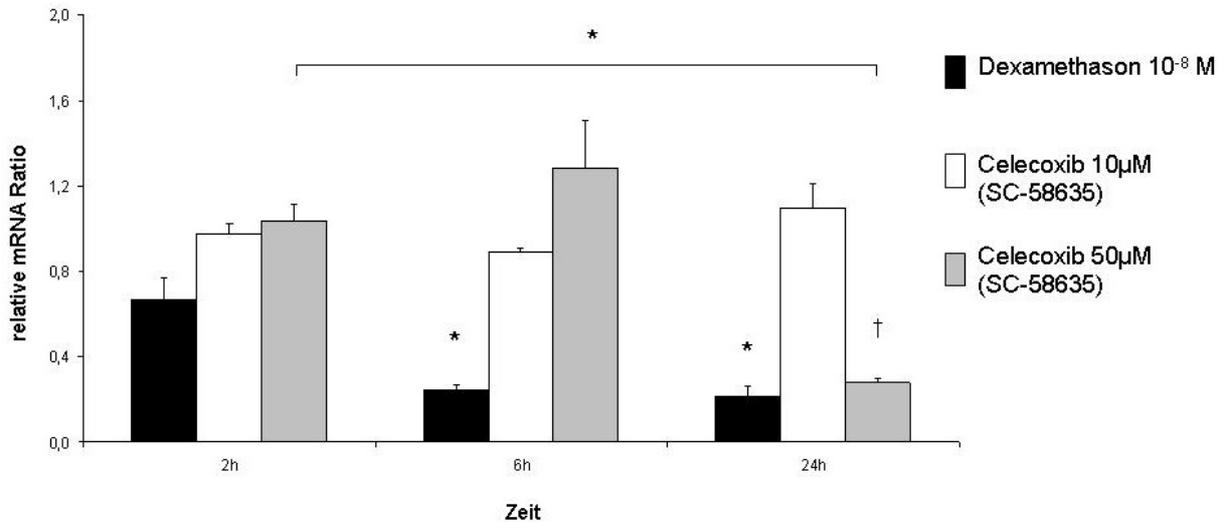


Abb. 16: mRNA-Expression von OPG bei MG-63 Osteoblasten in 3fach-Bestimmung; normalisiert auf β -Actin und als relatives Verhältnis zur Kontrolle (DMSO) angegeben; Kontrolle (DMSO) = 1; 0 h Werte = 1; Säulen entsprechen den Mittelwerten der MG-63 Osteoblasten aus vier unterschiedlichen Zellpräparationen; Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.; Signifikanzberechnungen nach ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$ versus DMSO- Kontrollgruppe; † $p < 0,001$ versus DMSO-Kontrollgruppe)

Abbildung 17 illustriert die Genexpression von OPG in phOB nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason 10^{-8} M, Celecoxib $10\mu\text{M}$ und Celecoxib $50\mu\text{M}$ in Abhängigkeit von der Zeit. Folgende Aussagen lassen sich treffen:

Die mit Dexamethason 10^{-8} M behandelten phOB zeigen eine initiale Abnahme der OPG-Expression nach 2 h (0,68). Nach 6 h ist der Effekt noch deutlicher ausgeprägt und mit einer relativen Ratio von 0,16 signifikant ($p = 0,01$) bezogen auf die Negativkontrolle (DMSO). Diese Effekte sind ähnlich den bei MG-63 Osteoblasten gefundenen. Auch ist der Rückgang der OPG-Expression innerhalb dieser Behandlungsgruppe zwischen dem 2 h und dem 6 h Zeitpunkt signifikant ($p = 0,022$). Nach 24 h erkennt man eine Erholung der OPG-Expression mit mäßiger Erhöhung der relativen Ratio auf 0,45. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO) liegt das Signifikanzniveau nach 24 h mit $p = 0,067$ leicht darüber.

Celecoxib $10\mu\text{M}$ scheint auch bei den phOB keinen Effekt auf die OPG-Expression zu haben. Bis zur 6 h Messung ist ein leichter Anstieg von OPG (1,38), bezogen auf die Negativkontrolle (DMSO), zu beobachten. Nach 24 h hat die OPG-Expression mit einer relativen Ratio von 0,97 jedoch wieder annähernd den Wert der Negativkontrolle erreicht. Bezüglich der mRNA-Expression für OPG verursacht Celecoxib $10\mu\text{M}$ bei den phOB im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO) zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikante Ergebnisse.

Die Behandlung der phOB mit Celecoxib $50\mu\text{M}$ führt nach 2 h zu einem Anstieg (1,59) der OPG-Expression. Diese fällt nach 6 h auf 1,07 und nach 24 h weiter auf 0,45 ab. Aufgrund der beim einzelnen Patienten individuell sehr unterschiedlichen Expressionsveränderungen für OPG und den damit verbundenen hohen Standardabweichungen konnte mit der Applikation von Celecoxib $50\mu\text{M}$

Ergebnisse

bei den phOB keine statistische Signifikanz erreicht werden. Jedoch ist ein deutlicher Trend in der Abnahme der OPG-Expression nach 24 h zu beobachten.

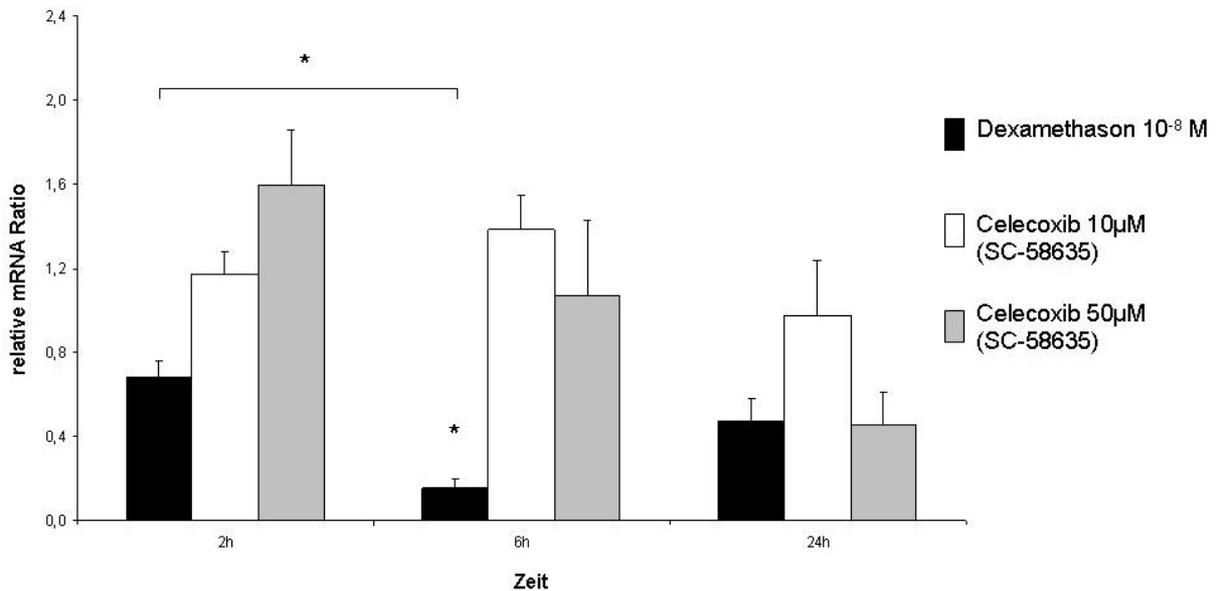


Abb. 17: mRNA-Expression von OPG aus phOB als 3fach-Bestimmung; normalisiert auf β -Actin und als relatives Verhältnis zur Kontrolle (DMSO) angegeben; Kontrolle (DMSO) = 1; 0 h Werte = 1; Säulen entsprechen den Mittelwerten der phOB von vier verschiedenen Patienten; Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.; Signifikanzberechnungen nach ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$ versus DMSO- Kontrollgruppe)

Vergleicht man die unterschiedlichen Zellpopulationen und deren OPG-Expressionen nach entsprechender Substanzenbehandlung untereinander, so lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Die Applikation von Dexamethason 10^{-8} M zeigt sowohl bei den MG-63 Osteoblasten als auch bei den phOB eine Hemmung der mRNA-Expression von OPG. Bei den phOB steigt jedoch die OPG-Expression nach 24 h wieder an, wogegen diese bei den MG-63 Osteoblasten den niedrigen 6 h Wert annähernd beibehält.

Die Gabe von Celecoxib 10 μ M erzielt sowohl bei den MG-63 Osteoblasten als auch bei den phOB bezüglich der OPG-Expression keine nennenswerten Effekte.

Die Behandlung der Zellen mit Celecoxib 50 μ M zeigt bei beiden Populationen eine Abnahme der OPG-Expression nach 24 h. Beim Vergleich der relativen Ratios von 2 h und 6 h ergibt sich eine zeitliche Verschiebung, indem bei den MG-63 Osteoblasten der Gipfel der OPG-Expression erst nach 6 h beobachtet wird. Dagegen ist das Maximum in der OPG-Expression bei den phOB schon nach 2 h erreicht.

Für die statistische Auswertung und die Signifikanzüberprüfung der beiden Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Unterschiede in der OPG-Expression, wurde der „Mann-Whitney-U-Test“ angewandt. Beim Vergleich aller Einzelwerte gegeneinander ließen sich dabei keine signifikanten Unterschiede für die OPG-Expression zwischen den MG-63 Osteoblasten und den phOB ermitteln. Dies lässt jedoch nicht den Schluss zu, dass sich die beiden Gruppen nicht voneinander unterscheiden.

Ergebnisse

In Abbildung 18 wird die Genexpression von GLUT-1 in MG-63 Osteoblasten nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason 10^{-8} M, Celecoxib $10 \mu\text{M}$ und Celecoxib $50 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Folgende Aussagen lassen sich treffen:

Zellen, die mit Dexamethason 10^{-8} M behandelt wurden, zeigen nach 2 h eine leichte Verminderung der GLUT-1-Expression (0,82), welche nach 6 h noch weiter abfällt (0,63). Nach 24 h steigt die GLUT-1-mRNA-Expression jedoch wieder an und erreicht damit die 2fache Expressionssteigerung bezogen auf die Negativkontrolle (DMSO). Statistische Signifikanz wird im Vergleich zur Kontrollgruppe DMSO jedoch nicht erreicht.

Celecoxib $10 \mu\text{M}$ lässt eine sukzessive Steigerung der GLUT-1-mRNA-Expression innerhalb der Zeitkinetik erkennen, welche zu jedem Messzeitpunkt über den Werten der Negativkontrolle (DMSO) liegt. Nach 24 h wird mit einer relativen Ratio von 2,15 lediglich ein Trend in der verstärkten Expression sichtbar.

Nach Applikation von Celecoxib $50 \mu\text{M}$ kommt es bei den MG-63 Osteoblasten zunächst auch zu einer Steigerung der GLUT-1-mRNA-Expression. Diese liegt nach 6 h bei einer relativen Ratio von 1,88. Interessanterweise steigt nach 24 h die Expression der GLUT-1-mRNA jedoch stark an und erreicht eine circa 25fache signifikante Steigerung ($p = 0,03$) bezogen auf die Negativkontrolle (DMSO). Ferner ergibt sich innerhalb der Kinetik dieser Behandlungsgruppe eine statistisch signifikante ($p = 0,03$) Expressionserhöhung von GLUT-1.

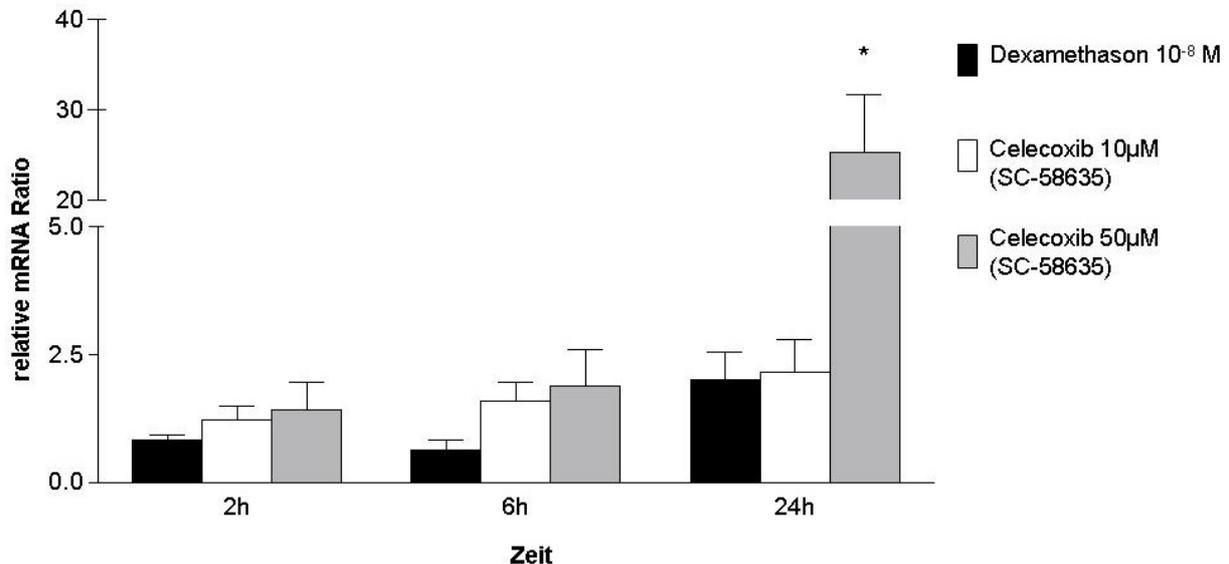


Abb. 18: mRNA-Expression von GLUT-1 bei MG-63 Osteoblasten in Triplicate-Bestimmung; normalisiert auf β -Actin und als relatives Verhältnis zur Kontrolle (DMSO) angegeben; Kontrolle (DMSO) = 1; 0 h Werte = 1; Säulen entsprechen den Mittelwerten der MG-63 Osteoblasten aus vier unterschiedlichen Zellpräparationen; Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.; Signifikanzberechnungen nach ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$ versus DMSO-Kontrollgruppe)

4.4 OPG-Quantifizierung aus den Zellkulturüberständen der primären humanen Osteoblasten

Mit der Fragestellung, welchen Einfluss Celecoxib auf die OPG-Proteinsekretion der phOB hat, soll OPG aus den Zellkulturüberständen dieser Zellen nachgewiesen werden. Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels der in Kapitel 3.5 eingesetzten ELISA-Technik.

Nach dem Erstellen einer Standardkurve wurden aus den einzelnen gemessenen Extinktionen der Proben die entsprechenden Konzentrationen errechnet.

Wie bereits bei der Berechnung der Expressionsergebnisse auf Transkriptionsebene werden in Abbildung 19 die Ergebnisse der OPG-Proteinquantifizierung in ihrer relativen Sekretion zur Negativkontrolle (DMSO) wiedergegeben.

Nach Behandlung der phOB mit Dexamethason 10^{-8} M lässt sich zum Zeitpunkt von 2 h eine leicht erhöhte Proteinsekretion von OPG (1,11) bezogen auf die Kontrolle erkennen, welche zu den weiteren Beobachtungszeiten nach 6 h und 24 h numerisch sukzessiv abfällt und eine relative Ratio von 0,74 erreicht. Im Vergleich zu den OPG-Expressionsergebnissen der phOB nach Dexamethason 10^{-8} M Behandlung ergibt sich somit bei der Proteinsekretion ein annähernd ähnliches Bild in der OPG-Inhibition nach 24 h Inkubation. Signifikanz konnte jedoch nicht erreicht werden, daher kann man nur von einer Tendenz sprechen.

Celecoxib 10 μ M zeigt auch bezüglich der OPG-Proteinsekretion keine deutlichen Effekte. Der maximale Wert der Proteinsekretion ist nach 2 h mit 1,21 erreicht und fällt zum Zeitpunkt 6 h annähernd auf das Niveau der Negativkontrolle mit 0,98 ab. Nach 24 h kommt es wieder zu einer diskreten Steigerung von OPG (1,15) im Zellkulturüberstand. Setzt man den maximalen 6 h Wert der OPG-mRNA-Expression nach Applikation von Celecoxib 10 μ M mit dem wieder ansteigenden 24 h Wert der OPG-Proteinsekretion in Verbindung, so lässt sich die leichte Erhöhung auf Proteinebene nach 24 h nachvollziehen.

Die inhibitorischen Effekte von Celecoxib 50 μ M auf Transkriptionsebene spiegeln sich auch auf Proteinebene wider. Nach 2 h zeigt sich bereits ein signifikanter ($p = 0,006$) Rückgang der OPG-Proteinsekretionsratio (0,92) zur Negativkontrolle (DMSO). Nach 6 h fällt die OPG-Proteinsekretion weiterhin ab (0,69) und erreicht nach 24 h den tiefsten Wert (0,62) mit Signifikanzniveau ($p = 0,033$) bezogen auf die Negativkontrolle (DMSO).

Ergebnisse

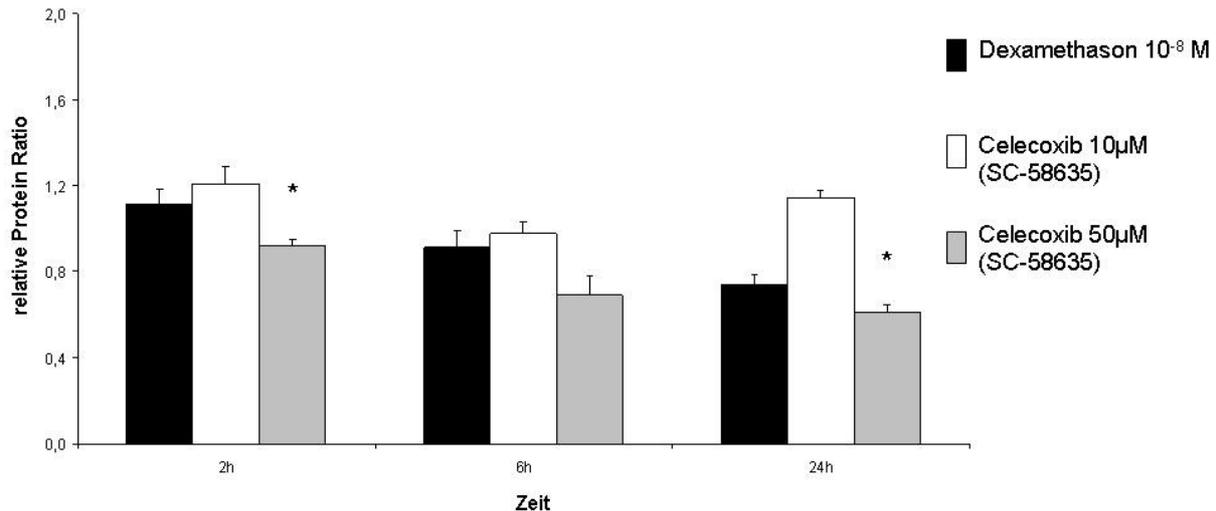


Abb. 19: OPG-Proteinsekretion der phOB aus den Zellkulturüberständen in Doppelbestimmung; angegeben als relatives Verhältnis zur Kontrolle (DMSO); Kontrolle (DMSO) = 1; 0 h Werte = 1; Säulen entsprechen den Mittelwerten der phOB-Zellkulturüberstände von vier verschiedenen Patienten; Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.; Signifikanzberechnungen nach ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$ versus DMSO-Kontrollgruppe)

4.5 Messungen des Sauerstoffverbrauches der MG-63 Osteoblasten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Celecoxib den Glucosetransporter (GLUT-1) auf Transkriptionsebene konzentrations- und zeitabhängig beeinflusst, soll zur Beurteilung des Energiestoffwechsels auch der Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten mit der Clark-Elektrode direkt gemessen werden. Die Arbeitshypothese ist: Celecoxib 50 µM führt durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und dem daraus verstärkten Einschalten der Glykolyse zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauches. In den beiden nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse präsentiert.

4.5.1 Effekte von Celecoxib (SC-58635) auf den Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten

Sowohl der Versuchsaufbau als auch die Berechnungen zum Sauerstoffverbrauch sind in Kapitel 3.6 beschrieben.

In Abbildung 20 wird die Originalmessung eines durchgeführten Experimentes zur Sauerstoffverbrauchsmessung mit dazugehöriger Interpretation beispielhaft veranschaulicht. Dargestellt ist der basale Sauerstoffverbrauch der Zellsuspension der MG-63 Osteoblasten und die Änderung des Verbrauches nach Zugabe von Celecoxib 50 µM in Abhängigkeit von der Zeit (min).

Während der Basalatmung liegt der Sauerstoffverbrauch im dargestellten Beispiel zunächst bei $22,36 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$. Nach Applikation von Celecoxib 50 µM in dieselbe Zellsuspension zeigt sich eine Abflachung des Anstieges. Dieser nun veränderte Anstieg der Geraden ergibt einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten in der gleichen Zeit und beträgt jetzt $29,94 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$. Bildet man die Differenz aus beiden Messungen, so errechnet sich eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches um $7,58 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$ nach Applikation von Celecoxib 50 µM, welches einer Zunahme um 25,3 % entspricht.

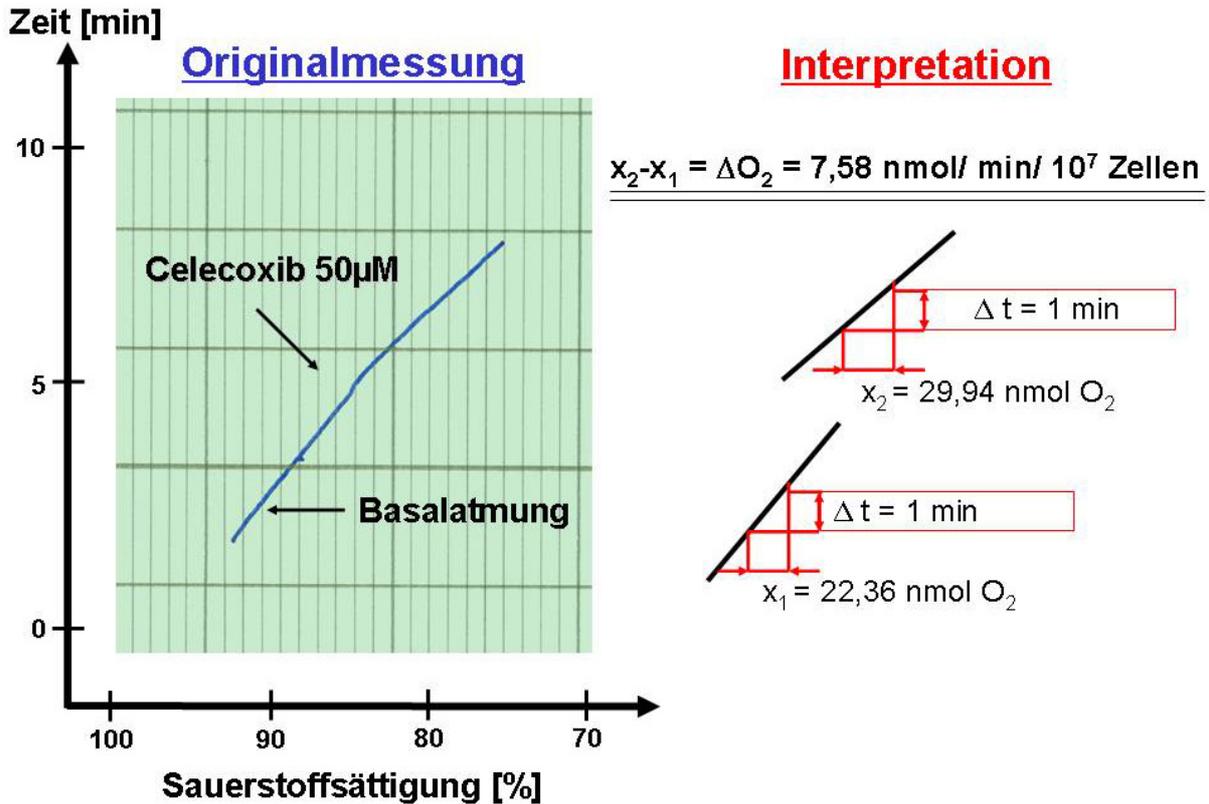


Abb. 20: links: Originalabbildung eines Sauerstoffverbrauchsexperimentes mit MG-63 Osteoblasten, gemessen mit der Clark-Elektrode. Nach Applikation von Celecoxib (SC-58635) 50 μM steigt die Zellatmung, so dass in der gleichen Zeiteinheit mehr Sauerstoff verbraucht wird.

rechts: Wiedergabe der Einzelanstiege der Zellatmung aus der Originalmessung (links) mit dazugehöriger numerischer Veränderung im Sauerstoffverbrauch. Dieser entspricht einer Zunahme um 25,3 %.

Die Zellatmung wurde auch nach 1 h und 24 h bestimmt, um die Veränderungen der Atmung über die Zeit zu erfassen.

In Vorexperimenten, welche den Einfluss der Negativkontrolle (DMSO) auf den Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten zeigen sollten, konnten keine Änderungen der Atmungsrate im angegebenen Inkubationszeitraum erkannt werden.

In der nachfolgenden Abbildung 21 wird die Veränderung des Sauerstoffverbrauches nach Applikation von Celecoxib 10 μM demonstriert. Folgende Aussagen lassen sich treffen:

Die basale Zellatmung von 21,84 $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^7$ Zellen veränderte sich nicht durch Zugabe von Celecoxib 10 μM ($21,63 \pm 1,97 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$ Zellen). Auch nach 1stündiger Inkubation wurde keine Veränderung des Sauerstoffverbrauches der MG-63 Osteoblasten durch Celecoxib 10 μM hervorgerufen. Erst nach einer Inkubation von 24 h mit Celecoxib 10 μM zeigte sich eine etwa 20 %ige Erhöhung der zellulären Atmung ($26,84 \pm 2,57 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$ Zellen), welche jedoch mit einem p-Wert von 0,078 nur einen ansteigenden Trend darstellt.

Ergebnisse

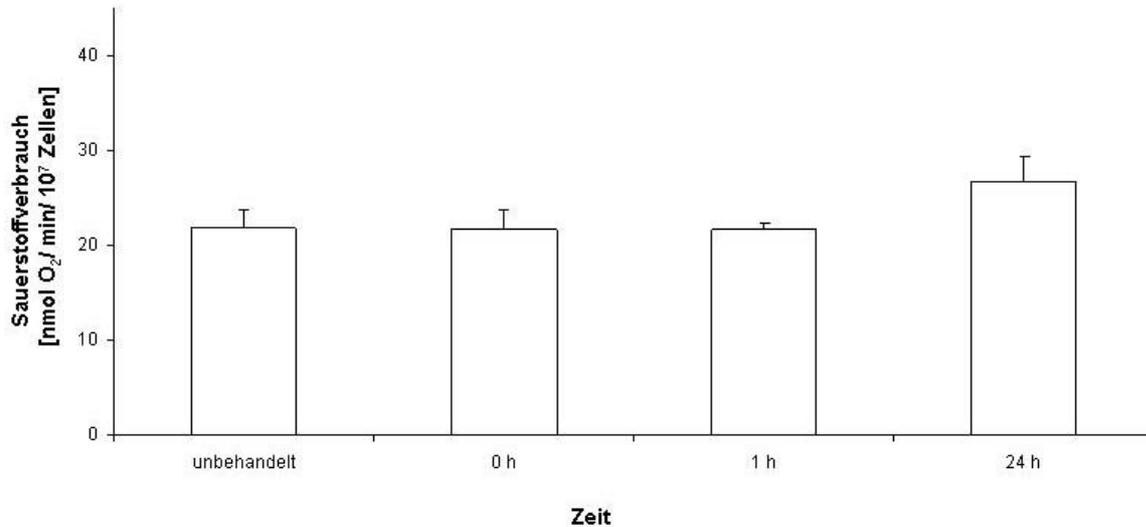


Abb. 21: Mittels Clark-Elektrode gemessener Sauerstoffverbrauch (nmol O₂/min/10⁷ Zellen) der MG-63 Osteoblasten nach Applikation von Celecoxib (SC-58635) 10 μM in Abhängigkeit von der Zeit; 0 h Werte spiegeln Soforteffekt nach direkter Substanzzugabe wider; Säulen entsprechen den Mittelwerten aus sechs unterschiedlichen Zellpräparationen; Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.

In der nachfolgenden Abbildung 22 ist die Veränderung des Sauerstoffverbrauches nach Applikation von Celecoxib 50 μM illustriert. Wiederum lassen sich folgende Aussagen treffen:

Im Unterschied zu Celecoxib 10 μM zeigt sich bereits unmittelbar nach Zugabe von Celecoxib 50 μM auf die Zellsuspension der MG-63 Osteoblasten ein signifikanter ($p = 0,031$) Soforteffekt bezüglich einer verstärkten Zellatmung ($30,94 \pm 2,67$ nmol O₂/min/10⁷ Zellen). Dieser Effekt ist nach 1 h noch deutlicher ausgeprägt und erreicht mit einem Sauerstoffverbrauch von $35,1 \pm 4,31$ nmol O₂/min/10⁷ Zellen wiederum Signifikanzniveau ($p = 0,031$). Auch noch nach 24 h bleibt ein erhöhter signifikanter ($p = 0,008$) Sauerstoffverbrauch ($35,81 \pm 3,09$ nmol O₂/min/10⁷ Zellen) bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe nachweisbar.

Vergleicht man den Sauerstoffverbrauch innerhalb der Gruppe der mit Celecoxib 50 μM behandelten MG-63 Osteoblasten zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h, dann verfehlt der verstärkte Verbrauch das Signifikanzniveau nur knapp ($p = 0,063$). Diese Tatsache bedeutet, dass der Sauerstoffverbrauch, der unmittelbar nach Celecoxib 50 μM-Zusatz schon so stark ansteigt, sich innerhalb der nächsten 24 h nur noch tendenziell weiter erhöht.

Ergebnisse

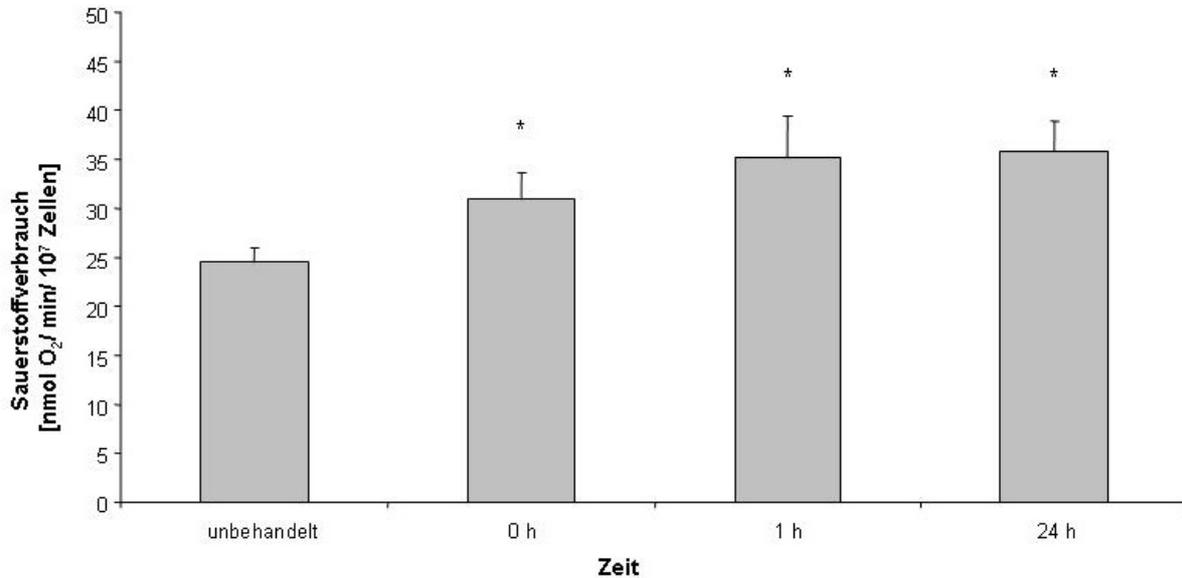


Abb. 22: Mittels Clark-Elektrode gemessener Sauerstoffverbrauch (nmol O₂/min/10⁷ Zellen) der MG-63 Osteoblasten nach Applikation von Celecoxib (SC-58635) 50 µM in Abhängigkeit von der Zeit; 0 h Werte spiegeln Soforteffekt nach direkter Substanzzugabe wider; Säulen entsprechen den Mittelwerten aus sechs unterschiedlichen Zellpräparationen; Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.; Signifikanzberechnungen nach Wilcoxon- Test (* p < 0,05 versus unbehandelt)

4.5.2 Effekte von FCCP und Celecoxib (SC-58635) in Kombination auf den Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten

Wie in Kapitel 4.5.1 gezeigt werden konnte, steigert Celecoxib den Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten konzentrations- und zeitabhängig. Es soll nun die Frage geklärt werden, über welchen Mechanismus eine derartige Steigerung der Zellatmung zustande kommt. Nach Formulierung der Hypothese, dass Celecoxib 50 µM die Zellatmung durch eine mögliche Entkopplung erhöhe, wurde das weitere experimentelle Vorgehen dieser Annahme angepasst. In diesem Zusammenhang wurde FCCP, als Entkoppler der Zellatmung, eingesetzt. Er wurde in einer üblichen Konzentration von 0,5 µM eingesetzt. Gemessen wurde zu Beginn wieder die Basalatmung unbehandelter MG-63 Osteoblasten. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse zur These der Atmungsentkopplung durch Celecoxib 50 µM präsentiert. Die Darstellungen sind hierbei in prozentualer Änderung des Sauerstoffverbrauches angegeben. Hierzu sind in Kapitel 3.6 die Substanzkombinationen beschrieben worden. Folgende Aussagen lassen sich treffen:

Die erste Säule von links spiegelt die sofortige Änderung des Sauerstoffverbrauches nach Applikation von FCCP 0,5 µM ohne eine vorherige Zugabe von Celecoxib 50 µM wider. In diesem Fall steigert FCCP 0,5 µM die Atmung um 75,45 % durch Entkopplung.

Mit der zweiten Säule wird die Änderung des Sauerstoffverbrauches durch FCCP 0,5 µM-Applikation nach vorheriger Celecoxib 50 µM-Zugabe gezeigt. FCCP 0,5 µM vermag jetzt nur noch eine Steigerung der Atmung um 53,26 % durch Entkopplung zu bewirken.

Die dritte Säule von links beschreibt den prozentual veränderten Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten nach Zugabe von Celecoxib 50 µM ohne FCCP 0,5 µM. Celecoxib 50 µM steigert die Atmung um 27,2 %, was in Übereinstimmung mit den im Kapitel 4.5.1 dargestellten Ergebnissen ist.

Ergebnisse

Mit der vierten Säule von links wird die Änderung des Sauerstoffverbrauches durch Celecoxib 50 μM -Applikation bei bereits zuvor durchgeführter FCCP 0,5 μM -Zugabe dargestellt. Celecoxib 50 μM ist jetzt nur noch in der Lage, die Atmung um 18,47 % durch Entkopplung zu steigern.

Da die Summe der beiden mittleren Säulen (80,46 %) annähernd den Wert der ersten Säule (75,45 %) wiedergibt, zeigen diese Daten, dass die Substanzen Celecoxib und FCCP synergistisch hinsichtlich einer Atmungsentkopplung wirken. Der Effekt der Steigerung des Sauerstoffverbrauches durch FCCP wird bei vorheriger Celecoxib 50 μM -Applikation reduziert. Wird Celecoxib 50 μM ohne FCCP den Zellen appliziert, ergibt sich annähernd die Differenz in der Änderung des Sauerstoffverbrauches, die dieser Reduktion entspricht. Somit lässt sich schlussfolgern, dass Celecoxib 50 μM die Steigerung der Atmung durch Entkopplung bewirkt.

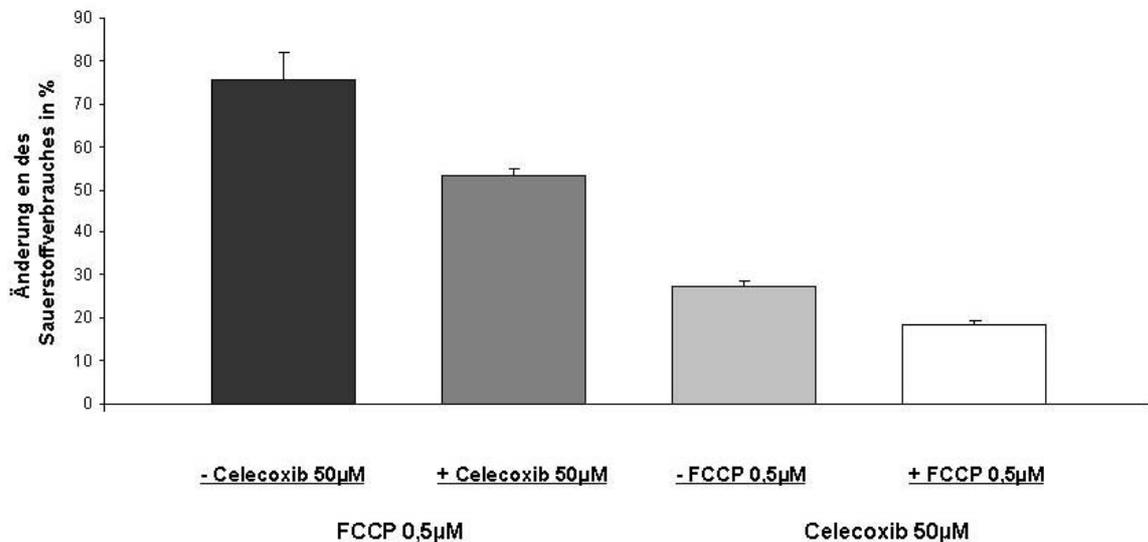


Abb. 23: Mittels Clark-Elektrode gemessene prozentuale Änderung des Sauerstoffverbrauches der MG-63 Osteoblasten nach Applikation von (linke Säule bis rechte Säule): 1. FCCP 0,5 μM ohne Celecoxib (SC-58635) 50 μM ; 2. Celecoxib (SC-58635) 50 μM mit anschließender FCCP 0,5 μM -Applikation; 3. Celecoxib (SC-58635) 50 μM ohne FCCP 0,5 μM ; 4. FCCP 0,5 μM mit anschließender Celecoxib (SC-58635) 50 μM -Applikation; Säulen entsprechen den Mittelwerten aus sechs unterschiedlichen Zellpräparationen; Fehlerbalken repräsentieren S.E.M.

4.6 Westernblot zur Proteindarstellung von HIF-1 α in Relation zu β -Actin

Die detaillierte Beschreibung von der Gewinnung der Proteinzelllysate bis zu der Peroxidasereaktion-vermittelten Lumineszenz der entsprechenden Antikörper auf einem Fotofilm erfolgte in Kapitel 3.7.

Die Durchführung der Experimente erfolgte mit der Intention, den Nachweis von HIF-1 α zur Validierung eines möglichen Hypoxiezustandes der inkubierten Zellen zu erbringen. Sollte der Sauerstoffgehalt des Medium nach Applikation von Celecoxib unter 5 % absinken, würde HIF-1 α zytoplasmatisch stabilisiert werden und nachweisbar sein.

Für die Experimente wurden MG-63 Osteoblasten verwendet, die mit DMSO (Negativkontrolle) bzw. Dexamethason 10^{-8} M oder Celecoxib (10 μM , 50 μM) inkubiert worden waren. Die Messzeitpunkte für diese Untersuchungen waren zu Beginn (0 h) und nach 24ständiger Inkubation. Es erfolgte jeweils die dreifache Wiederholung der Experimente aus drei unterschiedlichen Zellpassagen (Triplicates). Für den Nachweis einer korrekten experimentellen Vorgehensweise bei Verwendung reaktionsfähiger

Ergebnisse

Reagenzien wurde zur Überprüfung eine Positivkontrolle mitgeführt. Diese Positivkontrolle waren Zelllysate von PMA/Ionomycin stimulierten CD4+ T-Lymphozyten nach 6 h Hypoxie, welche in glukosehaltigem Medium inkubiert wurden. Die nachfolgende Abbildung 24 zeigt exemplarisch die Proteinblots eines der durchgeführten Experimente.

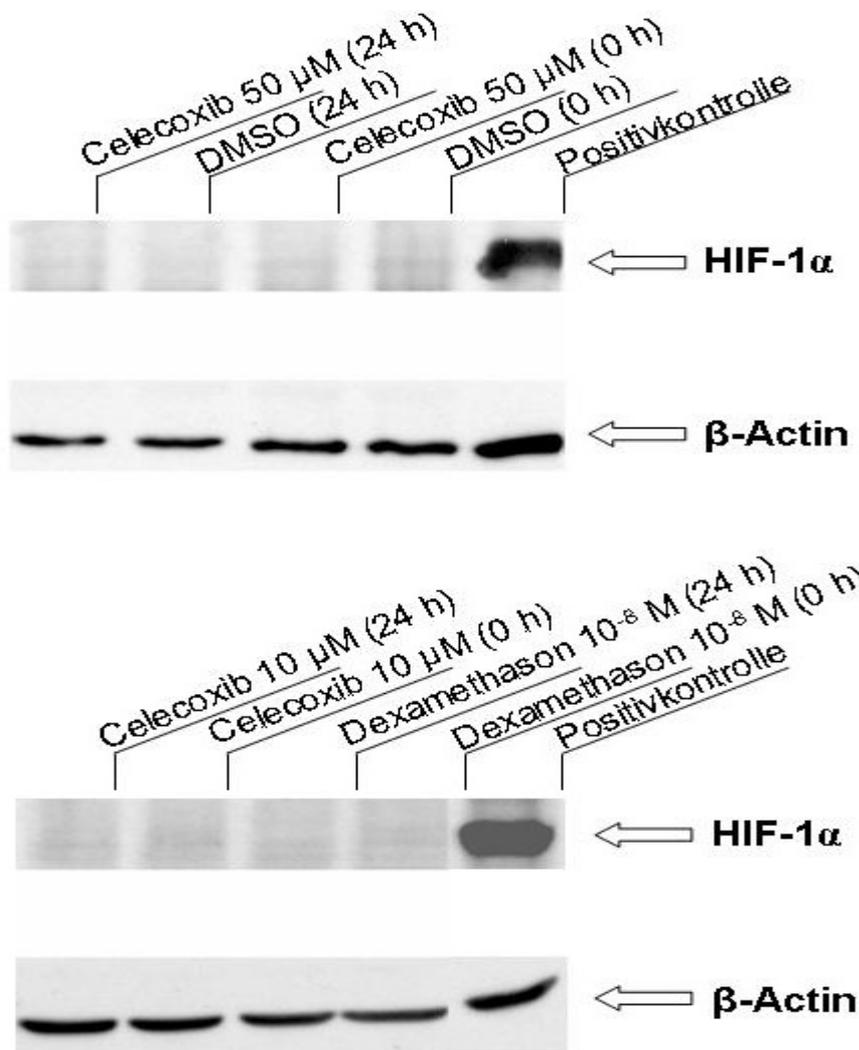


Abb. 24: Proteinblots zum Nachweis von HIF-1 α aus Zelllysaten von MG-63 Osteoblasten, die mit den angegebenen Substanzen behandelt wurden; Negativkontrolle: DMSO; Positivkontrolle: PMA/Ionomycin stimulierte CD4+ T-Lymphozyten nach 6 h Hypoxie und Inkubation in glukosehaltigem Medium; zur Beurteilung der Ladungsmenge ist β -Actin dargestellt

Weder bei Dexamethason 10⁻⁸ M, Celecoxib 10 μ M, Celecoxib 50 μ M noch für die Negativkontrolle (DMSO) konnte zu den untersuchten Inkubationszeitpunkten eine HIF-1 α -Expression nachgewiesen werden. Somit kann die intrazelluläre Präsenz von nicht degradiertem HIF-1 α innerhalb der beschriebenen experimentellen Vorgehensweise ausgeschlossen werden, was gegen die Annahme hypoxischer Verhältnisse (d.h. Sauerstoffgehalt des Mediums < 5 %) unter den dargestellten Inkubationsbedingungen spricht.