

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik II
mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Inhibition RANKL-induzierter
Differenzierung und Aktivierung humaner Osteoklasten
durch MG-132, MG-262, Bortezomib und Curcumin

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Holger Krebbel
aus Halle (Saale)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Sezer

2. Prof. Dr. med. V. Krenn

3. Prof. Dr. med. H. Peters

Datum der Promotion: 18.09.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Entdeckung des RANKL-RANK-OPG-Systems und seine Bedeutung in der Systemerkrankung multiples Myelom	1
1.2	M-CSF und RANKL – Kofaktoren bei Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten	3
1.3	NF- κ B – Steigerung der Osteoklastogenese und Aktivierung reifer Osteoklasten	5
1.4	Das Proteasom und der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg (UPS)	8
1.5	Medikamentöse Beeinflussungsmöglichkeiten	9
1.5.1	Proteasominhibition mittels MG-132, MG-262 und Bortezomib (Velcade, PS-341)	9
1.5.2	Das Polyphenol Curcumin (Diferuloylmethan)	11
1.6	Zielsetzung	13
2	MATERIALIEN UND METHODEN	14
2.1	Zellen und Materialien	14
2.1.1	Zellen	14
2.1.2	Geräte	14
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.4	Pharmaka/Chemikalien/Färbelösungen	15
2.1.5	Antikörper	18
2.1.6	Gebrauchsfertige Lösungen / Kits	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Vorbereitung von Osteoklastenmedium	19
2.2.2	Gewinnung von mononukleären Zellen	19
2.2.3	Gewinnung von adhärenenten mononukleären Zellen	20
2.2.4	Isolierung CD14-positiver Zellen	21
2.2.5	Reinheitsbestimmung der CD14 ⁺ -Zellpopulation	21
2.2.6	Vorbereitung der Testsubstanzen	22
2.2.7	MTT-Test zur Bestimmung der vitalen Zellfraktion	22
2.2.8	Dosisbestimmung/zytotoxischer Effekt der Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262	23
2.2.9	Dosisbestimmung/zytotoxischer Effekt von Curcumin	23
2.2.10	Vorversuch 1: Osteoklastendifferenzierung	24
2.2.11	TRAP (Tartrat-resistant acid phosphatase)-Färbung	24
2.2.12	Vorversuch 2: Osteoklastenfunktion	24
2.2.13	Quantitative Erfassung von TRAP-positiven Zellen	25
2.2.14	Quantitative Erfassung von Resorptionslakunen	25
2.2.15	NF- κ B-ELISA	26
2.2.16	Western Blot	27
2.3	Versuchsaufbau	29
2.3.1	Osteoklastendifferenzierung unter dem Einfluss von MG-132, MG-262 und Curcumin	29
2.3.2	Osteoklastenaktivität unter dem Einfluss von MG-132, MG-262 und Curcumin	29
2.3.3	NF- κ B-Aktivität unter dem Einfluss von MG-132, MG-262 und Curcumin	30
2.3.4	I κ B- α - und phospho-I κ B- α -Expression nach Behandlung mit Curcumin	31
2.3.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Bestimmung nach Curcuminbehandlung	31
2.3.6	Dosisermittlung/zytotoxischer Effekt von Bortezomib	32
2.3.7	Osteoklastendifferenzierung unter dem Einfluss von Bortezomib	33
2.3.8	Osteoklastenfunktion unter dem Einfluss von Bortezomib	33

2.3.9	NF- κ B-Aktivität unter dem Einfluss von Bortezomib	34
2.3.10	I κ B- α - und phospho-I κ B- α -Expression nach Behandlung mit Bortezomib	35
2.4	Graphische Auswertung	35
2.5	Statistische Auswertung	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Reinheit der isolierten CD14-positiven Zellen	37
3.2	Osteoklastenzüchtung	38
3.2.1	TRAP-Expression nach alleiniger Stimulation mit M-CSF	38
3.2.2	Osteoklastendifferenzierung nach Stimulation mit M-CSF und RANKL	38
3.2.3	Osteoklastenaktivität nach Stimulation mit M-CSF und RANKL	39
3.3	Dosisbestimmung/Zytotoxizität von MG-132, MG-262 und Curcumin	40
3.4	Untersuchungen mit den Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262	41
3.4.1	Osteoklastendifferenzierung unter Behandlung mit MG-132 und MG-262	41
3.4.2	Osteoklastenaktivität unter der Behandlung mit MG-132 und MG-262	43
3.4.3	NF- κ B-Aktivität unter der Behandlung mit MG-132 und MG-262	45
3.4.4	Zusammenfassung der Untersuchungen mit MG-132 und MG-262	46
3.5	Untersuchungen mit Bortezomib (PS-341, Velcade)	46
3.5.1	Zytotoxizitätsnachweis – MTT-Test für Bortezomib	47
3.5.2	Osteoklastogenese unter der Behandlung mit Bortezomib	48
3.5.3	Osteoklastenaktivität unter der Behandlung mit Bortezomib	49
3.5.4	NF- κ B-Aktivität unter der Behandlung mit Bortezomib	51
3.5.5	I κ B- und phospho-I κ B-Konzentration unter dem Einfluss von Bortezomib	52
3.6	Untersuchungen mit Curcumin	53
3.6.1	Osteoklastogenese unter der Behandlung mit Curcumin	53
3.6.2	Osteoklastenaktivität unter der Behandlung mit Curcumin	55
3.6.3	NF- κ B-Aktivität unter der Behandlung mit Curcumin	58
3.6.4	I κ B- und phospho-I κ B-Expression nach Behandlung mit Curcumin	59
3.6.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) – Bestimmung nach Curcuminbehandlung	60
3.6.6	Zusammenfassung der Untersuchungen mit Curcumin	61
4	DISKUSSION	62
4.1	Züchtung von humanen Osteoklasten	63
4.1.1	Stimulation mit M-CSF und RANKL bewirkt Osteoklastogenese	64
4.2	Rolle von NF-κB während Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten	65
4.3	Die Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262	66
4.4	Der Proteasominhibitor Bortezomib	68
4.5	Curcumin	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	LITERATURVERZEICHNIS	76

7	EIGENE PUBLIKATIONEN	83
8	DANKSAGUNG	84
9	CURRICULUM VITAE	85
10	ERKLÄRUNG ÜBER SELBSTÄNDIGKEIT	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP-1	Activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicin choninic acid
BMSC	Bone marrow stroma cell
CATK, CTSK	Cathepsin K
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
CO ₂	Kohlendioxid
CRM	Chromosome region maintenance
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FACS	Fluorescence-activated cell sorting/sorter
FKS	Fetales Kälberserum
GEMM	Granulocyte-erythrocyte-monocyte-macrophage
GM	Granulocyte-macrophage
HRP	Horseradish peroxidase
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IκB	Inhibitor of NF-κB
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco's Medium
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
JNK	Jun n-terminal kinase

LFA	Leucocyte function associated
MACS	Magnetic-activated cell sorting/sorter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MIP	Macrophage inhibitory protein
NES	Nuclear export sequence
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLS	Nuclear localization signal
OAF	Osteoclast activating factor
ODF	Osteoclast differentiation factor
OPG(L)	Osteoprotegerin (ligand)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
p-I κ B	Phosphoryliertes I κ B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK(L)	Receptor activator of nuclear factor kappa B (ligand)
RHD	c-Rel homology domaine
ROS	Reactive oxygen species
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
TAK	TGF- β -activated kinase
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
TRAP	Tartrat-resistant acid phosphatase
Ub	Ubiquitin

UPS	Ubiquitin-Proteasom-Signalweg
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late activation (integrin)

CHEMIKALIEN / LÖSUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
DCFDA	2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
PBS	Phosphate buffered saline
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin

EINHEITEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
I.E.	Internationale Einheit
l	Liter
M	Mol
m	Meter
min	Minute
s	Sekunde

EINHEITEN-Präfix

c	Zenti	(10 ⁻²)
m	Milli	(10 ⁻³)
μ	Mikro	(10 ⁻⁶)
n	Nano	(10 ⁻⁹)

1 Einleitung

Knochendestruktion durch Osteolysen ist ein Phänomen zahlreicher maligner Erkrankungen. Das multiple Myelom fungiert in diesem Zusammenhang als eine Modellerkrankung. So weist es die höchste Inzidenz von Knochendestruktionen unter den nicht-primär am Knochen manifestierten malignen Erkrankungen auf [Dahlin 1978]. Im Röntgenbild lassen sich osteolytische Areale zum einen als lokalisierte Defekte zum anderen als eine generalisierte Knochenresorption darstellen. Letztere imponiert im Röntgenbild wie eine diffus generalisierte Osteoporose.

Im Verlauf der Erkrankungen kommt es zu einem Ungleichgewicht im Knochenumbauprozess (*bone remodeling*) durch eine Aktivitätszunahme von knochenresorbierenden Osteoklasten sowie einer Aktivitätsabnahme von knochenaufbauenden Osteoblasten. Die Konsequenzen sind therapeutisch schwer beherrschbare Knochenschmerzen, pathologische Frakturen sowie eine Hyperkalzämie. Häufig sind die im Rahmen des Krankheitsprozesses auftretenden Wirbelkörperfrakturen ein Grund für die Entstehung von Kompressionssyndromen, die wiederholt eine chirurgische Intervention notwendig machen.

1.1 Die Entdeckung des RANKL-RANK-OPG-Systems und seine Bedeutung in der Systemerkrankung multiples Myelom

Der *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANKL) wurde als Mitglied der *tumor necrosis factor (TNF) ligand*-Superfamilie entdeckt und erhielt infolge der zeitgleichen Entdeckung durch mehrere Arbeitsgruppen zunächst unterschiedliche Bezeichnungen wie *osteoclast differentiation factor* (ODF), *osteoprotegerin ligand* (OPGL) und *TNF-related activation-induced cytokine* (TRANCE) [Anderson et al. 1997, Tan et al. 1997, Lacey et al. 1998, Kong et al. 1999]. Im menschlichen Körper kommt dieser im Knochenmark vorrangig in einer membrangebundenen und außerhalb des Knochenmarks in einer löslichen Form (sRANKL für soluble RANKL) vor. Der RANKL-Rezeptor (RANK) wird unter anderem auf Osteoklastenvorläufern und Osteoklasten exprimiert und aktiviert unter Vermittlung von *TNF-receptor associated factor 6* (TRAF6) die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, *activator protein 1* (AP-1) und p38 [Lee et al. 2003]. Dadurch kommt es zur vermehrten Differenzierung von Osteoklastenvorläufern und verstärkten Aktivierung reifer Osteoklasten. Zusätzlich führt die RANKL-RANK-Interaktion zu einem verlängerten Überleben von unreifen Vorstufen und reifen Osteoklasten.

Ein weiterer löslicher Rezeptor für RANKL ist das Osteoprotegerin (OPG), welches ohne transmembranäre Domäne als sezernierter TNF-Rezeptor im Körper vorliegt. *Osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF), *TNF-receptor-like molecule 1* (TR1) und Osteoprotegerin werden in der medizinischen Fachliteratur synonym gebraucht [Akatsu et al. 1998, Kwon et al. 1998].

Als Gegenspieler der Knochenresorption durch Osteoklasten neutralisiert es RANKL durch die Bildung eines löslichen Ligand-Rezeptor-Komplexes, der eine Bindung von RANKL an RANK verhindert. Unter physiologischen Bedingungen findet sich ein ausgewogenes Verhältnis dieser Partner, die ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau gewährleisten.

Myelomzellen exprimieren den RANK-Liganden auf ihrer Oberfläche [Sezer et al. 2002a, Sezer et al. 2002b]. Durch die Überexpression von RANKL im Knochenmark kommt es zu einer verstärkten Differenzierung der Vorläufer von Osteoklasten zu vielkernigen Riesenzellen, d.h. zu Osteoklasten. Diese ausdifferenzierten Zellen führen zu einem vermehrten Abbau von Knochenmatrix [Roodman 2004]. Des Weiteren reduzieren Myelomzellen den Bestand von OPG. Durch dessen Bindung an Syndecan, bekannt als CD138, auf der Oberfläche von Myelomzellen erfolgt die Aufnahme und der lysosomale Abbau von OPG [Sezer et al. 2003, Goranov et al. 2004].

Darüber hinaus modulieren andere Zytokine das RANKL-RANK-OPG-System. *Macrophage inhibitory protein-1 α* (MIP-1 α), sezerniert von Myelomzellen, kann das Gleichgewicht zugunsten von RANKL verschieben und somit wesentlich zur Osteoklastenaktivierung beitragen [Choi et al. 2000, Han et al. 2001, Abe et al. 2002, Terpos et al. 2003]. *Interleukin-1 β* (IL-1 β), *Interleukin-6* (IL-6) und *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), die einerseits von Stromazellen des Knochenmarks und Osteoblasten aber auch von Myelomzellen freigesetzt werden, führen zur Proliferation von malignen Plasmazellen und verhindern den Übergang in die Apoptose [Bataille et al. 1989, Cozzolino et al. 1989, Ge et al. 2000, Sezer et al. 2003]. Der Wachstumsfaktor IGF-1 wirkt zusätzlich als ein chemotaktischer Botenstoff auf Myelomzellen, was folglich zu einer verstärkten Adhäsion und Invasion der malignen Zellen führt [Qiang et al. 2004]. Zudem bewirken eine gleichzeitige Bindung von einigen Zytokinen, wie IL-6 und IGF an ihre Rezeptoren auf entarteten Myelomzellen einen synergistischen Effekt bezüglich der Proliferationsinduktion [Roodman 2002, Abroun et al. 2004].

Interessant ist diesbezüglich das Zusammenspiel von Myelomzellen, Stromazellen des Knochenmarks (*bone marrow stroma cells*, BMSCs) und Osteoklasten.

Die Produktion von IL-1 β , IL-6, IGF-1 und TNF- α durch Myelomzellen und BMSCs führt zur Expression zahlreicher Adhäsionsmoleküle wie den myelomzellständigen VLA4 und LFA1 sowie ihren Bindungspartnern VCAM1 und ICAM1, die sich auf Stromazellen befinden [Ludwig 2005, Zavrski et al. 2007]. Diese bewirken einen engen Kontakt von Myelomzellen und den sie umgebenden Stromazellen.

Die genannten Faktoren einerseits und die Interaktion über Adhäsionsmoleküle andererseits veranlassen eine Aktivierung intrazellulär gelegener NF- κ B-abhängiger Signalwege, die wiederum zur Produktion von IL-1 β , IGF-1, IL-6 und TNF- α führen und damit eine erneute Expression von Adhäsionsmolekülen bewirkt. Die Zytokine IL-1 β , IGF-1, IL-6, TNF- α zählen darüber hinaus zu den Osteoklasten-aktivierenden Faktoren (OAFs), die die RANKL-Sekretion sowie die Expression des Liganden auf Myelomzellen erhöhen [Bataille et al. 1997, Giuliani et al. 2001, Chng et al. 2005].

Die Befunde zeigen, dass beim multiplen Myelom nicht nur eine einseitige Beeinflussung von Osteoklasten durch Myelomzellen stattfindet, sondern vielmehr eine gegenseitige Stimulation in Form eines Circulus vitiosus zur Entstehung und zum Fortschreiten der Knochendestruktion im Verlauf der Erkrankung führt.

1.2 M-CSF und RANKL – Kofaktoren bei Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die auf die Resorption von Knochenmatrix spezialisiert sind. 2-10 Zellkerne enthalten die Zellen bei einer durchschnittlichen Größe von 50-100 μ m. Sie können sich aus der pluripotenten myelopoetischen Stammzelle (*colony forming unit*-GEMM, CFU-GEMM) über die Monozyten/Makrophagen-Zellreihe entwickeln.

Über die CFU-GEMM und die darauf folgende CFU-GM, die gemeinsame Stammzelle der Granulozyten- und Monozyten-Makrophagen-Reihe schlagen die Zellen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren die jeweilige Differenzierungsrichtung ein [Kurihara et al. 1990]. Eine entscheidende Rolle spielt dabei der von Osteoblasten sezernierte *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), Synonym CSF-1 [Hattersley et al. 1991, Hodge et al. 2004]. Nach Bindung an seinen Rezeptor c-Fms (Synonym CSF-1R), ein Rezeptor der auf allen Vorläuferzellen zu finden ist, kommt es zum Eintritt in die Monozyten-Makrophagen-Reihe [Suda et al. 1999].

Die Zellen durchlaufen zusammengefasst die Stufen CFU-GEMM → CFU-GM → Monoblast/Promonozyt → Monozyt → Makrophage.

Zudem führt die M-CSF-c-Fms-Interaktion zur Erhöhung der Expression von RANK, dem RANKL-Rezeptor [Miyamoto et al. 2003, Kitaura et al. 2005, Ross 2006].

Kommt es nun zur Stimulation durch RANKL-RANK-Interaktion so kann sich aus einer definierten monozytären Vorläuferzelle ein Osteoklast entwickeln: (CFU-GEMM) → CFU-GM → monozytärer Präkursor → Präosteoklast → Osteoklast [Roodman 1996, Matsuo et al. 2004].

Die CFU-GM konnte als früheste Form von Osteoklastenvorläuferzellen identifiziert werden [Ross 2006]. RANKL bewirkt nach Bindung an den RANK-Rezeptor die Expression von *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), *cathepsin K* (CTSK, CATK), *calcitonin receptor* (CTR) und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Vitronektin-Rezeptor), die typischerweise die Osteoklastenreihe charakterisieren (Abbildung 1) [Suda et al. 1999, Boyle et al. 2003].

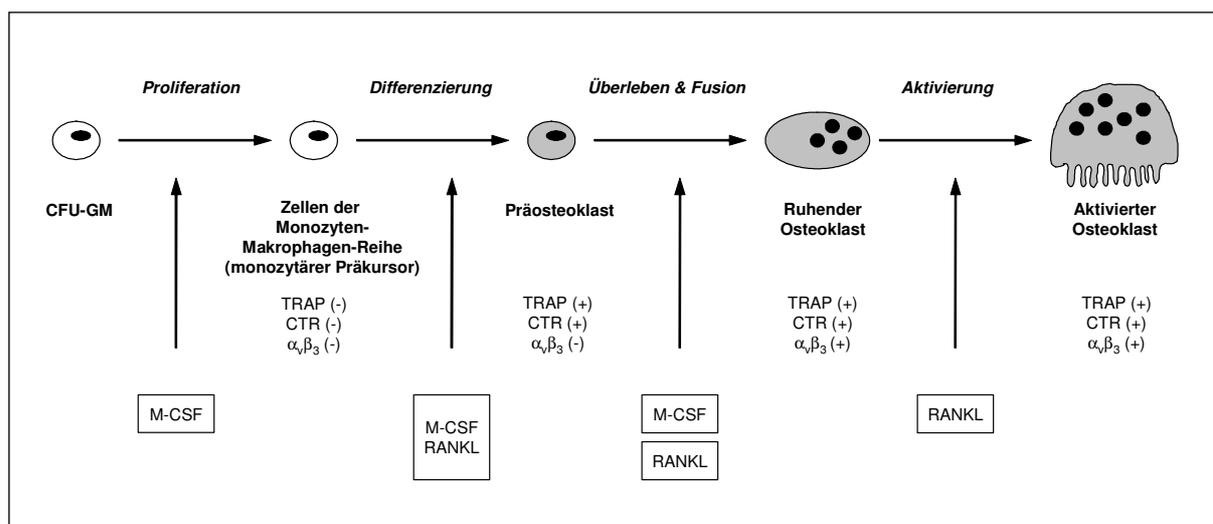


Abb. 1: Osteoklastenentwicklung aus der Vorläuferzelle der Granulozyten- und Monozyten/Makrophagen-Zellreihe (modifiziert nach Suda et al. Endocr Rev 1999, Boyle et al. Nature 2003). M-CSF: *macrophage colony stimulating factor*. RANKL: *receptor activator of nuclear factor kappa B*. TRAP: *tartrate-resistant acid phosphatase*. CTR: *calcitonin receptor*. $\alpha_v\beta_3$: Vitronektin-Rezeptor

Neben der kontinuierlichen Entwicklung aus der Knochenmarkstammzelle führt eine Stimulation mononukleärer Zellen (MNZ) bzw. Monozyten des peripheren Blutes mit M-CSF und sRANKL zur Fusion und zur Ausbildung von Osteoklasten [Udagawa et al. 1990]. In den etablierten In-vitro-Modellen zur Anzüchtung von Osteoklasten zeigen stimulierte Monozyten bereits nach 6-8 Tagen (Präosteoklasten) eine leichte, nach 10 Tagen eine deutliche TRAP- und CTSK-Aktivität.

Nach dem 10.-12. Tag bilden sich bereits erste mehrkernige Zellen, die deutlich größer erscheinen als die sie umgebenden Vorläufer [Karsdal et al. 2003].

1.3 NF- κ B – Steigerung der Osteoklastogenese und Aktivierung reifer Osteoklasten

Die Differenzierung zwischen Osteoklast oder Makrophage kann als Bifurkation innerhalb der myeloiden Reihe ähnlich der Ausreifung eines B- oder T-Lymphozyten in der lymphoiden Reihe angesehen werden. Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) bildet, gemeinsam mit AP-1, in myeloiden Vorläuferzellen eine Schnittstelle der Differenzierung. Allein die Interaktion der übergeordneten Ligand-Rezeptor-Interaktion entscheidet über die Weiterentwicklung in einen Osteoklasten oder Makrophagen. Die Bindung von RANKL an RANK würde dabei zur Differenzierung in einen Osteoklasten führen. Hingegen würde die Interaktion eines *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie dem Lipopolysaccharid von gramnegativen Bakterien, an den *Toll-like receptor 4* (TLR4) die Entwicklung zum Makrophagen nach sich ziehen [Matsuo et al. 2004]. Unabhängiger Kofaktor scheint dabei stets M-CSF zu sein [Wiktor-Jedrzejczak et al. 1990, Dai et al. 2002, Feng et al. 2002, Tolar et al. 2004]. Dendritische Zellen bilden eine weitere Möglichkeit der Differenzierung. Diese sind charakterisiert durch die Expression von RANK- und TLR-Rezeptoren. Entscheidender Unterschied ist bei diesem Differenzierungsarm die Notwendigkeit des Kofaktors *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) [Miyamoto et al. 2001].

NF- κ B steht als ein Überbegriff für die 5 Untereinheiten Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52) und deren Dimerisierung [Sha 1998]. Vor allem das Heterodimer RelA/p50, der Vertreter des klassischen Weges, führt im Rahmen der Osteoklastendifferenzierung zur Expression der typischen Osteoklastenprodukte TRAP, CTSK und dem Calcitoninrezeptor. Diese Marker der Osteoklastendifferenzierung werden jedoch nicht nur in Vorläufern durch den Einfluss von NF- κ B gebildet. Auch in ausgereiften Zellen kann der Transkriptionsfaktor über Nachfolgesignale die Produktion der Enzyme und Proteine induzieren und die Zellen zur vermehrten Resorption anregen. Zudem ist NF- κ B maßgeblich für ein verlängertes Überleben von Osteoklasten verantwortlich [Lee et al. 2003].

Als Folge der RANKL-RANK-Bindung kommt es zur Aktivierung von *TNF-receptor associated factors* (TRAFs), wobei der Subtyp TRAF6 als vorrangiges Ziel des RANK-Moleküls in Osteoklasten gilt. Über *TGF- β -activated kinase 1* (TAK1) wird ein *I κ B kinase* (IKK)-Komplex induziert, der den *inhibitor of NF- κ B* (I κ B) an den Serinresten 32 und 36 phosphoryliert (phospho-I κ B, p-I κ B) [Traenckner et al. 1995b, Chen et al. 1998, Wang et al. 2001]. Die Phosphorylierung von I κ B allein ist jedoch nicht ausreichend, um zu einer Aktivierung von NF- κ B zu führen. Die Phosphorylierung wird vielmehr als Voraussetzung für die Degradation von I κ B angesehen.

Erst die Ubiquitylierung und der anschließende Abbau von p-I κ B führen zur Freisetzung und damit zur Aktivierung von NF- κ B. Bereits durchgeführte Untersuchungen mit Proteasom-inhibitoren in HeLa-Zellen ließen den Schluß zu, dass nach der Phosphorylierung von I κ B ein NF- κ B-p-I κ B-Komplex vorliegen muss, der bei Stabilisierung von p-I κ B zu einer Hemmung von NF- κ B führt [Traenckner et al. 1995a]. Der dargestellte Weg wird als klassischer Signalweg bezeichnet (Abbildung 2).

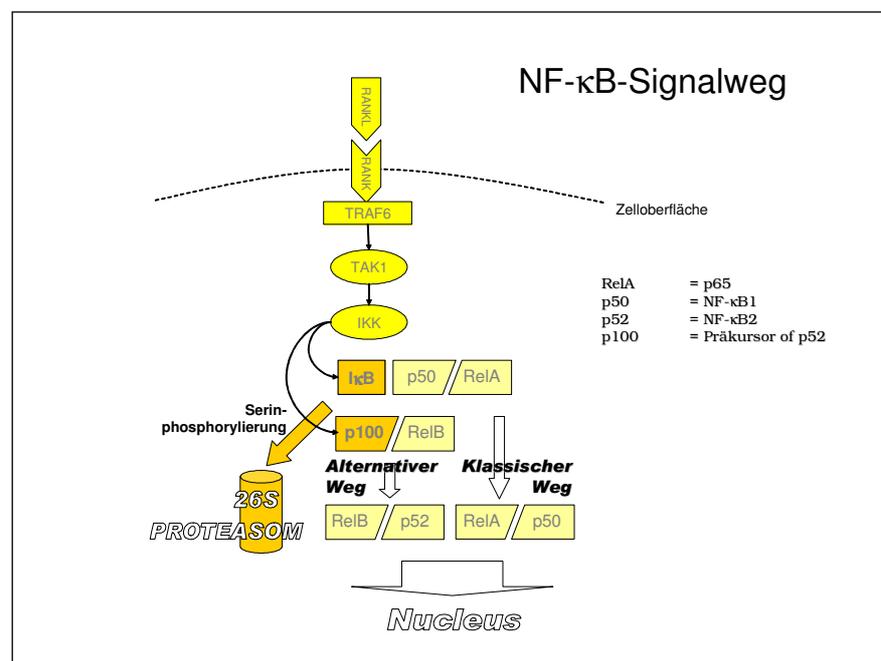


Abb. 2: Darstellung des klassischen und alternativen NF- κ B-Signalweges

Im klassischen NF- κ B-Signalweg besteht der IKK-Komplex aus den Untereinheiten IKK- α , IKK- β sowie der regulatorischen Komponente IKK- γ [Karin et al. 2004]. Vor allem die Untereinheit IKK- β aus dem IKK-Komplex scheint für die I κ B-Phosphorylierung in Osteoklasten zu sorgen [Ruocco et al. 2005].

I κ B als Inhibitor des klassischen Weges verfügt über 6-8 Ankyrin-Reste, mit Hilfe derer er an die zur DNA-Zielsequenzerkennung notwendige *c-Rel homology domain* (RHD) der NF- κ B-Moleküle bindet. In unphosphorylierter Form maskiert er dabei die *nuclear localization signals* (NLSs) und verhindert die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Jedoch konnte man zeigen, dass der Komplex aus RelA/p50/I κ B, wenn auch in deutlich geringerer Menge, im Kern vorkommt. Vermutlich, so lautet die Erklärung, ist I κ B in der Lage, nur das NLS einer NF- κ B-Untereinheit, also entweder die von RelA oder die von p50, zu blockieren.

Damit besteht trotz unphosphoryliertem I κ B die Möglichkeit des Komplexes, in den Kern zu translozieren. Der Gegenspieler des NLS, die *nuclear export sequence* (NES), ist ein Abschnitt, der sich innerhalb des I κ B-Moleküls, insbesondere der Hauptisoform I κ B- α , finden lässt und eine wesentlich höhere Aktivität aufweist. NES sorgt dafür, dass das Gleichgewicht zugunsten des auswärtsgerichteten Transports über CRM1, ein Transportmolekül der nukleären Membran, verschoben wird und sich somit eine weitaus größere Zahl des RelA/p50/I κ B-Komplexes im Zytosol befindet. Das Verhältnis von intrazytoplasmatischem zu intranukleärem NF- κ B-I κ B beträgt 10:1 [Carlotti et al. 2000]. In der Literatur wird der Prozess des Im- und Exports von NF- κ B-I κ B-Komplexen als *dynamic shuttling* bezeichnet [Ghosh et al. 2002]. Obwohl zahlreiche Forschungsgruppen diesen Vorgang demonstrieren konnten, bleibt die Frage bestehen, ob er im menschlichen Körper allgegenwärtig ist. Bisher konnte er vor allem in epithelialen Zellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden [Johnson et al. 1999, Carlotti et al. 2000, Huang et al. 2000].

Zusätzlich zum klassischen Weg existiert ein alternativer NF- κ B-Signalweg. Dieser spielt, wie man kürzlich herausfand, in Osteoklasten vorrangig eine modulatorische Rolle, kann jedoch auch als ein Reserveweg zur klassischen NF- κ B-Aktivierung in Präosteoklasten dienen [Novack et al. 2003, Ruocco et al. 2005]. Er ist charakterisiert durch die Anwesenheit eines IKK-Komplexes, der aus einem Homodimer von IKK- α Untereinheiten besteht.

Nur diesem Komplex ist es erlaubt, den Präkursor p100 zu aktivieren. P100 liegt im Zytosol der Zelle als eine p52-Untereinheit vor, die neben der RHD eine autoinhibitorische I κ B-ähnliche Domäne besitzt. Nach Phosphorylierung durch IKK- α wird der Vorläufer dem 26S-Proteasom zugeführt, aus dem er, befreit von seinem autoinhibitorischen Partner, als p52 heraustritt. P100 dient somit zum einen als Reservoir für p52 und zum anderen als ein I κ B-Molekül, welches im Zytosol RelA oder RelB inhibiert [Karin et al. 2004].

1.4 Das Proteasom und der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg (UPS)

Die exakte Kontrolle des Proteinhaushalts ist essentiell für die Funktionalität und das Überleben einer Zelle. In Eukaryoten übernimmt ein intrazellulär gelegener multikatalytischer Proteinasekomplex, das Proteasom, die Aufgabe des Proteinabbaus und sorgt so für ein an die Anforderungen der Zelle angepasstes Proteinmilieu. Mehrere Formen von Proteasomen wurden bereits in eukaryotischen Zellen entdeckt. Jedoch ist das 26S Proteasom der Vertreter, der im Ubiquitin-Proteasom-Signalweg (UPS) die Hauptrolle einnimmt. 2 Untereinheiten bilden das 26S Proteasom. Die zentrale 20S-core-Einheit, bestehend aus 4 Ringen, besitzt proteolytische Aktivität. Die jeweils an den Enden sitzenden 19S-Einheiten haben eine regulatorische Aufgabe.

Die 4 Ringe der core-Einheit lassen sich in eine zentrale β -Einheit und 2 periphere α -Einheiten unterteilen. Diese Einheiten bestehen wiederum aus 7 Untereinheiten (α 1- α 7, β 1- β 7), die Ähnlichkeiten mit verschiedenen Enzymen aufweisen. β 2 besitzt trypsin-ähnliche, β 5 chymotrypsin-ähnliche und β 1 post-glutamyl-peptidyl-hydrolytische (PGPH) Aktivität [Hershko et al. 1998]. Diesen Untereinheiten konnten Schnittpräferenzen an der Carbonylgruppe von basischen, hydrophoben und sauren Aminosäuren nachgewiesen werden [Somasundaram et al. 2002].

Bevor es zum proteasomalen Abbau kommen kann, muß ein Protein mittels Ubiquitin (Ub), das aus 76 Aminosäuren besteht, gekennzeichnet werden. Dies geschieht durch ATP-abhängige Ubiquitinylierung im UPS. Nacheinander wirken ein E1 Ub-aktivierendes Enzym, ein E2 Ub-konjugierendes Enzym und eine E3 Ub-Ligase, welche zum Aufbau und Konjugation einer Polyubiquitinkette an das Zielprotein führen. Die 19S-Untereinheit des Proteasoms erkennt diese Markierung, löst die Kette wieder ab und übergibt das entfaltete Protein an die 20S-Untereinheit. Diese sorgt daraufhin für die Spaltung des Proteins in Peptide von 3-12 Aminosäuren Länge [Goldberg et al. 1997, Hershko et al. 1998]. Der Bestand von 80% der intrazellulär gelegenen Proteine wird so durch das Proteasom reguliert.

Es folgt nach Ubiquitinylierung der Abbau von IκB, c-Fos, c-Jun, p44/p42 MAPK (ERK 1/2), den cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren p21 und p27, dem Tumorsuppressor p53 und dem proapoptotischen Faktor Bax im katalytischen Zentrum des Proteinasekomplexes [Salvat et al. 1999, Ludwig 2005, Zavrski et al. 2007]. Gemeinsam ist diesen Faktoren und Enzymen, dass sie wesentlich zur Differenzierung, Proliferation und Apoptosesuppression von Zellen beitragen.

1.5 Medikamentöse Beeinflussungsmöglichkeiten

1.5.1 Proteasominhibition mittels MG-132, MG-262 und Bortezomib (Velcade, PS-341)

Betrachtet man die zentrale Stellung des Proteasoms innerhalb einer Zelle, drängt sich der Gedanke auf, dass eine Hemmung des ubiquitär vorkommenden Komplexes unweigerlich und in kürzester Zeit zum Tod jeder Zelle eines gesunden oder kranken Organismus führen würde. Jedoch ist dies nicht der Fall. Eine gesunde ausdifferenzierte Zelle scheint im Gegensatz zu einer transformierten Krebszelle weniger empfindlich gegenüber einer Proteasominhibition zu sein. Die Erklärung dafür ist, dass in Krebszellen ein weitaus höherer Proteinumsatz herrscht und die Prozesse Differenzierung und Proliferation in einem gesteigerten Tempo ablaufen. Dies führt zu einer Zunahme der Proteasomaktivität. Durch den vermehrten Abbau von Tumorsuppressorproteinen und Apoptoseinduktoren mit Hilfe des Proteasoms entziehen sich diese Zellen der natürlichen Proliferationsinhibition und Zelltodinduktion [Cavo 2006, Dahlmann 2007].

Eine Hemmung des Proteasoms würde also nicht nur zur Einschränkung des Tumorwachstums sondern auch zum Untergang bereits vorhandenen Tumorgewebes führen. Beide Vorgänge konnten unter Verwendung von Proteasominhibitoren bereits in Zelllinien des multiplen Myeloms demonstriert werden [Zavrski et al. 2003].

Neben der Wachstumshemmung und der Apoptoseinduktion von malignen Zellen scheinen Proteasominhibitoren, auch gesunde proliferierende Zellen mit hohem Proteinumsatz zu beeinflussen. Vor allem die intrazelluläre Herunterregulation von NF-κB und der Einfluss von Bortezomib auf MAPK-Kaskaden führten zu der Annahme, dass eine Beeinflussung der Differenzierung und Funktion von Osteoklasten möglich ist.

Als Substanzen zur Hemmung des Proteasoms existieren derzeit das natürlich vorkommende, aus Streptomyceten stammende Lactacystin und die synthetisch hergestellten Inhibitoren MG-132, MG-262 und Bortezomib, welches sich bereits in klinischer Anwendung befindet.

Das Tripeptidalddehyd MG-132 hemmt reversibel β 1- und β 2-Untereinheiten des Proteasoms und wirkt zusätzlich auf andere Proteasen der Zelle, wie Calpain und Cathepsin B. Es gilt als ein unspezifischer und biologisch instabiler Inhibitor [Crawford et al. 2006]. Die Vertreter der nächsten Generation, die Boronsäuredipeptide MG-262 und Bortezomib, wirken wesentlich spezifischer. Beide binden reversibel vor allem an die β 5-Untereinheit des Proteasoms [Goldberg et al. 1997].

Bortezomib zeigte in Versuchen sowohl gegen solide als auch gegen hämatologische Tumorerkrankungen deutliche Antitumoraktivität. Unter der Behandlung verschiedenster Zelllinien kam es nicht nur zu einem Wachstumsrückgang, sondern gleichzeitig zur Apoptoseinduktion. Dies betraf insbesondere als therapieresistent geltende Zellstämme [Orlowski et al. 2006]. Dabei sind diese malignen Zellen 20-40mal sensitiver gegenüber der Apoptoseinduktion durch Bortezomib als gesunde mononukleäre Zellen aus peripherem Blut [Hideshima et al. 2001].

Erwähnenswert ist, dass auch die für die Progredienz der Tumormasse entscheidende Angiogenese durch Bortezomib gehemmt wird [Hideshima et al. 2003]. Darüber hinaus erhöht Bortezomib die Sensibilität von Tumorzellen gegenüber anderen Zytostatika [Ma et al. 2003, Voorhees et al. 2003, Chauhan et al. 2005].

Die Effekte sind vor allem auf die Inhibition des I κ B-Abbaus zurückzuführen, die zu einer Abnahme des intrazellulär wirksamen NF- κ B führt [Traenckner et al. 1994]. Bestätigung findet diese Annahme durch den Nachweis einer erhöhten NF- κ B-Aktivität innerhalb therapieresistenter Zellstämme [Voorhees et al. 2003]. Neben der Stabilisierung von I κ B scheint Bortezomib den Abbau von c-Fos- und c-Jun, Mitglieder der AP-1-Familie, zu beeinflussen [Stancovski et al. 1995].

Die hier aufgeführten Vorteile von Bortezomib und die Vielzahl von Ergebnissen präklinischer Untersuchungen führten zur Anwendung der Substanz bei soliden Tumoren und hämatologischen Tumorerkrankungen im Rahmen von Phase I- und Phase II-Studien [Orlowski et al. 2002]. Bei Patienten mit fortgeschrittenem multiplen Myelom konnte unter der alleinigen Therapie mit Bortezomib die mediane Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung von 3 Monaten auf mehr als das Doppelte gesteigert werden [Richardson et al. 2003]. Die Ergebnisse dieser Studie veranlassten die FDA (*Food and Drug Administration*) bereits zur Zulassung von Bortezomib bei Patienten mit rezidiviertem multiplen Myelom.

1.5.2 Das Polyphenol Curcumin (Diferuloylmethan)

Die Analyse der Ernährung wird zunehmend für die Klärung der Ätiologie sowie der Präventionsmöglichkeiten bestimmter Tumorentitäten eingesetzt. Der asiatische Raum ist dabei von besonderem Interesse. Verglichen mit westlichen Ländern ist in diesem Teil der Welt eine weitaus geringere Inzidenz von bestimmten Krebserkrankungen nachweisbar. Es fiel auf, dass unter der Beibehaltung traditioneller Ernährungsgewohnheiten deutlich weniger kolorektale Tumoren, Prostata- und Lungenkarzinome auftraten [Sinha et al. 2003].

Indien besitzt eine auf der Welt einzigartige Ernährungszusammenstellung. Ständig werden dort neue Inhaltsstoffe entdeckt, die das Interesse von Medizinern und Pharmakologen wecken. Eines dieser Inhaltsstoffe ist Curcumin. Als Bestandteil von Curry, einem in Indien weit verbreiteten Gewürz aus der Pflanze *Curcuma longa* (Zingiberaceae), wird Curcumin hierzulande aufgrund seiner intensiven gelben Farbe als E100 zur Farbakzentuierung in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie verwendet.

Aus pharmazeutischer Sicht besitzt Curcumin mehrere Eigenschaften und Wirkungen, die es mehr und mehr als Therapeutikum in den Vordergrund der westlichen Medizin rücken lässt. So induziert es Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien [Chen et al. 1998, Deeb et al. 2003], verhindert die chemische Karzinogenese durch Benzpyrene in Mausepidermiszellen [Conney et al. 1991], wirkt als antiinflammatorische Substanz durch Hemmung der Cyclooxygenase II [Zhang et al. 1999] und Lipoxygenase [Huang et al. 1991, Aggarwal et al. 2003].

Curcumin inhibiert darüber hinaus die Proteinkinase C (als Phosphatidylserinanalogen), Xanthinoxidase [Lin et al. 1997, Abroun et al. 2004] und die *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) [Ito et al. 2006] und moduliert die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) [Somasundaram et al. 2002, Balasubramanyam et al. 2003, Chan et al. 2003, Zhu et al. 2004, Chan et al. 2005, Sharma et al. 2005]. Des Weiteren interagiert Curcumin stark mit dem NF- κ B [Bharti et al. 2003, Aggarwal et al. 2005, Singh et al. 2006]- und AP-1-Weg [Huang et al. 1991, Sharma et al. 2004, Fullbeck et al. 2005].

Das sind Tatsachen, welche diese Substanz auch zur Erforschung neuer Beeinflussungsmöglichkeiten von Osteoklasten interessant machen. Ziele innerhalb der Signalwege sind der IKK-Komplex, die JNK und die AP-1-DNA-Sequenz, an die Curcumin komplementär bindet [Huang et al. 1995, Chen et al. 1998, Lin et al. 2001, Jana et al. 2004]. Erwähnenswert ist auch, dass Curcumin scheinbar mit dem Ubiquitin-Proteasom-Signalweg und dem Proteasom in Kontakt tritt [Wyke et al. 2004].

Dabei wirkt es, so die Vermutung, entweder direkt auf die 20S-core-Einheit des Proteasoms oder indirekt über die Inhibition einer Ubiquitin-Isopeptidase, welche für die Freisetzung von Ubiquitin-Monomeren aus beim Proteinabbau übrig gebliebenen Polyubiquitinketten sorgt. Ein Überangebot von Polyubiquitinketten innerhalb der Zelle hemmt das Proteasom und bahnt in sich schnell differenzierenden Zellen den Weg in die Apoptose [Jana et al. 2004].

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung moderner Therapeutika auf die Genese und Funktion von humanen Osteoklasten darzustellen. MG-132, MG-262 und Bortezomib aus der Gruppe der Proteasominhibitoren sowie Curcumin werden dabei zur Behandlung eingesetzt. Besonderes Augenmerk wird in der vorliegenden Arbeit auf das Polyphenol Curcumin und den Proteasominhibitor Bortezomib gerichtet, welcher sich in der Therapie des rezidivierenden multiplen Myeloms bereits als mögliche Behandlungsoption ausweisen konnte.

Zur Klärung der Wirkungsmechanismen der Substanzen werden die Effekte auf die für Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten entscheidende NF- κ B-Aktivität untersucht. Die Basis der Untersuchungen sollen einen sowohl qualitativen Vergleich als auch lichtmikroskopische Zählungen von humanen Osteoklasten und deren Resorptionslakunen beinhalten. Parallel dazu werden die NF- κ B-Aktivitäten innerhalb der Osteoklasten mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens ermittelt.

Die Erfassung des NF- κ B-Inhibitors I κ B und seiner phosphorylierten Form p-I κ B in einer Western-Blot-Analyse sollen Rückschlüsse auf Angriffspunkte von Bortezomib und Curcumin geben. Es soll auf diese Weise festgestellt werden, ob eine Beeinflussung von NF- κ B-Aktivatoren wie zum Beispiel der IKK vorliegt.

Die erhobenen Befunde werden sich auf Beobachtungen von Kulturen zur Anzucht von Osteoklasten aus humanen Osteoklastenvorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Zellreihe beziehen. Die Isolierung möglicher Vorläuferzellen aus peripherem Blut gesunder Probanden wird dabei einerseits über Adhäsion, andererseits über Selektion CD14-positiver Zellen erfolgen. Ein Vergleich dieser beiden Methoden soll kurz dargestellt und deren jeweilige Vorzüge bzw. Nachteile aufgezeigt werden. Beobachtungsergebnisse aus unbehandelten Kulturen werden einzeln und im Vergleich zu behandelten Kulturen analysiert. So sollen die Eckpunkte der humanen Osteoklastenentwicklung aufgezeigt und die Wirkung der Stimulation mit M-CSF und RANKL anhand mikroskopischer Veränderungen der Zellkulturen dargestellt werden.

2 Materialien und Methoden

Die Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Inhalten der Deklaration von Helsinki von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität zu Berlin überwacht.

2.1 Zellen und Materialien

2.1.1 Zellen

Die Gewinnung der mononukleären Zellen/*Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) aus Vollblut erfolgte durch Entnahme von 120-160 ml Blut mittels Punktion einer peripheren Vene weiblicher und männlicher gesunder Probanden im Alter zwischen 27 und 35 Jahren. Einverständniserklärungen zu der Punktion wurden durch die Probanden erteilt.

2.1.2 Geräte

Gerät	Firma
HERAsafe (Laminarbank)	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACSCalibur (Durchflußzytometer)	Becton Dickinson, San Jose, CA USA
Anthos ht 2 (Multiwellspektrophotometer)	Anthos, Salzburg, Österreich
Fluoreszenzspektrophotometer F2000	Hitachi Ltd., Tokio, Japan
IKA KS 130 basic (Tischschüttler)	IKA, Staufen, Deutschland
Tischwaage LE 2100	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Universal 30F (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Biofuge fresco (Zentrifuge)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio Rad-Laboratories, Hercules, CA USA
Power Pac 200	Bio Rad-Laboratories, Hercules, CA USA
Trans-Blot SD	Bio Rad-Laboratories, Hercules, CA USA
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Knochensäge Exakt 36/79	Apparatebau GmbH Norderstedt, Deutschland
Mikrolasermikroskop, P.A.L.M.	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland
Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena, Deutschland

Canon Digital IXUS 300	Canon, Krefeld, Deutschland
Canon Remote Capture 2.7.5.	Canon, Krefeld, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-, 12-, 96-well-Platten	Falcon, Becton Dickinson, CA USA
24-well-Platten	Falcon, Becton Dickinson, CA USA
	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen (Durchmesser 10 cm)	Falcon, Becton Dickinson, CA USA
Leucosep-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Elfenbein/Dentin	Muskuloskeletales Forschungszentrum Prof. Duda, Berlin, Deutschland

2.1.4 Pharmaka/Chemikalien/Färbelösungen

Substanz	Hersteller
Testsubstanzen	
MG-132	Biomol, Hamburg, Deutschland
MG-262	Biomol, Hamburg, Deutschland
Curcumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bortezomib	Millennium Pharm., Cambridge, MA USA
Zellkultur	
M-CSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Peprotech, Rockhill, NJ USA
RANKL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Peprotech, Rockhill, NJ USA
Biocoll Separation Sol. ($\varphi = 1,077$ g/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MEM Eagle Alpha Modification (α -MEM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin 10.000 I.E.	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Streptomycin 10.000 µg/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA 10X (0,5/0,2%)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Accutase 1X	Chemicon/Millipore Ochsenhausen, Deutschland

Natriumhypochlorit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
DCFDA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Trypanblau (0,5%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany

Western Blot

Lysispuffer

Substanz	Menge
Tris	20 mM
NaCl	137 mM
Glycerol	10% (w/v)
Triton X-100	1% (w/v)
EDTA	2 mM
Sodiumorthovanadat	1 mM
1 x Complete Protease Inhibitor	1 Tablette

Stripping Buffer

Substanz	Menge
β-Mercaptoethanol	100 mM
SDS	2% (w/v)
Tris-HCl pH 6,7	62,5 mM

Ladepuffer (4 X)

Substanz	Menge
Tris-HCl pH 6,8	100 mM
Glycerin	20% (w/v)
SDS	4% (w/v)
Bromphenolblau	0,2% (w/v)
DTT	200 mM

Elektrophoresepuffer (10 X)/

Laufpuffer

Substanz	Menge
Tris-Base	250 mM
Glycin	1920 mM
SDS	1% (w/v)

Transferpuffer

Substanz	Menge
Tris-Base	250 mM
Glycin	1920 mM
SDS	1% (w/v)
Methanol	10% (v/v)

Trenngele

	10%	12%
Aqua dest.	5,9	5,0
30% Acrylamide Mix (Roti-Phorese 30)	5,0	6,0
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,8	3,8
10% SDS	0,15	0,15
10% APS	0,15	0,15
TEMED	0,006	0,006
Angaben in ml		

Superblotto

Substanz	Menge
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1% (v/v)
NP40 (Igepal®)	0,5% (v/v)
BSA Fraktion V	0,5% (w/v)
Milchpulver	2,5% (w/v)

PBST

PAA, Cölbe, Deutschland

TBST

PAA, Cölbe, Deutschland

Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Coomassie Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ECL Detektionsreagenz	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ USA
Luminol	Santa Cruz Europe, Heidelberg, Deutschland
Entwickler	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fixierer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fotopapier	Kodak, Deutschland
NP40 (Igepal [®])	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Re Blot Plus (Stripping Solution)	Chemicon/Millipore, Ochsenhausen, Deutschland

2.1.5 Antikörper

Produkt	Hersteller
CD14-Selektion über MACS-Säule	
Anti-CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
FACS-Analyse	
Anti-CD14/CD45-Antibody	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Isotypic Control (IgG1-PE), Mouse	Immunotech, Marseille, Frankreich
Primärantikörper	
Anti-I κ B- α Antibody, Rabbit	Santa Cruz Europe, Heidelberg, Deutschland
Anti-phospho-I κ B- α (Ser 32), Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA USA
Anti-Actin (I-19), Goat	Santa Cruz Europe, Heidelberg, Deutschland
Sekundärantikörper	
Bovine Anti-Rabbit IgG HRP	Santa Cruz Europe, Heidelberg, Deutschland
Rabbit Anti-Goat IgG HRP	Dako, Hamburg, Deutschland

2.1.6 Gebrauchsfertige Lösungen / Kits

Produkt	Hersteller
Acid Leucocytosphatase Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TransAM NF κ B p65/NF κ B p50- Transcription Factor Assay Kit	Actif Motif, Rixensart, Belgien
Nuclear Extract Kit	Actif Motif, Rixensart, Belgien
BCA -Assay	Pierce, Rockford, IL USA
MTT labeling reagent 1 & 2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.2 Methoden

Die folgenden Versuchsaufbauten sowie die Versuchsdurchführung wurden aus Arbeiten entnommen, die Hinweise zur Kultivierung von Primärkulturen geben [Lindl et al. 1994]. Zum anderen wurden Protokolle aus Arbeiten verwendet, die die Anzüchtung von humanen Osteoklasten aus peripheren Blutmonozyten zum Gegenstand haben [Flanagan et al. 2003, Karsdal et al. 2003, Sabokbar et al. 2003, Schilling et al. 2004].

2.2.1 Vorbereitung von Osteoklastenmedium

Als Medium zur Züchtung von humanen Osteoklasten diente *Minimum Essential Medium – Alpha Modification* (α -MEM), dem fetales Kälberserum (FKS) 1:10, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin hinzugefügt wurden. In den hier aufgeführten Experimenten wurde stets diese Mediummischung verwendet und als Osteoklastenmedium bezeichnet.

Es wurde lediglich die Stimulation bzw. die Behandlung der Zellen verändert. Veränderungen, die die Stimulation von Zellen betreffen, werden zu jedem Experiment explizit angegeben. Darüber hinaus werden hinzugefügte Testsubstanzen und ihre Konzentration angegeben.

2.2.2 Gewinnung von mononukleären Zellen

Von weiblichen und männlichen gesunden Probanden im Alter zwischen 27-35 wurde zunächst 120-160 ml Venenblut entnommen. Um die Gerinnungsfähigkeit des Blutes herabzusetzen wurden 250 I.E. Liquemin (Heparin-Natrium) pro ml Vollblut verwendet.

Das heparinisierte Vollblut wurde auf *Biocoll seperation solution* (Ficoll) mit einer Dichte von $\rho = 1,077 \text{ g/ml}$ in 50 ml Leucosep-Röhrchen gegeben und eine Dichtegradientenzentrifugation bei 1000g für 10 min bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Leucosep-Röhrchen enthalten eine hochtransparente Polypropylenscheibe, die die mononukleäre Zellen in Form eines so genannten *buffy coats* von Ficoll und den restlichen Zellen trennt. Dies ermöglicht das einfache Dekantieren der mononukleären Zellfraktion in separate Röhrchen. Die gewonnene Zellsuspension enthält v.a. T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie Monozyten. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS mittels Zentrifugation bei 120g für 10 min bei RT gewaschen.

2.2.3 Gewinnung von adhärenenten mononukleären Zellen

Die gewonnenen Zellen wurden in Osteoklastenmedium resuspendiert und in einer Dichte von $2 \times 10^6 \text{ Zellen/cm}^2$ in Petrischalen (Durchmesser = 10 cm) ausgesät. Es folgte das Hinzufügen der Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml). Die Dosierung der Wachstumsfaktoren wurde aus Vorarbeiten und Vorversuchen entnommen, die die Kultivierung von humanen Osteoklasten zum Thema haben. Es wurde darauf geachtet, dass einheitliche Monolayer-Kulturen (einschichtige Kulturen) mit physiologischen Zellzwischenräumen entstehen. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Nach 24 Stunden wurden die Kulturen mit Hilfe von PBS durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren 3 x 2 min bei RT gewaschen und so von nicht adhärenenten Zellen getrennt. Auf die am Boden der Petrischalen haftenden Zellen wurde Accutase bzw. Trypsin-EDTA gegeben, und diese Ansätze wurden im Brutschrank für etwa 6 min inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit erfolgten die Reduktion der Trypsinaktivität durch Hinzufügen von FKS und die vorsichtige Ablösung der Zellen von ihrer Unterlage mittels Zellschaber. Die Zellen wurden dreimalig mit PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte dabei jeweils mit 120g für 10 min bei RT.

Anschließend wurden die Zellen in 37°C warmen Osteoklastenmedium resuspendiert. Die Zahl und Vitalität der Zellen wurden danach mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu erfolgte das Mischen der Zellsuspension mit 0,5%igem Trypanblau im Verhältnis 1:2. Zur Bestimmung der Zahlen lebender und toter Zellen wurden alle Quadranten der Neubauer-zählkammer ausgezählt und der Mittelwert pro Quadrant bestimmt. Ein Quadrant enthält 100 µl Zellsuspension.

Die gewonnenen adhärenenten mononukleären Zellen wurden in den Versuchsreihen zur Untersuchung von MG-132, MG-262 und Curcumin in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausgesät.

2.2.4 Isolierung CD14-positiver Zellen

Mononukleäre Zellen wurden zunächst bei 120g für 10 min bei RT abzentrifugiert und anschließend mit der in der Gebrauchsanweisung indizierten Menge Anti-CD14 MicroBeads (eisenmarkierte Anti-CD14-Antikörper) und PBS-EDTA versetzt. Auf einem Schüttler inkubierten die Zellen 15-20 min bei 4°C. Nach dieser Zeit folgte eine Zentrifugation bei 120g für 12 min bei 4°C. Danach wurde der Überstand mit den nicht-gebundenen Antikörpern verworfen, die Zellen in PBS aufgenommen, zur Vereinzelung über ein Zellsieb und schließlich über eine Säule des *magnetic-activated cell sorters* (MACS) gegeben. Bei dieser Prozedur verblieben alle markierten Zellen, in diesem Fall alle CD14-positiven Zellen, in der Säule. Nachdem zweimal mit PBS nachgespült worden war, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen aus der Säule mittels PBS-Spülung gelöst.

Die Zellen wurden unter Zuhilfenahme der Trypanblau-Färbung gezählt, und es wurde deren Vitalität bestimmt. Nach Reinheitsbestimmung der Zellpopulation wurden die Zellen bei 120g für 10 min bei RT zentrifugiert, anschließend in Medium aufgenommen und in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/cm² in Kultur gegeben.

2.2.5 Reinheitsbestimmung der CD14⁺-Zellpopulation

Die Bestimmung der Reinheit der Zellpopulation nach CD14-Selektion mittels MACS-Säulen erfolgte durch eine durchflußzytometrische Analyse mit Hilfe eines *fluorescens-activated cell sorters* (FACS)-Gerätes der Firma Becton Dickinson.

Dabei wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und danach mit 10 µl Anti-CD14-Antikörpern, die mit dem Fluorezenzfarbstoff R-Phycoerythrin (PE) markiert waren, bei 4°C laut Herstellerangaben für 20 min inkubiert. Die Antikörper binden an unbesetzte CD14-Moleküle der Zelloberfläche und markieren die Zelle so als CD14-positiv. Als Negativkontrolle diente ein Isotypenantikörper (100 µg/ml), der mit den Proben 1:4 verdünnt und anschließend bei 4°C laut Hersteller für 20 min inkubiert wurde.

Zur Anwendung kam dabei ein IgG1-Antikörper der Spezies Maus, der gegen Proteine gerichtet ist, die nicht auf humanen Zellen exprimiert werden. Das Ergebnis der Messung ergab den sogenannten Leerwert der Probe. Dieser wurde später vom Resultat der Zählung CD14-positiver Zellen abgezogen.

2.2.6 Vorbereitung der Testsubstanzen

MG-132 und MG-262 wurden laut Herstellerangaben in DMSO gelöst und anschließend als 1 mM Stammlösung in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Aliquote wurden bei -80°C aufbewahrt. Zur Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen wurden die entsprechenden Mengen der Stammlösung mit α -MEM verdünnt. MG-132 wurde in den Konzentrationen $0,01\ \mu\text{M}$ und $0,1\ \mu\text{M}$ verwendet, MG-262 in den Dosierungen $0,001\ \mu\text{M}$ und $0,01\ \mu\text{M}$.

PS 341 wurde gemäß Herstellerangaben in DMSO gelöst und anschließend in $1\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ Stammlösungen bei -80°C eingefroren. Zur Erstellung von Verdünnungsreihen wurde α -MEM verwendet. PS 341 wurde in den Versuchen in den Konzentrationen $0,1\ \text{nM}$ und $1\ \text{nM}$ eingesetzt.

Curcumin wurde laut Herstellerangaben in DMSO gelöst und anschließend als $200\ \text{mM}$ Stammlösung in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Stammlösung wurde bei -80°C aufbewahrt und zur Behandlung mittels Verdünnung mit α -MEM die gewünschte Konzentration hergestellt. Curcumin wurde bei den hier dargestellten Versuchen in den Konzentrationen $1\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ verwendet.

2.2.7 MTT-Test zur Bestimmung der vitalen Zellfraktion

Der MTT-Test beruht auf der Umwandlung von gelb erscheinendem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Reagenz 1) in dunkelblaue Formazankristalle.

Dieser Vorgang wird durch NAD(P)H-abhängige Enzyme des endoplasmatischen Retikulums sowie eine mitochondriale Succinatdehydrogenase in gesunden Zellen katalysiert [Berridge et al. 1993, Berridge et al. 2005]. Die anschließend hinzugefügte Solubilisierungslösung (Reagenz 2) führte zur Lyse der Zellen. Die Formazankristalle gehen in Lösung. Nach der indizierten Kultivierungsdauer wurden jedem Well $10\ \mu\text{l}$ MTT Reagenz hinzugefügt und die Kulturen für $4\ \text{h}$ zurück in den Brutschrank gestellt. Anschließend erhielt jedes Well $100\ \mu\text{l}$ der Reagenz 2.

Die Platten wurden danach über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

2.2.8 Dosisbestimmung/zytotoxischer Effekt der Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262

Die Dosierungen der Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262 wurden aus Vorarbeiten entnommen.

Um die toxische Grenze für die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypus zu ermitteln, wurde zusätzlich ein MTT-Test durchgeführt. Adhärente humane mononukleäre Zellen in Osteoklastenmedium wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² (90 µl pro Well) in 96-well-Platten ausgesät. Den Kulturen wurden zusätzlich die Wachstumsfaktoren M-CSF und RANKL (jeweils 25 ng/ml) hinzugefügt.

Am 1. Tag nach Adhäsion wurden die Zellen mit 0,1 und 0,01 µM MG 132 sowie 0,01 und 0,001 µM MG 262 jeweils in sechsfachem Ansatz über 3 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ angereicherter Raumluft und 95% relativer Luftfeuchtigkeit behandelt. Anschließend wurde ein wie in Material und Methoden 2.2.7 dargestellter MTT-Test durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Multiwellspektrophotometers für 96-well-Platten bei einer Wellenlänge von 550 nm.

2.2.9 Dosisbestimmung/zytotoxischer Effekt von Curcumin

Vor Beginn der Versuchsreihen wurde das zytotoxische Potential von Curcumin ermittelt. Es folgte dazu die Aufnahme von adhärennten mononukleären Zellen in Osteoklastenmedium mit den Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml). Die Zellen wurden danach in sechsfachem Ansatz auf 96-well-Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausgesät. Für Curcumin wurde eine Verdünnungsreihe von 0,1-100 µM erstellt, die auf die einzelnen Platten pipettiert wurde.

Die Kultivierung erfolgte stets für 96 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Anschließend wurde ein MTT-Test durchgeführt, wie er unter 2.2.7 im Teil Material und Methoden beschrieben wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Multiwellspektrophotometers für 96-well-Platten bei einer Wellenlänge von 550 nm.

2.2.10 Vorversuch 1: Osteoklastendifferenzierung

Zunächst wurden gewonnene adhärenente mononukleäre Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² in 24-well-Platten ausgesät und die Kultivierung mit Osteoklastenmedium und den hinzugefügten Wachstumsfaktoren M-CSF und RANKL für 28 Tage durchgeführt. Die Konzentration des Wachstumsfaktors M-CSF und des Wachstumsfaktors RANKL betrug je 25 ng pro ml Osteoklastenmedium.

Während der Kultivierung erfolgten nach jeweils 2 Tagen die Entfernung der Hälfte des Mediums und der Ersatz durch neu angesetztes Osteoklastenmedium mit den hinzugefügten Wachstumsfaktoren. Nach 28 Tagen erfolgte die Auswertung. Nach dieser Zeit wurde das gesamte Medium entfernt. Auf den Platten folgten die Anfärbung der tartrat-resistenten sauren Phosphatase (*Tartrat-resistant acid phosphatase* (TRAP)) und die anschließende manuelle Auszählung der multinukleären TRAP-positiven Zellen/Osteoklasten.

2.2.11 TRAP (Tartrat-resistant acid phosphatase)-Färbung

Zum Nachweis von TRAP-Aktivität wurde ein Kit zur Bestimmung der sauren Leukozytenphosphatase der Firma Sigma Aldrich genutzt. Nach beigefügtem Protokoll erfolgte die Anfärbung innerhalb der 24-well-Platten. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Danach folgte die Fixierung der Zellen mit Hilfe der mitgelieferten Fixierlösung. Die Anfärbung wurde anschließend mit der im Kit empfohlenen Rezeptur aus Fast Garnet GBC Standardlösung, Naphthol AS-BI Phosphorsäurelösung, L(+)-Tartratpuffer und Azetatpuffer durchgeführt.

Das nach enzymatischer Hydrolyse entstandene Naphthol AS-BI und Fast Garnet GBC bildeten hierbei unlösliche rot-braune Farbablagerungen. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

2.2.12 Vorversuch 2: Osteoklastenfunktion

Zur Bestimmung der Osteoklastenaktivität ließ sich die Eigenschaft der Osteoklasten nutzen, Knochen zu resorbieren. Auf mit Medium überschichtete Elfenbeinchips wurde adhärenente mononukleären Zellen das Wachstum und die Differenzierung zu Osteoklasten ermöglicht.

Zunächst wurden 1,2 bis 1,4 mm dicke Elfenbeinchips, in der Größe einer Kavität einer 24-well-Platte, mit Hilfe einer elektrischen Knochensäge angefertigt. Über Nacht folgte deren Inkubation in 96%igem Alkohol. Anschließend wurden die Chips vierfach mit PBS gewaschen und in eine 24-well-Platte gelegt.

Zum Nachweis der Sterilität eignete sich die Überschichtung der Chips mit Medium, dem FKS hinzugefügt worden war. Für 3 Tage wurde dieser Ansatz im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Damit sollte ein Wachstum noch vorhandener Zellen/Keime ermöglicht werden, und das im Medium enthaltene Phenolrot sollte durch einen Farbumschlag als Indikator für eine Kontamination dienen.

Zur Durchführung der Versuche erfolgte die Aussaat adhärenter mononukleärer Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² in Osteoklastenmedium mit M-CSF und RANKL (jeweils 25 ng/ml). Es wurde nach jeweils 2 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem die Hälfte des alten durch neues Osteoklastenmedium mit Wachstumsfaktoren ersetzt wurde.

2.2.13 Quantitative Erfassung von TRAP-positiven Zellen

Die Bestimmung der Zahl TRAP-positiver Zellen erfolgt nach Färbung mittels lichtmikroskopischer Auszählung auf 24-well-Platten. Dazu wurde ein Mikrolasermikroskop, P.A.L.M. der Firma Carl Zeiss Jena verwendet. Die Apparatur ermöglichte in dem hier dargestellten Versuchsaufbau, jedes Well durchlichtmikroskopisch zu durchfahren und jede TRAP-positive Zelle manuell zu erfassen. Als Kriterien galten hierbei eine Kernanzahl von über 3 Zellkernen pro Zelle sowie eine braun-rote Färbung des Zytoplasmas der Zellen (Abbildung 3a).



Abb. 3a: TRAP-positiver Osteoklast.
Ausschnittsvergr. von x40



Abb. 3b: Lakunen mit Toluidinblau.
Ausschnittsvergr. von x10

2.2.14 Quantitative Erfassung von Resorptionslakunen

Die Dentinchips wurden zunächst von anhaftenden Zellen und Mediumrückständen mittels 12%igem Natriumhypochlorit bei einer Inkubationsdauer von 1 h befreit. Viermaliges Waschen mit Aqua dest. schloss den Reinigungsprozess der Chips ab.

Darauf folgte die Färbung der Lakunen durch Eintauchen der Chips in 1%ige Toluidinblaulösung über 5 s. Nach manueller Reinigung wurden die Chips lichtmikroskopisch ausgewertet. Dazu diente ein Mikrolasermikroskop, P.A.L.M der Firma Carl Zeiss Jena. Jede Lakune wurde manuell erfasst und in die Auswertung aufgenommen (Abbildung 3b).

Bei Versuchen, bei denen eine Auszählung nicht möglich war, wurde die Fläche von Re-sorptionsbezirken durch Umrandung der Bereiche mittels Ellipsen bzw. Kreisen bestimmt.

Dabei wurde darauf geachtet, dass nur eines der Verfahren, d.h. entweder Auszählung oder Flächenbestimmung, pro Versuchsanordnung Verwendung fand, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

2.2.15 NF- κ B-ELISA

Die Bestimmung der NF- κ B-Aktivität wurde mit Hilfe eines auf ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Technik beruhenden Kits der Firma Actif Motif, Belgien, durchgeführt. Die Handhabung erfolgte anhand des beigefügten Protokolls.

Lysepuffer (*complete lysis buffer*), Waschpuffer (*washing buffer*), Bindungspuffer (*antibody binding buffer*), Entwickler (*developing solution*) und Stopplösung (*stop solution*) wurden laut Herstellerangaben aufbewahrt und zum Versuchsbeginn vorbereitet.

Die Zellen wurden zunächst innerhalb der Multiwellplatten durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit PBS (4°C) gewaschen und anschließend auf Eis und Schüttler über die indizierten Zeiten lysiert. Zum einen wurden Gesamtzelllysate durch die Verwendung des dem Kit beigefügten *complete lysis buffer* (siehe Material und Methoden 2.3.3), zum anderen Zellkernlysate (siehe Material und Methoden 2.3.9) durch die Verwendung des *nuclear extract kits* der Firma Actif Motif gebildet. Letztere Lysetechnik führte zu deutlicher Materialeinsparung. Zudem war es möglich, parallel die Expression von unterschiedlichen Proteinen zu untersuchen. Es wurde strikt darauf geachtet, nur Proben, die im gleichen Verfahren hergestellt worden waren, untereinander zu vergleichen.

Um in allen Proben eine äquivalente Menge an Gesamtprotein zu erhalten, wurden von den Lysaten zu Beginn des Versuchs 2 μ l abgenommen und eine Proteingesamtbestimmung mittels eines BCA-Assay Kits der Firma Pierce durchgeführt. Die Leerwertkontrolle enthielt den jeweils verwendeten Lysepuffer.

Die Ausgangsproteinmenge wurde je nach Versuchsaufbau auf 20 oder 50 µg pro Ansatz festgelegt. Diese Proben wurden mit Lysepuffer auf eine definierte Menge Lösung aufgefüllt und in zweifachem Ansatz auf die dem Kit beigelegten 96-well-Platten überführt.

Für das NF-κB-ELISA Kit enthielt jedes Well auf diesen Platten immobilisierte Oligonukleotide mit der Sequenz 5'-GGGACTTTCC-3'. Die NF-κB-Komplexe binden spezifisch an diese Sequenz.

Die Platte wurde abgedeckt und für 1h auf einem Tischschüttler bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Wells durch Ausschütten geleert.

Jedes Well wurde dreimal mit 200 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffers gewaschen. Anschließend wurde der mitgelieferte Anti-p65-Antikörper 1:1000 mit Bindungspuffer verdünnt. 100 µl der jeweiligen Antikörperlösung wurden verwendet. Es folgte die Inkubation der Platte für 1 h bei RT. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer von der Platte entfernt und es folgte die Inkubation der Platte mit dem mitgelieferten HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierten Sekundärantikörper. Dieser wurde ebenfalls 1:1000 mit Bindungspuffer verdünnt und 100 µl davon in jedes Well gegeben. Die Platte wurde anschließend für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte viermaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer pro Well.

Anschließend wurden 100 µl Entwickler in jedes Well gegeben, und es wurde bei RT der Farbumschlag von farblos zu blau abgewartet. Nach dem Farbumschlag erfolgte das Hinzufügen von 100 µl Stopplösung pro Well. Eine Farbveränderung von blau zu gelb konnte nun registriert werden. Die Messung erfolgte innerhalb von 5 min nach Farbumschlag mittels eines Multiwellspektrophotometers bei 450 nm Wellenlänge.

2.2.16 Western Blot

Die Zellen wurden zunächst innerhalb der Multiwellplatten bzw. Petrischalen dreimal mit PBS (4°C) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gewaschen und anschließend lysiert. Dazu wurde ein nach oben genannter Rezeptur hergestellter Lysepuffer verwendet.

Die Inkubation erfolgte auf Eis und Schüttler für 30 min. Die Lysate wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei 16.000g und 4°C zentrifugiert. Die Aufbewahrung der Überstände erfolgte bei -80°C.

Um in allen Proben eine äquivalente Menge an Gesamtprotein zu erhalten, wurde von den Lysaten zu Beginn des Versuchs 2 μ l abgenommen und eine Proteingehaltsbestimmung mittels BCA-Assay Kit der Firma Pierce durchgeführt. Als Leerwertkontrolle diente der verwendete Lysepuffer.

Je nach Versuchsaufbau wurde allen Proben 30 oder 60 μ g Protein entnommen und diese mit handelsüblichem Ladepuffer (β -Mercaptoethanol:Ladepuffer = 1:5) und handelsüblichem 2 x Sodiumdodecylsulfat (β -Mercaptoethanol: 2 x SDS = 1:50) auf die gewünschte Menge eingestellt.

Der Probenlauf erfolgte nach dem Prinzip der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) in Elektrophoresekammern von Amersham Bioscience/BioRad. Als Trenngele dienten hierbei 10-12%ige Acrylamid-Gele.

Die Beladung der Gele erfolgte mittels Hamilton-Spritzen sowie Eppendorf-Pipetten. Bei jedem Lauf wurde ein Proteinmarker der Firma BioRad mitgeführt. Nach Beladung erfolgte der Elektrophoreselauf bei 100 V und 25 mA für 2 h. Anschließend wurden die Gele entnommen, die jeweilige Seite markiert und in Transferpuffer überführt. Der Blot erfolgte im *semi-dry*-Verfahren auf PVDF-Membranen, die zuvor 30 s in Methanol inkubiert worden waren, bei 15 V und 2 A für 30 min.

Zur Kontrolle der Blotergebnisse wurden die Membranen für 5 min in Ponceaurot (*Ponceau S Solution*) und die Gele für 30 min mit Coomasieblau (*Coomassie Solution*) gefärbt. Die Membranen wurden anschließend in PBST kurz gewaschen. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungen auf den Membranen mittels Superblotto für 2 h auf einem Tischschüttler.

Die Membranen wurden mit dem Primärantikörper in Superblotto, welches in diesem Schritt 1:2 mit TBST verdünnt worden war, über Nacht bei 4°C inkubiert. Damit erreichte man eine besonders spezifische Bindung des Antikörpers an Proteine der Membranen. Die Dosierung der Antikörper erfolgte laut Beschreibung der Hersteller. Anschließend wurden die Membranen für 4 x 5 min auf dem Schüttler bei RT mit PBST gewaschen.

Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 2 h bei RT auf dem Schüttler, um eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers auf den Membranen zu erzielen. Anschließend folgte das Waschen der Membranen mittels PBST für 4 x 5 min bei RT.

Zur Darstellung der Banden wurde entweder ECL Detektionsreagenz oder Luminol laut Herstellerangaben verwendet.

Die Membranen wurden für 1 min bei RT in der jeweiligen Lösung belassen und anschließend in Folien auf den Film gelegt. Die Belichtungsdauer betrug 2-10 min. Zur Entwicklung wurden die Filme in Fertigentwickler und Fertigfixierer jeweils 2 min gelegt. Zwischen den einzelnen Entwicklungsstufen erfolgte die Spülung der Filme mit Leitungswasser.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Osteoklastendifferenzierung unter dem Einfluss von MG-132, MG-262 und Curcumin

Um Unterschiede und etwaige Variabilitätsfehler von Primärkulturen in den Versuchen so gering wie möglich zu halten, wurden die in Osteoklastenmedium suspendierten adhärennten mononukleären Zellen in dreifachem Ansatz auf 24-well-Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausgesät. Zusätzlich zu den Ansätzen der Testsubstanzen erfolgte die Aufnahme von Zellen, deren Medium nur M-CSF enthielt, als Negativkontrolle und Zellen, deren Medium M-CSF und RANKL ohne Testsubstanzen aufwies, als Positivkontrolle. Auch dabei wurde jeweils ein dreifacher Ansatz verwendet.

Jeden 2. Tag wurde die Hälfte des Mediums entfernt und durch frisches Osteoklastenmedium ersetzt. Dabei wurde darauf geachtet, die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren und Testsubstanzen beizubehalten. Vor dem Mediumwechsel wurde jedes Well lichtmikroskopisch kontrolliert, so dass ein sofortiger Abbruch des Versuchs bei mikroskopisch erkennbaren Wachstumsunterschieden möglich war.

Aufgrund der erworbenen Erkenntnisse aus den Vorversuchen erfolgte die Auswertung nach 28 Tagen. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren dreimal mit PBS gewaschen und anschließend eine TRAP-Färbung, wie in Material und Methoden 2.2.11 beschrieben, durchgeführt.

Die Zellzahl wurde durchlichtmikroskopisch bestimmt und in die Auswertung aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte wie in Material und Methoden 2.2.13 beschrieben.

2.3.2 Osteoklastenaktivität unter dem Einfluss von MG-132, MG-262 und Curcumin

Zur Untersuchung der Osteoklastenfunktion wurden Dentinchips in alle Kavitäten einer 24-well-Platte gelegt. In Osteoklastenmedium mit den Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) suspendierte adhärennte mononukleäre Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² auf diesen Platten ausgesät.

Es folgte die RANKL-Stimulation der Kulturen zur Erzeugung von Osteoklasten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bis zum Tag 28. Das Hinzufügen der Testsubstanzen erfolgte von Beginn dieser Kultivierungszeit an. Ein Ansatz mit Zellen, die nur mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert wurden, bildete die Negativkontrolle. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich 25 ng/ml RANKL. Während der gesamten Kultivierungszeit wurde ein Mediumwechsel jeden 2.Tag durchgeführt, wobei die Hälfte des Mediums verworfen wurde, und es durch frisches Osteoklastenmedium mit Wachstumsfaktoren und ggf. den Testsubstanzen in den indizierten Konzentrationen ersetzt wurde.

Die Auswertung erfolgte am 28. Tag. Zur Befreiung der Chips von Zell- und Mediumrückständen wurden diese mit 12%igem Natriumhypochlorit überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend folgten viermaliges Waschen mit Aqua dest. und die Färbung der Chips mit 1%iger Toluidinblaulösung für 5 s. Die Zahl der Lakunen bzw. deren Ausbreitung wurde durchlichtmikroskopisch bestimmt und in die Auswertung aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte wie in Material und Methoden unter 2.2.14 beschrieben.

2.3.3 NF-κB-Aktivität unter dem Einfluss von MG-132, MG-262 und Curcumin

Zur Messung der NF-κB-Aktivität wurden in Osteoklastenmedium suspendierte adhärente mononukleäre Zellen in 24-well-Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausgesät und bis zum 28. Tag mit MG-132, MG-262 und Curcumin in den indizierten Dosierungen behandelt. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Ein Ansatz mit Zellen, die nur mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert wurden, bildete die Negativkontrolle. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich 25 ng/ml RANKL. Ein Mediumwechsel, bei dem auch die Testsubstanzen frisch substituiert wurden, erfolgte jeweils am 2.Tag. Dabei wurde jeweils die Hälfte des alten Mediums verworfen und durch neues Osteoklastenmedium ersetzt.

Nach 28 Tagen erfolgte die Auswertung. Die Zellen wurden mit neuem Osteoklastenmedium, welches nur RANKL in der Dosierung 25 ng/ml enthielt, für 30 min im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen innerhalb der 24-well-Platten durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren dreimal mit PBS (4°C) gewaschen. Es folgten die Lyse der Zellen, Proteinbestimmung sowie NF-κB-ELISA gemäß dem Vorgehen wie in Materialien und Methoden unter 2.2.15 beschrieben.

2.3.4 I κ B- α - und phospho-I κ B- α -Expression nach Behandlung mit Curcumin

Die I κ B- α und phospho-I κ B- α -Expression wurde in einem Western Blot-Verfahren bestimmt und visualisiert.

Zunächst wurden durch Adhäsion gewonnene mononukleäre Zellen in Osteoklastenmedium auf 6-well-Platten in einer Dichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ ausgesät. Jedem Ansatz wurden anschließend 25 ng/ml M-CSF und 25 ng/ml RANKL hinzugefügt. Die Kultivierung wurde bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bis zum Tag 28 durchgeführt. Jeden zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums entfernt und durch neues Osteoklastenmedium ersetzt. Nach jedem Mediumwechsel wurden jedem Well 25 ng/ml M-CSF und 25 ng/ml RANKL hinzugefügt. Am 28. Tag wurde das gesamte Medium entfernt. Es folgte das Hinzufügen von 6 ml PBS in jedes Well. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen dreimal gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit Medium, welches M-CSF (25 ng/ml) und 100 μ M Curcumin enthielt für 60 Minuten behandelt und anschließend mit RANKL (150 ng/ml) über 0, 5, 15, 30 und 60 Minuten stimuliert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Zellen, die ohne Vorbehandlung mit Curcumin über den gleichen Zeitraum mit RANKL (150 ng/ml) stimuliert wurden.

Es folgte die Vorbereitung der Zellen für die Durchführung eines Western Blots gemäß der Beschreibung in Materialien und Methoden unter 2.2.16.

Als Primärantikörper wurden ein Anti-I κ B- α -Antikörper der Firma Santa Cruz in der Verdünnung 1:1000 und ein Anti-phospho-I κ B- α -Antikörper der Firma Cell Signaling in der Verdünnung 1:2000 eingesetzt. Die Beladungskontrolle wurde mit Hilfe eines Anti-Actin-Antikörpers der Firma Santa Cruz durchgeführt. Dieser wurde mit Blockierungspuffer 1:2000 verdünnt. Als Sekundärantikörper kamen ein Rabbit Anti-goat IgG HRP-Antikörper von Dako in der Verdünnung 1:2000 und ein Bovine Anti-Rabbit IgG HRP-Antikörper von Santa Cruz in der Verdünnung 1:2000 zum Einsatz.

2.3.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Bestimmung nach Curcuminbehandlung

Adhärente mononukleäre Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² in 96-well-Platten ausgesät. Es folgte die Stimulation dieser Zellen mit M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml). Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit über 28 Tage.

Nach jeweils 2 Tagen erfolgten die Entfernung der Hälfte des Mediums, der Ersatz durch frisches Osteoklastenmedium und das Hinzufügen der Wachstumsfaktoren. Nach 28 Tagen wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und alle Ansätze erhielten frisches Osteoklastenmedium. Es folgte die Behandlung mit 10 μM und 100 μM Curcumin in Triplets. Die Inkubation wurde bei 37°C, 5%igem CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank für 1 h durchgeführt. Die Negativkontrolle enthielt nur M-CSF (25 ng/ml), die Positivkontrolle zusätzlich RANKL (25 ng/ml).

Nach einer Stunde wurden alle Ansätze mit RANKL (150 ng/ml) stimuliert und für 15 bzw. 45 min unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Alle Ansätze wurden dann dreimal mit PBS gewaschen und mit 2',7'-Dichlorofluorescindiacetat (DCFDA) verdünnt in PBS versetzt.

Die Endkonzentration pro Well betrug 100 μM . DCFDA ist eine nicht fluoreszierende und nicht polare chemische Substanz, die in Zellen aufgenommen wird und dort verbleibt. Durch das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird DCFDA in den fluoreszierenden Stoff Dichlorofluorescein (DCF) umgewandelt.

Es folgte die Inkubation für 1 h bei den oben genannten Bedingungen im Brutschrank. Unmittelbar nach dieser Inkubationszeit folgte mittels eines Fluoreszenzspektrophotometers die Auswertung bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Detektionswellenlänge von 530 nm. Die beschriebenen Versuche wurden unter strengem Lichtabschluß durchgeführt.

2.3.6 Dosisermittlung/zytotoxischer Effekt von Bortezomib

Zunächst wurde eine CD14-Selektion von PBMCs wie in Material und Methoden unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt. CD14-positive Zellen wurden in Osteoklastenmedium aufgenommen und in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² in sechsfachem Ansatz auf 96-well-Platten ausgesät. Dem Medium wurden die Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) hinzugefügt. Nach 3 Tagen der Kultivierung bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit folgte die Auswertung mittels MTT-Test, wie unter 2.2.7 beschrieben. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Multiwellspektrometers bei einer Wellenlänge von 550 nm durchgeführt.

2.3.7 Osteoklastendifferenzierung unter dem Einfluss von Bortezomib

CD14-positive Zellen wurden wie im Teil Materialien und Methoden unter 2.2.4 beschrieben gewonnen. Diese Zellen wurden in Osteoklastenmedium in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² auf 96-well-Platten ausgesät.

Dem Medium wurden die Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte danach bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger relativer Luftfeuchtigkeit. Die Kultivierungszeit betrug 7 Tage für die Erzeugung von Präosteoklasten und 28 Tage für die Erzeugung von reifen Osteoklasten. An den Tagen 1, 8 und 21 wurde die Behandlung mit Bortezomib in dreifachem Ansatz begonnen.

Jeden 2. Tag folgte ein Mediumwechsel, wobei die Hälfte des Mediums verworfen und durch frisches Osteoklastenmedium ersetzt wurde. Die Wachstumsfaktoren und Testsubstanzen in den indizierten Konzentrationen wurden anschließend frisch hinzugefügt. Nach 28 Tagen erfolgte die TRAP-Färbung der Zellen wie unter 2.2.11 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte nach der in Material und Methoden unter 2.2.13 beschriebenen Methode.

2.3.8 Osteoklastenfunktion unter dem Einfluss von Bortezomib

Zur Untersuchung der Osteoklastenfunktion wurden Dentinchips in alle Kavitäten einer 24-well-Platte gelegt. In Osteoklastenmedium suspendierte CD14-positive Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 /cm² ausgesät. Es folgte die Ausdifferenzierung der Zellen mit Hilfe der Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) zu Osteoklasten bis zum Tag 21. Anschließend erfolgte das Hinzufügen der Testsubstanz Bortezomib für 7 Tage. Während der gesamten Kultivierungszeit wurde ein Mediumwechsel jeden 2. Tag durchgeführt.

Dabei wurden gleichzeitig Wachstumsfaktoren und ggf. die Testsubstanz (nach Tag 21) in den indizierten Konzentrationen frisch hinzugefügt. Es wurde stets das alte Medium zur Hälfte entfernt und durch frisches Osteoklastenmedium ersetzt.

Die Auswertung erfolgte am 28. Tag. Zur Befreiung der Chips von Zell- und Mediumrückständen wurden sie mit 12%igem Natriumhypochlorit überschichtet und für 1h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten viermaliges Waschen mit Aqua dest. und die Färbung der Chips mit 1%iger Toluidinblaulösung für 5 s.

Die Zahl der Lakunen bzw. deren Ausbreitung wurde durchlichtmikroskopisch bestimmt und in die Auswertung aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte wie in Materialien und Methoden 2.2.14 beschrieben.

2.3.9 NF- κ B-Aktivität unter dem Einfluss von Bortezomib

In Osteoklastenmedium suspendierte CD14-positive Zellen wurden in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bis Tag 21 bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt, wobei die Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) frisch hinzugefügt wurden. Es wurde jeweils die Hälfte des alten Mediums verworfen und durch frisches Osteoklastenmedium ersetzt.

Nach 21 Tagen wurden die Platten zunächst mit 5 μ M Bortezomib für 60 min behandelt und anschließend mit RANKL (150 ng/ml) für 15 min stimuliert.

Als Positivkontrolle dienten Platten, die ohne vorherige Behandlung mit Bortezomib mit RANKL (150 ng/ml) über 15 min stimuliert wurden. Die Inkubationen der Platten wurden stets bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

Zur Extraktion von Proteinen wurden Zellkernlysate und Lysate der zytoplasmatischen Zellfraktion mit Hilfe des *nuclear extract kits* der Firma Active Motif erzeugt.

Zur Erzeugung von Zellkernlysaten wurden die Zellen innerhalb der Petrischalen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren einmal mit PBS/Phosphataseinhibitor (4°C) gewaschen und anschließend mit dem im Kit enthaltenen hypotonem Puffer (*hypotonic buffer*) überschichtet und für 15 min auf Eis auf einem Tischschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 14.000g und 4°C für 30 s zentrifugiert.

Der Überstand bildete die zytoplasmatische Fraktion. Dieser wurde entnommen und bei -80°C asserviert. Die Zellkernfraktion wurde in dem im Kit enthaltenen Lysepuffer (*complete lysis buffer*) resuspendiert. Für 30 min wurde dieser Ansatz auf einem Tischschüttler auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14.000g und 4°C. Die Proteinquantifizierung sowie die Durchführung des NF- κ B-ELISA erfolgten wie in Materialien und Methoden 2.2.15 beschrieben.

2.3.10 I κ B- α - und phospho-I κ B- α -Expression nach Behandlung mit Bortezomib

Die I κ B- α - und phospho-I κ B- α -Expression wurden in einem Western Blot Verfahren bestimmt und visualisiert. Zunächst wurden CD14-positive Zellen in Osteoklastenmedium aufgenommen und in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausgesät. Jedem Ansatz wurden anschließend 25 ng/ml M-CSF und 25 ng/ml RANKL hinzugefügt.

Die Kultivierung wurde bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bis zum Tag 21 durchgeführt.

Jeden 2. Tag wurde die Hälfte des Mediums entfernt und durch neues Osteoklastenmedium ersetzt. Nach jedem Mediumwechsel wurden jedem Well 25 ng/ml M-CSF und 25 ng/ml RANKL hinzugefügt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden am Ende der Kultivierungszeitraums die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit Medium, welches 5 μ M Bortezomib enthielt für 60 Minuten behandelt und anschließend mit RANKL (150ng/ml) über 15 Minuten stimuliert.

Als Kontrolle dienten Ansätze, die ohne Vorbehandlung mit Bortezomib über den gleichen Zeitraum mit RANKL (150 ng/ml) stimuliert worden waren. Es folgten die Lyse der Zellen und die Proteinbestimmung mit Hilfe eines BCA-Assays der Firma Pierce. Zur Durchführung des Western Blots wurden die Lysate der zytoplasmatischen Zellfraktion verwendet. Jeweils 30 μ g Protein der Proben wurden dabei eingesetzt.

Als Primärantikörper wurden ein Anti-I κ B- α -Antikörper in der Verdünnung 1:1000 und ein Anti-phospho-I κ B- α -Antikörper in der Verdünnung 1:2000 eingesetzt. Die Beladungskontrolle wurde jeweils mit Hilfe eines Anti-Actin-Antikörpers der Firma Santa Cruz durchgeführt. Dieser wurde 1:2000 verdünnt.

Als Sekundärantikörper kamen ein Rabbit Anti-goat IgG HRP-Antikörper von Dako in der Verdünnung 1:2000 und ein Bovine Anti-Rabbit IgG HRP-Antikörper von Santa Cruz in der Verdünnung 1:2000 zum Einsatz.

2.4 Graphische Auswertung

Die Erfassung erfolgte mit Hilfe einer Kleinbildkamera der Firma Leica sowie in späteren Versuchen mit einer Digitalkamera der Firma Canon. Die Bildbearbeitung und graphische Auswertung wurden mit Adobe Photoshop 7.0 durchgeführt.

2.5 Statistische Auswertung

Die quantitative Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS in den Versionen 13.0 und 16.0. Diagramme dieser Arbeit wurden in Sigma Plot 10.0 der Firma SPSS Inc. erstellt. Dieses Programm basiert auf den statistischen Auswertungsprinzipien von SPSS.

Um die Zusammenfassung der Versuchsdaten für Osteoklastendifferenzierung und -aktivität zu ermöglichen, wurden innerhalb der Versuchsreihen die Prozentwerte berechnet. Als Bezugsgröße diente dabei die Positivkontrolle, die 100% gesetzt wurde. Zuvor wurde die Vergleichbarkeit der Versuchsreihen durch eine Spearman-Rho-Rangkorrelationsanalyse der Absolutmittelwerte bestimmt. Es wurden jeweils die dazugehörigen Signifikanzniveaus angegeben.

Für NF- κ B- und ROS-Bestimmung wurden die ermittelten Extinktionswerte in die Auswertung aufgenommen. Mittelwerte, geschätzte Standardabweichungen und Konfidenzintervalle wurden von den erhobenen Stichprobenwerten durch explorative Datenanalyse in SPSS ermittelt. Alle darüber hinaus dargestellten Diagramme enthalten stets die prozentualen Mittelwerte der Stichproben. Fehlerbalken innerhalb der Diagramme geben die einfache Standardabweichung der Mittelwerte an. Im Text erfolgt die Angabe der berechneten Mittelwerte sowie das dazugehörige Konfidenzintervall in eckigen Klammern.

Um das Signifikanzniveau zu ermitteln, wurde jeweils ein Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben durchgeführt.

Es wurden stets die prozentualen oder absoluten Stichprobenwerte eines Behandlungsansatzes mit den Stichprobenwerten der Positivkontrolle verglichen und deren p-Werte ermittelt. Es diente dazu das Statistikprogramm SPSS in der Version 16.0, welches die Berechnung der hier dargestellten zweiseitig exakten p-Werte ermöglichte.

In allen Diagrammen erfolgte die Angabe des Signifikanzniveaus mit * für einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) und ** für einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0.005$).

3 Ergebnisse

Zur Untersuchung von Osteoklastendifferenzierung, Osteoklastenaktivität, NF- κ B-Aktivität, I κ B- α - und phospho-I κ B- α -Expression sowie des ROS-Vorkommens in reifen Osteoklasten unter dem Einfluss der hier vorgestellten Testsubstanzen wurden die Ergebnisse dreifach in voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Ein erster Versuch diente zunächst einer qualitativen Erfassung von Unterschieden. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden anschließend zumindest voneinander unabhängige Doppelversuche durchgeführt. Innerhalb der Versuchsreihen wurden dreifache oder sechsfache Ansätze verwendet. Obligatorisch in jedem Versuchsteil war die Mitführung einer Negativ- und einer Positivkontrolle.

Bei der Aufnahme der Daten wurde stets auf gleiche Bedingungen geachtet und die Auswertung nach bestem Wissen und Gewissen durchgeführt.

3.1 Reinheit der isolierten CD14-positiven Zellen

PBMCs wurden einer CD14-Selektion mittels MACS-Säule zugeführt. Angereicherte CD14-positive Zellen wurden mit einem monoklonalen Anti-CD14/CD45 Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflußzytometrische Bestimmung der Reinheit.

Mit Hilfe der unter Materialien und Methoden 2.2.4 beschriebenen Isolierungsmethode konnte eine Reinheit CD14-positiver Zellen von über 97% erreicht werden. Vor der Anreicherung handelte es sich dabei um eine große Fraktion CD45⁺/CD14⁻-Zellen und eine kleine Fraktion CD45⁺/CD14⁺-Zellen. Nach Anreicherung waren fast ausschließlich CD45⁺/CD14⁺-Zellen nachweisbar (Abbildung 5).

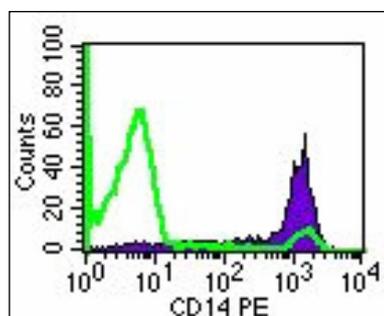


Abb. 4: Reinheit nach Isolierung von CD14-positiven Zellen. grüne Kurve: vor Isolation. blaue Kurve: nach Isolation

Das Ergebnis bestätigte das Vorliegen einer homogenen Zellpopulation. Gleichzeitig charakterisierte das CD14-Merkmal Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Zellreihe.

3.2 Osteoklastenzüchtung

3.2.1 TRAP-Expression nach alleiniger Stimulation mit M-CSF

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden über Adhäsion wie in Material und Methoden unter 2.2.3 beschrieben gewonnen. Anschließend wurden diese in Anwesenheit von M-CSF (25 ng/ml) in Triplets auf 24-well-Platten über 28 Tage behandelt. Alle Kulturansätze wiesen vergleichbare Wachstumsdichten auf. Nach der Kultivierungszeit folgte die Anfärbung der intrazellulären sauren Phosphatase mittels eines TRAP-Kits.

Es konnten eine rote bis rot-braune Zellanfärbungen nachgewiesen werden. Zum größten Teil handelte es sich dabei um mononukleäre Zellen, deren intrazellulär gelegene unspezifische saure Phosphatase eine rote Färbung des Zytoplasmas ergab (Abbildung 5). Zu einem geringen Prozentsatz waren multinukleäre rot-braune Zellen nachweisbar (siehe auch Ergebnisse 3.2.2).

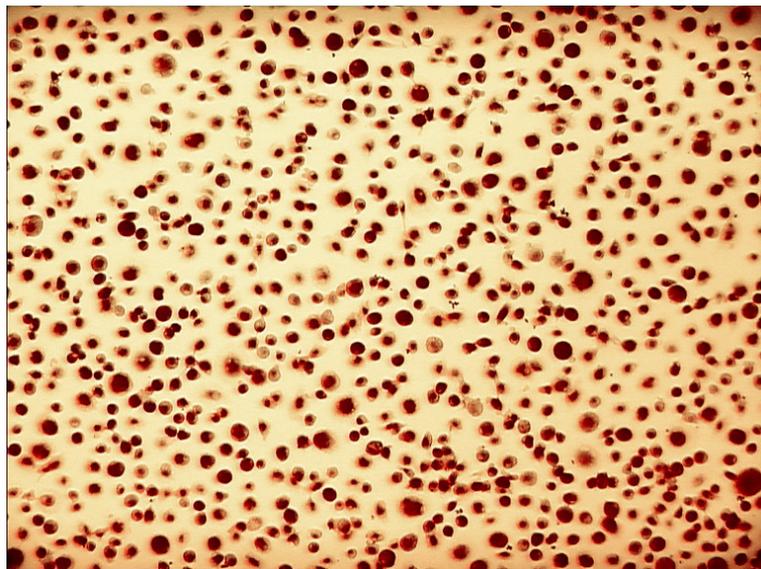


Abb. 5: Färbung der intrazellulären sauren Phosphatase adhärenter mononukleärer Zellen nach 28 Tagen unter der alleinigen Stimulation mit M-CSF. Vergrößerung x 10.

3.2.2 Osteoklastendifferenzierung nach Stimulation mit M-CSF und RANKL

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden über Adhäsion wie in Materialien und Methoden unter 2.2.3 beschrieben gewonnen. Anschließend wurden diese Zellen zum einen mit M-CSF (25 ng/ml) zum anderen in der Kombination M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) in Triplets auf 24-well-Platten über 28 Tage stimuliert. Alle Kulturansätze wiesen vergleichbare Wachstumsdichten auf.

Nach 28 Tagen folgte die Anfärbung der intrazellulären sauren Phosphatase mittels eines TRAP-Kits. Auch in Ansätzen, deren Medium nur den Wachstumsfaktor M-CSF enthielt, waren multinukleäre TRAP-positive Zellen nachweisbar (Tabelle 1).

Tab. 1: Multinukleäre TRAP-positive Zellen/Osteoklasten. Auswertung der Einzelversuchsreihen nach Stimulation mit M-CSF und der Kombination M-CSF und RANKL. MW: Mittelwert in Prozent. SD: Standardabweichung der Prozentwerte

	Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
	N	MW	SD	N	MW	SD
+ M-CSF	3	13,1	2,5	3	17,5	2,4
+ M-CSF + RANKL	3	100,0	8,0	3	100,0	0,0

In dem mit M-CSF stimulierten Ansatz konnten zu 13,1% bzw. 17,5% Osteoklasten pro Well nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte nach M-CSF- und RANKL-Stimulation eine deutliche Steigerung der Osteoklastenzahl erreicht werden. Durch die zusätzliche Stimulation mit RANKL konnte in den vorliegenden Versuchsreihen die Anzahl an humanen multinukleären TRAP-positiven Zellen/Osteoklasten um das sechs- bis siebenfache gesteigert werden.

Die Spearman-Rho-Rangkorrelationsanalyse der Absolutwerte, d.h. der pro Well manuell erfassten Osteoklastenzahlen, zwischen den Versuchsreihen ergab den Wert 0,833. Dieses Ergebnis war mit $p < 0,05$ signifikant.

3.2.3 Osteoklastenaktivität nach Stimulation mit M-CSF und RANKL

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden über Adhäsion wie in Materialien und Methoden unter 2.2.3 beschrieben gewonnen. Diese wurden zum einen in Anwesenheit von M-CSF (25 ng/ml) zum anderen in Anwesenheit von M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) in Triplets auf 24-well-Platten mit Elfenbeinchips über 28 Tage geführt. Die Auswertung erfolgte wie in Materialien und Methoden unter 2.2.14 beschrieben.

Es zeigte sich, dass es auch unter alleiniger Stimulation mit M-CSF zu einer Resorption von Elfenbein kommt (Tabelle 2, Seite 40).

Tab. 2: Lakunendichte. Auswertung der Einzelversuchsreihen nach Stimulation mit M-CSF und der Kombination M-CSF und RANKL. MW: Mittelwert in Prozent. SD: Standardabweichung der Prozentwerte

	Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
	N	MW	SD	N	MW	SD
+ M-CSF	3	0,6	0,9	3	2,0	0,4
+ M-CSF + RANKL	3	100	18,0	3	100	8,9

Diese Resorptionsdichte war mit 0,6% bis 2% im Vergleich zur Positivkontrolle als vernachlässigbar gering einzuschätzen. Die Stimulation mit RANKL führte bei den in Kultur befindlichen humanen mononukleären Zellen zu einer bis zu 100fachen Steigerung der Resorptionslakunendichte.

Die Spearman-Rho-Rangkorrelationsanalyse der Absolutwerte, d.h. der manuell erfassten Resorptionslakunendichte, zwischen den Versuchsreihen ergab den Wert 0,916. Das Ergebnis war mit $p < 0,05$ signifikant.

3.3 Dosisbestimmung/Zytotoxizität von MG-132, MG-262 und Curcumin

Zur Ermittlung des zytotoxischen Effekts der Testsubstanzen Curcumin, MG-132 und MG-262 wurde ein MTT-Test, wie in Materialien und Methoden unter 2.2.7, 2.2.8 und 2.2.9 beschrieben, durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die ohne Hinzufügen von Testsubstanzen mit M-CSF und RANKL (25 ng/ml) über den indizierten Zeitraum stimuliert worden waren. Die Negativkontrolle wurde allein mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert. Curcumin wurde in den Dosierungen 1 μ M und 10 μ M, MG-132 in den Dosierungen 0,01 μ M und 0,1 μ M und MG-262 in den Dosierungen 0,001 μ M und 0,01 μ M eingesetzt.

Die Ansätze, denen Testsubstanzen hinzugefügt worden waren, zeigten in den angegebenen Dosierungen nach 96 h keinen relevanten zytotoxischen Effekt gegenüber der Positivkontrolle. Die Auswertung zur Bestimmung der Zellvitalität ergaben stets Vitalitäten zwischen 90-100% ohne signifikanten Unterschied im prozentualen Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 6, Seite 41).

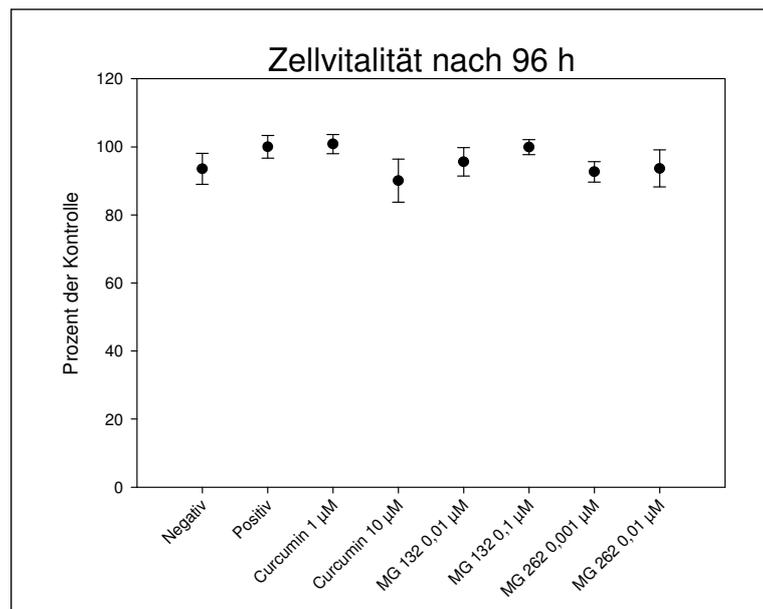


Abb. 6: Zellvitalität in MTT-Test nach Behandlung mit MG-132, MG-262 und Curcumin über 96 h. Negativ: M-CSF. Positiv: M-CSF und RANKL. Alle Behandlungsansätze enthielten M-CSF und RANKL

3.4 Untersuchungen mit den Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262

In diesem Abschnitt erfolgt die Beschreibung der Ergebnisse aus der Untersuchung der Osteoklastendifferenzierung/-generierung, der Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten und der NF- κ B-Aktivität unter dem Einfluss der Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262. Der Versuchsaufbau sowie der Ablauf der Versuche sind im Teil Materialien und Methoden unter 2.3.1, 2.3.2 und 2.3.3 dargestellt.

3.4.1 Osteoklastendifferenzierung unter Behandlung mit MG-132 und MG-262

Nach 28 Tagen wiesen alle Kulturansätze eine vergleichbare Wachstumsdichte auf. Kulturen von RANKL-stimulierten adhärennten mononukleären Zellen zeigten unter der Behandlung mit MG-132 und MG-262 einen geringeren Anteil an Osteoklasten als die RANKL-stimulierte Positivkontrolle. Adhärennte mononukleäre Zellen, die nur mit M-CSF stimuliert worden waren, bildeten hierbei die Negativkontrolle. Ausgewertet wurden die mittels Lichtmikroskopie manuell erfassten Zellzahlen im prozentualen Vergleich zur Positivkontrolle.

Die Spearman-Rho-Rangkorrelationsanalyse der Absolutwerte, d.h. der manuell erfassten Osteoklastenzahlen pro Well, zwischen den Einzelversuchsreihen ergab eine Korrelation von 0,833 bei einer zweiseitigen Signifikanz von $p < 0,05$.

Beim Vergleich der Einzelversuchsreihen zeigte sich eine eindeutige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Tabelle 3).

Tab. 3: Multinukleäre TRAP-positive Zellen/Osteoklasten. Auswertung der Einzelversuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses von MG-132 und MG-262 auf die Osteoklastogenese. MW: Mittelwert in Prozent. SD: Standardabweichung der Prozentwerte

	Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
	N	MW	SD	N	MW	SD
+ M-CSF	3	13,1	2,5	3	17,5	2,4
+ M-CSF + RANKL	3	100,0	8,0	3	100,0	0,0
+ M-CSF + RANKL + MG-132 0,01 μM	3	15,7	3,1	3	45,8	8,1
+ M-CSF + RANKL + MG-132 0,1 μM	3	11,9	1,8	3	36,3	2,4
+ M-CSF + RANKL + MG-262 0,001 μM	3	17,3	2,4	3	45,1	3,7
+ M-CSF + RANKL + MG-262 0,01 μM	3	14,8	1,6	3	37,4	2,1

Um die Daten in die graphische Auswertung aufnehmen zu können, wurden die prozentualen Mittelwerte beider Versuchsreihen gebildet. Dabei diente die Positivkontrolle (Stimulation mit M-CSF und RANKL) als Bezugspunkt und wurde auf 100% gesetzt (Abbildung 7).

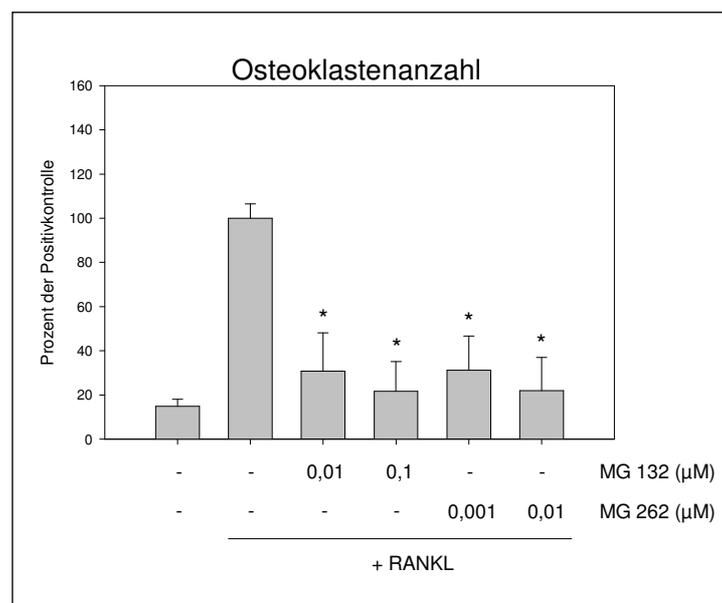


Abb. 7: Osteoklastenzahl nach Behandlung mit MG-132 und MG-262. Alle Ansätze enthielten M-CSF. (*) entspricht $p < 0.05$ im Vergleich zur Positivkontrolle

Für die Ansätze zuzüglich 0,01 μM MG-132 ergab sich eine Reduktion der Osteoklastenzahl auf 30,7% [12,5-49,0; $p = 0,01$], für 0,1 μM MG-132 auf 21,7% [4,9-38,4; $p = 0,01$], verglichen mit der Positivkontrolle, die auf 100,0% [89,7-110,3] festgesetzt worden war. Für die Ansätze, die 0,001 μM MG-262 enthielten, konnte eine Reduktion der Anzahl Osteoklasten auf 31,2% [14,9-47,4; $p = 0,02$] gezeigt werden. In den Ansätzen, die mit 0,01 μM MG-262 behandelt worden waren, konnten 23,9% [8,4-39,3; $p < 0,02$] Osteoklasten ermittelt werden. Diese Prozentangaben beziehen sich auf die Positivkontrolle mit 100,0% [89,7-110,3]. Die Unterschiede in der Osteoklastenzahl innerhalb der Ansätze nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262 gegenüber der unbehandelten Positivkontrolle konnten mit $p < 0,05$ als signifikant gewertet werden.

3.4.2 Osteoklastenaktivität unter der Behandlung mit MG-132 und MG-262

Kulturen von RANKL-stimulierten adhärennten mononukleären Zellen auf Elfenbeinchips zeigten unter der Behandlung mit MG-132 und MG-262 eine geringere Dichte an Resorptionslakunen als die RANKL-stimulierte Positivkontrolle. Adhärennte mononukleäre Zellen, die nur mit M-CSF stimuliert worden waren, bildeten hierbei die Negativkontrolle. Ausgewertet wurde die mittels Lichtmikroskopie manuell erfasste Dichte von Resorptionslakunen im prozentualen Vergleich zur Positivkontrolle.

Zur Lakunendichtebestimmung innerhalb der Versuchsreihen wurde das in Materialien und Methoden unter 2.2.14 beschriebene Mikrolasermikroskop mit integrierter Software verwendet. Diese Apparatur ermöglichte es, Resorptionslakunen und Resorptionsbezirke zu quantifizieren.

Zur Überprüfung, ob beide Versuchsreihen in einen gemeinsamen Datensatz aufgenommen werden können, wurde eine Spearman-Rho-Rangkorrelationsanalyse durchgeführt. Zwischen den Absolutmittelwerten der Versuchsreihen lag eine Korrelation von 0,916 bei einer zweiseitigen Signifikanz von $p < 0,05$ vor.

Beim Vergleich der Absolutmittelwerte der Einzelversuchsreihen zeigte sich eine eindeutige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Tabelle 4, Seite 44).

Tab. 4: Lakunendichte. Auswertung der Einzelversuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses von MG-132 und MG-262 auf die Osteoklastenaktivität. MW: Mittelwert in Prozent. SD: Standardabweichung der Prozentwerte

	Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
	N	MW	SD	N	MW	SD
+ M-CSF	3	0,6	0,9	3	2,0	0,4
+ M-CSF + RANKL	3	100,0	18,0	3	100,0	8,9
+ M-CSF + RANKL + MG-132 0,01 μM	3	45,8	3,6	3	33,0	2,8
+ M-CSF + RANKL + MG-132 0,1 μM	3	1,2	2,1	3	11,3	0,8
+ M-CSF + RANKL + MG-262 0,001 μM	3	5,2	3,0	3	20,3	2,2
+ M-CSF + RANKL + MG-262 0,01 μM	3	0,0	0,0	3	5,5	0,6

Um die Daten in die graphische Auswertung aufnehmen zu können, wurden die prozentualen Mittelwerte beider Versuchsreihen gebildet. Dabei diente die Positivkontrolle (Stimulation mit M-CSF und RANKL) als Bezugspunkt und wurde auf 100% gesetzt (Abbildung 8).

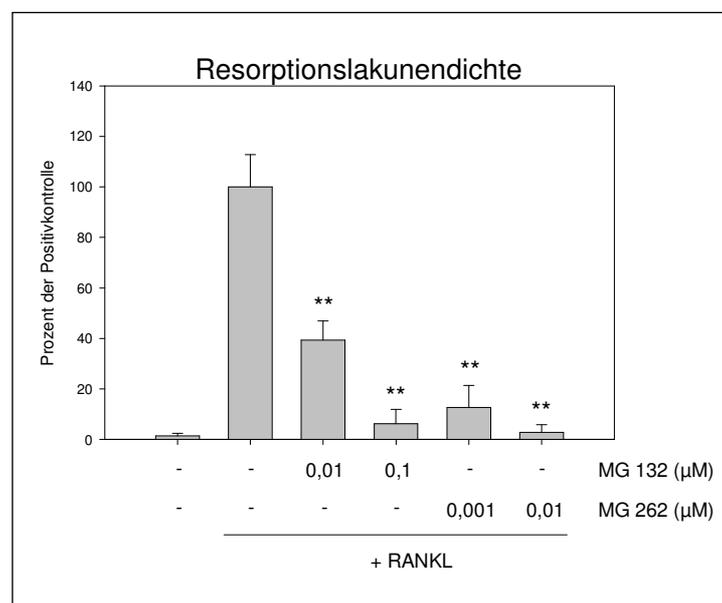


Abb. 8: Resorptionslakunendichte nach Behandlung mit MG-132 und MG-262. Alle Ansätze enthielten M-CSF. (***) entspricht $p < 0,005$ im Vergleich zur Positivkontrolle

In mit 0,01 μM MG-132 behandelten Ansätzen zeigte sich eine Reduktion der Resorptionslakunendichte auf 39,4% [31,5-47,3; $p = 0,002$], für 0,1 μM MG-132 auf 6,3% [0,3-12,3; $p = 0,002$], verglichen mit der Positivkontrolle, die auf 100,0% [86,7-113,3] festgesetzt worden war.

Eine Behandlung mit 0,001 μM MG-262 führte zu einer Reduktion der Dichte von Resorptionslakunen auf 12,7% [3,7-21,8; $p = 0,002$]. In den Ansätzen, denen 0,01 μM MG-262 hinzugefügt worden war, konnten 2,8% [0,0-6,0; $p = 0,002$] Resorptionslakunen registriert werden. Diese Prozentangaben beziehen sich auf die Positivkontrolle mit 100,0% [86,7-113,3]. Eine Dosisabhängigkeit konnte graphisch für MG-132 und MG-262 nachgewiesen werden. Darüber hinaus bestand ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,005$) in der registrierbaren Lakunendichte zwischen 0,01 μM MG-132 und 0,1 μM MG-132. Die Unterschiede in der Resorptionslakunendichte nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262 gegenüber der unbehandelten Positivkontrolle konnten mit $p < 0,005$ als hochsignifikant gewertet werden.

3.4.3 NF- κ B-Aktivität unter der Behandlung mit MG-132 und MG-262

Kulturen von RANKL-stimulierten adhärennten mononukleären Zellen zeigten unter der Behandlung von MG-132 und MG-262 eine geringere NF- κ B-Aktivität als die RANKL-stimulierte Positivkontrolle. Ausgewertet wurden die Extinktionswerte, die in einem ELISA erfasst worden waren (Abbildung 9).

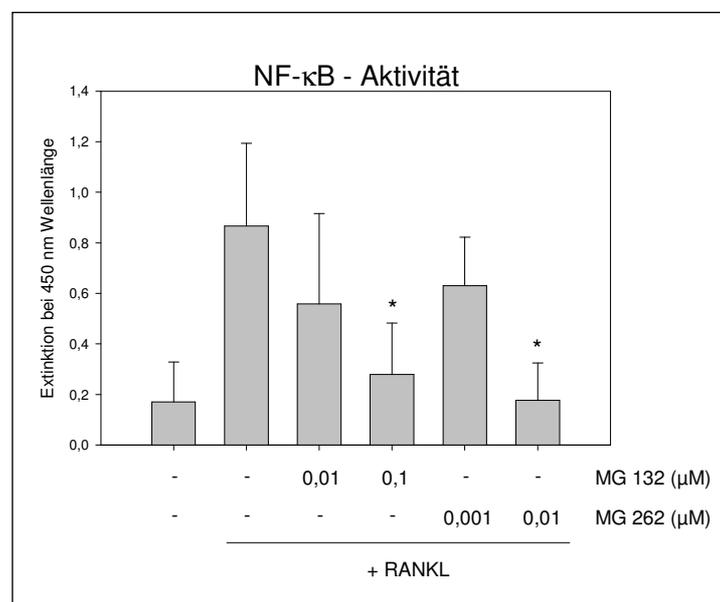


Abb. 9: Extinktionswerte in NF- κ B-ELISA nach Behandlung mit MG-132 und MG-262. Alle Ansätze enthielten M-CSF. (*) entspricht $p < 0,05$ verglichen mit der Positivkontrolle.

Adhärenente mononukleäre Zellen, die nur mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert worden waren, bildeten die Negativkontrolle.

Für die Behandlung mit MG-132 in einer Konzentration von 0,01 μ M ergab sich eine Abnahme der Extinktionswerte auf 0,56 [0,18-0,93], für 0,1 μ M MG-132 auf 0,28 [0,06-0,49; $p = 0,01$]. In der Positivkontrolle konnte eine Extinktion von 0,87 [0,35-1,39] registriert werden.

Eine Behandlung mit 0,001 μ M MG-262 führte zu einer Reduktion der Extinktionswerte auf 0,63 [0,43-0,83]. In den Ansätze, die mit 0,01 μ M MG-262 behandelt worden waren, konnte eine Extinktion von 0,18 [0,02-0,33; $p = 0,01$] registriert werden. Auch diese Extinktionen wurden mit denen der Positivkontrolle mit einem Extinktionswert von 0,87 [0,35-1,39] graphisch verglichen. Die Unterschiede der Extinktionswerte und somit der NF- κ B-Aktivität nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 in der Konzentration 0,1 μ M und MG-262 in einer Konzentration von 0,01 μ M konnten mit $p < 0,05$ gegenüber der unbehandelten Positivkontrolle als signifikant gewertet werden. Die Negativkontrolle wies mit einem Extinktionswert von 0,17 [0,00-0,35; $p < 0,05$] ebenfalls eine signifikant geringere NF- κ B-Aktivität gegenüber der Positivkontrolle auf.

3.4.4 Zusammenfassung der Untersuchungen mit MG-132 und MG-262

MG-132 und MG-262 vermindern die RANKL-induzierte Osteoklastogenese und reduzieren die RANKL-induzierte Aktivierung reifer Osteoklasten. Insgesamt überwog die Steigerung der Resorptionshemmung gegenüber der Hemmung der Osteoklastendifferenzierung. Dabei fiel zudem auf, dass sich Dosiserhöhungen der Proteasominhibitoren MG 132- und MG-262 nur gering auf die Osteoklastogenese auswirkten. Dagegen konnte durch die Verwendung der höheren Dosen bezüglich der Resorptionsfähigkeit eine deutlich höhere Hemmung erreicht werden.

3.5 Untersuchungen mit Bortezomib (PS-341, Velcade)

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus Untersuchungen zur Osteoklastogenese und Osteoklastenfunktion unter dem Einfluss von Bortezomib dargestellt. Die Untersuchungsmethodik sowie der Ablauf der Experimente sind im Teil Materialien und Methoden unter 2.3.6 bis 2.3.10 dargestellt.

3.5.1 Zytotoxizitätsnachweis – MTT-Test für Bortezomib

Zur Bestimmung des subapoptotischen Dosisbereichs von Bortezomib wurden 5 Dosen aus einem Bereich von 0,01 bis 100 nM gewählt und an drei unterschiedlichen Ausreifungsstadien der osteoklastären Zellreihe untersucht.

Isolierte CD14-positive Zellen wurden mit M-CSF (25 ng/ml) sowie RANKL (25 ng/ml) bis zum Tag 1, Tag 8 und Tag 21 zu Präosteoklasten bzw. reifen Osteoklasten herangezüchtet und anschliessend über 3 Tage mit Bortezomib in den oben genannten Dosen behandelt. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die nur unter Stimulation mit M-CSF (25 ng/ml) kultiviert wurden (*Negativ*). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die sowohl mit M-CSF als auch mit RANKL (jeweils 25 ng/ml) während der Behandlungsperiode kultiviert wurden (*Positiv*). Alle Präosteoklasten und Osteoklasten, die einer Behandlung mit Bortezomib zugeführt wurden, erhielten beide Wachstumsfaktoren in der o.g. Dosis. Interessanterweise zeigte die Auswertung, dass die Toxizität des Bortezomibs mit der Zunahme des Differenzierungsgrades abnahm. So wurde für die monozytären Osteoklastenvorläufer vom Tag 1 ein IC_{50} -Wert von 9 nM, für die Präosteoklasten vom Tag 8 ein IC_{50} -Wert von 32 nM und für die reifen Osteoklasten ein IC_{50} -Wert von 92 nM ermittelt (Abbildung 10).

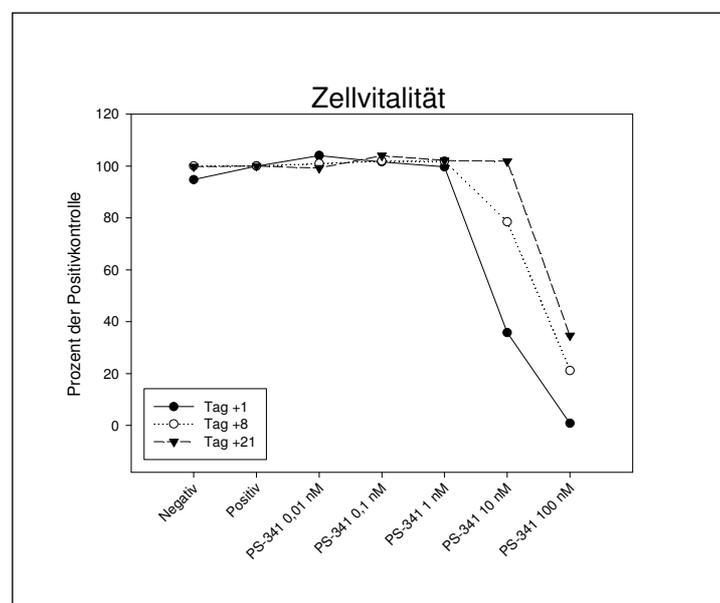


Abb. 10: Zellvitalität im MTT-Test nach Behandlung mit Bortezomib. Negativ: M-CSF. Positiv: M-CSF und RANKL. Alle Behandlungsansätze enthielten M-CSF und RANKL.

Für die folgenden Versuche zur Untersuchung der Wirkung von Bortezomib auf die RANKL-stimulierte Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivierung wurden zwei subapoptotische Dosen von 0,1 und 1 nM festgelegt.

3.5.2 Osteoklastogenese unter der Behandlung mit Bortezomib

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um die inhibitorische Wirkung von Bortezomib auf die Osteoklastendifferenzierung zu untersuchen. Monozytäre Osteoklastenvorläufer (CD14-positive-Zellen) wurden mit 0,1 nM und mit 1 nM Bortezomib bis zum Tag 28 behandelt. Die Positivkontrolle sowie die Behandlungsansätze enthielten M-CSF und RANKL (jeweils 25 ng/ml), für die Negativkontrolle wurde auf eine RANKL-Zugabe verzichtet.

Am Ende der Behandlung wurden die Zellen mit Hematoxylin angefärbt und auf ihre TRAP-Aktivität hin untersucht. Die Zugabe von RANKL führte zum Auftreten von multinukleären TRAP-positiven Zellen, die als Osteoklasten identifiziert wurden (Abbildung 11).

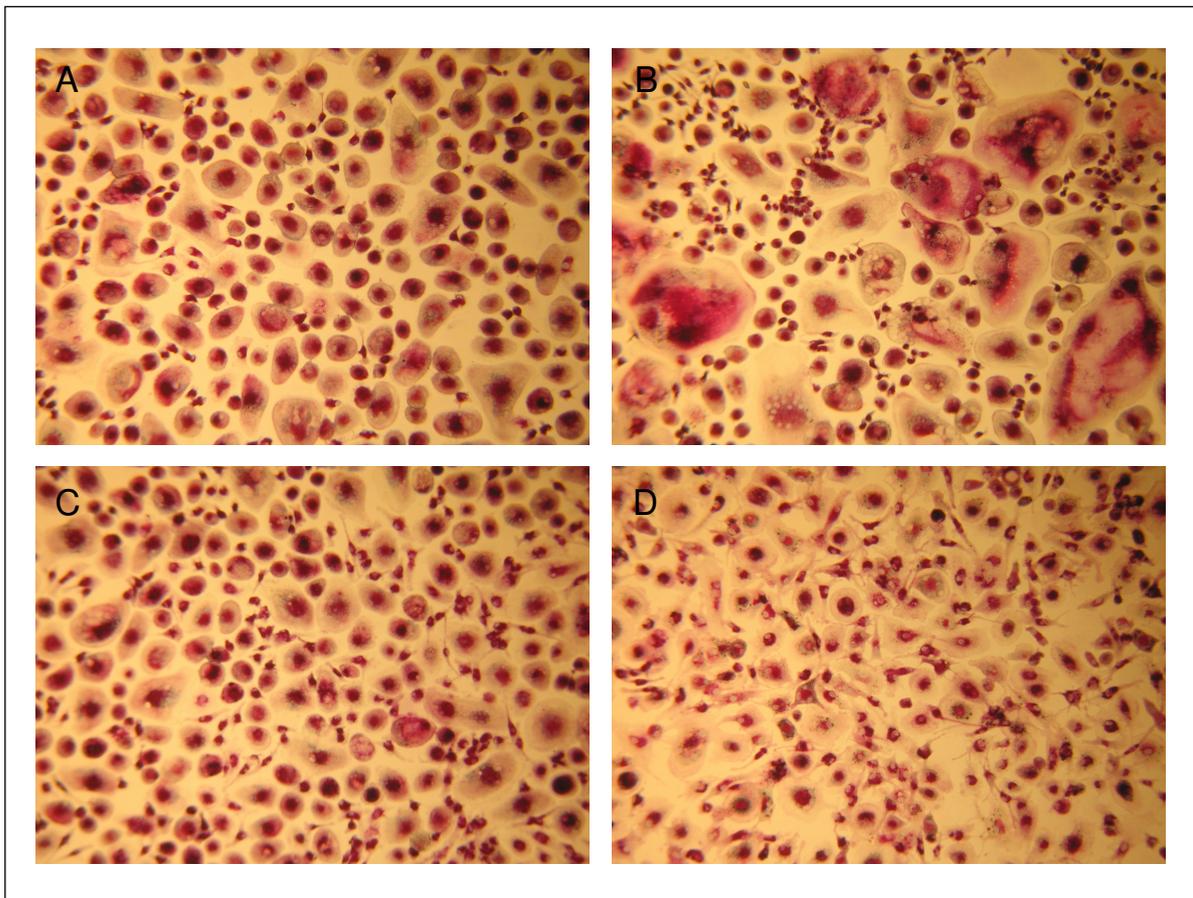


Abb. 11: Einfluss von Bortezomib auf die RANKL-induzierte Osteoklastogenese. A: Stimulation mit M-CSF. B: Stimulation mit M-CSF und RANKL. C: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Bortezomib 0,1 nM. D: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Bortezomib 1 nM. Vergr. x 40

Die Behandlung mit Bortezomib reduzierte dosisabhängig das Auftreten dieser Zellen und somit die Osteoklastendifferenzierung. Dieser Effekt konnte durch Auszählung der Osteoklasten quantifiziert und bestätigt werden (Abbildung 12).

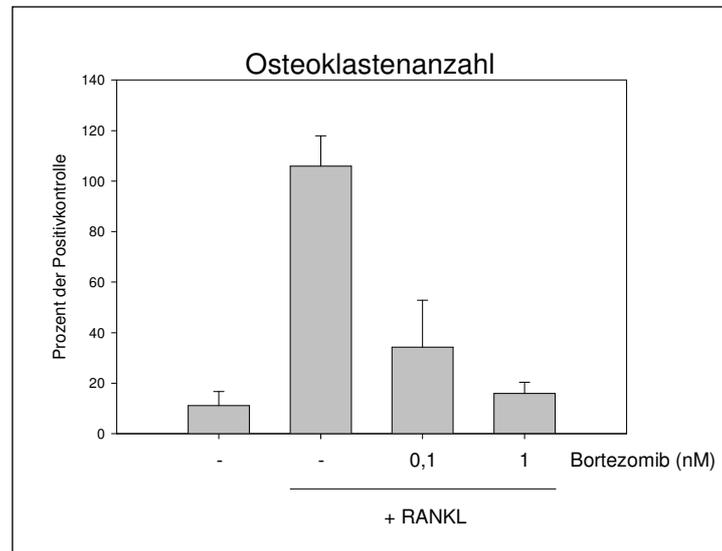


Abb. 12: Anzahl der Osteoklasten nach Behandlung mit Bortezomib. Alle dargestellten Ansätze enthielten M-CSF.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung. Für Bortezomib konnte in einer Dosierung von 0,1 nM eine Reduktion der Osteoklastenanzahl auf 34,2% [0,0-80,5], in einer Dosierung von 1 nM auf 15,9% [5,1-26,7] erreicht werden. Die Prozentwerte bezogen sich auf die Positivkontrolle, für die ein Wert von 100% festgelegt worden war [76,0-135,7].

3.5.3 Osteoklastenaktivität unter der Behandlung mit Bortezomib

Ausdifferenzierte Osteoklasten, welche unter Standardbedingungen gezüchtet worden waren, wurden ab dem 21. Tag mit 0,1 nM und 1 nM Bortezomib behandelt. Die Kulturen wurden auf 24-well-Platten, die Elfenbeinchips enthielten, bis zum 28. Tag fortgeführt. Über die Zeit der Kultivierung erfolgte die Stimulation der Behandlungskulturen mit M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz CD14-positiver Zellen, der über den gesamten Zeitraum nur mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert worden war. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich RANKL (25 ng/ml).

Bortezomib inhibiert die RANKL-induzierte Aktivierung von Osteoklasten. Die Wirkung war dosisabhängig (Abbildung 12).

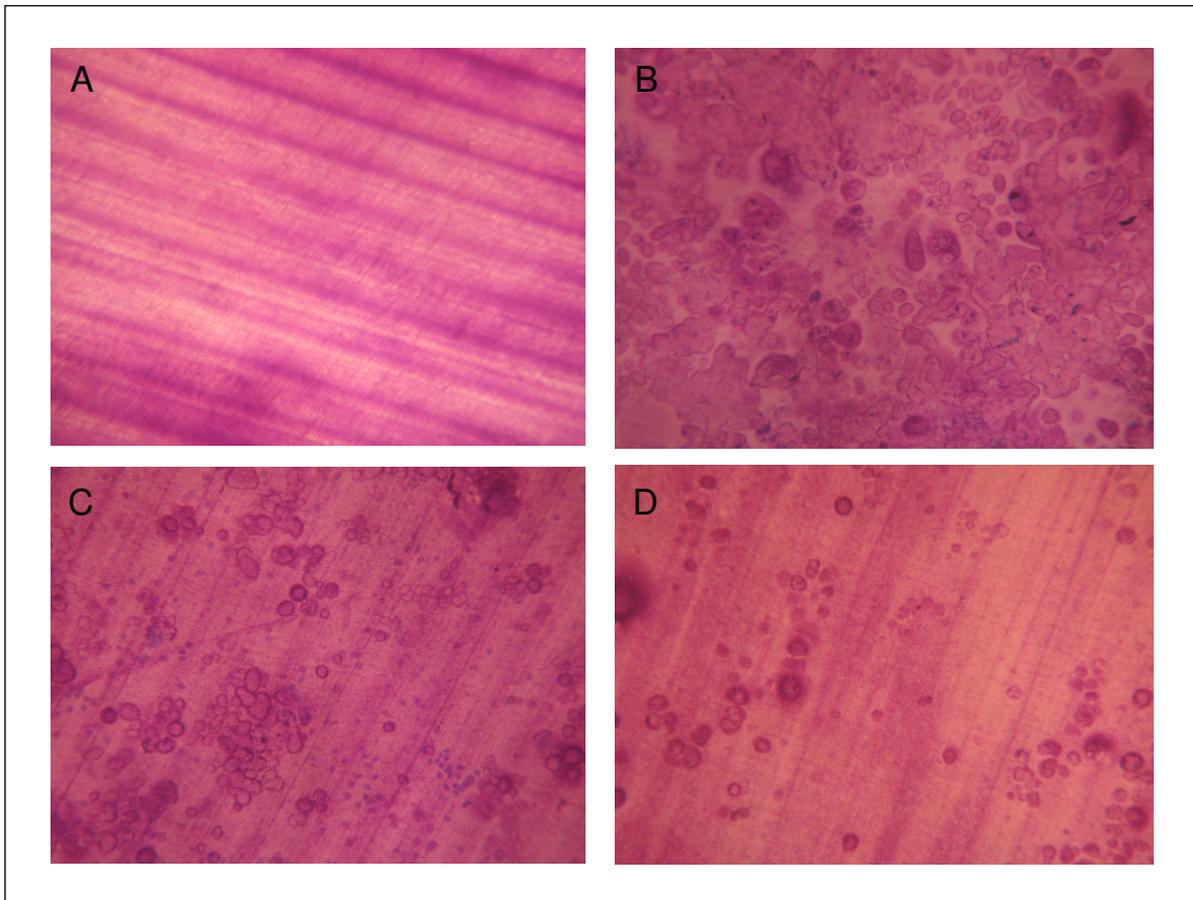


Abb. 12: Einfluss von Bortezomib auf die RANKL-induzierte Osteoklastenaktivität. A: Stimulation mit M-CSF. B: Stimulation mit M-CSF und RANKL. C: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Bortezomib 0,1 nM. D: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Bortezomib 1 nM. Vergr. x 10

Die Reduktion der Resorptionsaktivität der Osteoklasten zeigte bei Quantifizierung eine Reduktion auf 34,8% [0,0-89,5; $p = 0,007$] bei dem Einsatz von 0,1 nM Bortezomib und eine Reduktion auf 20,8% [0,0-42,1; $p < 0,005$] bei dem Einsatz von 1 nM Bortezomib. Als Bezugspunkt diente die Positivkontrolle, die auf 100% [65,7-135,6] gesetzt wurde. Die Unterschiede konnten für Bortezomib in einer Dosierung von 0,1 nM signifikant ($p < 0,05$) und für Bortezomib in einer Dosierung von 1 nM mit $p < 0,005$ als hochsignifikant gewertet werden (Abbildung 13, Seite 51).

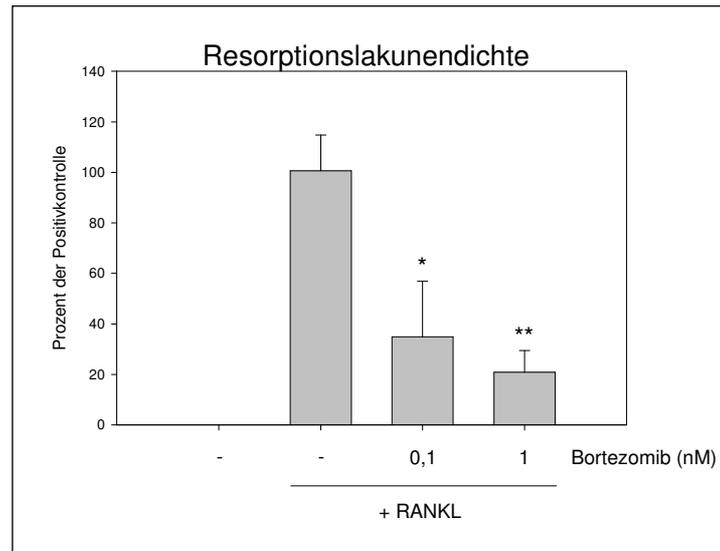


Abb. 13: Resorptionslakunendichte nach Behandlung mit Bortezomib. Alle dargestellten Ansätze enthielten M-CSF. (*) entspricht $p < 0.05$, (**) $p < 0.005$ verglichen mit der Positivkontrolle

3.5.4 NF- κ B-Aktivität unter der Behandlung mit Bortezomib

Ausdifferenzierte Osteoklasten wurden am Tag 21 mit 5 μ M Bortezomib über einen Zeitraum von 60 min behandelt und anschließend mit RANKL in einer Dosierung von 150 ng/ml über 15 min stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Osteoklasten, denen lediglich 25 ng/ml M-CSF hinzugefügt wurde, und als Positivkontrolle Osteoklasten, die zuerst 25 ng/ml M-CSF erhielten und anschliessend mit 150 ng/ml RANKL stimuliert wurden. Am Ende der Inkubationszeit folgten die Präparation nukleärer Extrakte (Materialien und Methoden 2.3.9) und die Durchführung eines NF- κ B-ELISA (Material und Methoden 2.2.15).

Mit Hilfe dieses Versuchs konnte gezeigt werden, dass Bortezomib die RANKL-induzierte Aktivierung von NF- κ B reduzierte. Es zeigte sich eine Reduktion der NF- κ B-Aktivität unter der Behandlung mit Bortezomib auf 52,9% [39,1-66,6] im Vergleich zur RANKL-stimulierten Positivkontrolle, die auf 100% [95,0-104,0] festgesetzt worden war. Der Unterschied konnte mit $p = 0,029$ als signifikant gewertet werden. In der Negativkontrolle konnte 65,3% [22,3-104,8] der NF- κ B-Aktivität der Positivkontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 14, Seite 52).

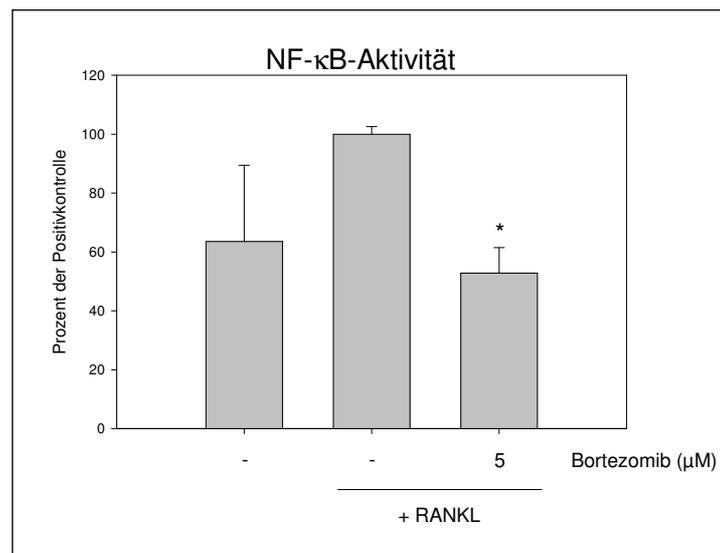


Abb. 14: NF- κ B-Aktivität in Prozent zur Positivkontrolle nach Behandlung mit Bortezomib. Alle dargestellten Ansätze enthielten M-CSF. (*) entspricht $p < 0.05$ im Vergleich zur Positivkontrolle.

3.5.5 I κ B- und phospho-I κ B-Konzentration unter dem Einfluss von Bortezomib

Reife Osteoklasten wurden unter den in Abschnitt 3.5.4 beschriebenen Bedingungen kultiviert und behandelt. Am Versuchsende wurden, neben nukleären Extrakten, auch zytoplasmatische Extrakte gewonnen und einer Proteinmengenbestimmung nach dem BCA-Verfahren zugeführt. Anschließend erfolgte die Durchführung eines Western Blots, wie in Material und Methoden unter 2.3.10 beschrieben. Bortezomib erhöhte die Konzentration von phospho-I κ B in den Osteoklasten, während die I κ B Expression nach vorausgegangener RANKL-Stimulation abnahm (Abbildung 15).

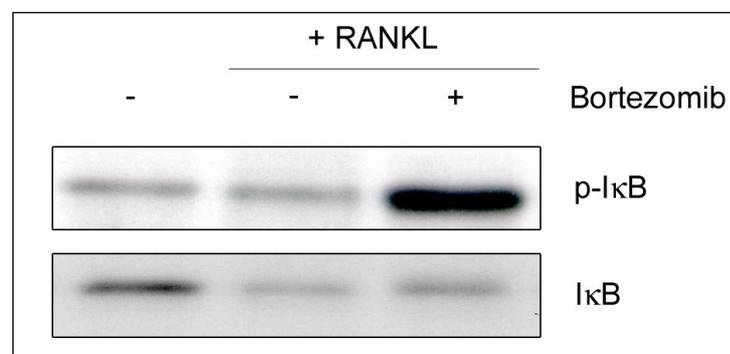


Abb. 15: Darstellung der RANKL-induzierten I κ B- und phospho-I κ B-Expression unter der Behandlung mit Bortezomib.

3.6 Untersuchungen mit Curcumin

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus Untersuchungen zur Osteoklastogenese und Osteoklastenfunktion unter dem Einfluss von Curcumin dargestellt. Der Versuchsaufbau sowie der Ablauf der Versuche sind im Teil Materialien und Methoden unter 2.3.1 bis 2.3.5 dargestellt.

3.6.1 Osteoklastogenese unter der Behandlung mit Curcumin

Folgende Versuche dienten der Erfassung der inhibitorischen Wirkung von Curcumin auf die humane Osteoklastogenese. Laufzeit der Versuchsreihen betrug jeweils 28 Tage.

Kulturen von M-CSF- und RANKL- (jeweils 25 ng/ml) stimulierten adhärennten mononukleären Zellen, wiesen unter der Behandlung mit 1 μ M und 10 μ M Curcumin (Abbildung 16 C, 16 D) eine geringere Anzahl an Osteoklasten als die Positivkontrolle (Abbildung 16 B) auf. Adhärennte mononukleäre Zellen, die nur mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert worden waren, bildeten hierbei die Negativkontrolle (Abbildung 16 A).

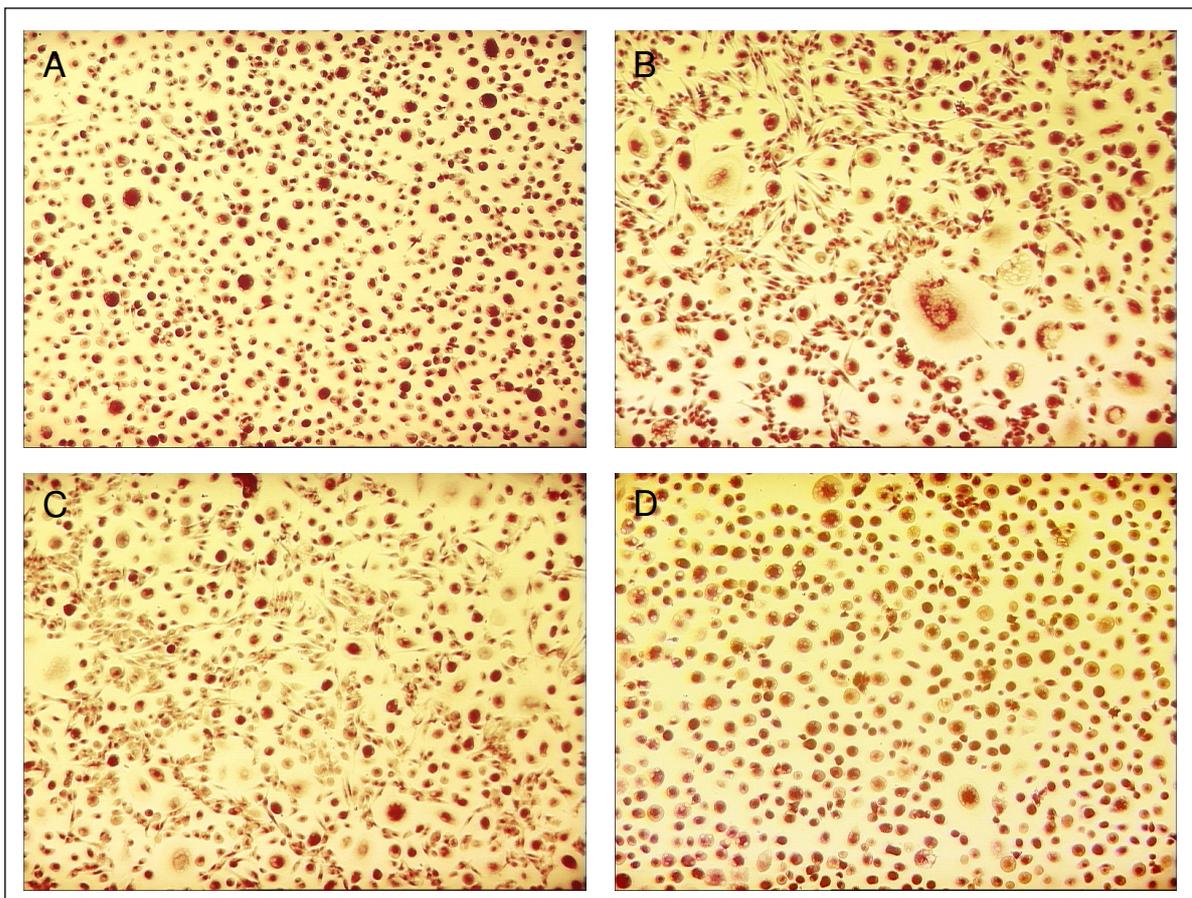


Abb. 16: Einfluss von Curcumin auf die RANKL-induzierte Osteoklastogenese. A: Stimulation mit M-CSF. B: Stimulation mit M-CSF und RANKL. C: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Curcumin 1 μ M. D: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Curcumin 10 μ M. Vergr. x 10

Die qualitativ erhobenen Befunde konnten quantifiziert und bestätigt werden.

Ausgewertet wurden die mittels Lichtmikroskopie manuell erfassten Zellzahlen im prozentualen Vergleich zur Positivkontrolle. Die Spearman-Rho-Rangkorrelationsanalyse der Absolutmittelwerte der Einzelversuche lieferte als Ergebnisse 0,833 bei einer zweiseitigen Signifikanz von $p < 0,05$. Der direkte Vergleich der Einzelversuchsreihen zeigte eine eindeutige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Tabelle 5).

Tab. 5: Osteoklastenanzahl. Auswertung der Einzelversuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses von Curcumin auf die Osteoklastogenese. MW: Mittelwert in Prozent. SD: Standardabweichung der Prozentwerte.

	Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
	N	MW	SD	N	MW	SD
+ M-CSF	3	13,1	2,5	3	17,5	2,4
+ M-CSF + RANKL	3	100,0	8,0	3	100	0,0
+ M-CSF + RANKL + Curcumin 1 μM	3	37,1	4,8	3	49,6	11,3
+ M-CSF + RANKL + Curcumin 10 μM	3	12,2	1,5	3	28,1	8,6

Um die Daten in die graphische Auswertung aufnehmen zu können, wurden die prozentualen Mittelwerte der Versuchsreihen gebildet. Dabei diente die Positivkontrolle (Stimulation mit M-CSF und RANKL) als Bezugspunkt und wurde auf 100,0% [89,7-110,3] gesetzt.

Die Ansätze, die Curcumin in einer Konzentration von 1 μM enthielten, ergaben in der quantitativen Auswertung eine Abnahme der Zahl von Osteoklasten auf 43,3% [32,5-54,2; $p = 0,02$].

Für Curcumin in der Dosierung 10 μM war ein Rückgang der Osteoklastenzahl auf 21,7% [8,5-35,0; $p = 0,02$] zu verzeichnen (Abbildung 17, Seite 55).

Die Unterschiede der Osteoklastenanzahl in Kulturen von RANKL-stimulierten adhärennten mononukleären Zellen konnten mit $p < 0,05$ nach Behandlung mit Curcumin in den Konzentrationen 1 und 10 μM gegenüber der unbehandelten Positivkontrolle als signifikant gewertet werden. Eine Dosisabhängigkeit konnte graphisch und rechnerisch beschrieben werden. Es bestand mit $p = 0,01$ ein signifikanter Unterschied zwischen Curcumin in den Dosierungen 1 μM und 10 μM .

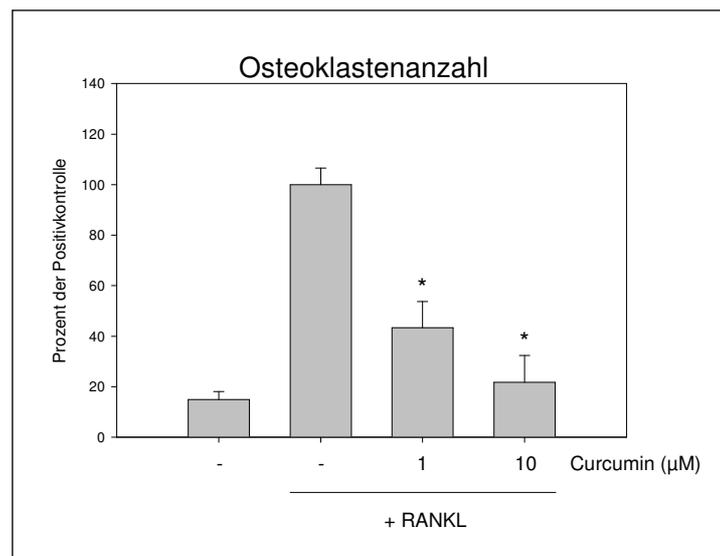


Abb. 17: Anzahl der Osteoklasten nach Behandlung mit Curcumin. Alle dargestellten Ansätze enthielten M-CSF. (*) entspricht $p < 0.05$ verglichen zur Positivkontrolle.

3.6.2 Osteoklastenaktivität unter der Behandlung mit Curcumin

Folgende Versuchsreihen dienten der Erfassung der inhibitorischen Wirkung von Curcumin auf die humane Osteoklastenaktivität. Laufzeit der Versuchsreihen betrug jeweils 28 Tage.

Die RANKL-stimulierten Kulturen zur Erzeugung von Osteoklasten auf Elfenbeinchips wurden ab Kultivierungsbeginn mit 1 µM bzw. 10 µM Curcumin behandelt. Über die gesamte Laufzeit erfolgte die Stimulation der Zellen mit M-CSF und RANKL (jeweils 25 ng/ml). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der nur mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert wurde. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich RANKL in einer Konzentration von 25 ng/ml. Zur Lakunendichtebestimmung innerhalb der Versuchsreihen wurde das in Materialien und Methoden 2.2.14 beschriebene Mikrolasermikroskop mit integrierter Software verwendet. Diese Apparatur ermöglichte es, Resorptionslakunen und Resorptionsbezirke zu quantifizieren.

Kulturen von RANKL-stimulierten adhärennten mononukleären Zellen auf Elfenbeinchips zeigten unter der Behandlung von Curcumin (Abbildung 18 C, 18 D, Seite 56) eine geringere Dichte an Resorptionslakunen als die Positivkontrolle (Abbildung 18 B, Seite 56). Ein dosisabhängige Wirkung für Curcumin konnte nachgewiesen werden (Abbildung 18 C, 18 D).

Adhärennte mononukleäre Zellen, die nur mit M-CSF stimuliert worden waren, bildeten hierbei die Negativkontrolle (Abbildung 18 A, Seite 56).

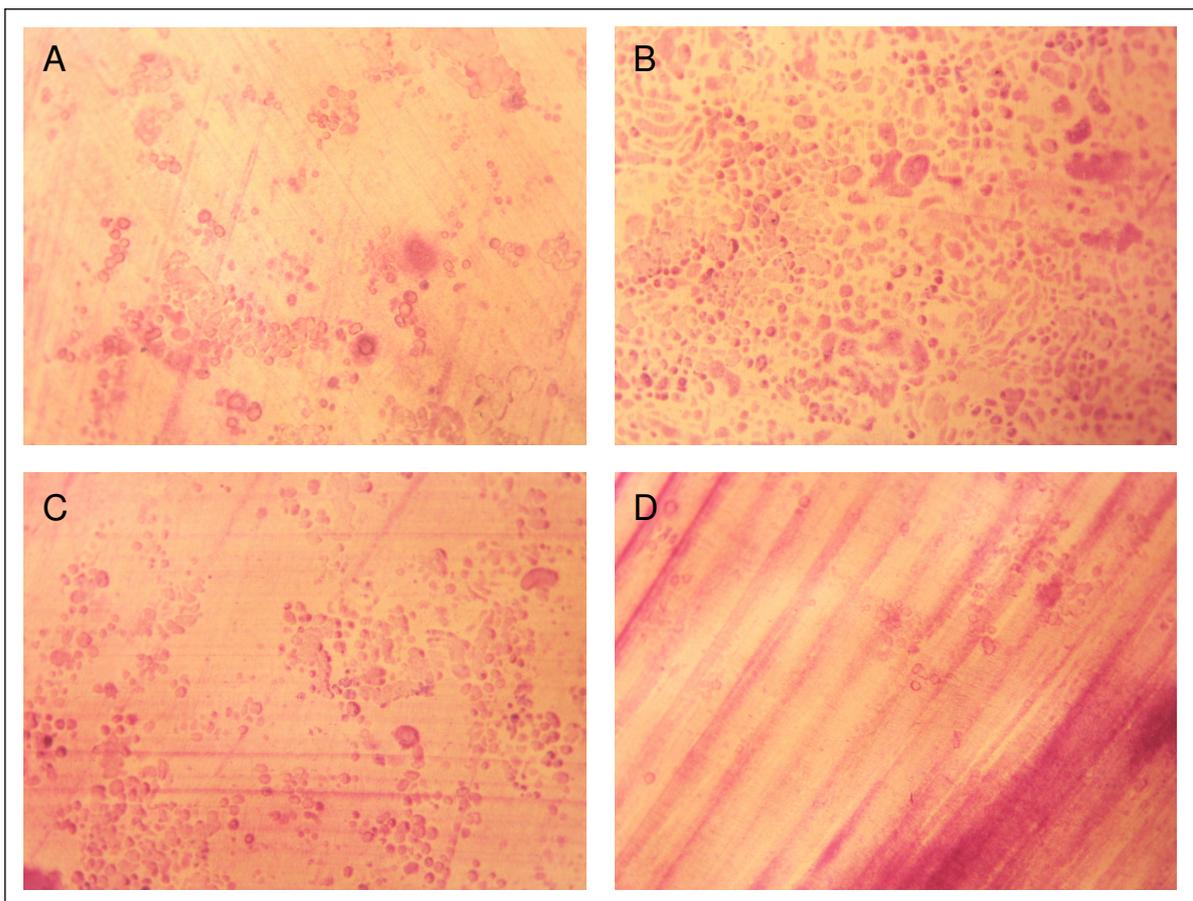


Abb. 18: Einfluss von Curcumin auf die RANKL-induzierte Osteoklastenaktivierung. A: Stimulation mit M-CSF. B: Stimulation mit M-CSF und RANKL. C: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Curcumin 1 μM . D: Behandlungsansatz mit M-CSF, RANKL und Curcumin 10 μM . Vergr. x10

Die dargestellten Effekte konnten durch Quantifizierung bestätigt werden. Der direkte Vergleich der Einzelversuchsreihen zeigte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Tabelle 6)

Tab. 6: Lakunendichte. Auswertung der Einzelversuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses von Curcumin auf die Osteoklastenfunktion. MW: Mittelwert in Prozent. SD: Standardabweichung der Prozentwerte.

	Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
	N	MW	SD	N	MW	SD
+ M-CSF	3	0,6	0,9	3	2,0	0,4
+ M-CSF + RANKL	3	100,0	18,0	3	100,0	8,9
+ M-CSF + RANKL + Curcumin 1 μM	3	21,7	3,4	3	72,8	0,1
+ M-CSF + RANKL + Curcumin 10 μM	3	0,0	0,0	3	1,0	0,1

Eine Spearman-Rho-Rangkorrelationsanalyse wurde nach Aufnahme der Daten durchgeführt. Zwischen den Absolutmittelwerten der Versuchsreihen lag eine Korrelation von 0,916 bei einer zweiseitigen Signifikanz von $p < 0,05$ vor.

Um die Daten in die graphische Auswertung aufnehmen zu können, wurden die prozentualen Mittelwerte beider Versuchsreihen gebildet. Dabei diente die Positivkontrolle (Stimulation mit M-CSF und RANKL) als Bezugspunkt und wurde auf 100% gesetzt.

Die Behandlung mit 1 μM Curcumin zeigte eine Reduktion der Resorptionslakunendichte auf 52,4% [16,3-88,4; $p < 0,005$]. Bei einer Dosiserhöhung auf 10 μM Curcumin konnte eine Abnahme auf 0,5% [0,0-1,0; $p < 0,005$] nachgewiesen werden. Beide Befunde sind im Vergleich zur Positivkontrolle zu sehen, die auf 100,0% [86,7-113,3] festgesetzt worden war (Abbildung 19).

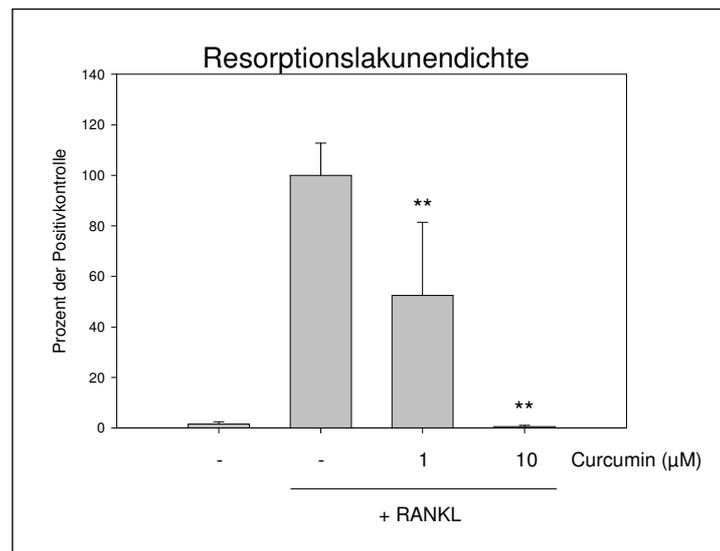


Abb. 19: Resorptionslakunendichte nach Behandlung mit Curcumin. Alle dargestellten Ansätze enthielten M-CSF. (**) entspricht $p < 0,005$ im Vergleich zur Positivkontrolle.

Die Unterschiede in der Resorptionslakunendichte nach Behandlung mit Curcumin konnten gegenüber der unbehandelten Positivkontrolle für die Konzentration 1 μM Curcumin und 10 μM Curcumin als hochsignifikant ($p < 0,005$) gewertet werden.

Eine Dosisabhängigkeit konnte sowohl graphisch als auch rechnerisch nachgewiesen werden. Es bestand ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,005$) in der registrierbaren Lakunendichte zwischen Curcumin in den Dosierungen 1 μM und 10 μM .

3.6.3 NF- κ B-Aktivität unter der Behandlung mit Curcumin

Kulturen von RANKL-stimulierten adhärennten mononukleären Zellen zeigten nach 28 Tagen unter der Behandlung mit Curcumin eine geringere NF- κ B-Aktivität als die RANKL-stimulierte Positivkontrolle. Adhärennte mononukleäre Zellen, die nur mit M-CSF (25 ng/ml) stimuliert worden waren, bildeten hierbei die Negativkontrolle. Ausgewertet wurden die Extinktionswerte, die in einem ELISA erfasst worden waren (Abbildung 20).

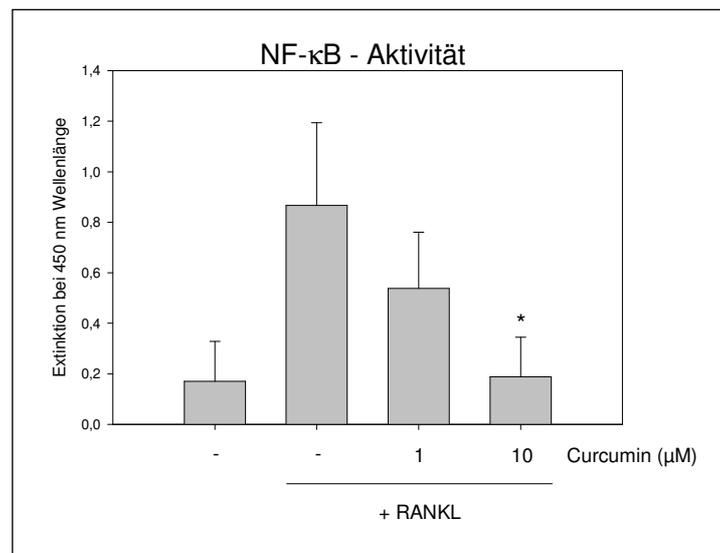


Abb. 20: Extinktionswerte in NF κ B-ELISA nach Behandlung mit Curcumin. Alle dargestellten Ansätze enthielten M-CSF. (*) entspricht $p < 0.05$ im Vergleich zur Positivkontrolle.

Für die Ansätze, die mit 1 μ M Curcumin behandelt worden waren, ergab sich eine Abnahme der Extinktionswerte auf 0,54 [0,30-0,77]. Eine Behandlung mit 10 μ M Curcumin führte zur Reduktion des Extinktionswertes auf 0,19 [0,02-0,35; $p = 0,01$]. Die Positivkontrolle zeigte einen Extinktionswert von 0,87 [0,35-1,39]. Der Extinktionswert der Negativkontrolle ergab 0,17 [0,00-0,34; $p = 0,01$].

Die Reduktion des Extinktionswertes und somit der NF- κ B-Aktivität nach Behandlung mit Curcumin in der Konzentration 10 μ M konnte gegenüber der unbehandelten Positivkontrolle mit $p < 0,05$ als signifikant gewertet werden. Der Unterschied der NF- κ B-Aktivität von Negativ- zur Positivkontrolle war mit $p < 0,05$ signifikant.

Darüber hinaus konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,024$) zwischen den NF- κ B-Aktivitäten von Curcumin in einer Konzentration von 1 μ M und Curcumin in einer Konzentration von 10 μ M nachgewiesen werden.

3.6.4 I κ B- und phospho-I κ B-Expression nach Behandlung mit Curcumin

Es erfolgte der semiquantitative Nachweis der Expression von I κ B- α und phospho-I κ B- α (p-I κ B- α) mit Hilfe eines Western Blot Verfahrens nach den Zeitpunkten 5, 15, 30 und 60 Minuten. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der wie in den Versuchen zuvor über die Kultivierungszeit eine Stimulation mit M-CSF erhielt. Da die Negativkontrolle bis zum Versuchsende kein RANKL hinzugefügt worden war, wurde sie in Abbildung 17 mit 0 gekennzeichnet. Eine Beladungskontrolle wurde anhand der Expression von β -Actin durchgeführt.

Nach RANKL-Stimulation konnte ein Anstieg der p-I κ B-Expression innerhalb von 5 Minuten verzeichnet werden. Danach reduziert sich die Expression, bis sie nach 30-60 Minuten wieder das Ausgangsniveau erreicht hatte. Parallel konnte ein Abfall der I κ B-Expression nach 15 Minuten registriert werden. Die I κ B-Expression erreichte nach 30-60 Minuten das Ausgangsniveau. Curcumin verhinderte die RANKL-induzierte Phosphorylierung von I κ B zu phospho-I κ B. Nach Vorbehandlung der Ansätze mit Curcumin und anschließender RANKL-Stimulation konnte ein Anstieg der p-I κ B-Expression nach 5 Minuten registriert werden. Dieser Anstieg fiel jedoch deutlich geringer aus als bei alleiniger Stimulation mit RANKL. Die Expression erreichte bereits nach 15 Minuten das Ausgangsniveau. Nach 30 Minuten war keine p-I κ B-Expression nachweisbar. Parallel wurde die I κ B-Expression erfasst, die nach 15 bis 30 Minuten einen Anstieg zeigte (Abbildung 21).

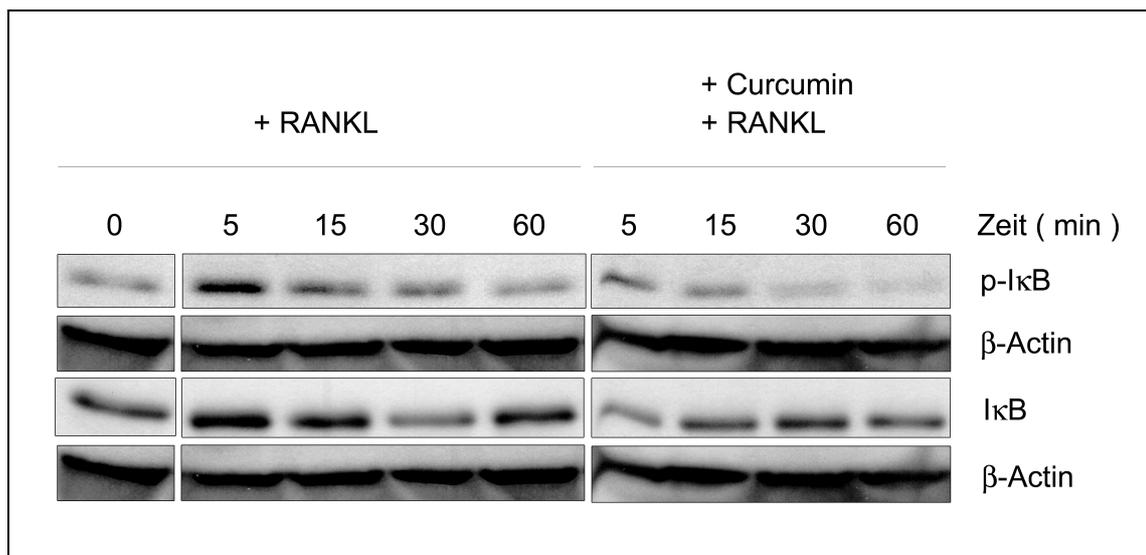


Abb. 21: Darstellung der zeitlichen Entwicklung der RANKL-induzierten I κ B- und phospho-I κ B-Expression unter der Behandlung mit Curcumin.

3.6.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) – Bestimmung nach Curcuminbehandlung

Zur Ermittlung des Vorkommens reaktiver Sauerstoffspezies wurde die chemische Substanz 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat verwendet. Nach Stimulation von reifen humanen Osteoklasten mit RANKL konnte nach 15 min ein leichter, nach 45 min ein starker Anstieg an intrazellulär gelegenen ROS gemessen werden. Zur Auswertung wurde der Ansatz, in dem die größte Menge an ROS nachweisbar war, auf 100% gesetzt.

Nach RANKL-Stimulation über 45 Minuten war die größte Menge von ROS in den nicht-behandelten Ansätzen nachweisbar. Dieser Ansatz wurde 100,0% [72,3-127,7] gesetzt. Nach 15 minütiger RANKL-Stimulation waren 74,8% [47,3-102,3] dieser ROS-Menge nachweisbar.

Unter der Behandlung mit Curcumin in einer Dosierung von 1 μM kam es nach 45 min RANKL-Stimulation zu einem leichten Anstieg der ROS-Konzentration auf 107,3% [100,6-114,08], nach 15 min RANKL-Stimulation zu einem leichten Abfall der ROS-Konzentration auf 72,6% [56,8-88,3]. Deutlicher zeigte sich die Veränderung bei Präinkubation mit Curcumin in einer Dosierung von 100 μM und anschließender RANKL-Stimulation. Dabei fielen die ROS-Konzentrationen nach 15minütiger RANKL-Stimulation auf 46,3% [27,9-64,7] und nach 45minütiger RANKL-Stimulation auf 74,2% [36,4-112,0] (Abbildung 22).

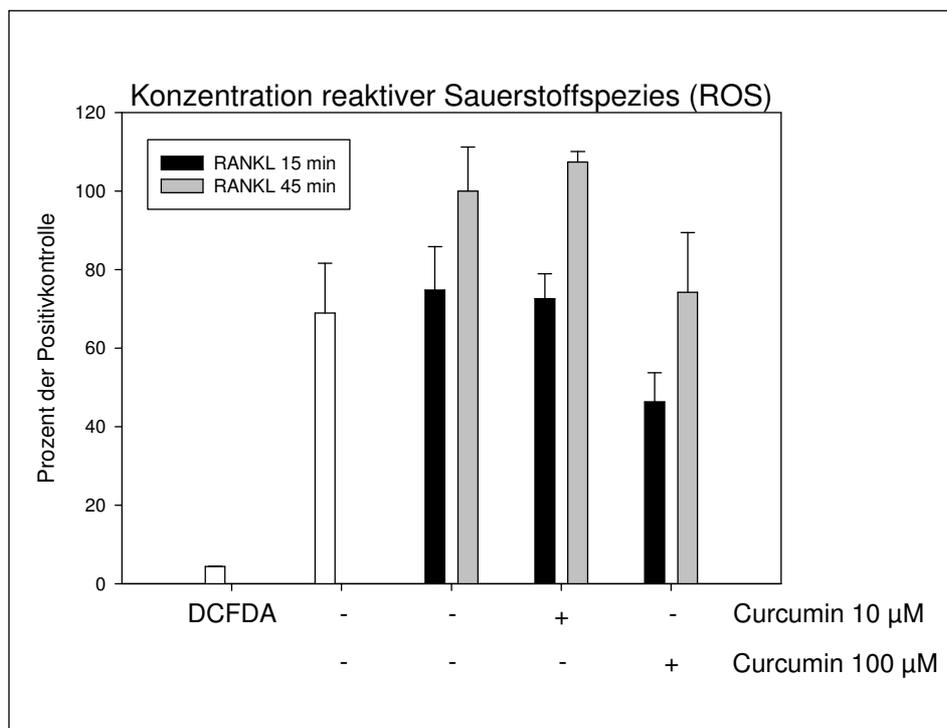


Abb. 22: ROS-Bestimmung nach Präinkubation mit Curcumin und anschließender RANKL-Stimulation in reifen humanen Osteoklasten.

3.6.6 Zusammenfassung der Untersuchungen mit Curcumin

Curcumin vermindert die durch die Stimulation mit M-CSF und RANKL hervorgerufene Osteoklastogenese und reduziert die Resorptionsfähigkeit von RANKL-aktivierten Osteoklasten. Curcumin reduzierte die NF- κ B-Aktivierung in RANKL-stimulierten Kulturen zur Erzeugung von Osteoklasten. Gleichzeitig konnte die RANKL-induzierte Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B in ausgereiften Osteoklasten durch die Behandlung mit Curcumin vermindert werden.

Zum Abschluß der Untersuchungen wurde das Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in reifen Osteoklasten untersucht. Dabei zeigte die Stimulation mit RANKL eine zeitabhängig erhöhte Produktion von ROS innerhalb von Osteoklasten. Durch Präinkubation mit Curcumin konnte die RANKL-induzierte Produktion von intrazellulären ROS konzentrationsabhängig moduliert werden. Die Verwendung einer niedrigen Konzentration ließ die ROS-Produktion unbeeinflusst. Eine Dosissteigerung hingegen führt zu einem deutlichen Absinken der intrazellulär gelegenen reaktiven Sauerstoffspezies. Zum Teil konnte dabei die RANKL-Wirkung durch Curcumin vollständig inhibiert werden.

4 Diskussion

Das Knochenskelett des Menschen stellt ein unentbehrliches Element bei der Stabilisierung und Bewegung des menschlichen Körpers dar. Als ubiquitärer Bestandteil ist es ein Reservoir für Calcium, Phosphat, Proteine und Wachstumsfaktoren [Raisz 1999]. Im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen, die als primäre Neoplasie, in Form von Tumormetastasen oder als eine Paraneoplasie in das Gefüge des Knochens eingreifen, kommt es zur Auflösung der Knochenstruktur mit Freisetzung dieser Bestandteile [Chirgwin et al. 2000].

Das multiple Myelom stellt ein Modell für eine tumorinduzierte Knochenerkrankung dar. Es handelt sich dabei um die zweithäufigste hämatologische Neoplasie, bei der terminal differenzierte B-Lymphozyten (Plasmazellen) das Knochenmark diffus infiltrieren. Dieser Erkrankung ist eigen, dass sie Osteoklasten aktiviert, zu verstärkter Knochenresorption sowie daraus resultierenden multiplen Skelettdestruktionen (Osteolysen) führt.

Der derzeitige Goldstandard innerhalb der Therapie von malignen Erkrankungen mit Osteolysen ist die Supportivtherapie mit Bisphosphonaten. Der Aufbau dieser Substanzen ähnelt dem von Pyrophosphatmolekülen, entgeht jedoch der enzymatischen Hydrolyse durch den Austausch eines Sauerstoff- gegen ein Kohlenstoffmolekül. 25-50% dieser Substanz werden nach Resorption im Knochen gespeichert. Während des Resorptionsprozesses nehmen Osteoklasten die Bisphosphonate durch Endozytose auf. Nicht stickstoffhaltige Bisphosphonate wie Clodronat und Etidronat werden intrazellulär metabolisiert und in nicht-hydrolysierbare zytotoxische ATP-Moleküle eingebaut [Green 2004]. Diese inhibieren daraufhin ATP-abhängige Enzyme.

Die weitaus potenteren stickstoffhaltigen Bisphosphonate wie Alendronat, Pamidronat und Zoledronat werden dagegen innerhalb der Zellen nicht verändert. Sie wirken direkt auf Enzyme des Mevalonat-Signalweges und verhindern so die Bildung von Isoprenverbindungen, die essentiell für die posttranslationelle Modifikation von GTP-bindenden Proteinen sind [Wyke et al. 2004]. Zu diesen zählen u.a. Proteine wie rab, rho und rac, die wichtige regulatorische Funktionen innerhalb der Zellen übernehmen.

Dem hemmenden Effekt von Bisphosphonaten auf die Osteoklastenaktivität und damit dem Knochenabbau steht jedoch ein Nebenwirkungsspektrum gegenüber, welches zu einer Einschränkung der Lebensqualität von Patienten führen kann. Zu den potentiellen Nebenwirkungen zählen Nephrotoxizität, Akut-Phase-Reaktionen, eine gastrointestinale Toxizität und Osteonekrosen im Kieferbereich [Diel et al. 2007, Ural et al. 2008].

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung neuer Substanzen, die den Knochenabbau durch Osteoklasten beeinflussen können. Vor dem Hintergrund der rasanten Erforschung der Osteoklastenentwicklung mit Identifikation der Hauptaktivierungswege galt dabei dem NF- κ B-Signalweg besonderes Augenmerk. Dieser bildet eine zentrale Komponente bei der Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und ist nach der Entdeckung des RANKL-RANK-OPG-Systems zu einem bedeutenden Ziel in der Beeinflussung von Osteoklasten und ihrer Vorläuferzellen geworden.

Bei den Testsubstanzen handelte es sich zum einen um die Proteasominhibitoren MG-132, MG-262 und Bortezomib. Zum anderen wurde Curcumin zur Behandlung von Osteoklastenvorläuferzellen und ausgereiften Osteoklasten verwendet. Besonderer Stellenwert kam der Untersuchung der modernen Therapeutika Bortezomib und Curcumin zu, für die in früheren Arbeiten ein durch NF- κ B-Inhibition induzierter Antitumoreffekt beim multiplen Myelom nachgewiesen wurde [Hideshima et al. 2001, Bharti et al. 2003, Thomas et al. 2005, Roccaro et al. 2006].

Die hier dargestellten Befunde wurden ausschließlich in Kulturen humaner Osteoklasten erhoben. Die Entwicklung und Funktionsweise dieser Zellen ist im menschlichen Organismus einzigartig. Aus diesem Grund soll zunächst die Isolation von humanen Vorläuferzellen und deren Züchtung diskutiert werden.

4.1 Züchtung von humanen Osteoklasten

Von gesunden Probanden wurde Blut aus einer peripheren Vene entnommen und dieses einer Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung von mononukleären Zellen (PBMCs) zugeführt. Die Isolation möglicher Osteoklastenvorläufer aus der PBMC-Zellfraktion erfolgte einerseits über Adhäsion, andererseits erfolgte die Isolation CD14-positiver Zellen über das MACS-System.

Zu Beginn des Kultivierungszeitraums von Monozytenkulturen, die über Adhäsion selektioniert wurden, befanden sich für 24 Stunden noch nicht-adhärenente mononukleäre Zellen im Mediumüberstand der Kulturen. Diese Zellen wurden durch Abnahme des Mediumüberstandes aus der Kultur entfernt und adhärenente mononukleäre Zellen nach Trypsinierung in 24-well- bzw. 6-well-Platten überführt. Es konnte so eine homogene Zellkultur generiert und eine Beeinflussung der adhärenenten mononukleären Zellen durch nicht-adhärenente mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten, minimiert werden.

Der Vorteil einer CD14-selektierten Population von mononukleären Zellen lag in der Erzeugung einer Zellkultur, die zu einem höheren Prozentsatz potentielle Osteoklastenvorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Zellreihe enthielten. Zudem konnte man die Beeinflussung durch nicht-adhärenente mononukleäre Zellen umgehen.

Zur Wahrung der Vergleichbarkeit der Versuche wurde innerhalb der Versuchsreihen für die jeweilige Testsubstanz entweder die Adhäsionsselektion oder die Selektion von CD14-positiven Zellen durchgeführt. Die gewonnenen Zellen wurden jeweils für 28 Tage auf Plastik oder auf Elfenbeinchips mit den Wachstumsfaktoren M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (25 ng/ml) stimuliert. Es wurden bei jeder Versuchsreihe Negativkontrollen mitgeführt, deren Medium nur M-CSF (25 ng/ml) als Stimulans enthielten.

4.1.1 Stimulation mit M-CSF und RANKL bewirkt Osteoklastogenese

Unter der Stimulation der Kulturen mononukleärer Zellen (PBMCs) und CD14-selektierter mononukleärer Zellen mit M-CSF und RANKL kam es in dem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen zu einer Osteoklastogenese. In den im Vorfeld zu den Behandlungsuntersuchungen durchgeführten Experimenten wurden unabhängig von dem Isolationsverfahren bereits ab dem 7. Tag erste TRAP-positive mononukleäre Zellen lichtmikroskopisch nachgewiesen, die als Präosteoklasten identifiziert werden konnten. Nach etwa 14 Tagen kam es innerhalb der Kulturen zur Bildung von multinukleäre TRAP-positiven Zellen. Ab dem 21. Tag konnten mehrkernige TRAP-positive Zellen lichtmikroskopisch eindeutig als Osteoklasten identifiziert werden. Diese Entwicklung mononukleärer Zellen zu Osteoklasten unter Stimulation mit M-CSF und RANKL deckt sich mit Untersuchungen, die diesbezüglich von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden [Karsdal et al. 2003, Schilling et al. 2004, Yaccoby et al. 2004, Zauli et al. 2004].

Interessanterweise führte die alleinige Stimulation der Kulturen mit M-CSF nach 28 Tagen zur Bildung einer geringen Anzahl an multinukleären TRAP-positiven Zellen, die als Osteoklasten identifiziert werden konnten. Diese Kulturen müssen somit Zellen enthalten haben, die unter Stimulation mit M-CSF zu einer Produktion und Sekretion bzw. Expression von RANKL befähigt waren. Dieser Befund konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden [Nicholson et al. 2000]. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Zellen um noch nicht genau identifizierte Mitglieder der Monozyten-Makrophagen-Zellreihe handelt.

Eine Bestätigung fand dies in den hier vorliegenden Beobachtungen an CD14-selektionierten mononukleären Zellen. Auch hierbei kam es unter der alleinigen Stimulation mit M-CSF zur Bildung von Osteoklasten. Innerhalb der im Anschluss durchgeführten Resorptionsuntersuchungen zeigte sich, dass die Stimulation von adhärenenten PBMCs, jedoch nicht die Stimulation CD14-selektionierter Zellen mit M-CSF zu einer Resorption von Elfenbein führten. Demzufolge führte die Stimulation CD14-selektionierter Zellen mit M-CSF zu einem geringen Prozentsatz zur Bildung von nicht resorptionsfähigen multinukleären Osteoklasten, so genannten ruhenden Osteoklasten.

4.2 Rolle von NF- κ B während Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten

Wie der Name des extrazellulären Aktivierungsfaktors für Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*) vermuten lässt, ist dieser eng mit dem intrazellulär gelegenen Transkriptionsfaktor NF- κ B verbunden. Jedoch ist dieser nicht der einzige Faktor, der die komplexen Prozesse während der unterschiedlichen Stadien der Osteoklastogenese und der Osteoklastenaktivierung beeinflussen, so dass mit Neuentdeckung anderer Faktoren die Rolle von NF- κ B immer wieder in Frage gestellt wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass vor allem p38, c-Fos, und NFATc1, ebenfalls Ziele von RANKL, zu einer Steigerung der Osteoklastogenese führen. Dabei fand eine Arbeitsgruppe zwar NFATc1, jedoch konnte sie keine Untereinheiten von NF- κ B in einem frühen Stadium der Osteoklastogenese nachweisen [Zhu et al. 2005]. Dem gegenüber stehen zahlreiche Arbeiten, die weiterhin NF- κ B eine wichtige Rolle während der Osteoklastendifferenzierung zuschreiben [Franzoso et al. 1997, Iotsova et al. 1997, Jimi et al. 1998, Boyce et al. 1999, Wei et al. 2001]. Eine viel zitierte Arbeit, die sich mit der Expression von NF- κ B in Präosteoklasten beschäftigte, konnte in einem Knock-out-Mausmodell zeigen, dass ein Fehlen von NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52) unabwendbar in die Manifestation einer Osteopetrose mündet [Iotsova et al. 1997].

Auch bezüglich der Aktivierung von Osteoklasten gilt NF- κ B als ein kritischer Faktor. Jedoch existieren nur wenige Arbeiten zu diesem Thema. Die Untersuchung gestaltet sich schwieriger und langwieriger, da eine Kultur über mindestens 21 Tage geführt werden muss. NF- κ B-knock-out Modelle in Mäusen lassen sich nicht anwenden, da es zunächst zur Ausbildung von Osteoklasten kommen muss, um deren Funktion zu untersuchen. Das in der vorliegenden Arbeit dargestellte Verfahren stellt die derzeit gängigste Untersuchung der Osteoklastenfunktion dar.

Mit Hilfe derer konnte bereits gezeigt werden, dass IL-1 α über die Aktivierung von NF- κ B zu einer Steigerung der Knochenresorption in Mausosteoklasten führt [Miyazaki et al. 2000]. In dieser Arbeit konnte die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch das Einschleusen einer IKK-Mutante als Adenovirusvektor demonstriert werden.

Die vorliegende Arbeit unterstützt die These, dass NF- κ B einen kritischen Faktor während der Osteoklastogenese, Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten darstellt.

4.3 Die Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262

Die hier vorgestellten Untersuchungen mit den Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262 wurden an humanen Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen durchgeführt, deren Gewinnung aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes über Adhäsion erfolgte.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die in den hier vorgestellten Versuchen verwendeten Dosierungen im subapoptotischen Bereich lagen. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die dargestellten Befunde auf der Induktion eines programmierten Zelltodes (Apoptose) in einem Frühstadium der Osteoklasten, sondern vielmehr auf der Interaktion der Proteasominhibitoren mit dem Proteasom innerhalb der Zellen beruhen.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Proteasominhibitoren MG-132 und MG-262 die RANKL-stimulierte Ausreifung von humanen mononukleären Zellen zu Osteoklasten signifikant hemmen. Die Reduktion der Osteoklastenzahl war signifikant und betrug für MG-132 und MG-262 bis zu 80% im Vergleich zur Positivkontrolle. Eine Dosisabhängigkeit war nachweisbar.

Des Weiteren konnte eine signifikante Reduktion der Osteoklastenfunktion, d.h. der Fähigkeit von Osteoklasten, Knochen zu resorbieren, demonstriert werden. Dazu wurden humane adhärenente mononukleäre Zellen bis zum Tag 28 mit den Wachstumsfaktoren M-CSF und RANKL stimuliert. Zusätzlich erfolgte in einem Teil der Ansätze die Behandlung mit MG-132 und MG-262. Die Lakunenanzahl bzw. Lakunendichte wurde durch MG-132 um 60-93% im Vergleich zur Positivkontrolle reduziert. Für MG-262 konnte eine Reduktion der Lakunendichte von 87-97% erreicht werden. Die Reduktion der Resorptionslakunendichte übertraf in den höheren Dosierungen von MG-132 und MG-262 die Verminderung der Osteoklastenzahl, was als ein eindeutiger Hinweis auf eine zusätzliche Hemmung der RANKL-induzierten Aktivierung von Osteoklasten zu werten ist.

Vergleicht man MG-132 und MG-262 in ihrer Wirkung auf die Osteoklastendifferenzierung und die Osteoklastenaktivierung so fällt auf, dass obwohl beide Substanzen eine vergleichbare Hemmung der Osteoklastendifferenzierung erreichten, sich die Hemmung der Osteoklastenfunktion unterschiedlich gestaltete. Dabei zeigte sich, dass MG-262 eine etwa doppelt so starke Hemmung der Osteoklastenfunktion bewirkte wie MG-132.

Die Messung der NF- κ B-Aktivität erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis der Untereinheit p65 von DNA-bindungsfähigem NF- κ B am Tag 28 der Kultivierung. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit MG-132 und MG-262 eine signifikante Inhibition der NF- κ B-Aktivität in RANKL-stimulierten Kulturen zur Erzeugung von Osteoklasten nachweisbar ist. Die NF- κ B-Aktivität konnte durch MG-132 und MG-262 auf bis zu 1/3 der unbehandelten Kontrolle reduziert werden. Eine Dosisabhängigkeit war nachweisbar.

Diese Befunde legen nahe, dass die Aktivierung von NF- κ B und die Resorptionsinduktion von humanen Osteoklasten in einem direkten Zusammenhang stehen. Da zudem eine signifikante Korrelation zwischen NF- κ B-Aktivität und Osteoklastogenese nachweisbar war, ist anzunehmen, dass auch die Hemmung der Osteoklastendifferenzierung, zumindest teilweise, auf diesem Mechanismus beruht.

Eine entscheidende Wirkung der Proteasominhibition stellt dabei die Hemmung des phospho-I κ B-Abbaus durch das 26S-Proteasom dar. Beide hier verwendeten Proteasominhibitoren lassen die Phosphorylierung und die anschließende Markierung mit Hilfe von Ubiquitin aufgrund der dargestellten Wirkungsmechanismen unbeeinflusst. Wie bereits durch andere Arbeitsgruppen dargestellt, löst sich das markierte phospho-I κ B nicht aus der Bindung des NF- κ B-Komplexes [Traenckner et al. 1994]. Folge ist vermutlich eine Reduktion der Liberation von NF- κ B-Molekülen und deren Bindung an NF- κ B-Zielgene.

Aufgrund der leichten Unterschiede zwischen Hemmung der Osteoklastendifferenzierung und Hemmung der Osteoklastenfunktion müssen zumindest während der humanen Osteoklastogenese weitere Faktoren eine Rolle spielen. Dabei kommt zum einen p38 in Frage, welches bereits in vorhandenen Arbeiten als wichtiger Faktor in der frühen Osteoklastenentwicklung dargestellt wurde [Li et al. 2002]. Zum anderen scheinen c-Fos und c-Jun, Mitglieder der AP-1-Familie, als Heterodimer eine entscheidende Rolle in Präosteoklasten zu spielen. Dass zudem zwischen diesen Faktoren ein Zusammenhang besteht, bestätigt der Befund, dass sowohl p38 als auch c-Fos in Kontakt mit NFATc1 treten [Matsumoto et al. 2004, Huang et al. 2006].

Ein Teil der hier vorgestellten Befunde konnte bereits in angesehenen internationalen medizinischen Zeitschriften veröffentlicht werden [Zavrski et al. 2005, Zavrski et al. 2007].

4.4 Der Proteasominhibitor Bortezomib

Für die Untersuchungen mit Bortezomib wurden erstmals nur humane Monozyten, die über CD14-Selektion mit Hilfe von MACS-Säulen gewonnen wurden, verwendet. Zu Beginn der Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen von Bortezomib im subapoptotischen Bereich lagen. Bortezomib wirkte in den vorgestellten Dosierungen während der Osteoklastenentwicklung nicht toxisch.

In den anschließenden Versuchen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Bortezomib die RANKL-induzierte Differenzierung von humanen Osteoklasten signifikant inhibiert. Die Reduktion der Zahl multinukleärer TRAP-positiver Zellen lag verglichen mit der Positivkontrolle für die niedrigere Dosis bei 60%, für die höhere sogar bei 80%. Eine vollständige Inhibition der RANKL-stimulierten Osteoklastogenese konnte nicht erreicht werden. In Parallelversuchen wurde gleichzeitig die Wirkung von Bortezomib auf die Aktivierung von ausgereiften humanen Osteoklasten untersucht. Es wurde eine Reduktion der Lakunendichte um etwa die gleichen Zahlenwerte wie die Differenzierungshemmung erreicht. In der Negativkontrolle konnte in diesen Versuchsreihen keine Resorption nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Bortezomib in den hier vorgestellten Dosierungen führte nicht zum vollständigen Erliegen der Resorption.

Der Einfluss von Bortezomib auf die NF- κ B-expression wurde in ausgereiften Osteoklasten am Tag 28 der Kultur untersucht. Es konnte eine deutliche Reduktion der NF- κ B-Aktivität in ausgereiften Osteoklasten nachgewiesen werden. Dabei übertraf die Minderung der Aktivität von NF- κ B unter der Behandlung mit Bortezomib die der Negativkontrolle, d.h. der nicht-RANKL-stimulierten Kontrolle. Mit der Behandlung mit Bortezomib konnte somit die RANKL-stimulierte NF- κ B-Aktivierung vollständig inhibiert werden. Es zeigte sich die Bortezomibwirkung in einem erhöhten Vorhandensein von phosphoryliertem I κ B innerhalb der Zellen. In ausgereiften Osteoklasten kam es somit zu einer Verringerung der NF- κ B-aktivität durch die Bildung eines stabilen p-I κ B-NF- κ B-Komplexes im Zellinneren.

Damit konnte die schon in den Versuchen zu den Proteasominhibitoren MG 132 und MG 262 geäußerte Vermutung bestätigt werden, dass die Phosphorylierung von I κ B nicht zur Lösung der Bindung von NF- κ B und I κ B führte. Der inhibitorische Effekt von I κ B blieb bestehen.

Mit Hilfe dieser Befunde konnte in der vorliegenden Arbeit zum einen der Wirkungsmechanismus von Bortezomib in humanen Osteoklasten und deren Vorläuferzellen demonstriert werden. Zum anderen bestätigen diese Befunde die führende Rolle von NF- κ B während der Aktivierung von humanen Osteoklasten.

Ein Teil der hier vorgestellten Befunde konnte bereits in einer renommierten medizinischen Zeitschrift veröffentlicht werden [von Metzler et al. 2007].

4.5 Curcumin

Kaum eine andere Medizinalpflanze wird zurzeit so intensiv erforscht wie *Curcuma longa* L., die Gelbwurz. Befanden sich im Jahre 2003 noch etwa 500 Einträge in *Medline*, so sind heute bereits über 2300 Publikationen in der medizinischen Datenbank vorhanden.

Verwandt ist der Gelbwurz mit den Ingwergewächsen und wird vor allem im südasiatischen Raum angebaut. Zu den Wirkstoffen werden die ätherischen Öle sowie die Curcuminoide gezählt. Bei den Curcuminoiden handelt es sich um nicht flüchtige, gelb-orange gefärbte Dicinamoylmethan-Derivate, die überwiegend in einer durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Keto-Enol-Form vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Curcumin bzw. Curcumin I verwendet und dessen Wirkung auf heranreifende sowie ausgereifte humane Osteoklasten beschrieben. Neben Curcumin existieren noch Mono- und Didesmethoxycurcumin (Curcumin II und III), die ebenfalls aus pharmazeutischer Sicht mehr und mehr an Bedeutung gewinnen [Buechi et al. 2004].

Da ein großer Teil der hier vorgestellten Versuche mit Curcumin zur gleichen Zeit wie Versuche mit MG 132 und MG 262 an humanen Osteoklasten durchgeführt wurden, erfolgte die Isolierung von humanen Osteoklastenvorläuferzellen des peripheren Blutes vorrangig durch eine Selektion innerhalb der PBMCs über Zelladhäsion. In der vorliegenden Arbeit sollten vor allem die Ergebnisse aus diesen Versuchsreihen vorgestellt und analysiert werden.

Zu Beginn der Versuche wurde das zytotoxische Potential der hier verwendeten Konzentrationen von Curcumin auf mononukleäre Zellen getestet. 1 μ M und 10 μ M Curucmin konnten als subapoptotische Dosierungen ermittelt werden.

Erstmalig konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Curcumin signifikant die Genese von humanen Osteoklasten hemmt. Eine Dosisabhängigkeit war dabei graphisch und rechnerisch nachweisbar. Mit der höheren Dosierung von 10 μM Curcumin wurde eine Reduktion der in Kultur befindlichen humanen Osteoklasten um fast 70% erreicht. Damit konnte in etwa das Niveau der Negativkontrolle am Tag 28 der Kultur erzielt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen bei Beobachtungen von Präosteoklastenkulturen aus der Mausmakrophagen-Zelllinie RAW 264.7 erhoben [Bharti et al. 2004]. Dabei wurde diese Zelllinie als Sekundärkultur unter der Stimulation mit RANKL und Curcuminbehandlung über 5 Tage geführt. Hierbei konnte eine Reduktion der Osteoklastenzahl unter Behandlung mit Curcumin in einer Dosierung von 10 μM um 80% nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle in diesen Versuchen zeigte keinerlei Wachstum von Osteoklasten.

Im Verlauf der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Fotografien der Kulturen nach TRAP-Färbung am Tag 28 aufgenommen. Eine Stimulation mit RANKL führt zum vermehrten Auftreten von großen mehrkernigen Riesenzellen, die z.T. das 10-12fache der Größe benachbarter Präosteoklasten ausmachten. Daneben konnten TRAP-positive Zellen nachgewiesen werden, die sich in einem zellulären Verband zusammengeschlossen hatten, um zu diesem Zeitpunkt der Kultur weitere Osteoklasten zu formieren.

Nach Behandlung mit Curcumin zeigten sich deutlich geringere Osteoklastenzahlen. Die Zelldichte der Kultur unter der Behandlung mit Curcumin 10 μM entsprach in etwa dem Bild der Negativkontrolle, d.h. dem Ansatz, der ohne RANKL-Stimulation über 28 Tage geführt worden war.

Neben der Hemmung der humanen Osteoklastogenese durch Curcumin konnte hier erstmalig die Inhibition der Resorptionsaktivität von RANKL-stimulierten Kulturen zur Erzeugung von Osteoklasten durch Curcuminbehandlung beschrieben werden. Es zeigte sich in den vorliegenden Versuchen eine deutliche Reduktion von Resorptionslakunen auf Elfenbein. Wo es unter Curcuminbehandlung in einer Dosierung von 1 μM zu einer Reduktion der Lakunendichte um etwa die Hälfte kam, konnte mit einer Dosissteigerung von Curcumin auf 10 μM eine nur minimale Aktivität von Osteoklasten nachgewiesen werden. In einem Teil der Versuche war keine Resorption bei Behandlung mit Curcumin in einer Dosis von 10 μM nachweisbar. Dieser Befund zeigte somit eine vollständige Inhibition der RANKL-stimulierten Aktivierung von Osteoklasten durch 10 μM Curcumin.

Ein Vergleich der Wirkung von Curcumin auf Osteoklastenanzahl und Osteoklastenaktivität verdeutlicht den oben genannten Effekt. Es zeigte sich, dass in etwa die gleiche Reduktion von Osteoklastenanzahl und Resorptionslakunendichte in RANKL-stimulierten Kulturen zur Erzeugung von Osteoklasten durch den Einsatz von Curcumin in der Dosis 1 μM erzielt wurde. Bei der Behandlung mit Curcumin in der Dosis 10 μM jedoch dominierte die Reduktion der Resorptionsaktivität, was auf eine zusätzliche Inhibition der RANKL-induzierten Aktivierung von reifen Osteoklasten hinweist. In dieser Dosierung lag die Reduktion der Osteoklastenanzahl über der Negativkontrolle, hingegen die Reduktion der Osteoklastenaktivität deutlich unter dem Niveau der Negativkontrolle.

Der übergeordnete Mechanismus scheint hierbei, die Inhibition der NF- κB -Aktivität zu sein. Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit die Reduktion der NF- κB -Aktivität in RANKL-stimulierten Kulturen zur Erzeugung von humanen Osteoklasten unter Curcuminbehandlung gezeigt werden. Dabei wiesen die Behandlung mit Curcumin in einer Dosierung von 1 μM eine leichte, in einer Dosierung von 10 μM eine deutliche und signifikante Hemmung der RANKL-induzierten NF- κB -Aktivierung auf. Die NF- κB -Aktivität lag in etwa auf dem Niveau der Negativkontrolle. Es lag zwischen der Dichte von Resorptionslakunen und der NF- κB -Aktivität eine signifikante Korrelation vor, d.h. Curcumin inhibierte die Resorptionsaktivität in RANKL-stimulierten Kulturen zur Erzeugung von humanen Osteoklasten durch die Hemmung der intrazellulären NF- κB -Aktivität.

Zur Klärung des Wirkungsmechanismus von Curcumin im Zusammenhang mit der NF- κB -Aktivität wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche vorgestellt, in denen der zeitliche Ablauf der Entstehung von phosphoryliertem I κB - α in humanen Osteoklasten untersucht worden war.

Es erfolgte über unterschiedliche Zeiträume eine RANKL-Stimulation humaner Osteoklastenkulturen mit und ohne Curcumin-Präinkubation. Erstmals konnte dabei gezeigt werden, dass Curcumin in reifen humanen Osteoklasten die RANKL-induzierte Phosphorylierung von I κB - α hemmt. Es wurde unter Stimulation mit RANKL bereits nach 5 Minuten ein deutlicher Anstieg von phosphoryliertem I κB - α innerhalb der Zellen registriert. Daraufhin folgte die stetige Abnahme der Konzentration von phospho-I κB - α vermutlich aufgrund des sich anschließenden Abbaus von p-I κB - α im Proteasom. Die parallel erhobene I κB - α -Expression zeigte eine Reduktion des Gesamt-I κB - α innerhalb der Zellen nach 15 Minuten. Es folgte ein Wiederanstieg innerhalb von 45 Minuten auf die Ausgangsexpression.

Dieser Befund lässt sich ebenfalls durch die sinkende Konzentration von phospho-I κ B- α erklären. Anscheinend folgte diesem Absinken der Gesamt-I κ B- α -Expression eine Produktion von Inhibitormolekülen, die zu einem Wiederanstieg der I κ B- α -Konzentration führte. Auch hierfür ist vermutlich die Induktion durch RANKL eine Ursache.

Curcumin reduziert die RANKL-induzierte Phosphorylierung von I κ B- α . Nach 5 Minuten ist unter Curcuminbehandlung verglichen mit der unbehandelten Probe eine sehr geringe Konzentration nachweisbar. Zum Zeitpunkt nach 30 Minuten sind nur noch Spuren von phospho-I κ B- α im Western Blot vorhanden. Die parallel aufgenommene I κ B- α -Expression zeigte ein nahezu gleich bleibendes Niveau ohne zeitliche Schwankungen. Eine mögliche Ursache der verminderten Phosphorylierung von I κ B- α könnte die Hemmung der intrazellulären IKK durch Curcumin sein. Andere Arbeitsgruppen postulierten bereits eine Hemmung der IKK durch Curcumin in humanen Tumorzelllinien [Bharti et al. 2003, Aggarwal et al. 2006]. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund indirekt durch den Nachweis des enzymatischen Produktes der IKK, p-I κ B- α , in humanen reifen Osteoklasten bestätigt werden.

Vervollständigt wurden die Untersuchungen zu Curcumin durch die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) innerhalb von humanen reifen Osteoklasten. Bereits in den 1990er Jahren konnte von Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies in niedriger Konzentration als Botenstoff (*second messenger*) innerhalb von Zellen wirken [Garrett et al. 1990, Lander 1997, Rhee 1999, Foreman et al. 2003].

Dabei scheint ein direkter Zusammenhang der reaktiven Sauerstoffspezies mit p38, JNK, ERK und NF- κ B zu bestehen, was diesen Mechanismus auch für die Untersuchung der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivierung interessant macht [Lee et al. 2005]. Vor allem die durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesene anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaft von Curcumin ließen darauf schließen, dass die Produktion von ROS durch Curcumin moduliert werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein zeitabhängiger RANKL-stimulierter Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in humanen reifen Osteoklasten gezeigt werden. Erstmals demonstrierten die hier vorgestellten Versuche, dass Curcumin die Bildung der ROS durch RANKL moduliert. Dabei zeigte sich, dass Curcumin in einer Konzentration von 10 μ M die RANKL-stimulierte Bildung von ROS nahezu unbeeinflusst lässt. Jedoch führte eine Dosissteigerung von Curcumin auf 100 μ M zur vollständigen Inhibition der RANKL-induzierten ROS-Bildung.

Diese dosisabhängige Wirkung konnte bereits in abgewandelter Form in humanen Osteoblastenzelllinien demonstriert werden [Chan et al. 2006].

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal beschrieben werden, dass es in humanen reifen Osteoklasten durch 45minütige RANKL-Stimulation zu einem Anstieg von ROS kommt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Curcumin, welches eindeutig die humane Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivierung beeinflusst, die ROS-Produktion in der hier verwendeten Dosierung innerhalb reifer Osteoklasten nur minimal moduliert. Diese Befunde verdeutlichen, dass für die Curcuminwirkung in einer Konzentration von 10 μM bezüglich der RANKL-induzierten Osteoklastenaktivierung vorrangig andere Ziele, wie vermutlich die Hemmung der IKK, eine Rolle spielen.

Ein Teil der hier vorgestellten Befunde konnte bereits in anerkannten medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden [von Metzler et al. 2008].

5 Zusammenfassung

Die Therapie osteolytischer Herde bei Tumorerkrankungen stellt noch immer eine Herausforderung für Patient und Arzt dar. Dabei führt der Abbau von Knochengewebe im Bereich der Wirbelsäule als Prädilektionsstelle zur Änderung der Stabilität des Körpers und der Gefahr der Schädigung des Rückenmarks. Folgen sind neben einem schwer beherrschbaren Schmerzsyndrom neurologische Defizite und Blasen-Mastdarmstörungen, die zu einer drastischen Reduktion der Lebensqualität führen. Der derzeitige pharmakologische Goldstandard liegt in der Anwendung von Bisphosphonaten. So kommt zu dem bereits vorhandenen Pharmakaregime ein weiteres nebenwirkungsreiches Medikament. Dieses wirkt zwar effektiv, jedoch nur auf die knochenresorbierenden Zellen des menschlichen Organismus, die Osteoklasten.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Wirkung moderner Tumorthapeutika auf die Genese, Differenzierung und Aktivität von humanen Osteoklasten. Zur Beschreibung der Wirkungsmechanismen wurden die für die Entwicklung und Funktion von Osteoklasten wichtige NF- κ B-Aktivität herangezogen. Analysiert wurden die Proteasominhibitoren MG-132, MG-262 und Bortezomib sowie Curcumin. Diesen Substanzen konnte in Studien und Vorversuchen ein eindeutiger Antitumoreffekt bestätigt werden. Besonderes Interesse lag auf der Wirkungsanalyse der Substanzen Bortezomib und Curcumin. Bortezomib kommt bereits bei der Therapie von fortgeschrittenem multiplen Myelom zum Einsatz. Für Curcumin konnte in tierexperimentellen Versuchsreihen eine Antitumorwirkung beim metastasierenden Melanom, Mantelzelllymphom, metastasierenden Mammakarzinom und in der Prävention des Kolonkarzinoms gezeigt werden. Beide Substanzen werden als besonders nebenwirkungsarm eingeschätzt.

Zur Gewinnung humaner Präosteoklasten und Osteoklasten wurde gesunden Probanden peripheres Venenblut entnommen, aus dem die Selektion möglicher Osteoklastenvorläuferzellen innerhalb der Monozyten-Makrophagen-Linie erfolgte. Hierbei wurden die Adhäsionsfähigkeit und die Expression des Oberflächenmarkers CD14 dieser Zellen genutzt. Die Stimulation von Wachstum und Resorption erfolgte dann mit Hilfe der Wachstumsfaktoren M-CSF und RANKL. Zur Auswertung der Osteoklastogenese/-differenzierung innerhalb der Kulturen wurde die intrazellulär gelegene tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) angefärbt. Die Analyse der Aktivierung reifer Osteoklasten wurde durch Toluidinblaufärbung von Resorptionslakunen auf Elfenbeinchips erreicht. Dabei wurden die Kulturen stets über 28 Tage geführt. Nach dieser Zeit folgte die Bestimmung der NF- κ B-Aktivität per p65-ELISA.

Zur Klärung der Wirkungsmechanismen von Bortezomib und Curcumin erfolgte neben der Ermittlung der intrazellulären NF- κ B-Aktivität die Expression von I κ B- α - und phospho-I κ B- α innerhalb der Zellen per Western Blot. Die Analyse des intrazellulären ROS-Spiegels unter Curcuminbehandlung erfolgte durch die Verwendung von 2',7'-Dichlorofluoreszeindiacetat.

Es konnten in der vorliegenden Arbeit zunächst Befunde bezüglich der noch relativ neuen Methode der In-vitro-Anzucht humaner Osteoklasten geliefert und bestätigt werden. Dabei kamen 2 Isolationsverfahren möglicher Osteoklastenvorläuferzellen zum Einsatz. Einerseits erfolgte zur Separation die Adhäsionsselektion mononukleärer Zellen (PBMCs), andererseits wurden PBMCs einer CD14-Selektion mit Hilfe eines *magnetic-activated cell sorters* (MACS) zugeführt. Dabei zeigten sich vergleichbare Wachstumsdichten. Beide Verfahren führen zur Generierung von inhomogenen Zellpopulationen, in denen stets durch die Stimulation mit M-CSF und RANKL eine Osteoklastogenese hervorgerufen werden kann. Die Stimulation dieser Kulturen mit M-CSF führte unabhängig vom verwendeten Isolationsverfahren zur Entstehung multinukleärer TRAP-positiver Zellen. Allerdings kam es dabei nur bei den über Adhäsionsselektion isolierten Zellen, nicht bei den CD14-selektionierten Zellen zur Resorption von Dentin. Die aus dieser Arbeit resultierende Empfehlung ist die Verwendung der CD14-Selektion zur Gewinnung möglicher Osteoklastenvorläuferzellen, da diese Methode beständigere und homogenere Kulturen lieferte.

Die Untersuchungen zeigten eine deutliche dosisabhängige Reduktion der RANKL-induzierten Genese/Differenzierung und Resorptionsaktivierung von humanen Osteoklasten durch die Proteasominhibitoren MG-132, MG-262 und Bortezomib sowie Curcumin. Gleichzeitig zeigte sich durch die verwendeten Substanzen eine Reduktion der RANKL-induzierten NF- κ B-Aktivierung. Die Analyse der I κ B- α und phospho-I κ B- α -Expression nach 28 Tagen zeigte bei der Behandlung mit Bortezomib eine erhöhte Expression von phospho-I κ B- α im Vergleich zur RANKL-stimulierten Positivkontrolle. Zurückzuführen ist dieser Befund vermutlich auf die Hemmung des Proteasomabbaus dieses Inhibitors. Curcumin zeigte in einem ähnlichen Versuchsaufbau, vermutlich basierend auf einer IKK-Hemmung, eine reduzierte Expression von phospho-I κ B- α . Die aufgeführten Befunde nach Bortezomib- und Curcuminbehandlung zeigen die Bedeutung von NF- κ B für die Aktivierung von humanen Osteoklasten.

Klinische Studien sind nun notwendig, um zu prüfen, ob die hier verwendeten Pharmaka zu einer Reduktion von Knochenmanifestationen bei malignen Erkrankungen mit Knochenmetastasen führen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abe M., Hiura K., Wilde J., Moriyama K., Hashimoto T., Ozaki S., Wakatsuki S., Kosaka M., Kido S., Inoue D. and Matsumoto T. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002; 100:2195-2202.
- [2] Abroun S., Ishikawa H., Tsuyama N., Liu S. Q., Li F. J., Otsuyama K., Zheng X., Obata M. and Kawano M. M. Receptor synergy of interleukin-6 (IL-6) and insulin-like growth factor-I that highly express IL-6 receptor alpha myeloma cells. *Blood* 2004; 103:2291-2298.
- [3] Aggarwal B. B., Kumar A. and Bharti A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003; 23:363-98.
- [4] Aggarwal B. B., Shishodia S., Takada Y., Banerjee S., Newman R. A., Bueso-Ramos C. E. and Price J. E. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7490-8.
- [5] Aggarwal S., Ichikawa H., Takada Y., Sandur S. K., Shishodia S. and Aggarwal B. B. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol* 2006; 69:195-206.
- [6] Akatsu T., Murakami T., Ono K., Nishikawa M., Tsuda E., Mochizuki S. I., Fujise N., Higashio K., Motoyoshi K., Yamamoto M. and Nagata N. Osteoclastogenesis inhibitory factor exhibits hypocalcemic effects in normal mice and in hypercalcemic nude mice carrying tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Bone* 1998; 23:495-8.
- [7] Anderson D. M., Maraskovsky E., Billingsley W. L., Dougall W. C., Tometsko M. E., Roux E. R., Teepe M. C., DuBose R. F., Cosman D. and Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390:175-179.
- [8] Balasubramanyam M., Koteswari A. A., Kumar R. S., Monickaraj S. F., Maheswari J. U. and Mohan V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. *J Biosci* 2003; 28:715-21.
- [9] Bataille R. and Housseau J. L. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 1997; 336:1657-64.
- [10] Bataille R., Jourdan M., Zhang X. G. and Klein B. Serum Levels of Interleukin-6, a Potent Myeloma Cell-Growth Factor, as a Reflect of Disease Severity in Plasma-Cell Dyscrasias. *Journal of Clinical Investigation* 1989; 84:2008-2011.
- [11] Berridge M. V., Herst P. M. and Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11:127-52.
- [12] Berridge M. V. and Tan A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303:474-82.
- [13] Bharti A. C., Donato N., Singh S. and Aggarwal B. B. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003; 101:1053-62.
- [14] Bharti A. C., Takada Y. and Aggarwal B. B. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced NF-kappa B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J Immunol* 2004; 172:5940-7.
- [15] Boyce B. F., Xing L., Franzoso G. and Siebenlist U. Required and nonessential functions of nuclear factor-kappa B in bone cells. *Bone* 1999; 25:137-9.
- [16] Boyle W. J., Simonet W. S. and Lacey D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337-42.
- [17] Buechi S. and Bolli R. Curcuma, die Gelbwurz - Botanische, pharmakologische und klinische Aspekte. *Phytotherapie Nr. 4* 2004:26-31.
- [18] Carlotti F., Dower S. K. and Qwarnstrom E. E. Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem* 2000; 275:41028-34.
- [19] Cavo M. Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20:1341-52.

- [20] Chan W. H., Wu C. C. and Yu J. S. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Cell Biochem* 2003; 90:327-38.
- [21] Chan W. H., Wu H. J. and Hsuuw Y. D. Curcumin inhibits ROS formation and apoptosis in methylglyoxal-treated human hepatoma G2 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042:372-8.
- [22] Chan W. H., Wu H. Y. and Chang W. H. Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. *Food Chem Toxicol* 2006; 44:1362-71.
- [23] Chauhan D., Hideshima T. and Anderson K. C. Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:465-76.
- [24] Chen Y. R. and Tan T. H. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998; 17:173-8.
- [25] Chirgwin J. M. and Guise T. A. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000; 10:159-78.
- [26] Chng W. J., Lau L. G., Yusof N. and Mow B. M. Targeted therapy in multiple myeloma. *Cancer Control* 2005; 12:91-104.
- [27] Choi S. J., Cruz J. C., Craig F., Chung H., Devlin R. D., Roodman G. D. and Alsina M. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood* 2000; 96:671-675.
- [28] Conney A. H., Lysz T., Ferraro T., Abidi T. F., Manchand P. S., Laskin J. D. and Huang M. T. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv Enzyme Regul* 1991; 31:385-96.
- [29] Cozzolino F., Torcia M., Aldinucci D., Rubartelli A., Miliani A., Shaw A. R., Lansdorp P. M. and Diguglielmo R. Production of Interleukin-1 by Bone-Marrow Myeloma Cells. *Blood* 1989; 74:380-387.
- [30] Crawford L. J., Walker B., Ovaa H., Chauhan D., Anderson K. C., Morris T. C. and Irvine A. E. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Res* 2006; 66:6379-86.
- [31] Dahlin D. C. Bone tumors. 3rd Edition. Charles C. Thomas, Springfield IL 1978;
- [32] Dahlmann B. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* 2007; 8 Suppl 1:S3.
- [33] Dai X. M., Ryan G. R., Hapel A. J., Dominguez M. G., Russell R. G., Kapp S., Sylvestre V. and Stanley E. R. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 2002; 99:111-20.
- [34] Deeb D., Xu Y. X., Jiang H., Gao X., Janakiraman N., Chapman R. A. and Gautam S. C. Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2:95-103.
- [35] Diel I. J., Bergner R. and Grotz K. A. Adverse effects of bisphosphonates: current issues. *J Support Oncol* 2007; 5:475-82.
- [36] Feng X., Takeshita S., Namba N., Wei S., Teitelbaum S. L. and Ross F. P. Tyrosines 559 and 807 in the cytoplasmic tail of the macrophage colony-stimulating factor receptor play distinct roles in osteoclast differentiation and function. *Endocrinology* 2002; 143:4868-74.
- [37] Flanagan A. M. and Massey H. M. Generating human osteoclasts in vitro from bone marrow and peripheral blood. *Methods Mol Med* 2003; 80:113-28.
- [38] Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D., Davies J. M. and Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 2003; 422:442-6.
- [39] Franzoso G., Carlson L., Xing L., Poljak L., Shores E. W., Brown K. D., Leonardi A., Tran T., Boyce B. F. and Siebenlist U. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997; 11:3482-96.
- [40] Fullbeck M., Huang X., Dumdey R., Frommel C., Dubiel W. and Preissner R. Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. *BMC Cancer* 2005; 5:97.

- [41] *Garrett I. R., Boyce B. F., Oreffo R. O., Bonewald L., Poser J. and Mundy G. R.* Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990; 85:632-9.
- [42] *Ge N. L. and Rudikoff S.* Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 2000; 96:2856-2861.
- [43] *Ghosh S. and Karin M.* Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl:S81-96.
- [44] *Giuliani N., Bataille R., Mancini C., Lazzaretti M. and Barille S.* Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 2001; 98:3527-33.
- [45] *Goldberg A. L., Akopian T. N., Kisselev A. F., Lee D. H. and Rohrwild M.* New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Biol Chem* 1997; 378:131-40.
- [46] *Goranov S. E. and Goranova-Marinova V. S.* Bone lesions in multiple myeloma--the OPG/RANK-ligand system. *Folia Med (Plovdiv)* 2004; 46:5-11.
- [47] *Green J. R.* Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 4:3-13.
- [48] *Han J. H., Choi S. J., Kurihara N., Koide M., Oba Y. and Roodman G. D.* Macrophage inflammatory protein-1 alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Blood* 2001; 97:3349-3353.
- [49] *Hattersley G., Owens J., Flanagan A. M. and Chambers T. J.* Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177:526-31.
- [50] *Hershko A. and Ciechanover A.* The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:425-79.
- [51] *Hideshima T., Richardson P., Chauhan D., Palombella V. J., Elliott P. J., Adams J. and Anderson K. C.* The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61:3071-6.
- [52] *Hideshima T., Richardson P. G. and Anderson K. C.* Targeting proteasome inhibition in hematologic malignancies. *Rev Clin Exp Hematol* 2003; 7:191-204.
- [53] *Hodge J. M., Kirkland M. A. and Nicholson G. C.* GM-CSF cannot substitute for M-CSF in human osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321:7-12.
- [54] *Huang H., Chang E. J., Ryu J., Lee Z. H., Lee Y. and Kim H. H.* Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351:99-105.
- [55] *Huang M. T., Lysz T., Ferraro T., Abidi T. F., Laskin J. D. and Conney A. H.* Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res* 1991; 51:813-9.
- [56] *Huang T. S., Kuo M. L., Lin J. K. and Hsieh J. S.* A labile hyperphosphorylated c-Fos protein is induced in mouse fibroblast cells treated with a combination of phorbol ester and anti-tumor promoter curcumin. *Cancer Lett* 1995; 96:1-7.
- [57] *Huang T. T., Kudo N., Yoshida M. and Miyamoto S.* A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:1014-9.
- [58] *Iotsova V., Caamano J., Loy J., Yang Y., Lewin A. and Bravo R.* Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 1997; 3:1285-9.
- [59] *Ito K., Hirao A., Arai F., Takubo K., Matsuoka S., Miyamoto K., Ohmura M., Naka K., Hosokawa K., Ikeda Y. and Suda T.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006; 12:446-51.
- [60] *Jana N. R., Dikshit P., Goswami A. and Nukina N.* Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:11680-5.
- [61] *Jimi E., Nakamura I., Ikebe T., Akiyama S., Takahashi N. and Suda T.* Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem* 1998; 273:8799-805.
- [62] *Johnson C., Van Antwerp D. and Hope T. J.* An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J* 1999; 18:6682-93.
- [63] *Karin M., Yamamoto Y. and Wang Q. M.* The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:17-26.

- [64] Karsdal M. A., Hjorth P., Henriksen K., Kirkegaard T., Nielsen K. L., Lou H., Delaisse J. M. and Foged N. T. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem* 2003; 278:44975-87.
- [65] Kitaura H., Zhou P., Kim H. J., Novack D. V., Ross F. P. and Teitelbaum S. L. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest* 2005; 115:3418-27.
- [66] Kong Y. Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H. L., Timms E., Capparelli C., Morony S., Oliveira-dos-Santos A. J., Van G., Itie A., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C. R., Lacey D. L., Mak T. W., Boyle W. J. and Penninger J. M. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397:315-23.
- [67] Kurihara N., Chenu C., Miller M., Civin C. and Roodman G. D. Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology* 1990; 126:2733-41.
- [68] Kwon B. S., Wang S., Udagawa N., Haridas V., Lee Z. H., Kim K. K., Oh K. O., Greene J., Li Y., Su J., Gentz R., Aggarwal B. B. and Ni J. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *Faseb J* 1998; 12:845-54.
- [69] Lacey D. L., Timms E., Tan H. L., Kelley M. J., Dunstan C. R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y. X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J. and Boyle W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-76.
- [70] Lander H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J* 1997; 11:118-24.
- [71] Lee N. K., Choi Y. G., Baik J. Y., Han S. Y., Jeong D. W., Bae Y. S., Kim N. and Lee S. Y. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005; 106:852-9.
- [72] Lee Z. H. and Kim H. H. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:211-4.
- [73] Li X., Udagawa N., Itoh K., Suda K., Murase Y., Nishihara T., Suda T. and Takahashi N. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* 2002; 143:3105-13.
- [74] Lin J. K., Chen Y. C., Huang Y. T. and Lin-Shiau S. Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 1997; 28-29:39-48.
- [75] Lin J. K. and Lin-Shiau S. Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2001; 25:59-66.
- [76] Lindl T. and Bauer J. *Zell- und Gewebekultur*. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1994; 250:103-115.
- [77] Ludwig H. Advances in biology and treatment of multiple myeloma. *Ann Oncol* 2005; 16 Suppl 2:ii106-12.
- [78] Ma M. H., Yang H. H., Parker K., Manyak S., Friedman J. M., Altamirano C., Wu Z. Q., Borad M. J., Frantzen M., Roussos E., Neeser J., Mikail A., Adams J., Sjak-Shie N., Vescio R. A. and Berenson J. R. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1136-44.
- [79] Matsumoto M., Kogawa M., Wada S., Takayanagi H., Tsujimoto M., Katayama S., Hisatake K. and Nogi Y. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem* 2004; 279:45969-79.
- [80] Matsuo K. and Ray N. Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c-Fos: new insight into osteoimmunology. *Keio J Med* 2004; 53:78-84.
- [81] Miyamoto T., Ohneda O., Arai F., Iwamoto K., Okada S., Takagi K., Anderson D. M. and Suda T. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* 2001; 98:2544-54.
- [82] Miyamoto T. and Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 2003; 52:1-7.
- [83] Miyazaki T., Katagiri H., Kanegae Y., Takayanagi H., Sawada Y., Yamamoto A., Pando M. P., Asano T., Verma I. M., Oda H., Nakamura K. and Tanaka S. Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol* 2000; 148:333-42.

- [84] *Nicholson G. C., Malakellis M., Collier F. M., Cameron P. U., Holloway W. R., Gough T. J., Gregorio-King C., Kirkland M. A. and Myers D. E.* Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond)* 2000; 99:133-40.
- [85] *Novack D. V., Yin L., Hagen-Stapleton A., Schreiber R. D., Goeddel D. V., Ross F. P. and Teitelbaum S. L.* The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2003; 198:771-81.
- [86] *Orlowski R. Z., Stinchcombe T. E., Mitchell B. S., Shea T. C., Baldwin A. S., Stahl S., Adams J., Esseltine D. L., Elliott P. J., Pien C. S., Guerciolini R., Anderson J. K., Depcik-Smith N. D., Bhagat R., Lehman M. J., Novick S. C., O'Connor O. A. and Soignet S. L.* Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20:4420-7.
- [87] *Orlowski R. Z. and Zeger E. L.* Targeting the proteasome as a therapeutic strategy against haematological malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15:117-30.
- [88] *Qiang Y. W., Yao L., Tosato G. and Rudikoff S.* Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103:301-308.
- [89] *Raisz L. G.* Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45:1353-8.
- [90] *Rhee S. G.* Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999; 31:53-9.
- [91] *Richardson P. G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., Rajkumar S. V., Srkalovic G., Alsina M., Alexanian R., Siegel D., Orlowski R. Z., Kuter D., Limentani S. A., Lee S., Hideshima T., Esseltine D. L., Kauffman M., Adams J., Schenkein D. P. and Anderson K. C.* A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:2609-17.
- [92] *Roccaro A. M., Vacca A. and Ribatti D.* Bortezomib in the treatment of cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2006; 1:397-403.
- [93] *Roodman G. D.* Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17:308-32.
- [94] *Roodman G. D.* Pathogenesis of myeloma bone disease. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32:290-2.
- [95] *Roodman G. D.* Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1921-5.
- [96] *Ross F. P.* M-CSF, c-Fms, and signaling in osteoclasts and their precursors. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:110-6.
- [97] *Ruocco M. G., Maeda S., Park J. M., Lawrence T., Hsu L. C., Cao Y., Schett G., Wagner E. F. and Karin M.* IkappaB kinase (IKK)beta, but not IKKalpha, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 2005; 201:1677-87.
- [98] *Sabokbar A. and Athanasou N. S.* Generating human osteoclasts from peripheral blood. *Methods Mol Med* 2003; 80:101-11.
- [99] *Salvat C., Aquaviva C., Jariel-Encontre I., Ferrara P., Pariat M., Steff A. M., Carillo S. and Piechaczyk M.* Are there multiple proteolytic pathways contributing to c-Fos, c-Jun and p53 protein degradation in vivo? *Mol Biol Rep* 1999; 26:45-51.
- [100] *Schilling A. F., Linhart W., Filke S., Gebauer M., Schinke T., Rueger J. M. and Amling M.* Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 2004; 25:3963-72.
- [101] *Sezer O., Heider U., Jakob C., Eucker J. and Possinger K.* Human bone marrow myeloma cells express RANKL. *J Clin Oncol* 2002a; 20:353-4.
- [102] *Sezer O., Heider U., Jakob C., Zavrski I., Eucker J., Possinger K., Sers C. and Krenn V.* Immunocytochemistry reveals RANKL expression of myeloma cells. *Blood* 2002b; 99:4646-7; author reply 4647.
- [103] *Sezer O., Heider U., Zavrski I., Kuhne C. A. and Hofbauer L. C.* RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003; 101:2094-8.
- [104] *Sha W. C.* Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor. *J Exp Med* 1998; 187:143-6.
- [105] *Sharma R. A., Euden S. A., Platton S. L., Cooke D. N., Shafayat A., Hewitt H. R., Marczylo T. H., Morgan B., Hemingway D., Plummer S. M., Pirmohamed M., Gescher A. J. and Steward W. P.* Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6847-54.

- [106] *Sharma R. A., Gescher A. J. and Steward W. P.* Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41:1955-68.
- [107] *Singh S. and Khar A.* Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2006; 6:259-70.
- [108] *Sinha R., Anderson D. E., McDonald S. S. and Greenwald P.* Cancer risk and diet in India. *J Postgrad Med* 2003; 49:222-8.
- [109] *Somasundaram S., Edmund N. A., Moore D. T., Small G. W., Shi Y. Y. and Orlowski R. Z.* Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62:3868-75.
- [110] *Stancovski I., Gonen H., Orian A., Schwartz A. L. and Ciechanover A.* Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol Cell Biol* 1995; 15:7106-16.
- [111] *Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M. T. and Martin T. J.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20:345-57.
- [112] *Tan K. B., Harrop J., Reddy M., Young P., Terrett J., Emery J., Moore G. and Truneh A.* Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997; 204:35-46.
- [113] *Terpos E., Politou M., Szydlo R., Goldman J. M., Apperley J. F. and Rahemtulla A.* Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003; 123:106-9.
- [114] *Thomas R. K., Sos M. L., Zander T., Mani O., Popov A., Berenbrinker D., Smola-Hess S., Schultze J. L. and Wolf J.* Inhibition of nuclear translocation of nuclear factor-kappaB despite lack of functional I kappa Balpha protein overcomes multiple defects in apoptosis signaling in human B-cell malignancies. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8186-94.
- [115] *Tolar J., Teitelbaum S. L. and Orchard P. J.* Osteopetrosis. *N Engl J Med* 2004; 351:2839-49.
- [116] *Traenckner E. B. and Baeuerle P. A.* Appearance of apparently ubiquitin-conjugated I kappa B-alpha during its phosphorylation-induced degradation in intact cells. *J Cell Sci Suppl* 1995a; 19:79-84.
- [117] *Traenckner E. B., Pahl H. L., Henkel T., Schmidt K. N., Wilk S. and Baeuerle P. A.* Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* 1995b; 14:2876-83.
- [118] *Traenckner E. B., Wilk S. and Baeuerle P. A.* A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *Embo J* 1994; 13:5433-41.
- [119] *Udagawa N., Takahashi N., Akatsu T., Tanaka H., Sasaki T., Nishihara T., Koga T., Martin T. J. and Suda T.* Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:7260-4.
- [120] *Ural A. U., Avcu F. and Demirbag S.* Bisphosphonates may increase peritoneal fibrinolytic activity by inhibiting the mevalonate pathway. *Ann Surg* 2008; 247:203-4; author reply 204-5.
- [121] *von Metzler I., Krebbel H., Hecht M., Manz R. A., Fleissner C., Mieth M., Kaiser M., Jakob C., Sterz J., Kleeberg L., Heider U. and Sezer O.* Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia* 2007; 21:2025-34.
- [122] *von Metzler I., Krebbel H., Kuckelkorn U., Heider U., Jakob C., Kaiser M., Fleissner C., Terpos E. and Sezer O.* Curcumin diminishes human osteoclastogenesis by inhibition of the signalosome-associated I kappa B kinase. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008.
- [123] *Voorhees P. M., Dees E. C., O'Neil B. and Orlowski R. Z.* The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:6316-25.
- [124] *Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G. R., Inoue J. and Chen Z. J.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412:346-51.
- [125] *Wei S., Teitelbaum S. L., Wang M. W. and Ross F. P.* Receptor activator of nuclear factor-kappa b ligand activates nuclear factor-kappa b in osteoclast precursors. *Endocrinology* 2001; 142:1290-5.

- [126] Wiktor-Jedrzejczak W., Bartocci A., Ferrante A. W., Jr., Ahmed-Ansari A., Sell K. W., Pollard J. W. and Stanley E. R. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:4828-32.
- [127] Wyke S. M., Russell S. T. and Tisdale M. J. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* 2004; 91:1742-50.
- [128] Yaccoby S., Wezeman M. J., Henderson A., Cottler-Fox M., Yi Q., Barlogie B. and Epstein J. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res* 2004; 64:2016-23.
- [129] Zauli G., Rimondi E., Nicolin V., Melloni E., Celeghini C. and Secchiero P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF. *Blood* 2004; 104:2044-50.
- [130] Zavrski I., Kleeberg L., Kaiser M., Fleissner C., Heider U., Sterz J., Jakob C. and Sezer O. Proteasome as an emerging therapeutic target in cancer. *Curr Pharm Des* 2007; 13:471-85.
- [131] Zavrski I., Krebbel H., Wildemann B., Heider U., Kaiser M., Possinger K. and Sezer O. Proteasome inhibitors abrogate osteoclast differentiation and osteoclast function. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333:200-5.
- [132] Zavrski I., Naujokat C., Niemoller K., Jakob C., Heider U., Langelotz C., Fleissner C., Eucker J., Possinger K. and Sezer O. Proteasome inhibitors induce growth inhibition and apoptosis in myeloma cell lines and in human bone marrow myeloma cells irrespective of chromosome 13 deletion. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129:383-91.
- [133] Zhang F., Altorki N. K., Mestre J. R., Subbaramaiah K. and Dannenberg A. J. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis* 1999; 20:445-51.
- [134] Zhu L. L., Zaidi S., Moonga B. S., Troen B. R. and Sun L. RANK-L induces the expression of NFATc1, but not of NFkappaB subunits during osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326:131-5.
- [135] Zhu Y. G., Chen X. C., Chen Z. Z., Zeng Y. Q., Shi G. B., Su Y. H. and Peng X. Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25:1606-12.

7 Eigene Publikationen

[1] *Zavrski I., Krebbel H., Wildemann B., Heider U., Kaiser M., Possinger K. and Sezer O.* Proteasome inhibitors abrogate osteoclast differentiation and osteoclast function. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333:200-5.

[2] *von Metzler I., Krebbel H., Hecht M., Manz R. A., Fleissner C., Mieth M., Kaiser M., Jakob C., Sterz J., Kleeberg L., Heider U. and Sezer O.* Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia* 2007; 21:2025-34.

[3] *von Metzler I., Krebbel H., Kuckelkorn U., Heider U., Jakob C., Kaiser M., Fleissner C., Terpos E. and Sezer O.* Curcumin diminishes human osteoclastogenesis by inhibition of the signalosome-associated I κ B kinase. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008.

8 Danksagung

Ich möchte an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Orhan Sezer für die Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen während der Erstellung dieser Arbeit danken. Darüber hinaus gilt besonderer Dank Frau Dr. med. univ. Ivana von Metzler, mit der zu jeder Zeit ein anregender Gedankenaustausch möglich war.

Zudem möchte ich allen medizinisch-technischen Assistentinnen für ihre ständige Hilfestellung danken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

9 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Erklärung über Selbständigkeit

Ich, Holger Krebbel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Inhibition RANKL-induzierter Differenzierung und Aktivierung humaner Osteoklasten durch MG-132, MG-262, Bortezomib und Curcumin“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift