

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**In-vitro Wirkmechanismen von zwei unterschiedlichen
Bisphosphonaten (Zoledronat und Pamidronat) auf humane
Gingivafibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Maciej Simon
aus Poznan

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Yahya Açil

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Bernhard Kimmig

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 17. Dezember 2009

gez. Prof. Dr. Helge Fischer-Brandies

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. EINLEITUNG	1
1.1. Fragestellung / Ziel der Studie	7
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1. Vorversuche	9
2.2. Hauptversuch	9
2.3. Zellkultur	10
Herstellung von Basisnährmedium	10
Anlegen einer Zellkultur	11
Passage	11
2.4. Bestimmung der Zellzahl	12
2.5. Messung der Zellproliferation	12
Prinzip	12
Durchführung	13
2.6. Nachweis von extrazellulärer Matrix	13
2.6.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	13
Prinzip und Durchführung	13
2.6.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	15
Salzfällung	15
Zentrifugation und Lösung in Essigsäure	16
Ultrafiltration	16
Pepsinverdauung	16
Ultrazentrifugation der Probe mit Pepsin	17
Hydrolyse	17
Vorbereitung des CF-1	17
Adsorptionschromatografische Vorreinigung der Proben	18
Quantitative Bestimmung von Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP)	19
2.7. Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin (Hyp)	20
Durchführung	20
2.8. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	21
Durchführung	21

2.9. Nachweis von extrazellulären Proteinen mittels molekularbiologischer Methoden	23
2.9.1. RNA-Aufbereitung	23
2.9.2. Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	24
2.9.2.1. Reverse Transkription (RT)	24
2.9.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.9.2.3. Quantitative Bestimmung der Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als House-Keeping-Gen	29
2.9.2.4. Quantitative Bestimmung der Expression des Osteocalcins als Knochenmarker	30
2.9.2.5. Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs I als Knochenmarker	30
2.9.2.6. Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs II als Knorpelmarker	30
2.9.2.7. Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs III als Hautmarker	31
2.9.2.8. Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs V als Teil des Knochenmarkers	31
2.9.2.9. Quantitative Bestimmung der Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) als knochenspezifisch	31
2.9.3. Agarosegelelektrophorese	32
3. ERGEBNISSE	33
3.1. Einwöchige Mikrotiterplattenuntersuchung	33
3.2. Vierwöchige 6er-Well-Studie	37
3.2.1. Zellzählung	37
3.2.2. Digitale Dokumentation der Zellkultur	39
3.2.3. Kollagenbestimmung mittels ELISA	49
3.2.4. HPLC-Analyse und Hyp-Bestimmung	55
3.2.5. SDS-PAGE	61
3.2.6. Molekularbiologische Verfahren	62
Quantitative Bestimmung der RNA	62
Qualitative Expression extrazellulärer Proteine	62
Quantitative Expression extrazellulärer Proteine	63

4. DISKUSSION	69
4.1. Bisphosphonate und ihre Konzentrationen	69
4.2. Proliferationseinfluss	70
4.3. Kollagen-detektion mittels ELISA	71
4.4. HPLC und SDS-PAGE	72
4.5. Extrazelluläre Matrix	74
4.6. Schlussfolgerung	76
5. ZUSAMMENFASSUNG	78
6. LITERATURVERZEICHNIS	79
7. DANKSAGUNG	88
8. LEBENS LAUF	89

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destilata
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Bisphosphonate
BSA	Bovine Serum Albumin (Bovines Serumalbumin)
cDNA	copy DNA (kopierte Desoxyribonukleinsäure)
CF-1	fibröse Cellulose
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymine
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GOI	Gene of interest
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HKG	House-Keeping-Gene
HP	Hydrosylsilylpyridinolin

II

HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochempfindliche Flüssigkeitschromatografie)
Hyp	Hydroxyprolin
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_3PO_4	Kaliumphosphat
LP	Lysylpyridinolin
M	molar
mA	Milliampere
mM	millimolar
MgCl_2	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mV	Millivolt
n	Anzahl der untersuchten Proben
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid

III

nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
ONJ	Osteonecrosis of the jaw (Osteonekrose des Kieferknochens)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Pamidronat
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia/pondus hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
pmol	picomolar
Poly-A ⁺	Polyadenylatschwanz der mRNA
PP	Pyrophosphat
R Rnasin	rekombinanter Ribonukleaseinhibitor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion
SaOS-2-Zellen	Osteosarkomzellen
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
Taq	Thermus aquaticus

TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	ultraviolett
ZOL	Zoledronat
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar

1. Einleitung

Viele Studien dokumentieren klinisch unerwünschte Ereignisse von Patienten unter einer Bisphosphonattherapie (Gonzalez-Moles und Bagan-Sebastian 2000; Marx 2003; Ficarra et al. 2005; Marx et al. 2005; Migliorati et al. 2005; Abu-Id et al. 2006; 2008), es wird von einer Knochenzerstörung im Kieferknochen berichtet – aufgrund dieser Tatsachen ist die Idee dieser experimentellen Studie entstanden. Die Untersuchungen dienen der Beurteilung von Reaktionen der Gingivafibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen in vitro auf Bisphosphonate (BP). Es waren hierfür die Zellen zu untersuchen, welche am häufigsten negativ von einer Bisphosphonattherapie betroffen sind und welche klinische Auswirkungen demonstrieren. Aus diesen Gründen wurden die genannten Zelllinien ausgewählt und mit zwei Bisphosphonaten, Zoledronat (ZOL) und Pamidronat (PAM), behandelt. Die Wahl dieser beiden BP resultiert aus den klinischen Aufzeichnungen, durch die die meisten Kieferknochennekrosen dokumentiert worden sind. Die genauen Zusammenhänge zwischen Kiefernekrosen und Bisphosphonattherapien sind bislang noch nicht vollständig eruiert worden und wurden zudem selten in In-vitro-Studien untersucht.

Bisphosphonate

Bisphosphonate sind Pyrophosphat-Analoga. Pyrophosphate dienen der Energieübertragung in lebenden Zellen. Die Grundstruktur des Pyrophosphats setzt sich aus Sauerstoff und Phosphor zu einer P-O-P-Grundstruktur zusammen. Da die Pyrophosphate eine instabile Struktur aufweisen und somit leicht hydrolysierbar sind, wurde versucht, ähnliche Medikamente zu entwickeln. Das Resultat sind Bisphosphonate (BP). In der Grundstruktur ist Sauerstoff durch Kohlenstoff zu einer P-C-P-Bindung ersetzt worden (Abb. 1). Hierdurch unterliegen sie im Körper keiner enzymatischen Hydrolyse (Sietsema und Ebetino 1994; Rodan und Fleisch 1996). Bevor die therapeutische Wirkung bei der Osteoporose entdeckt wurde, wurden BP aufgrund ihrer Korrosionsinhibition unter anderem als Waschmittelzusätze oder in der Ölindustrie verwendet (Blomen 1995). Durch Modifikationen der Molekülstruktur wurden ihre therapeutischen Eigenschaften schrittweise verbessert. Zu den neueren Substanzen zählen die sogenannten Aminobisphosphonate. In Deutschland sind

folgende BP zugelassen: Alendronat, Clodronat, Etidronat, Ibandronat, Pamidronat, Risedronat, Tiludronat und Zoledronat (Karow und Lang-Roth 2006).

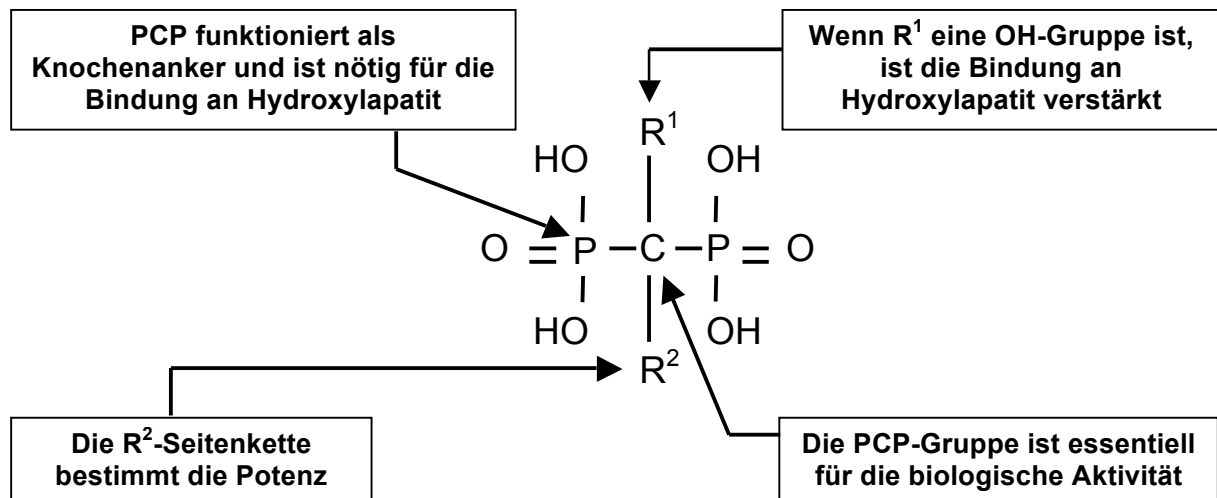


Abb. 1: Grundstruktur von Bisphosphonaten

BP besitzen eine stabile Molekülstruktur und sind potente Inhibitoren des Knochenabbaus. Sie tragen zu Funktionsstörungen der Osteoklasten bei, wodurch sich die selektive Wirkung auf den Knochenstoffwechsel erklärt (Jung et al. 1973; Fleisch 1998). Ein weiteres Kennzeichen der BP ist eine hohe Hydroxylapatitaffinität. Die Knochensubstanz unterliegt einem ständigen Auf- und Abbauprozess, der über ein Netzwerk von verschiedenen Faktoren durch Osteoblasten und Osteoklasten gesteuert wird. Der Hauptwirkungsort der Bisphosphonate sind die Osteoklasten, wobei vier verschiedene Mechanismen für die Inhibition verantwortlich sind: 1) BP haben einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklasten-Vorstufen, 2) BP unterbinden die Adhäsion der Osteoklasten auf der Knochenoberfläche (Colucci et al. 1998), 3) BP bewirken eine Hemmung der Aktivität der knochenresorbierenden Zellen durch eine Veränderung der Zellmorphologie und 4) BP führen zur Apoptose-Induktion (Sato et al. 1991). Die Ursache dieser Wirkung auf die Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität ist im Eingriff der Bisphosphonate in wichtigen intrazellulären Signalwegen zu suchen. Dabei werden zwei molekulare Mechanismen unterschieden: Bisphosphonate der ersten Generation (Etidronat und Clodronat) mit stickstofffreien Seitenketten bilden nicht hydrolysierbare, zytotoxische Adenosintriphosphat-Analoga (ATP-Analoga) (Frith et al. 1997), die zu einer Beeinflussung der Zellfunktion und der Apoptose-Induktion führen. Bisphosphonate der zweiten Generation (Pamidronat, Alendronat, Ibandronat, Olpandronat, Risedronat, Zoledronat) haben einen

aliphatischen oder heterozyklischen stickstoffhaltigen Substituenten und hemmen ein Schlüsselenzym des Mevalonsäure-Weges, die Farnesyldiphosphonatesynthetase (Rogers et al. 2000; Dunford et al. 2001). Die Enzymhemmung verhindert die reguläre posttransitionelle Prenylierung kleiner Guanosintriphosphat(GTP)-bindender Proteine. Diese Proteine sind für die Zellproliferation und die Funktion des Zytoskeletts verantwortlich (Dunford et al. 2001). Sowohl stickstofffreie als auch stickstoffhaltige Bisphosphonate führen zur Apoptose-Induktion der Osteoklasten durch eine Aktivierung der Caspase-3, die bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten durch einen Mangel an Geranyl-geranylierten Proteinen ausgelöst wird (Benford et al. 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Bisphosphonate auch einen Einfluss auf die Proliferation, die Differenzierung und die Genexpression der knochenbildenden Osteoblasten haben (Reinholz et al. 2000) bzw. die Interaktionen der Osteoblasten und Osteoklasten blockieren bzw. beeinflussen und somit eine reguläre Kommunikation verhindern (Green 2002; Roelfs et al. 2006; Vitté et al. 1996).

Die gastrointestinale Resorption der Bisphosphonate ist mit 1–6 % bei einer Plasmahalbwertszeit von 20 bis 180 Minuten gering. Aufgrund der irreversiblen Bindung an Hydroxylapatit kommt es zu einer starken Akkumulation der Chemotherapeutika im Körper. Ihre Freisetzung erfolgt nur per Resorption (Sato et al. 1991). Durch eine hohe Halbwertszeit von Monaten bis zu Jahren erklärt sich die lang anhaltende Wirkung von reduziertem Knochenumbau und einer höheren Knochendichte durch eine drastische Veränderung am Osteoblasten- und/oder Osteoklastengleichgewicht (Mönkkönen et al. 1990; Kasting et al. 1992).

Einsatzgebiete der Bisphosphonate

Die Bisphosphonate werden in oral (per os = p. o.) und parenteral (intravenös = i. v.) applizierte Substrate aufgeteilt, da ihnen unterschiedliche Wirkspektren und Einsatzgebiete unterliegen. Die oralen Therapeutika werden z. B. bei Osteoporose und Morbus Paget benötigt (Risedronat, Etidronat und Alendronat) (Bauwens 2002).

Zu den Bereichen der parenteralen Medikamente, zu denen Zoledronat (ZOL) und Pamidronat (PAM) gehören, zählen die Bereiche der tumorinduzierten Erkrankungen (z. B. Brustkrebs, Prostatakarzinom oder das Lungenkarzinom) mit ossären Metastasen, das Plasmozytom und Osteogenesis imperfecta (Hortobagyi et al. 1996;

Saad et al. 2002; Rauch et al. 2002; Saad et al. 2004; Santini et al. 2006). Es wird versucht, das Hyperkalzämierisiko sowie eine Reduktion des Wachstums und des Neuauftretens von skeletalen Metastasen zu verhindern. Begleitend dazu erfolgt auch eine Schmerzlinderung (Santini et al. 2003). Zunehmend werden die stickstoffhaltigen, hochpotenten Derivate PAM und ZOL eingesetzt (Ramaswamy und Shapiro 2003).

Klinische Komplikationen unter der Bisphosphonattherapie

Im Jahr 2003 erschienen erste Berichte von Marx über Kieferknochennekrosen bei Patienten unter Bisphosphonattherapie. Die Patienten erhielten eine Bisphosphonattherapie aufgrund von Plasmozytomen, neoplastischen Veränderungen mit Knochenbeteiligung, dadurch bedingte Hyperkalzämie, Morbus Paget und Osteoporose (Marx 2003).

Darauf folgten verschiedene Berichte zu diesem Thema (Migliorati 2003; Melo und Obeid 2005a; Migliorati et al. 2005; Felsenberg et al. 2006; Kumar et al. 2008). Die Kieferknochennekrose zeichnet sich durch den freiliegenden Knochen und dadurch Schmerzen aus. Zudem wurden bei vielen Patienten lockere Zähne entdeckt sowie Haut- und Mukosafisteln beobachtet, zuweilen wurde auch Knochen durch die Haut sichtbar. Die Mandibula ist zweimal häufiger betroffen als die Maxilla, in einer geringen Anzahl von Fällen sind beide Kieferknochen befallen (Marx et al. 2005). In 86 % der Fälle wird eine dentoalveoläre Maßnahme vor der Kieferknochenexposition notiert (Ruggiero et al. 2004).

Laut einer Studie von Marx (2005) bekamen rund 40 % der Patienten ZOL, 26 % PAM, bei 36 % wurde von PAM auf ZOL umgestellt und nur 3 % erhielten Alendronat. Der Einsatz von ZOL und PAM wird in den meisten Berichten (Ruggiero et al. 2004; Ficarra et al. 2005; Abu-Id et al. 2006; Felsenberg et al. 2006) bestätigt. Aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit sind diese beiden Derivate die Meistgebrauchten (Schirmer et al. 2005). Die Dosierungen von Bisphosphonaten unterscheiden sich im Präparat, in der Indikation, der Verabreichungsform und auch in ihrer Wirkpotenz (Hoefert und Eufinger 2005). Die Potenzen zeigen laut einer In-vitro-Studie: 1 für Etidronat, 10 für Clodronat, 100 für Pamidronat, 100 bis 1000 für Alendronat, 1000 bis 10000 für Risedronat und Ibandronat sowie 10000 + für Zoledronat (Fleisch 1997;

1998; O'Connell und Elliot 2002). Die hochwirksamen Aminoderivate wie Pamidronat und Zoledronat werden in der Regel intravenös verabreicht.

Heute erscheinen fast täglich neue Berichte zu Kiefernekrosen unter Bisphosphonattherapie (Grötz und Diel 2005; Abu-Id et al. 2006; Marx et al. 2007; Abu-Id et al. 2008). In einem Fallbericht von Melo und Obeid (2005b) wird versucht, die Zahnärzte und die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen auf die Gefahren sowie Konsequenzen einer Therapie von Knochenmetastasen mit Bisphosphonaten aufmerksam zu machen. Dies ist nur einer von vielen Artikeln, der diese klinischen Befunde bei zahlreichen Patienten unter Bisphosphonattherapie in den letzten Jahren beschreibt. Eine andere Studie basiert auf retrospektiven Untersuchungen von Patienten mit einer Kieferknochennekrose (Ficarra et al. 2005). Es wird auch eine multifaktorielle Ursache der Osteonekrose des Kieferknochens nicht ausgeschlossen (Melo 2004). Unter Therapie mit Bisphosphonaten haben heutige Kieferknochennekrosen eine hohe Konkordanz mit den historischen „Phossy-Jaws“.

Gesondert muss die Knochennekrose durch Bisphosphonate von anderen Erkrankungen des Kiefers, wie der Osteopetrose, betrachtet werden. Osteopetrose (im Volksmund: Marmorknochenkrankheit) ist eine angeborene Störung der Osteoklastentätigkeit, die bei erhaltener Knochenbildung zur Einschränkung des Knochenabbaus führt (Whyte 2002). Es kommt hierbei zu keiner Reparatur der Frakturen und zu keinem Remodeling des Knochengewebes. Hierdurch kann es zu Knochenschmerzen und Spontanfrakturen kommen. Diese Beschreibungen ähneln der Osteonekrose im Kieferknochen, müssen aber getrennt betrachtet werden, da auch hier Befunde in anderen Knochen gemacht werden (Whyte et al. 2003). Die Osteonekrose im Kieferknochen ist schon seit längerer Zeit bekannt, allerdings in der Form der Osteoradionekrose (Marx 1983). Bei der Radiotherapie werden nicht nur Stammzellpopulationen lysiert, sondern auch Osteoblasten und endotheliale Gefäßzellen. Diese Zusammenkunft der pathologischen Ereignisse führt meist erst nach Monaten zu minderwertigem und statisch weniger belastbarem Knochengewebe, welches oft zu Spontanfrakturen führt oder in einer avaskulären Knochennekrose endet. Eine weitere Form von freiliegendem Knochen, die der Kieferknochennekrose ähnelt, ist die Osteomyelitis. Bei dieser Erkrankung kommt es durch Mikrothromben in kleinen Blutgefäßen im Kieferknochen zu einer Minderversorgung des Knochengewebes (Acosta et al. 2004). Es resultiert aus dem

Absterben von Osteozyten und Osteoblasten, was zum Untergang des Knochengewebes und exponierter Knochen des Kiefers führt. Diese Art der Osteonekrose zeigt sich klinisch als komplett freiliegender, schwarzer, nekrotischer Knochen oder als unscheinbare weißliche Veränderung wie bei einer bakteriellen Osteomyelitis. Eine weitere Art der Osteonekrose kann durch Steroide hervorgerufen werden, allerdings ist dieses Ereignis deutlich häufiger in Röhrenknochen dokumentiert (Reid 1989; Fitzpatrick 1994; Weinstein 2001).

Historischer Vergleich – „Phossy-Jaw“

Der Begriff „Phossy-Jaw“ entstand im 19. Jahrhundert (Miles 1972) und beschreibt die Ereignisse im Zusammenhang mit der Zündholzherstellung. Im Jahr 1832 wurden die ersten Zündhölzer produziert. In der Herstellung wurde gelber (weißer) Phosphor verwendet, dieses Element prägte das erfolgreiche „strike-anywhere“-Zündholz, auch Luziferzündholz genannt. Bei der Produktion dieser Streichhölzer entstanden Dämpfe des gelben Phosphors, welchen die Arbeiter einatmeten. Diese Dämpfe erwiesen sich in den kommenden Jahren als toxisch. 1855 wurde das Sicherheitszündholz in Schweden entwickelt. Es konnte nicht mehr so wie das Luziferzündholz an einer beliebigen Stelle entzündet werden, sondern nur noch an der Verpackung. Hinzu kam, dass bei der Herstellung des Sicherheitszündholzes kein gelber Phosphor verwendet wurde. Es kam zu einem Verkaufswettbewerb zwischen den beiden Fabrikanten, dieser wurde schließlich durch die Berner Konvention von 1906 beendet, welche den Einsatz von gelbem Phosphor in Zündhölzern verbot. Der Grund hierfür waren Beobachtungen, wobei die erste bereits 1839 in Wien erfolgte, dass bei den Zündholzarbeitern in den Kieferknochen sogenannte Phosphornekrosen auftraten. Andere Länder wie Finnland und Dänemark verhängten Verbote gegen den Gebrauch gelben Phosphors schon 1872 bzw. 1874. Die Vereinigten Staaten von Amerika durften aus rechtlichen Gründen die Berner Konvention nicht unterzeichnen, stoppten allerdings den Gebrauch gelben Phosphors in der Zündholzindustrie mit einer enormen Steuererhöhung auf diese Produkte (Hunter 1969). Die Letalität dieser Krankheit lag in der präantibiotischen Ära zwischen 20 und 50 %. Diese Tatsachen beschreiben, wie eine Berufskrankheit, in diesem Fall die Phosphor-Kieferknochennekrose, durch ein Gesetz ausgeschlossen werden konnte.

1.2 Fragestellung / Ziel der Studie

Diese geschichtlichen Ereignisse lassen Hellstein und Marek (2005) zwischen den „Phossy-Jaws“ und den heutigen Kieferknochennekrosen einen Vergleich ziehen. Somit stellt sich die Frage, ob es sich bei bisphosphonatinduzierter Osteochemonekrose um die „Bis-Phossy-Jaws“ des 21. Jahrhunderts handelt. Dieser Gedanke liegt auch der hier behandelten Studie zugrunde. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene humane Zellreihen (Gingivafibro- und Osteoblasten sowie Sarkomzellen vom Typ SaOS-2) angezchtet und in einer einwöchigen sowie vierwöchigen Studie mit zwei verschiedenen Bisphosphonaten, Zoledronat und Pamidronat sowie mit Pyrophosphat in vier unterschiedlichen therapeutisch relevanten Konzentrationen beimpft. Mit dem Wissen, dass Bisphosphonate Osteoklasten in ihrer Wirkung hemmen und dieses in vielen Studien und Untersuchungen beschrieben worden ist (Giuliani et al. 1998a; Green 2002; Roelfs et al. 2006), fokussiert diese Studie auf die Reaktion anderer humaner Zellen auf eine In-vitro-Bisphosphonattherapie:

- 1) Wie ist der Einfluss von Bisphosphonaten in vitro auf humane Gingivafibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen?
- 2) Wie wirken in vitro unterschiedliche Konzentrationen von benutzten Bisphosphonaten auf die Synthese der Kollagen Typen I, II, III und V?
- 3) Wie beeinflussen Bisphosphonate in vitro die Reifung der Kollagen Typen I und V?
- 4) Wirken die Bisphosphonate in den verschiedenen Konzentrationen auf die Zellkulturen in vitro unterschiedlich?
- 5) Ist ein Unterschied zwischen den Wirkungen von Zoledronat und Pamidronat zu sehen?

2. Material und Methoden

Es wurden drei Zelllinien (humane Gingivafibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen [Osteosarkomzellen]) für diese Studie benutzt. Das Material der Osteo- und Fibroblasten wurde vorab von Patienten gewonnen (Ethiknummer D 402/07). Die SaOS-2-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) sind kommerziell erworben worden. Die gewählten Bisphosphonate waren Zoledronat (ZOL) (Zoledronic acid, Zometa[®], Novartis) und Pamidronat (PAM) (Pamidronate, Aredia[®], Novartis). Pyrophosphat (PP) (Pyrophosphorsäure techn., Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde ebenso wie ZOL und PAM in Aqua dest. gelöst.

Zunächst wurden mit SaOS-2-Zellen Vorversuche durchgeführt, um die nötige Zelldichte für 96er Well-Mikrotiterplatten und 6er Well-Platten zu bestimmen und die benötigte Konzentration von Bisphosphonaten zu ermitteln. Mit diesen gewonnenen Informationen wurden die drei Zelllinien für 3–6 Wochen kultiviert und dreimal passagiert. Nachdem die benötigte Zellmenge erreicht war, wurden je Zelllinie 96er Well-Mikrotiterplatten und 6er Well-Platten angelegt. Die Zellen in den 6er Well-Platten wurden für 4 Wochen kultiviert und erhielten zweimal in der Woche einen Nährmediumwechsel mit Zusätzen von den drei Substraten (ZOL, PAM, PP) in vier verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20 μM). Einmal pro Woche wurde ein Teil des Nährmediumüberstandes für eine Kollagenbestimmung abgenommen und gesammelt. Zusätzlich wurden die Zellen fotografisch dokumentiert. Die 96er Well-Mikrotiterplatten wurden mit Nährmedium mit den gleichen Substraten und in genau den gleichen Konzentrationen bestückt. Es wurden zwei Messungen der Zellproliferation (Cell Proliferation Kit I [MTT = 3-{4,5-Dimethylthiazol-2-yl}-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid]) durchgeführt. Aus den Überständen der 6er Well-Platten konnten Kollagene isoliert werden. Für die qualitative und quantitative Auswertung des gesammelten Kollagens wurde zu einem späteren Zeitpunkt eine SDS-PAGE-Elektrophorese (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) und eine Analyse der Pyridiniumkomponenten mittels des HPLC-Verfahrens (High Performance Liquid Chromatography / Hochempfindliche Flüssigkeitschromatografie) vorgenommen. Mit Beendigung des vierwöchigen 6er-Well-Platten-Versuches wurde eine Zellzählung jedes Wells durchgeführt und die restlichen vorhandenen Zellen für

eine spätere molekularbiologische Untersuchung in entsprechendem Lysepuffer aufbewahrt.

2.1 Vorversuche

Mehrere Mikrotiterplatten wurden mit SaOS-2-Zellen bestückt und mit supplementiertem Nährmedium versorgt. Als Supplement funktionierte PP in drei verschiedenen Konzentrationen à 5, 10 und 25 μM und pro Vertiefung wurden 5×10^3 SaOS-2-Zellen verwendet. Zusätzlich wurden zwei geometrische Verdünnungsreihen (angefangen bei 1×10^4 Zellen) angefertigt und nur mit Nährmedium versorgt. Am nächsten Tag wurde der Cell Proliferation Kit I (Roche® Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) durchgeführt und am darauffolgenden Tag an einem Fotometer bei 550 nm Wellenlänge abgelesen. Diese Vorversuche dienten der Bestimmung der benötigten Zellzahl und Konzentrationsbestimmung zwischen höchster und niedrigster Konzentration der Substrate für den Hauptversuch.

2.2 Hauptversuch

Es wurden die drei Zelllinien (SaOS-2-Zellen, Gingivafibroblasten und Osteoblasten) im Brutschrank (wasserdampfgesättigte Atmosphäre bei 37 °C, 95 % Außenluft und 5 % CO₂; Firma Haereus Christ, Osterode, Deutschland) für 3–6 Wochen kultiviert, um die benötigte Zellzahl zu erreichen. Danach wurde ein einwöchiges Projekt auf Mikrotiterplatten und ein vierwöchiges Experiment in 6er Well-Platten gestartet.

Die einwöchige Studie wurde auf Mikrotiterplatten durchgeführt und doppelt angesetzt. Hierzu wurde ein Nährmedium jeweils mit den drei Substraten (PP, ZOL, PAM) supplementiert, sodass sich pro Substrat vier verschiedene Konzentrationen à 1, 5, 10 und 20 μM ergaben. Bei den Mikrotiterplatten wurde bei den Proben pro Vertiefung anfangs eine Menge von 5×10^3 Zellen ausgesetzt. Es wurde jeweils eine Zehnfachbestimmung durchgeführt. Am dritten und am siebten Tag wurde der Überstand abgenommen und ist für weitere Untersuchungen tiefgekühlt bei –32 °C (Liebherr – International Deutschland GmbH, Biberbach, Deutschland) aufbewahrt worden, gleichzeitig erfolgte ein Nährmediumwechsel mit dem gleichen supplementierten Nährmedium (je 200 μl). Am ersten und am siebten Tag wurde

eine Untersuchung der Zellproliferation (Cell Proliferation Kit I, Roche® Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) vollzogen.

Bei der Vierwochenstudie auf den 6er Well-Platten wurden jeweils 5×10^4 Zellen pro Vertiefung gegeben. Es wurden wiederum die drei Zelllinien mit den verschiedenen supplementierten und konzentrierten Nährmedien (3 ml pro Vertiefung), wie bei den Mikrotiterplatten, versorgt. Pro Substrat und Konzentration wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Jeden dritten Tag wurde das supplementierte Nährmedium gewechselt. Das gesamte „alte“ Nährmedium wurde für eine spätere Kollagenbestimmung eingefroren. Einmal pro Woche wurde 1 ml des „alten“ Nährmediums für ELISA gesammelt. Das restliche Nährmedium wurde für SDS-PAGE, HPLC und molekularbiologische Untersuchungen gepoolt und bis Versuchsende bei -32 °C eingefroren. Anhand von Fotos wurden die Zellen am Tag 2, 5, 7, 14, 21 und 28 digital dokumentiert. Am 28. Tag wurde das Experiment beendet und es erfolgte eine abschließende Zellzählung jeder Vertiefung.

2.3 Zellkultur

Herstellung von Basisnährmedium

Als Basisnährmedium für die Zellkultur diente Duplecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biochrom AG, Seromed, Berlin, Deutschland) in einer Konzentration von 10,15 g/l mit 4,5 g D-Glucose und ergänzt mit 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG, Seromed, Berlin, Deutschland). Nach Zugabe von Aqua dest. und 3,7 g Natriumhydrogencarbonat wurde der pH-Wert mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt. Unter sterilen Bedingungen wurde das Basismedium nun mit einem Membranfilter (Cellulose-Acetate-Filter, Satorius AG, Göttingen, Deutschland) der Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$ sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Direkt vor Gebrauch wurde fetales Kälberserum zu einer Konzentration von 10 % (Perbio Science Deutschland, Bonn, Deutschland) sowie 100 E./ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin (Biochrom KG, Seromed, Berlin, Deutschland) und 1 mmol/l Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) supplementiert. Im Gegensatz zur Fibroblasten-Kultur erhielt die Osteoblasten-Zellkultur 1 ml einer Stammlösung (100 nmol/l) Dexamethasone (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland).

Anlegen einer Zellkultur

Osteosarkomzellen (SaOS-2) besitzen die Eigenschaften, sich rasch zu vermehren und mehr Kollagen zu exprimieren als Osteoblasten. Diese Zellen stammen von DZSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland). Sie waren tiefgefroren und mussten vorsichtig unter handwarmem Wasser aufgetaut werden. Nach dem Auftauungsprozess wurden mehrere Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask, PE Vented Cap, Sarstedt, Newton, NC, USA) angelegt, mit je 10 ml Basisnährmedium gefüllt und mit den aufgetauten SaOS-2-Zellen bestückt. Zur Kultivierung wurden sie in den Brutschrank (wasserdampfgesättigte Atmosphäre bei 37 °C, 95 % Außenluft und 5 % CO₂; Firma Haereus Christ, Osterode, Deutschland) gegeben. Bei jedem Nährmediumwechsel (nach 72 h) wurde die Kultur unter dem Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) bezüglich einer Kontamination kontrolliert.

Die humanen Gingivafibroblasten (im Folgenden nur als Fibroblasten bezeichnet) und Osteoblasten wurden ebenfalls in einer Tiefkühltruhe bei -70 °C aufbewahrt. Ihre Aufbereitung zur Zellkultur erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den SaOS-2-Zellen. Zusätzlich zur lichtmikroskopischen Begutachtung wurde eine Testung auf Osteocalcin durchgeführt sowie die alkalische Phosphatase für die Differenzierung der Osteoblasten, ähnlich wie bei Roggendorf und Mitarbeitern (1986). Zur Kultivierung wurden diese Zellen ebenfalls in den Brutschrank gegeben und es folgten der ständige Nährmediumwechsel und die lichtmikroskopische Kontrolle auf Bakterien- oder Pilzbefall.

Passage

Konfluente Osteoblasten, Fibroblasten und SaOS-2-Zellen wurden zum Zweck der Vermehrung mit Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (PBS, 10 ml/100 cm²) gewaschen und anschließend mit Trypsin-Ethylen-Diamin-tetraessigsäure (EDTA) (0,05 % Trypsin, 0,01 % EDTA in PBS, 5 ml/100 cm², Biochrom AG, Seromed, Berlin, Deutschland, Trypsin-EDTA-Solution) bei 37 °C für 5 Minuten im Brutschrank abgelöst. Anschließend wurde die Trypsin-EDTA-Lösung in ein Röhrchen (Röhre 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert und die gleiche Menge an DMEM hinzugegeben, um die Trypsin-Reaktion zu inhibieren. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1200 U/min für 3 Minuten in der

Laborzentrifuge (Haereus Christ, Osterode, Deutschland) bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml supplementiertem Basisnährmedium resuspendiert und erneut mit einer Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät.

Die Passage erfolgte immer nach lichtmikroskopischer Beurteilung in Abständen von 1–3 Wochen abhängig vom Zelltyp. Die Tendenz der Vermehrungsgeschwindigkeit nahm anhand der Beobachtungen von den SaOS-2-Zellen über die Fibroblasten zu den Osteoblasten ab, wie zuvor von Aufmkolk und Mitarbeitern (1985) beschrieben.

2.4 Bestimmung der Zellzahl

Es wurde eine einfache Zellzählung mittels einer standardisierten Neubauer-Zählkammer (Mercateo AG, München, Deutschland) vollzogen. Hierzu wurde die Technik der Passage genutzt, um die Zellen von den Zellkulturflaschen zu lösen (siehe 2.3 Zellkultur – Passage). Nach der Zelllösung erfolgte eine Zellzählung jeder Probe.

2.5 Messung der Zellproliferation

Die Messung der Zellproliferation wurde mit Hilfe eines Cell Proliferation Kit I (MTT-Test) (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) durchgeführt.

Prinzip

Der MTT-Test ist ein fotometrisches Verfahren für eine In-vitro-, nichtradioaktive Quantifikation der Zellproliferation und Zellentwicklung. Es wird der Farbumschlag von gelben Tetrazolium-Salz MTT zu violetten Formazan-Kristallen bei metabolisch aktiven Zellen untersucht.

Auf zellulärer Ebene sind Pyridinnukleotid-Kofaktoren, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), involviert. Für dieses Verfahren werden zwei Lösungen benötigt. Die erste Lösung ist der MTT labeling reagent, die zweite heißt Solubilization solution. Die entstehenden löslichen Kristalle bzw. die dadurch verfärbte Lösung werden mit Hilfe eines

Multiwell-Spektrometers, auch Fotometer genannt (SpectraMax plus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA), quantifiziert.

Durchführung

- In einer 96er Well-Mikrotiterplatte wurden 5×10^3 Zellen pro Well eingebracht. Nach 24 Stunden wurde jedes Nährmedium abgesaugt und entfernt. Es wurden 100 μ l neues DMEM pro Well und 10 μ l MTT labeling reagent hinzugegeben. Die Inkubationszeit im Brutschrank (bei 37 °C, 95 % Außenluft und 5 % CO₂) betrug 4 Stunden.
- Es formierten sich violette Tetrazolium-Salzkristalle. Diese Kristalle sind nicht wasserlöslich. Durch Zugabe von 100 μ l Solubilization solution wurden die Salzkristalle nach einer Inkubationszeit, über Nacht im Brutschrank, wasserlöslich gemacht.
- Am nächsten Tag wurde jedes Well der Mikrotiterplatten fotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 und 600 nm ausgewertet.

2.6 Nachweis von extrazellulärer Matrix

Die Untersuchung auf extrazelluläre Proteine wurde mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) durchgeführt. Um die Crosslinked Kollagene nachzuweisen, wurde die High performance liquid chromatography (HPLC) angewandt.

2.6.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Prinzip und Durchführung

Das ELISA-Verfahren diente dem Nachweis von Proteinen. Dieser Test wurde auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen vollzogen. Eine geometrische Verdünnungsreihe erfolgte für den Standard mit je 100 μ l (mit je einer Verdünnungsreihe von 1×10^4 und 5×10^3 Zellen, angefangen bei 2000 ng bis 15,6 ng). Je 100 μ l unterschiedlicher Konzentrationen der zu untersuchenden Zellkulturüberstände wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben und inkubierten über Nacht. Nach 24 Stunden wurde jede Vertiefung dreimal mit 200 μ l PBS gewaschen.

- Herstellung von PBS:
 - 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) in 1500 ml Aqua dest. lösen
 - 13,6 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) in 1000 ml Aqua dest. lösen
 - Zugabe von Kaliumdihydrogenphosphatlösung zu Dinatriumhydrogenphosphatlösung, bis sich ein pH-Wert von 7,4 eingestellt hat
 - Lösung mit Aqua dest. bis auf 2000 ml auffüllen

Als nächstes wurden für 60 Minuten mit 200 μl 3 % BSA in PBS (1,5 g BSA in 50 ml PBS) die Bindungsstellen der Proteine blockiert. 100 μl des primären Antikörpers Kaninchen anti Kollagen I (Polyclonal Rabbit Anti human Collagen Type I, Biologo, Kronshagen, Deutschland) wurden in jede Vertiefung gegeben und inkubierten für 90 Minuten. Die Vertiefungen wurden erneut dreimal mit 200 μl PBS gewaschen. Nun wurde der sekundäre Antikörper Kaninchen anti Kaninchen IgG (Peroxidase labeled Anti Rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit einer Menge von 100 μl für weitere 90 Minuten hinzugegeben. Es folgte ein dreifaches Waschen der Mikrotiterplatten mit 200 μl PBS mit 0,1 % Tween 20. Mit Peroxidase Substrat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wurde Chromogen hergestellt.

- Chromogen pro Mikrotiterplatte:
 - 10 ml Aqua dest.
 - + 4 Tropfen Pufferkonzentrat
 - + 6 Tropfen TMB-Konzentrat
 - + 4 Tropfen Wasserstoffsuperoxid

In jede Vertiefung wurden 100 μl Chromogen pipettiert, diese inkubierten für 10 Minuten. Die blaue Farbentwicklung wurde mit 50 μl 1 N Schwefelsäure gestoppt. Eine Auswertung erfolgte am Fotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Farbentwicklung ist proportional zu der Antigenkonzentration der Probe und gibt die Konzentrationen der Proben anhand der mitgeführten geometrischen Verdünnungsreihe des Standards an.

2.6.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Das Flussdiagramm (Abb. 2) demonstriert die Teilschritte zur Analyse der Kollagen-Verknüpfungen: Hydroxyprolin (Hyp), Hydroxylsilypyridinolin (HP) und Lsilypyridinolin (LP).

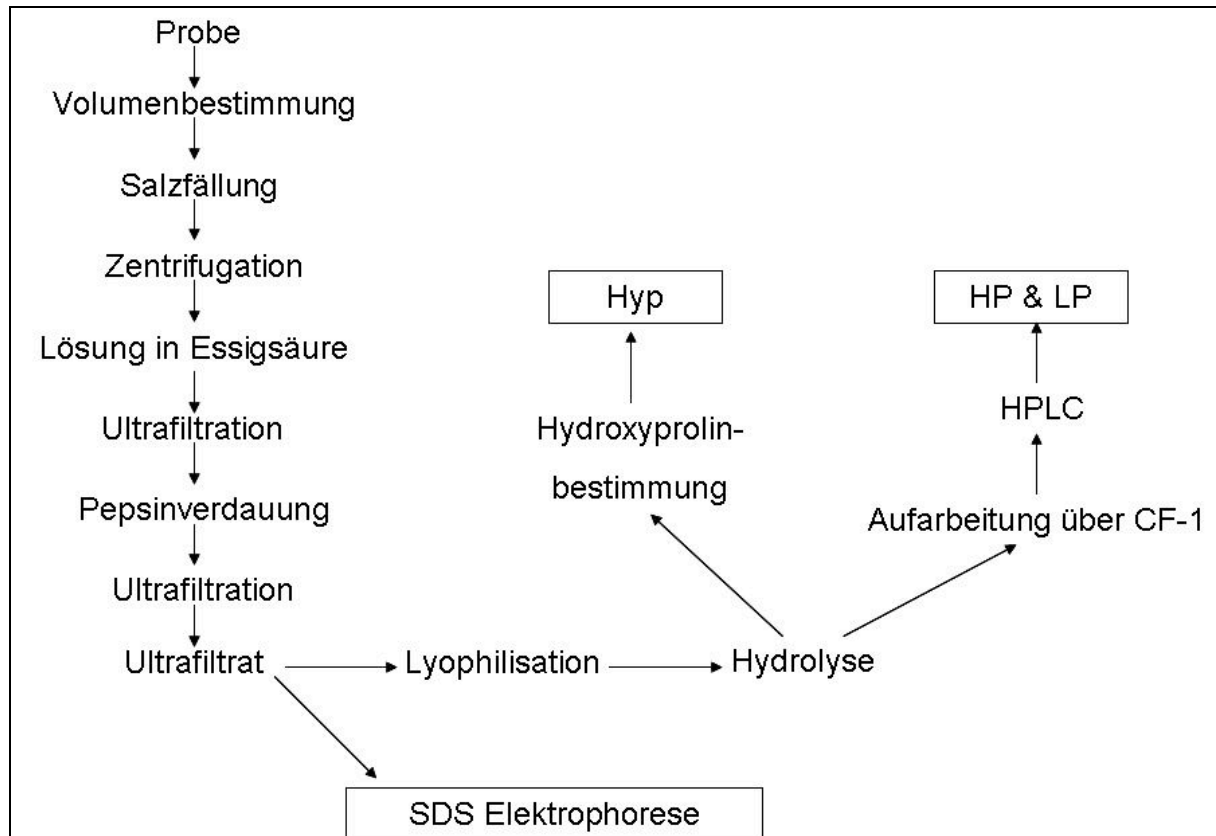


Abb. 2: Grafische Darstellung der Vorbereitung für die Kollagenanalyse

Folgende Schritte gehören zur HPLC-Analyse: Volumenbestimmung und Salzfällung, Zentrifugation und Lösung in Essigsäure, Ultrafiltration, Pepsinverdauung, Ultrafiltration, Hydrolyse und Aufbereitung über CF-1.

Salzfällung

Es erfolgte eine Volumenbestimmung des gesammelten Nährmediums mit dem Ergebnis von 80 ml pro Probe.

Die Kollagene mussten aus ihrer löslichen Form isoliert werden. Bei Zugabe von 4 M Kochsalz zum gesammelten Nährmedium kommt es zur Lösung der Hydrathüllen der Kollagene. Um aber Ungenauigkeiten zu vermeiden und keine Kollagene auszulassen, wurden 5 M Kochsalz zur Lösung gegeben. Die Salzfällung wurde über

mindestens 12 Stunden in Glasgefäßen unter permanenter Rührung bei Zimmertemperatur vollzogen.

Zentrifugation und Lösung in Essigsäure

Nach der Salzfällung folgte eine Zentrifugation des gesammelten Nährmediums. Es wurden die gesammten 80 ml bei 8000 U/min für 60 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 3K30, Sigma, Osterode, Deutschland). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt. Abschließend wurde das übrig gebliebene Pellet mit 6 ml 0,5%iger Essigsäure + 0,2 M NaCl resuspendiert.

Die Zentrifugation diente der Anreicherung von freien Kollagenen und gleichzeitiger Reinigung von weiterhin gelösten Kollagenen.

Ultrafiltration

Die gelösten Proteine in 6 ml 0,5%iger Essigsäure + 0,2 M NaCl wurden in VivaSpin-Röhrchen (VivaSpin 6, VivaScienceAG, Sartorius Group, Hannover, Deutschland) gegeben. Dieser Verfahrensschritt sollte Salze herausfiltern. Diese Röhrchen enthalten einen Filter mit einer Ausschlussgrenze von kleiner oder gleich 100 kDa (MWCO PES). Im Filter wurden Kollagene aufgefangen, da diese Proteine ein sehr hohes Molekulargewicht von über 100 kDa besitzen. Es folgte eine Zentrifugation von mindestens 90 Minuten bei 6000 U/min bei 4 °C. Das Ultrafiltrat wurde aus dem Röhrchen entfernt und aufbewahrt. Es wurden zwei weitere Zentrifugationen von jeder Probe mit je 3 ml 0,5%iger Essigsäure + 0,2 M NaCl durchgeführt, jedes Mal wurde das Ultrafiltrat entfernt und aufbewahrt. Zuletzt wurde das Pellet in 6 ml 0,5%iger Essigsäure + 0,2 M NaCl gelöst. Der doppelte Waschvorgang mit 0,5%iger Essigsäure + 0,2 M NaCl diente der exakten Einstellung der Molarität von Kochsalz und der kompletten Reinigung von Salzen.

Pepsinverdauung

Pepsin ist eine Endopeptidase, welches Peptidbindungen hydrolysiert. Da jedes Enzym einen optimalen pH-Wert aufweist, bei dem es arbeiten kann, wurde dieser erst in der Lösung eingestellt, ehe die Zugabe von Pepsin erfolgte. Da Pepsin physiologischerweise im Magensaft aktiv ist, liegt das Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert von 2.

Für eine optimale Funktion musste der pH-Wert jeder Pellet-0,5%igen Essigsäure + 0,2 M NaCl-Lösung eingestellt werden. Die pH-Wert-Einstellung auf 2 erfolgte mit verdünnter Salzsäure. Pepsin (Pepsin porcine, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde in Aqua dest. gelöst. Nach Zugabe von Pepsin (0,2 mg/ml) musste es für 24 Stunden bei Zimmertemperatur und auf einer Schwenkmaschine (RM5 Assistent, Schumann & Ehlers, Kiel, Deutschland) gemischt werden.

Ultrazentrifugation der Probe mit Pepsin

Nach 24 Stunden des Pepsinverdaus wurde die Probe erneut bei 6000 U/min bei 4 °C in VivaSpin-Röhrchen mindestens 120 Minuten ultrazentrifugiert, das entstandene Ultrafiltrat abgefüllt und tiefgekühlt bei -32 °C (Liebherr – International Deutschland GmbH, Biberbach, Deutschland) aufbewahrt. Das Pellet wurde viermal mit je 2,5 ml 0,5%iger Essigsäure resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml 0,5%iger Essigsäure resuspendiert und in 2,5 ml für SDS-PAGE Elektrophorese aufgeteilt, die restlichen 7,5 ml wurden für weitere Untersuchungen gefriergetrocknet.

Hydrolyse

Die saure Hydrolyse diente der Freisetzung der Quervernetzungsbestandteile HP (Hydroxylylsylpyridinolin) und LP (Lysylpyridinolin) aus dem in den Proben enthaltenen Kollagen. Dazu wurden die Proben mit jeweils 1 ml 6 M Salzsäure versetzt und anschließend 24 Stunden bei 110 °C in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Für die fotometrische Detektion des Hydroxyprolins wurden aus dem Hydrolysat 30 µl entnommen.

Vorbereitung des CF-1

Für die Adsorptionschromatografie wurde 10%ige fibröse Zellulose (CF-1) (Watman, Springfield Mill Maidstone, England) benötigt, das wie folgt verarbeitet wurde:

Zuerst wurden 100 g CF-1 in 3 l M Natriumacetat in Lösung gebracht und dann

- a) mit einem Magnetrührer 20 Minuten verrührt,
- b) nach 10 Minuten, als sich die Zellulose abgesetzt hatte, wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und
- c) das Sediment mit einem Bücher-Trichter möglichst trocken abgenutscht.

Anschließend wurde das Sediment in 3 l 0,5 M NaOH gelöst und anschließend erneut das Verfahren wie unter a), b), c) in vorangegangenen Punkten beschrieben durchgeführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Der entstandene Filterkuchen wurde in Aqua dest. resuspendiert, dann wie zuvor unter a), b), c) beschrieben vorgegangen.

Danach wurde die Zellulose mit 3 l 0,5 M HCl für 5 Minuten gerührt und weiter so verfahren, wie unter b) und c) beschrieben; dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Nun wurde der Filterkuchen in 3 l 0,1 M HCl und 95%igem Ethanol resuspendiert und erneut wie unter a), b), c) beschrieben vorgegangen.

Danach erfolgte eine Resuspendierung von CF-1 wie unter a), b), c) beschrieben; dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Über Nacht wurde der Filterkuchen in 3 l 0,1 M Natriumacetat und 3 mM EDTA gelagert.

Am nächsten Tag wurde das abgesaugte und abfiltrierte Material noch einmal in bidestilliertem Wasser gelöst, so wie bereits unter a), b), c) beschrieben; dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Das CF-1 konnte in Chloroform aufbewahrt werden.

Adsorptionschromatografische Vorreinigung der Proben

Die hydrolisierten Proben wurden einer adsorptionschromatografischen Vorreinigung unterzogen.

Dazu wurden jeweils angesetzt:

1 ml Probe

+ 1 ml Eisessig

+ 5 ml 10%iges CF-1 (in n-Butanol/Eisessig/H₂O 4 : 1 : 1 = Laufmittel)

+ 2 ml n-Butanol

Das Gemisch wurde in eine Polyprep-Chromatographiesäule (40 × 8 mm, Filter mit 2 µm Poren, Bio-Rad, München, Deutschland) gefüllt, das Eluat zweimal über die Säule gegeben und dann verworfen. Daraufhin folgte ein zweimaliges Waschen der Säule mit 5 ml Laufmittel. Das entstandene Eluat wurde wieder verworfen.

Die Desorption von HP und LP erfolgte mit 3 ml Aqua dest., das auf die Säule aufgetragen wurde. Auf der Oberfläche befand sich nun eine Schicht, bestehend aus n-Butanol, die vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. HP und LP befanden sich jetzt in dem verbliebenen Eluat.

Die Pyridinoline wurden nach dem Einfrieren und anschließender Lyophilisation (siehe unter Ultrazentrifugation der Probe mit Pepsin) in 1 ml Laufmittel A (0,22 % Heptafluorbuttersäure in Aqua dest.) gelöst und in Analyseflaschen (Gyothek, Germering, Deutschland) gefüllt.

Quantitative Bestimmung von Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP)

Die HPLC (High performance liquid chromatography) erfolgte bei Raumtemperatur und einer Flussgeschwindigkeit von 0,7 ml/min. Die Fluoreszenz-Detektion (Fluoreszenz-Detektor RF 1002, Gyothek, Germering, Deutschland) wurde bei 297 nm Extinktion und 397 nm Emission vorgenommen (Açil et al. 2000; 2002). Folgende Lösungsmittel sind zum Aufbau des Konzentrationsgradienten der Chromatographiesäule verwendet worden:

Laufmittel A: 0,22 % Heptafluorbuttersäure (HFBA) in bidestilliertem Wasser

Laufmittel B: 0,22 % HFBA in Acetonitril/Aqua dest. (80 : 20)

Die Laufmittel wurden ständig über einen Degaser entgast. Der Konzentrationsgradient bildete sich wie folgt:

- a) zu Beginn betrug das Konzentrationsverhältnis von Laufmittel A zu B 81 : 19 %,
- b) innerhalb der ersten 24 Minuten stieg die Konzentration des Laufmittels B auf 21 % an,
- c) dann innerhalb von 3 Minuten auf 100 % B,
- d) so wurde die Säule 5 Minuten gereinigt,
- e) danach fiel die Säule in 4,2 Minuten auf 19 % (Laufmittel B).

Bis zum Beginn der folgenden Analyse blieb das Konzentrationverhältnis zwischen Laufmittel A und B bei 81 : 19 %.

Für die Ermittlung der Konzentrationen der Pyridinoline HP und LP im pmol Bereich musste ein Abgleich mit dem verwendeten externen Standard (Osseinhydrolysat; Deutsche Gelantine Fabriken Stoess AG, Eberbach, Deutschland) vorgenommen werden. So konnte auch die Trennleistung der Säule überprüft werden (Açil und Müller 1994).

2.7 Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin (Hyp)

Hydroxyprolin ist ein Bestandteil des Kollagenstoffwechsels. Es ist sowohl im Abbau als auch im Aufbau enthalten. Da Hydroxyprolin organunabhängig in jedem Kollagen enthalten ist, ist eine Messung der Konzentration erforderlich.

Durchführung

Die Hydroxyprolinbestimmung wurde wie bei Jamall et al. (1981) beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden je 11 µl aus dem Hydrolysat (siehe 2.6.2 HPLC) entnommen. In einer 96er Well-Mikrotiterplatte (MTP) wurden zwei Standardverdünnungsreihen von Hydroxyprolin erstellt:

- 1) 4,6 µg/ml ... 100 µg/ml
- 2) 3,1 µg/ml ... 200 µg/ml

Von den Proben wurden 3 µl entnommen, im Verhältnis 1 : 10 und 1 : 50 verdünnt und in die Vertiefungen der 96er Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Für jede Vertiefung kamen hinzu: 70 µl Propanol-Wasser (10 ml 2-Propanol + 5 ml Aqua dest.), 50 µl Chloramine (1,4 g Chloramine T + 20 ml Aqua dest. + 100 ml Puffer = 34,38 g Natriumacetat + 37,5 g Trinatriumacetat + 5,5 g Citronensäure in 300–400 ml Aqua dest. gelöst + 400 ml 2-Propanol, auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt).

Die 96er Well-Mikrotiterplatte wurde für 5 Minuten inkubiert, dann 125 µl Ehrlichs Reagenz (1,2 g Dimethylaminobenzaldehyd + 1,8 g 60%ige Perchlorsäure + 10 ml 2-Propanol) in jede Vertiefung hinzugegeben und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurde bei 550 nm die Konzentration von Hydroxyprolin am Plattenfotometer nachgemessen.

2.8 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Die Untersuchung mittels der SDS-PAGE diente dazu, die Kollagen Typen I, II, III und V in den Proben qualitativ nachzuweisen (Açil et al. 2000; 2002).

Durchführung

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde mit einer Anlage der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Es handelt sich hierbei um eine Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit verzögerter Reduktion. Das SDS (Sodiumdodecylsulfat, Serva, Boehringer Ingelheim, Deutschland) ist ein anionisches Detergens und bindet an die hydrophoben Regionen eines Proteins. Der Großteil der Proteine dissoziiert in seine Untereinheiten.

Das Trenngel (1 ml 6%iges Bisacrylamid, 2 ml 1,3-molare TRIS-Lösung, 3 ml Aqua dest., 12 µl TEMED [Tetramethylethylen, Serva, Boehringer, Ingelheim, Deutschland] und 40 µl 1%iges APS [Ammoniumpersulfat, Serva, Boehringer, Ingelheim,

Deutschland] nahm drei Viertel des Polyacrylamidgels ein und wurde zuerst zügig zwischen die Platten einpipettiert, mit Aqua dest. überschichtet und für 10–15 Minuten polymerisiert. Dann wurde das Aqua dest. wieder abgegossen und die noch verbliebene Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt, ohne das Gel zu berühren. Das Sammelgel enthielt 0,4 ml Bisacrylamid, 0,9 ml 1,3-molare TRIS-Lösung, 2,5 ml Aqua dest., 6 µl TEMED und 40 µl APS und es erfolgte das gleiche Procedere wie beim Trenngel. Nach der Überschichtung des Trenngels mit dem Sammelgel wurde ein Probetaschenkamm (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit 20 Probetaschen vor der Polymerisation in das Sammelgel eingesetzt.

Zur Vorbereitung der Elektrophoresekammer wurde der Elektrodenpuffer/Laufpuffer (12,1 g, 1,3-molare TRIS-Lösung, 17,9 g Glycerin und 1 g SDS vermischt, auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt) ohne Schaumbildung eingefüllt und die Gele in die Kammer luftblasenfrei eingesetzt.

Zusammen mit den zu analysierenden Proben wurden Standards aus Haut (Kollagen Typen I und III), Knorpel (Kollagen Typ II) und Knochen (Kollagen Typen I, III und V) mit durch die Elektrophorese geführt. Die Trennung der α -Ketten des in den Proben enthaltenen Kollagens erfolgte bei einer Stromzufuhr von 50 mA mit 50 V Spannung je Gel bei Raumtemperatur. Nach rund 75 Minuten hatten die Proben die Hälfte des Polyacrylamidgels durchwandert. Jetzt wurde der Lauf angehalten und 7 µl verdünntes Mercaptoethanol (20 µl Mercaptoethanol + 180 µl Auftragspuffer) in jede Probetasche einpipettiert. Das Mercaptoethanol sorgt für eine verzögerte Reduktion der Disulfidgruppen der Proteinuntereinheiten. Nach 10 Minuten wurde die Elektrophorese wieder gestartet und der Lauf fortgesetzt, bis die Lauffront das Gel durchwandert hatte.

Die Proben wurden mittels einer Silberlösung gefärbt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 30 Minuten in Lösung (60 ml Aqua dest., 30 ml 96%iges Ethanol und 10 ml Essigsäure) fixiert. Es folgte eine 30-minütige Reduktion in einer anderen Lösung (15 ml 4 M Natriumacetat [4,8 g], 45 ml Ethanol, ca. 80 ml Aqua dest., pH-Wert-Einstellung auf 6 mit 500 µl Eisessig, 150 mg Natriumthiosulfat und 3 ml 25%iges Glutaraldehyd). Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen, ehe es mit einer Silberlösung (150 mg Silbernitrat, 150 ml Aqua dest. und 30 µl Formaldehyd) für 20 Minuten gefärbt wurde. Der Färbung folgte

die Entwicklung mit einer Lösung aus 30 ml 12,5 % Natriumcarbonat, 270 ml Aqua dest. und 120 µl Formaldehyd. Diese Entwicklerlösung wurde nur kurz auf die Gele gegeben und direkt abgegossen. Die Entwicklung wurde mit 5%iger Essigsäure (50 ml Eisessig auf 1000 ml Aqua dest.) gestoppt.

Die Banden wurden unter UV-Licht mit Hilfe einer Videokamera in einem Computer dokumentiert. Es wurde dafür eine Geldokumentationsanlage (Video BioDoc II, Biometra, Göttingen, Deutschland) verwendet.

Unter Zugabe einer Geltrocknungsflüssigkeit (Gel drying solution, Bio-rad Laboratories, CA, USA) und von Wärme konnten die Gele zwischen zwei Spezialfolien (Gel air cellophane, Bio-rad Laboratories, CA, USA) in einem Gefriertrockner (Gel drying frame, Bio-rad Laboratories, CA, USA) getrocknet sowie längerfristig konserviert werden.

2.9 Nachweis von extrazellulären Proteinen mittels molekularbiologischer Methoden

Zum Nachweis von extrazellulären Proteinen wurden zusätzlich zu den Kollagen Typen I, II, III und V auch GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), die ALP (alkalische Phosphatase) und Osteocalcin nachgewiesen. Zunächst wurden die Proben aufbereitet, wonach eine RT-PCR (Reverse Transkription–Polymerase-Kettenreaktion) erfolgen konnte. Als folgender Schritt wurden die extrazellulären Proteine quantitativ bestimmt und es erfolgte die Auswertung. Als letztes wurden die Proben mit Hilfe einer Gelelektrophorese auf einem Agarosegel dokumentiert.

2.9.1 RNA-Aufbereitung

Nach der Zellzählung wurde die Zell-Nährmediumlösung noch einmal mit 1200 U/min für 3 Minuten in der Laborzentrifuge (Haereus Christ, Osterode, Deutschland) bei Raumtemperatur (20 °C) zentrifugiert. Alle weiteren Schritte und Materialien basierten auf dem RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 350 µl RLT-Plus-Puffer gelöst. Die Lösung wurde homogenisiert und in eine gDNA-Eliminator-Säule in ein 2-ml-Sammelgefäß gegeben und für 30 Sekunden bei 4 °C bei 8000 U/min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und das Eluat aufbewahrt. Zum Eluat wurden 350 µl

70%iges Ethanol hinzugefügt und gut vermischt. 700 µl der Lösung wurden in ein RNeasy spin column (Säule) in ein verschließbares Gefäß (2 ml) gegeben. Nach der Zentrifugation der Lösung bei 4 °C und 8000 U/min für 15 Sekunden wurde das Eluat verworfen, um den RLT-Plus-Puffer zu entfernen. Nun wurden 700 µl RW1-Puffer in die RNeasy spin column gegeben und erneut bei 4 °C und 8000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat wurde wiederum verworfen. In die RNeasy spin column wurden 500 µl RPE-Puffer (Lyse-Puffer) addiert und für 15 Sekunden bei 4 °C und 8000 U/min zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde verworfen. Es wurden nochmals 500 µl RPE-Puffer in die RNeasy spin column gegeben und nun für 2 Minuten bei 4 °C und 8000 U/min zentrifugiert. Diese Langzeitzentrifugation diente dazu, das Ethanol komplett zu trennen. Die jeweils benutzte RNeasy spin column wurde samt Pellet in ein neues Sammelgefäß gebracht und für 1 Minute bei 4 °C und 8000 U/min zentrifugiert. Die RNeasy spin column wurde erneut auf ein neues 1,5-ml-Sammelgefäß aufgebracht und mit 40 µl RNase free water ergänzt. Eine Zentrifugation bei 4 °C und 8000 U/min für 1 Minute wurde durchgeführt und die RNA eluiert. Falls die RNA-Ansammlung größer als 30 pg war, wurden erneut 40 µl RNase free water hinzugegeben und bei 4 °C und 8000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Es folgte eine fotometrische Bestimmung bei 260, 280 und 320 nm der RNA.

2.9.2 Reverse Transkription–Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.9.2.1 Reverse Transkription (RT)

Die RT-PCR haben Veres et al. 1987 beschrieben. Es handelt sich um eine hochsensitive Methode zur Bestimmung der Genexpression. Die RT-PCR kombiniert das Umschreiben der mRNA als Expressionsprodukt in stabile DNA mit der anschließenden Amplifizierung des gesuchten Genprodukts mittels PCR. Dabei wird im ersten Schritt an die isolierte Poly(A)⁺-RNA ein Oligo-(dT)₂₀-Primer hybridisiert. Dieses Oligonukleotid dient nun als Starthilfe zur Synthese des komplementären DNA-Stranges (cDNA) durch das Enzym „reverse Transkriptase“. Der so gewonnene cDNA-Strang wird als Matrize für die PCR genutzt.

Für diese Synthese wird ein Enzym, die reverse Transkriptase, benötigt. Dieses Enzym braucht für die in 5'–3'-Richtung verlaufende cDNA-Synthese ein kurzes Oligonukleotid, einen sogenannten Primer, als Startermolekül. Der Primer muss ein

freies 3'-Ende besitzen und komplementär zur RNA sein. Die meisten eukaryontischen mRNAs sind an ihrem 3'-Ende polyadenyliert (Poly-A⁺-RNA). Als Primer wurden komplementäre Oligonukleotide aus Thyminbasen, sogenannte Oligo-(dT)₂₀-Primer, verwendet. Diese bestehen in der Regel aus 15–20 Nukleotiden, hybridisieren mit den Poly-A⁺-Enden der mRNAs und ermöglichen der reversen Transkriptase dadurch, die komplementäre cDNA zu synthetisieren. Folgende Materialien sind aus dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entnommen worden.

2 µl gDNA-Wipeout-Puffer werden mit 1 µg der zuvor gewonnenen RNA kombiniert und mit Aqua dest. auf 14 µl Endvolumen je Probe gefüllt. Dieses Gemisch inkubiert in einem Wasserbad (Grant JB Series, Grant Instruments Ltd., Cambridge, England) bei 42 °C für 2 Minuten, ehe es auf Eis gestellt wurde. Nun wurde der Reaktionsmix für die reverse Transkription angesetzt. Er setzt sich zusammen aus 1 µl RT, 4 µl Quantiscript-RT-Puffer und 1 µl RT-Primer-Mix. Die 6 µl Reaktionsmix wurden zu den 14 µl der Probe gegeben. Dies wurde für 15 Minuten bei 42 °C auf dem Wasserbad inkubiert und anschließend für 3 Minuten bei 95 °C auf einen Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) gegeben. Das fertige Produkt wurde eingefroren.

2.9.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR, die 1985 entwickelt wurde, gestattet mit Hilfe von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primern), einen gewünschten DNA-Abschnitt zu amplifizieren (Saiki et al. 1988). Die Primer dienen als Startmolekül für die matrizenabhängige Neustartsynthese der DNA durch eine spezielle DNA-Polymerase. Da die Polymerase-Kettenreaktion in einem sogenannten Thermocycler stattfindet, d. h., die Reagentien sind stetigen Temperaturschwankungen ausgesetzt, ist es wichtig, dass die DNA-Polymerase ein thermostabiles Enzym ist. Es wurde daher die hitzestabile, aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase benutzt. Diese hat den Vorteil, nahezu keinen Leistungsverlust über die Gesamtdauer der PCR zu haben (Saiki et al. 1988).

Durch die zyklische Reaktionsabfolge von Denaturierung, Primeranlagerung und Verlängerung durch die Taq-Polymerase während der PCR wird eine exponentielle Amplifizierung eines einzigen spezifischen DNA-Abschnittes ermöglicht, sodass

schon nach wenigen Programmzyklen eine hohe DNA-Ausbeute erreicht werden kann.

Die folgenden Schritte der PCR wurden mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) vollzogen. SYBR-Green ist ein Farbstoff, welcher in der kleinen Furche der DNA bindet. Die Primer mussten in 1,1 ml TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) gelöst werden. Der TE-Puffer setzt sich aus 1 ml 1 M TRIS-HCl, 0,2 ml 0,5 M EDTA und 98,8 ml Aqua dest. zusammen. Nachdem die Primer nun gelöst waren, wurde der PCR-Mix erstellt. 10 µl SYBR-Green wurden mit 2 µl des Primers (0,5 µM) und 7 µl Aqua dest. zusammengebracht. Diese 19 µl des PCR-Mixes wurden in Kapillaren pipettiert und 1 µl cDNA unverdünnt aus der zuvor durchgeführten RT-PCR dazugegeben. Nachdem jede Probe in einer Kapillare war, wurde die Real-Time-PCR-Analyse mit dem Fluoreszenz-Cycler (LightCycler®) der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Jede Probe wurde mit sieben verschiedenen Primern getrennt getestet und vervielfältigt.

Die PCR setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

- Vorinkubation
 - 50 °C, 120 sec
- Aktivierung der Polymerase
 - 95 °C, 900 sec
- 3-Schrittzyklus (45 Zyklen)
 - Denaturierung 94 °C, 15 sec
 - Annealing 55 °C, 20 sec
 - Messung 72 °C, 20 sec
- Verschmelzung
 - 95 °C, 20 sec
 - 65 °C, 15 sec
 - 97 °C, 0,1 sec
- Abkühlung
 - 40 °C, 30 sec

Dieser Prozess dauerte knapp 1 Stunde und 40 Minuten pro Primer. Es wurden sieben humane Primer der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet: GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphat-dehydrogenase), Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, Kollagen Typ III, Kollagen Typ V, alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin

(Bone Gamma-carboxyglutamate-[gla]-protein). Mittels der RT-PCR-Analyse konnte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung des PCR-Produktes für jeden Zyklus, aufgezeichnet werden.

Während der Annealing-Phase hybridisieren die Primer an ihrer Zielsequenz und bilden sehr kleine Abschnitte von DNA, was dem Farbstoff wiederum ermöglicht zu binden (Applied Biosystems 2001). Hier fanden sich vergleichsweise noch sehr geringe Konzentrationen. In der Elongationsphase, in der es zu einer Verlängerung der Primer entlang der DNA-Matrize kommt, wurde mehr und mehr von dem Farbstoff an der DNA gebunden. Am Ende der Elongationsphase stellten sich somit wieder eine doppelsträngige DNA und gleichzeitig ein Maximum an gebundenem SYBR-Green-Farbstoff dar. Genau an diesem Punkt eines Zyklus in der PCR, durchgeführt im LightCycler[®], fand die Messung statt. Dieser Vorgang wurde in jedem Zyklus wiederholt, sodass jeweils auf dem Monitor das gemessene Fluoreszenzsignal abgelesen werden konnte. Dadurch bestand eine genaue Kontrolle über den Ablauf der PCR.

Die Software legt eine sogenannte 5%-Schwelle fest, d. h., jede Probe, die in ihrer Konzentration mindestens 5 % der höchsten Standardkonzentration erreicht hat, kann quantifiziert werden. Das Erreichen dieser Schwelle geht mit dem Austritt derjenigen Probe aus der Hintergrundaktivität der Reaktion einher.

Es ergeben sich somit für jede untersuchte Probe zwei unterschiedliche Parameter. Der erste Parameter ist die oben beschriebene Schwelle, also das Erreichen einer 5%igen PCR-Produktkonzentration (Gibson et al. 1996). Weiterhin ist der Zeitpunkt (als Crossing-Point = threshold cycle [C_t] bezeichnet), an dem diese Schwelle erreicht wird, als zweiter Parameter entscheidend. Dieser Zeitpunkt wird anhand der Zyklenzahl festgelegt. Je später, d. h. mit zunehmender Zyklenzahl, die Probe diese Schwelle erreicht, desto geringer fällt die Konzentration des Produktes aus (Higuchi et al. 1993).

Für eine abschließende Kontrolle über das erfolgreiche Ablaufen der PCR entschied eine Negativkontrolle. Dabei wurde anstatt der cDNA Wasser zum Probenmix gegeben. Es sollte hier keinerlei PCR-Produkt entstehen.

Die Software kalkuliert automatisch aus dem Wert des Crossing-Points und dem der Zyklenzahl die relative Transkriptionsproduktmenge (relative transcript level) mit dem Abschluss der PCR für jede untersuchte Probe, einschließlich des Standards. Die daraus ermittelte Standardkurve entspricht einer Linearregression, umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR (Applied Biosystems 2001). Die Steigung dieser Standardkurve steht mit dem entsprechenden Wert für die Effizienz der PCR. Der Wert wird mit einem negativen Vorzeichen angegeben und dient der Vergleichbarkeit der einzelnen Polymerase-Kettenreaktionen untereinander (Applied Biosystems 2001).

Ein Signal ergibt sich bei jedem Abdiffundieren der mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehenen Primer. Bei drei unterschiedlichen Wellenlängen (530, 640 und 710 nm) erfolgt nach jedem Zyklus eine Messung der Fluoreszenzänderung in der Reaktionskapillare (Applied Biosystems 2001). Die verschiedenen Proben wurden anhand eines Standards quantifiziert.

Das PCR-Produkt, das in jedem einzelnen Zyklus entstanden ist, wurde über die Messung der Fluoreszenz von SYBR-Green I bei einer Temperatur von 87 °C am Ende eines jeden Zyklus aufgezeichnet.

Nach Abschluss der 45 Zyklen folgte, von dem Programm automatisch eingeleitet, die Aufzeichnung der Schmelzkurven für alle PCR-Produkte (Applied Biosystems 2001). Dabei wurden die Proben auf 65 °C für 15 Sekunden abgekühlt und anschließend in sehr engen Schritten (0,2 °C/sec) bis auf 95 °C erhitzt. Dieser Schritt diente der qualitativen Analyse der PCR. Nur bei erfolgreicher Amplifizierung sind Schmelzkurven hoher Temperatur zu erzielen.

Im Folgenden konnten sowohl die Schmelzkurve als auch die Kurven der PCR-Reaktion mit Hilfe der LightCycler[®]-Software ausgewertet werden. Es wird von der LightCycler[®]-Software ein Punkt festgelegt, an dem die Hintergrundaktivität der initialen Zyklen in die tatsächliche Amplifikationskurve der einzelnen Proben übergeht. Dieser Punkt, auch Crossing-Point genannt, zeigt diese Schwelle des Übergangs an (Higuchi et al. 1993). Dabei wird genauestens dokumentiert, bei welchem Zyklus diese Schwelle überschritten wird.

Laut Herstellerangaben (Applied Biosystems 2001) und Literatur (Higuchi et al. 1993) verhält sich die Zyklusnummer umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen Produktkonzentration. Zur Optimierung der PCR für die quantitative Bestimmung der Expression wurde eine abgewandelte Verfahrensweise, die sogenannte Hot-Start-PCR, angewandt (Bustin 2002). Dabei handelt es sich um eine Modifikation, bei der die initiale Denaturierungsphase ausgedehnt wird. Es wird zur Reaktion, statt der LightCycler®-DNA-SYBR-Green-Polymerase die LightCycler®-FastStart-DNA-Master-SYBR-Green-I-Polymerase hinzugegeben. Die Begriffe Hot-Start und Fast-Start werden synonym verwendet. Die Hot-Start-Polymerase unterscheidet sich von der Taq-Polymerase dadurch, dass ein spezifischer Antikörper die Aktivität des Enzyms bei niedriger Temperatur inhibiert. Erst, wenn der Antikörper durch Temperaturerhöhung beim Start der PCR denaturiert wird, ist die Hot-Start-Polymerase enzymatisch aktiv, und es beginnt die Amplifizierung. Dadurch wird eine unerwünschte Kettenverlängerung durch unspezifisches Priming bei niedriger Temperatur verhindert (Newton und Graham 1994; Bustin 2002).

2.9.2.3 Quantitative Bestimmung der Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als House-Keeping-Gen

Die GAPDH ist ein Enzym, das als Teil der Glykolyse in jeder metabolisch aktiven Zelle vorhanden ist. Das bedeutet, dass die mRNA für die GAPDH in allen Zellen in nahezu gleichen Mengen vorhanden ist (Thellin et al. 1999; Bustin 2000; Ke et al. 2000; Bustin 2002; Vandesompele et al. 2002). Somit reiht sich die GAPDH in die Gruppe der House-Keeping-Gene ein.

Bei der Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR ist die Verwendung von GAPDH-Primern zur Normalisierung der Ergebnisse eine gebräuchliche und anerkannte Methode (Thellin et al. 1999; Bustin 2000; Ke et al. 2000; Bustin 2002; Liu und Saint 2002; Vandesompele et al. 2002). Die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des House-Keeping-Genes GAPDH verwendeten Primer sind wie folgt aufgezeigt.

GAPDH:

Sense: 5' GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT 3'

Antisense: 3' GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG 5'

2.9.2.4 Quantitative Bestimmung der Expression des Osteocalcins als Knochenmarker

Osteocalcin ist ein guter diagnostisch spezifischer Marker der Knochenbildung. Die Bildung von Osteocalcin erfolgt von Osteoblasten im Knochen und Odontoblasten in den Zähnen. Es ist Teil der extrazellulären nichtkollagenen Knochenmatrix. Die Bestimmung von Osteocalcin wird bei Osteoporose und beim Plasmozytom genutzt.

Osteocalcin:

Sense: 5' TTC TGT GGG TGG AAG GAG AC 3'

Antisense: 3' GGG GAG AGC CCC TAT TTA AG 5'

2.9.2.5 Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs I als Knochenmarker

Das Gen kodiert den Hauptteil der Kollagen-Typ-I-Komponente. Das fibrilläre Kollagen ist in den meisten Bindegeweben enthalten und die einzige Komponente im Kollagen des Knorpels. Mutationen dieses Gens sind assoziiert mit Osteogenesis Imperfecta, Ehlers-Danlos-Syndrom und der idiopathischen Osteoporose.

Kollagen Typ I:

Sense: 5' CCC CAG CCA CAA AGA GTC TA 3'

Antisense: 3' CTG TAC GCA GGT GAT TGG TG 5'

2.9.2.6 Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs II als Knorpelmarker

Dieses Gen kodiert die α -1-Kette vom Kollagen Typ II, welches ausschließlich fibrilläres Kollagen im Knorpel und im Glaskörper des Auges ausmacht. Mutationen dieses Genes sind z. B. mit der Achondrogenesis und Chondrodysplasie assoziiert.

Kollagen Typ II:

Sense: 5' ATG AGG GCG CGG TAG AGA C 3'

Antisense: 3' CGG CTT CCA CAC ATC CTT AT 5'

2.9.2.7 Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs III als Hautmarker

Dieser Kollagen Typ ist im dehnbaren Bindegewebe (Haut, Lunge, Gefäßsystem) oft mit Kollagen Typ I assoziiert. Mutationen sind mit Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV und aortalen und arteriellen Aneurysmen assoziiert.

Kollagen Typ III:

Sense: 5' AGG GGA GCT GGC TAC TTC TC 3'

Antisense: 3' CGG ATC CTG AGT CAC AGA CA 5'

2.9.2.8 Quantitative Bestimmung der Expression des Kollagen Typs V als Teil des Knochenmarkers

Dieses Gen kodiert die α -Kette für eines der fibrillären Kollagene. Die fibrillären Kollagenmoleküle sind Trimere, welche aus einer oder mehreren α -Ketten gebildet sein können. Der Kollagen Typ V ist in Geweben vorhanden, welche den Kollagen Typ I enthalten, und scheint die Zusammensetzung von heterotypischen Fasern (Kollagen Typen I und V) zu regulieren.

Kollagen Typ V:

Sense: 5' CGA TCC TGT GGA TGT CCT G 3'

Antisense: 3' TGG CCT TCT GGA AAG AGT TC 5'

2.9.2.9 Quantitative Bestimmung der Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) als knochenspezifisch

Es gibt vier verschiedene alkalische Phosphatasen: intestinal, plazental, plazenta-ähnliche und Leber-Knochen-Nieren (gewebunspezifisch). Die ersten drei ALP sind zusammen auf Chromosom 2 lokalisiert und die gewebunspezifische ALP ist auf Chromosom 1 eingeordnet. Die ALP ist ein glykolysiertes Enzym, deren exakte physiologische Funktion bisher nicht bekannt ist. Eine wahrscheinliche Funktion ist die Matrix-Mineralisation (Mäuse besitzen dieses Enzym nicht, entwickeln aber trotzdem ein normales Skelett). Das Enzym steht in Verbindung mit der Hypophosphatasie, einer Fehlfunktion mit der Folge einer Hyperkalzämie und

skeletalen Defekten. Der Charakter diese Funktionsstörung kann variieren und ist abhängig von der spezifischen Mutation.

Alkalische Phosphatase:

Sense: 5' GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT 3'

Antisense: 3' GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG 5'

2.9.3 Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an den PCR-Lauf im LightCycler[®] wurden die Proben auf ein 2%iges Agarosegel (2,5 ml Tris-Borsäure-EDTA-Puffer [TBE-Puffer] + 47,5 ml Aqua dest., 1 g Agarosegel [Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA] hinzugegeben und unter Rühren erhitzt, 6 µl Ethidiumbromid [Merck, Darmstadt, Deutschland] wurden vor dem Abkühlen hinzugefügt) aufgetragen. Zu den Proben wurden 3 µl Auftragspuffer gegeben. Danach wurden 23 Proben und ein Standard (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mit je 7 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief über 50 Minuten bei 100 V in 500 ml 0,5 M TBE-Puffer (Sambrook et al. 1989).

Die Banden wurden durch das zugesetzte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videokamera in einem Computer dokumentiert, ähnlich der SDS-PAGE-Dokumentation. Es wurde dafür eine Geldokumentationsanlage (Video BioDoc II, Biometra, Göttingen, Deutschland) verwendet.

3. Ergebnisse

Es wurden 96er Well-Mikrotiterplatten und 6er Well-Platten mit drei humanen Zelltypen (Gingivafibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen) für eine bzw. vier Wochen kultiviert. Zum Nährmedium wurden Bisphosphonate (Zoledronat, Pamidronat und Pyrophosphat) in einer Konzentration von 1, 5, 10 und 20 μM hinzugefügt. Es galt, den Einfluss der Bisphosphonate auf die Zellkulturen zu untersuchen und abschließend mit diversen Verfahren zu bestimmen.

Bei den auswertenden Verfahren wurde insbesondere die extrazelluläre Matrix und Toxizität untersucht.

3.1 Einwöchige Mikrotiterplattenuntersuchung

Der MTT-Test in der einwöchigen Studie demonstriert eine klare Tendenz. Der Vergleich von Tag 1 zu Tag 7 zeigt eine Zellabnahme in jeder Zellreihe unter der Supplementation von ZOL als auch von PAM. Die Osteoblasten und Fibroblasten reagieren mit einer deutlichen Abnahme der Zellen unter Bisphosphonateinfluss, allerdings ist PAM bei 5 und 1 μM weniger toxisch (bis zu 62 %) als ZOL in den gleichen Konzentrationen (bis zu 95 %) (Abb. 3a, b; Abb. 4a, b). PP wirkt sich positiv auf das Zellwachstum aus, was die Ergebnisse besonders bei den Fibroblasten, bei denen teilweise ein Zuwachs von 79 % demonstriert werden konnte (Abb. 3c), und bei Osteoblasten bei 20 μM (80 %) belegen (Abb. 4c). Am stärksten sind die SaOS-2-Zellen (Abb. 5a–c) betroffen, hier ist eine Zellabnahme von bis zu 95 % unter ZOL-Supplementation festgestellt worden (Abb. 5a).

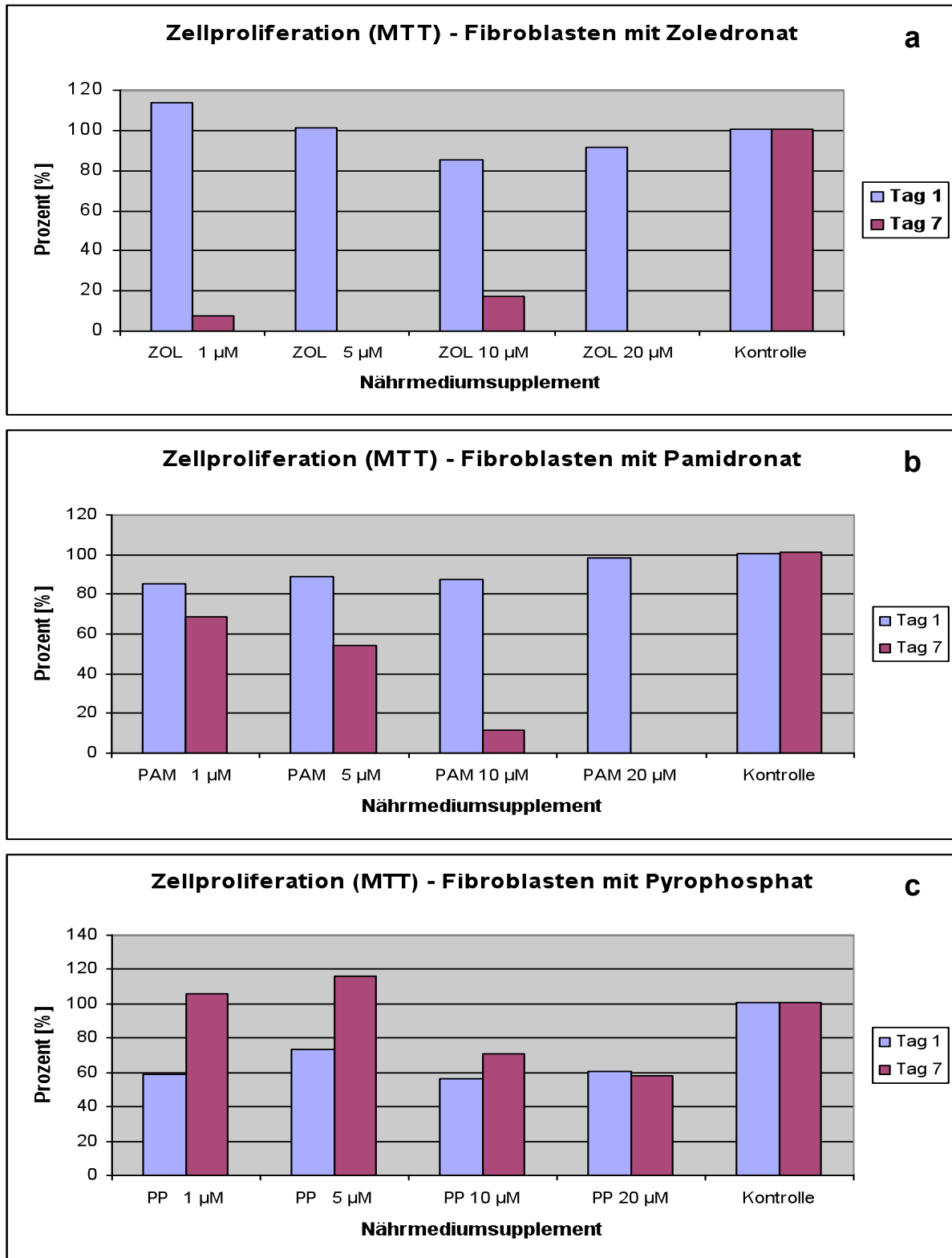


Abb. 3: Darstellung der prozentualen Zellproliferation der Fibroblasten unter a) Zoledronat, b) Pamidronat und c) Pyrophosphat, Supplementation am Tag 1 und am Tag 7. ZOL und PAM demonstrieren eine Reduktion in der Fibroblastenzahl. Im Gegensatz dazu übt PP teilweise einen Proliferationsvorteil aus. (ZOL 1 µM = Zoledronat 1 µM, ZOL 5 µM = Zoledronat 5 µM, ZOL 10 µM = Zoledronat 10 µM, ZOL 20 µM = Zoledronat 20 µM, PAM 1 µM = Pamidronat 1 µM, PAM 5 µM = Pamidronat 5 µM, PAM 10 µM = Pamidronat 10 µM, PAM 20 µM = Pamidronat 20 µM, PP 1 µM = Pyrophosphat 1 µM, PP 5 µM = Pyrophosphat 5 µM, PP 10 µM = Pyrophosphat 10 µM, PP 20 µM = Pyrophosphat 20 µM, K = Kontrolle)

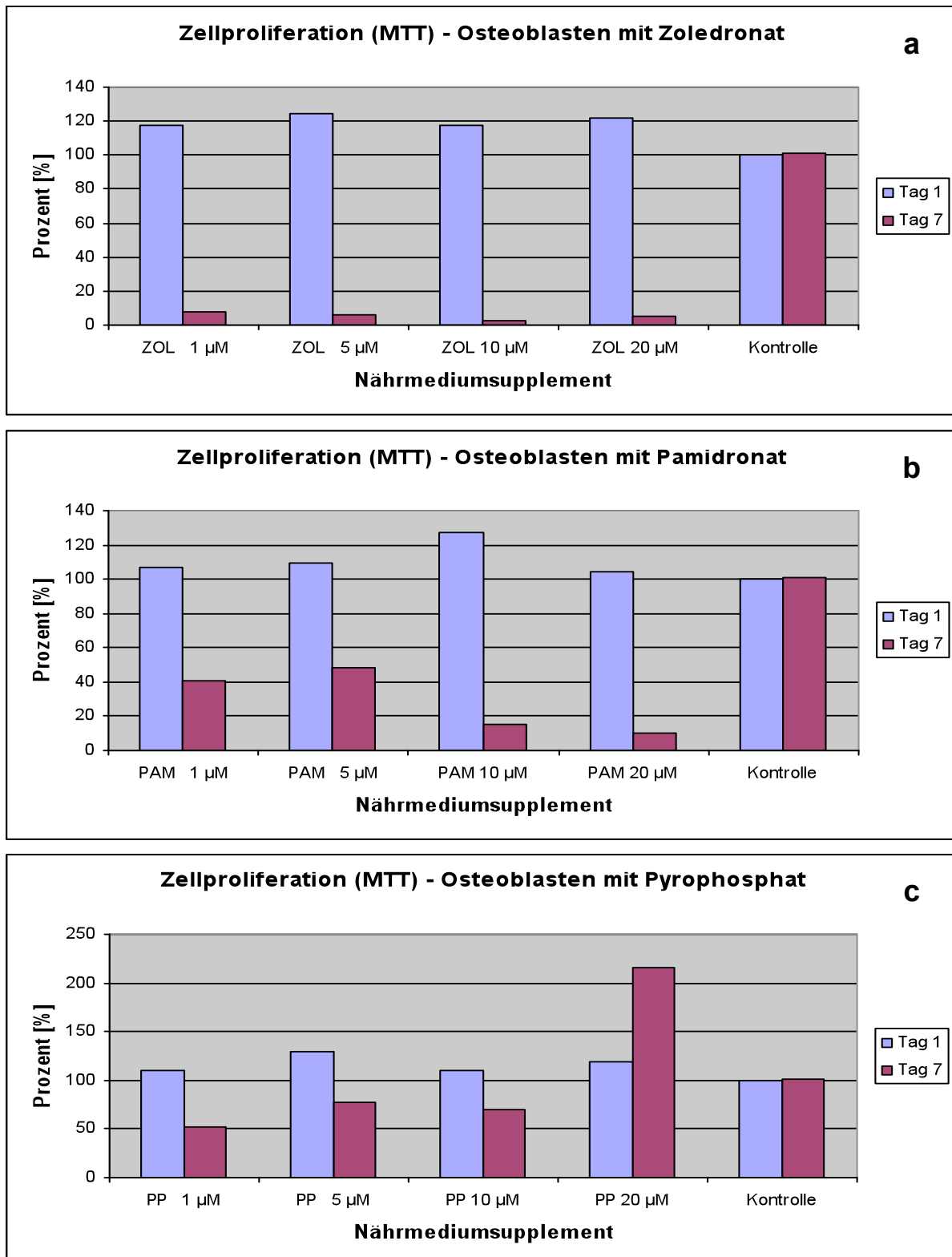


Abb. 4: Ergebnisse in Diagrammform der prozentualen Zellproliferation der Osteoblasten unter a) Zoledronat, b) Pamidronat und c) Pyrophosphat, Supplementation am Tag 1 und am Tag 7. a) ZOL vermittelt deutlich einen negativen Eindruck auf die Proliferation und gleichzeitige Toxizität auf ausgesetzte Zellen. b) PAM wirkt ähnlich wie ZOL. c) PP stellt unterschiedliche Wirkung, sowohl negative als auch positive, auf Osteoblasten dar. (ZOL 1 µM = Zoledronat 1 µM, ZOL 5 µM = Zoledronat 5 µM, ZOL 10 µM = Zoledronat 10 µM, ZOL 20 µM = Zoledronat 20 µM, PAM 1 µM = Pamidronat 1 µM, PAM 5 µM = Pamidronat 5 µM, PAM 10 µM = Pamidronat 10 µM, PAM 20 µM = Pamidronat 20 µM, PP 1 µM = Pyrophosphat 1 µM, PP 5 µM = Pyrophosphat 5 µM, PP 10 µM = Pyrophosphat 10 µM, PP 20 µM = Pyrophosphat 20 µM, K = Kontrolle)

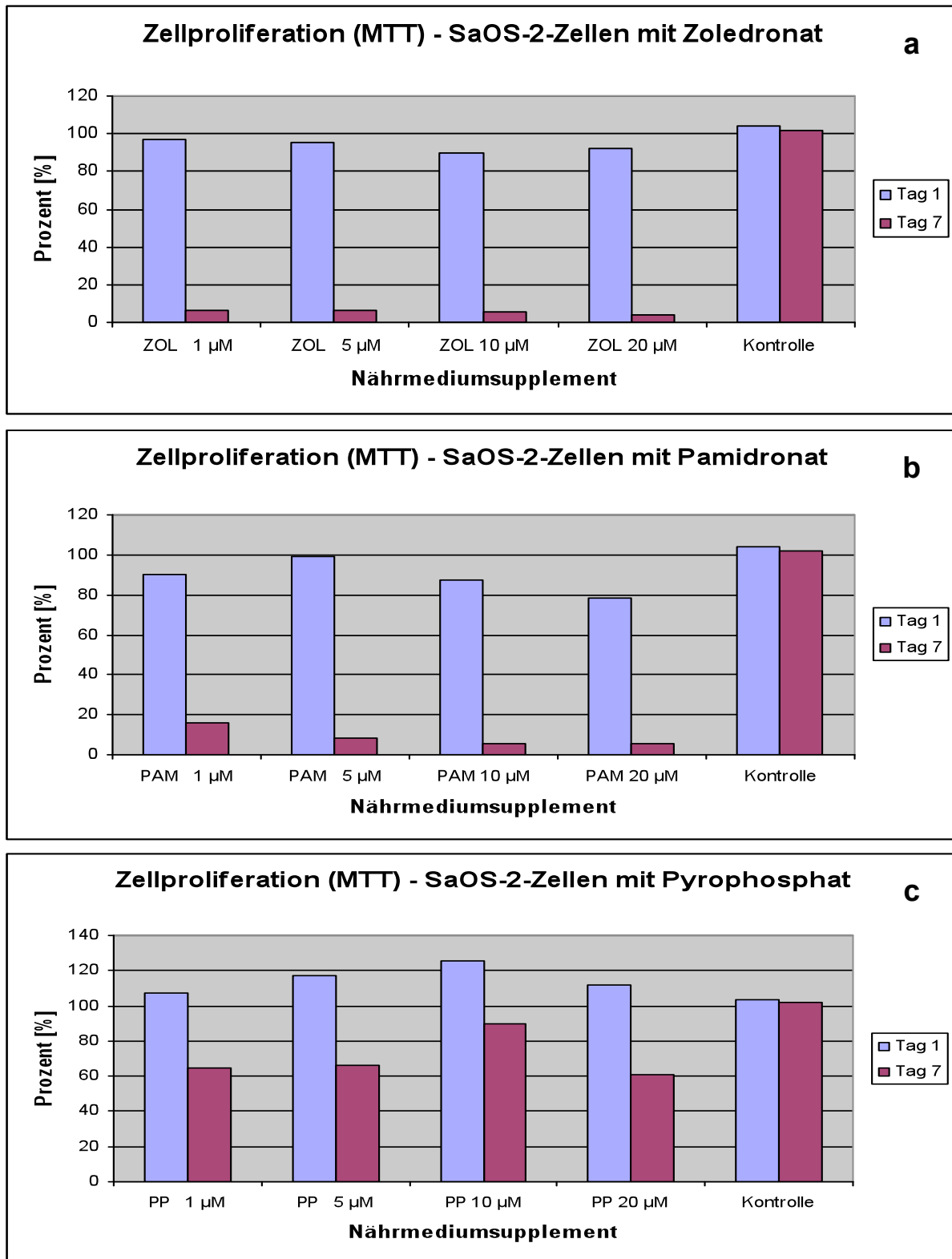


Abb. 5: Resultate der prozentualen Zellproliferation der SaOS-2-Zellen unter a) Zoledronat, b) Pamidronat und c) Pyrophosphat, Supplementation am Tag 1 und am Tag 7. a-c) ZOL, PAM und PP übten toxischen Einfluss auf die SaOS-2-Zellen aus. c) Eine Zellabnahme lässt sich eventuell dadurch erklären, dass zuerst ein deutlicher Zellzuwachs bestand. Mit diesem Zuwachs kam es zu einem gesteigerten Verbrauch des Nährmediums einschließlich des PP, wodurch sich die SaOS-2-Zellen nicht mehr ernähren konnten, was zum vermehrten Untergang der Zellen führte (ZOL 1 µM = Zoledronat 1 µM, ZOL 5 µM = Zoledronat 5 µM, ZOL 10 µM = Zoledronat 10 µM, ZOL 20 µM = Zoledronat 20 µM, PAM 1 µM = Pamidronat 1 µM, PAM 5 µM = Pamidronat 5 µM, PAM 10 µM = Pamidronat 10 µM, PAM 20 µM = Pamidronat 20 µM, PP 1 µM = Pyrophosphat 1 µM, PP 5 µM = Pyrophosphat 5 µM, PP 10 µM = Pyrophosphat 10 µM, PP 20 µM = Pyrophosphat 20 µM, K = Kontrolle)

3.2 Vierwöchige 6er-Well-Studie

Zu Beginn des vierwöchigen Experimentes auf den 6er Well-Platten wurden 5×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesetzt. Am 28. Tag wurde das Experiment beendet und es erfolgte eine abschließende Zellzählung. Währenddessen sind Nährmedium-überstände für weitere Analysen gesammelt und die Auswertung durchgeführt worden.

3.2.1 Zellzählung

Die Zellzahl wurde am Anfang (Tag 0) des Versuches auf 5×10^4 Zellen pro Probe definiert und nach Ansatz des Experimentes überprüft. Am Ende des Versuches (Tag 28) bestätigte die Zellzählung den Trend aus den zuvor gewonnenen Ergebnissen des einwöchigen MTT-Tests. Die Veränderungen der Zellzahl werden von Tag 0 zu Tag 28 derselben Probe angegeben, für den generellen Vergleich sind die Kontrollgruppen dokumentiert. Die Daten demonstrieren bei Fibroblasten, dass ZOL im Laufe der Studie in jeder gegebenen Konzentration toxisch (Reduktion von 60 bis 75 %) wirkt (Tab. 1). PAM weist ebenfalls eine toxische Wirkung auf, allerdings wird diese nicht in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ (70 % Zunahme) bestätigt. PP wirkte als positiver Faktor, da ein Zuwachs auf bis zu 346 % an Tag 28 verzeichnet werden konnte.

Tab. 1: Zellzählung der Fibroblasten mit jeweiligem Supplement am Anfang (Tag 0) und am Ende des Experimentes (Tag 28) sowie die Veränderung der Zellzahl in Prozent. PP zeichnet sich durch eine leichte Vermehrung der Zellen im Vergleich zur Kontrolle aus. ZOL und PAM demonstrieren einen Abfall der Zellzahl.

Zelltyp	Supplement	Tag 0	Tag 28	[%]
Fibroblasten	20 μM Pyrophosphat	5×10^4	16×10^4	320
Fibroblasten	10 μM Pyrophosphat	5×10^4	$22,3 \times 10^4$	446
Fibroblasten	5 μM Pyrophosphat	5×10^4	$15,8 \times 10^4$	316
Fibroblasten	1 μM Pyrophosphat	5×10^4	$16,5 \times 10^4$	330
Fibroblasten	Kontrolle	5×10^4	$16,5 \times 10^4$	330
Fibroblasten	20 μM Zoledronat	5×10^4	$1,63 \times 10^4$	32,6
Fibroblasten	10 μM Zoledronat	5×10^4	$1,75 \times 10^4$	35
Fibroblasten	5 μM Zoledronat	5×10^4	$1,25 \times 10^4$	25
Fibroblasten	1 μM Zoledronat	5×10^4	2×10^4	40
Fibroblasten	Kontrolle	5×10^4	$15,5 \times 10^4$	310
Fibroblasten	20 μM Pamidronat	5×10^4	$0,625 \times 10^4$	12,5
Fibroblasten	10 μM Pamidronat	5×10^4	1×10^4	20
Fibroblasten	5 μM Pamidronat	5×10^4	$1,125 \times 10^4$	22,5
Fibroblasten	1 μM Pamidronat	5×10^4	$8,5 \times 10^4$	170
Fibroblasten	Kontrolle	5×10^4	$15,5 \times 10^4$	310

Ebenfalls positiv auf das Zellwachstum wirkte PP in den vier Konzentrationen auf Osteoblasten (Zuwachs zwischen 303 und 555 %). Die Steigerung unter PP war im Durchschnitt höher als in der Kontrollgruppe. ZOL demonstrierte erneut eine Senkung der Zellzahl auf 13,5 %. PAM wirkte abermals in den Konzentrationen von 20 und 10 μM mit einem starken Zellrückgang (Reduktion um bis 83 %) (Tab. 2).

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der Zellzählung der Osteoblasten mit jeweiligem Supplement am Anfang (Tag 0) und am Ende des Experimentes (Tag 28) sowie die Veränderung der Zellzahl in Prozent. PP wirkte deutlich positiver auf das Zellwachstum der Osteoblasten als auf das der Fibroblasten. ZOL und PAM markieren Zellabnahmen, mit der Ausnahme bei einer PAM-Konzentration von 1 und 5 μM .

Zelltyp	Supplement	Tag 0	Tag 28	[%]
Osteoblasten	20 μM Pyrophosphat	5×10^4	$27,3 \times 10^4$	546
Osteoblasten	10 μM Pyrophosphat	5×10^4	$32,75 \times 10^4$	655
Osteoblasten	5 μM Pyrophosphat	5×10^4	$20,16 \times 10^4$	403,2
Osteoblasten	1 μM Pyrophosphat	5×10^4	$25,5 \times 10^4$	510
Osteoblasten	Kontrolle	5×10^4	$30,3 \times 10^4$	606
Osteoblasten	20 μM Zoledronat	5×10^4	$2,125 \times 10^4$	42,5
Osteoblasten	10 μM Zoledronat	5×10^4	$0,875 \times 10^4$	17,5
Osteoblasten	5 μM Zoledronat	5×10^4	$1,875 \times 10^4$	37,5
Osteoblasten	1 μM Zoledronat	5×10^4	$0,875 \times 10^4$	17,5
Osteoblasten	Kontrolle	5×10^4	$24,5 \times 10^4$	490
Osteoblasten	20 μM Pamidronat	5×10^4	$0,875 \times 10^4$	17,5
Osteoblasten	10 μM Pamidronat	5×10^4	$3,625 \times 10^4$	72,5
Osteoblasten	5 μM Pamidronat	5×10^4	$9,375 \times 10^4$	187,5
Osteoblasten	1 μM Pamidronat	5×10^4	$10,125 \times 10^4$	202,5
Osteoblasten	Kontrolle	5×10^4	$24,5 \times 10^4$	490

Unter PP kam es zu einem enormen Zuwachs bei den SaOS-2-Zellen (bis zu 3760 %). ZOL bewirkte eine Abnahme von 58 bis 80 % auf die Zellen. Mit PAM wurde ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum bei Konzentrationen von 20 und 10 μM demonstriert, allerdings wurde bei einer Konzentration von 5 und 1 μM eine leichte Vermehrung der Zellen (196 und 330 %) dokumentiert, jedoch bleibt diese Vermehrung deutlich unter der Kontrolle (bis zu 2260 %) (Tab. 3).

Tab. 3: Ergebnisse der Zellzählung der SaOS-2-Zellen mit jeweiligem Supplement am Anfang (Tag 0) und am Ende des Experimentes (Tag 28) sowie die Veränderung der Zellzahl in Prozent. PP wirkte positiv auf das Zellwachstum und übertraf die Kontrollgruppe. PAM in einer Konzentration von 5 und 1 μM dokumentierte einen positiven Einfluss auf die Zellzunahme, lag jedoch unter der Kontrolle. In den restlichen Konzentrationen von PAM und ZOL wurde eine Reduktion der Zellzahl registriert.

<u>Zelltyp</u>	<u>Supplement</u>	<u>Tag 0</u>	<u>Tag 28</u>	<u>[%]</u>
SaOS-2 Zellen	20 μM Pyrophosphat	5×10^4	152×10^4	3040
SaOS-2 Zellen	10 μM Pyrophosphat	5×10^4	156×10^4	3120
SaOS-2 Zellen	5 μM Pyrophosphat	5×10^4	176×10^4	3520
SaOS-2 Zellen	1 μM Pyrophosphat	5×10^4	193×10^4	3860
SaOS-2 Zellen	Kontrolle	5×10^4	113×10^4	2260
SaOS-2 Zellen	20 μM Zoledronat	5×10^4	$1,5 \times 10^4$	30
SaOS-2 Zellen	10 μM Zoledronat	5×10^4	1×10^4	20
SaOS-2 Zellen	5 μM Zoledronat	5×10^4	1×10^4	20
SaOS-2 Zellen	1 μM Zoledronat	5×10^4	$2,12 \times 10^4$	42,4
SaOS-2 Zellen	Kontrolle	5×10^4	118×10^4	2360
SaOS-2 Zellen	20 μM Pamidronat	5×10^4	$1,25 \times 10^4$	25
SaOS-2 Zellen	10 μM Pamidronat	5×10^4	1×10^4	20
SaOS-2 Zellen	5 μM Pamidronat	5×10^4	$14,8 \times 10^4$	296
SaOS-2 Zellen	1 μM Pamidronat	5×10^4	$21,5 \times 10^4$	430
SaOS-2 Zellen	Kontrolle	5×10^4	118×10^4	2360

3.2.2 Digitale Dokumentation in der Zellkultur

Fortlaufend während der Studie wurden die Zellkulturen in Form von bildlichen Darstellungen dokumentiert. Diese bestätigen die Zählungen der Zellen. Fibroblasten weisen deutlich eine Abnahme unter ZOL (Abb. 6) und unter PAM, mit Ausnahme der Supplementation unter 1 μM , (Abb. 7) auf. PP dokumentiert eine dichte Zellzahl bei Fibroblasten (Abb. 8). Wie schon zuvor wirkt ZOL auch toxisch auf die Osteoblasten (Abb. 9) und unter PAM-Supplementation wird auch eine verschwindend geringe Zellmenge beobachtet, mit der Ausnahme einer Konzentration von 1 und 5 μM (Abb. 10). Grenzwertig ist die Wirkung der 10- μM -PAM-Supplementation auf Osteoblasten zu werten (Abb. 10c). Osteoblasten mit PP als Zusatz im Nährmedium demonstrieren ein sehr dichtes Zellfeld (Abb. 11). SaOS-2-Zellen unter ZOL-Supplementation werden sehr stark in ihren sichtbaren Zellen verringert (Abb. 12). Bei PAM sind Unterschiede in der Wirkung zu sehen, die höchste Konzentration (20 μM) reduziert die SaOS-2-Zellen deutlich, ganz im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen (Abb. 13). Eine überdurchschnittlich hohe Zelldichte wird bei den SaOS-2-Zellen unter PP-Zusatz digital dokumentiert (Abb. 14). Die Kontrollen machen die Relationen zur Zelldichteab- oder -zunahme zu den Proben deutlich (Abb. 15). Zusätzlich zu den Zelldichteänderungen, welche in

den Abbildungen 6–14 dokumentiert sind, wurden morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet. Diese morphologischen Zellveränderungen sind nur aus dem Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 15) ersichtlich, besonders stark verändernd wirken ZOL und PAM auf die Morphologie.

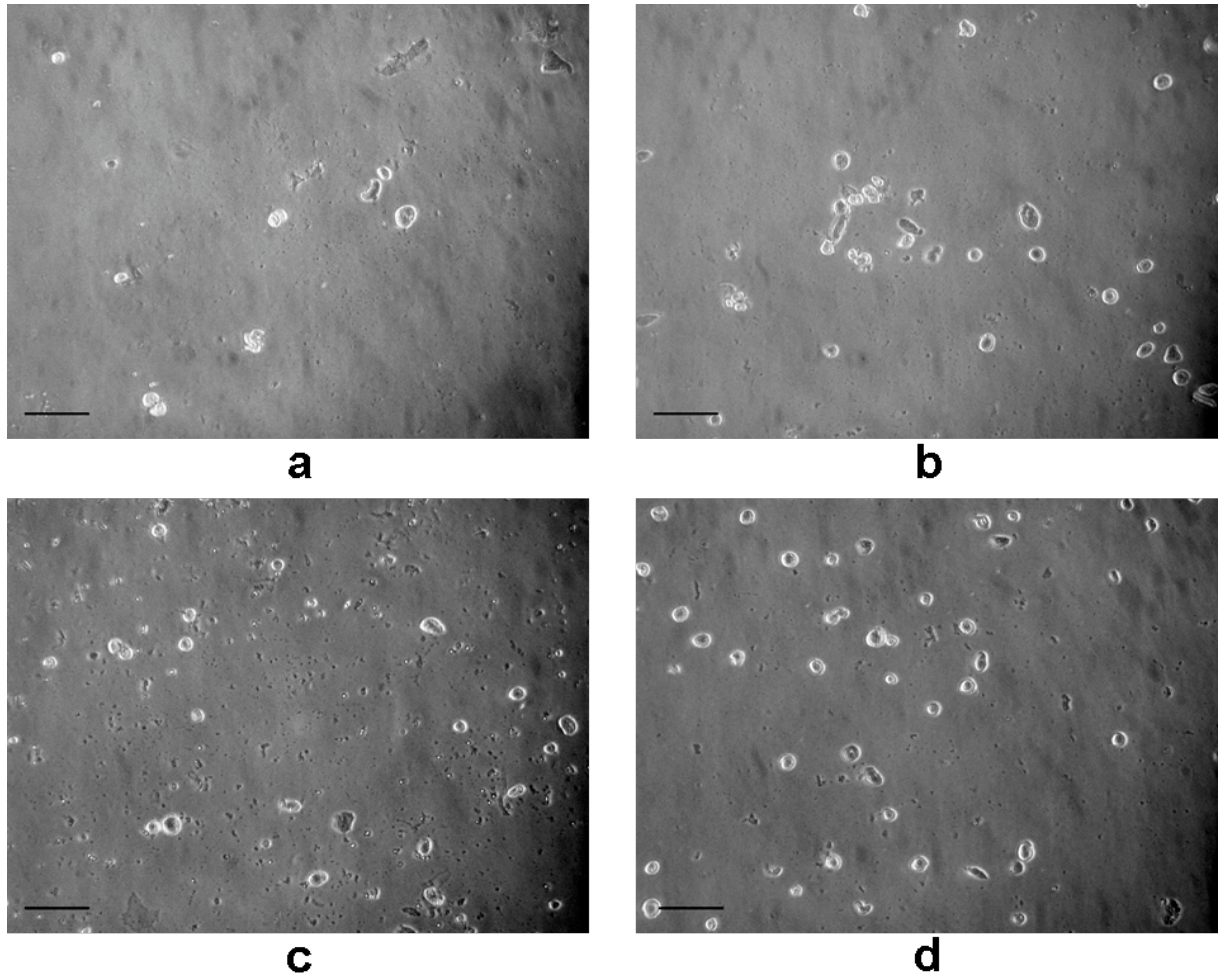


Abb. 6: Digitale Aufnahmen von Fibroblasten unter Zoledronat am 28. Tag. Eine niedrige Anzahl von abgerundeten Zellen kann unter dem Einfluss von ZOL dargestellt werden und verdeutlicht den toxischen Einfluss. a) Zoledronat 20 μM , b) Zoledronat 10 μM , c) Zoledronat 5 μM , d) Zoledronat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

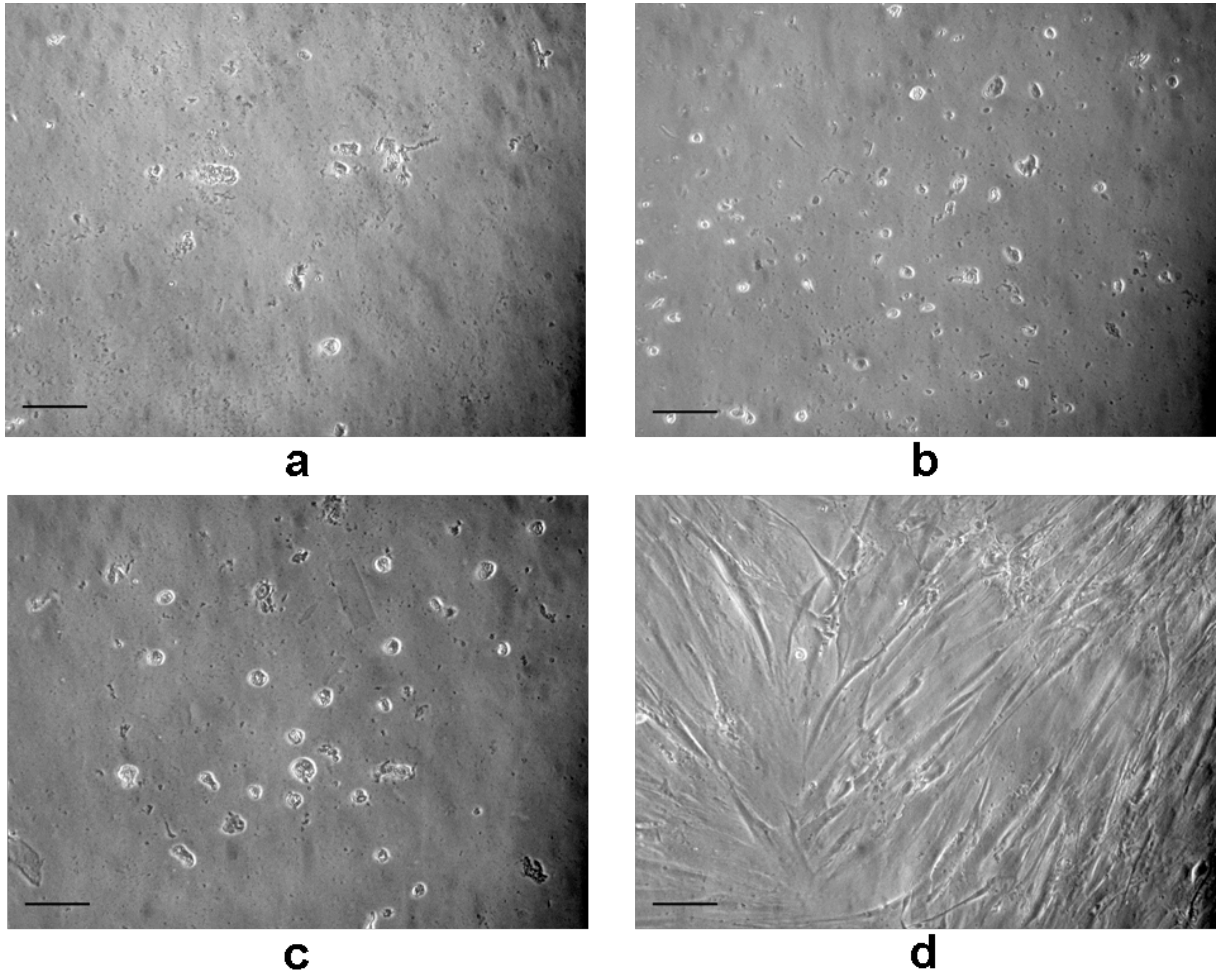


Abb. 7: Digitale Zustandsaufnahmen von Fibroblasten am Tag 28 unter Pamidronat. Die Konzentrationen von Pamidronat von 20, 10 und 5 μM wirken toxisch auf die Fibroblastenkulturen. Nur in d) wird eine Zellverdichtung aufgezeichnet. a) Pamidronat 20 μM , b) Pamidronat 10 μM , c) Pamidronat 5 μM , d) Pamidronat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

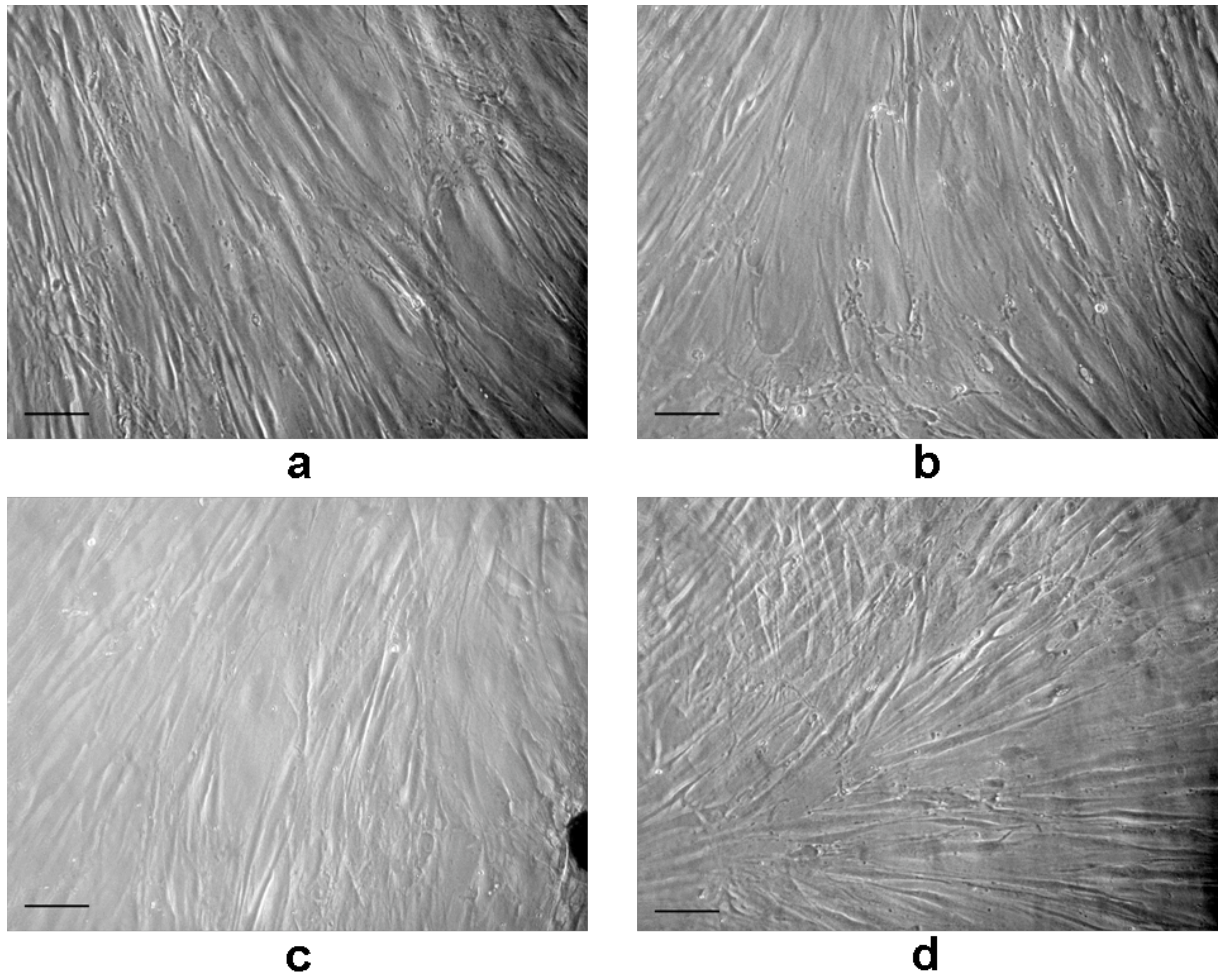


Abb. 8: Digitale Aufnahmen von Fibroblasten am Tag 28 mit Pyrophosphat-Substitution. Bei allen Proben wird eine deutliche Zunahme der Zellzahl in typischer fischzugartiger Zellform dargestellt. a) Pyrophosphat 20 μM , b) Pyrophosphat 10 μM , c) Pyrophosphat 5 μM , d) Pyrophosphat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

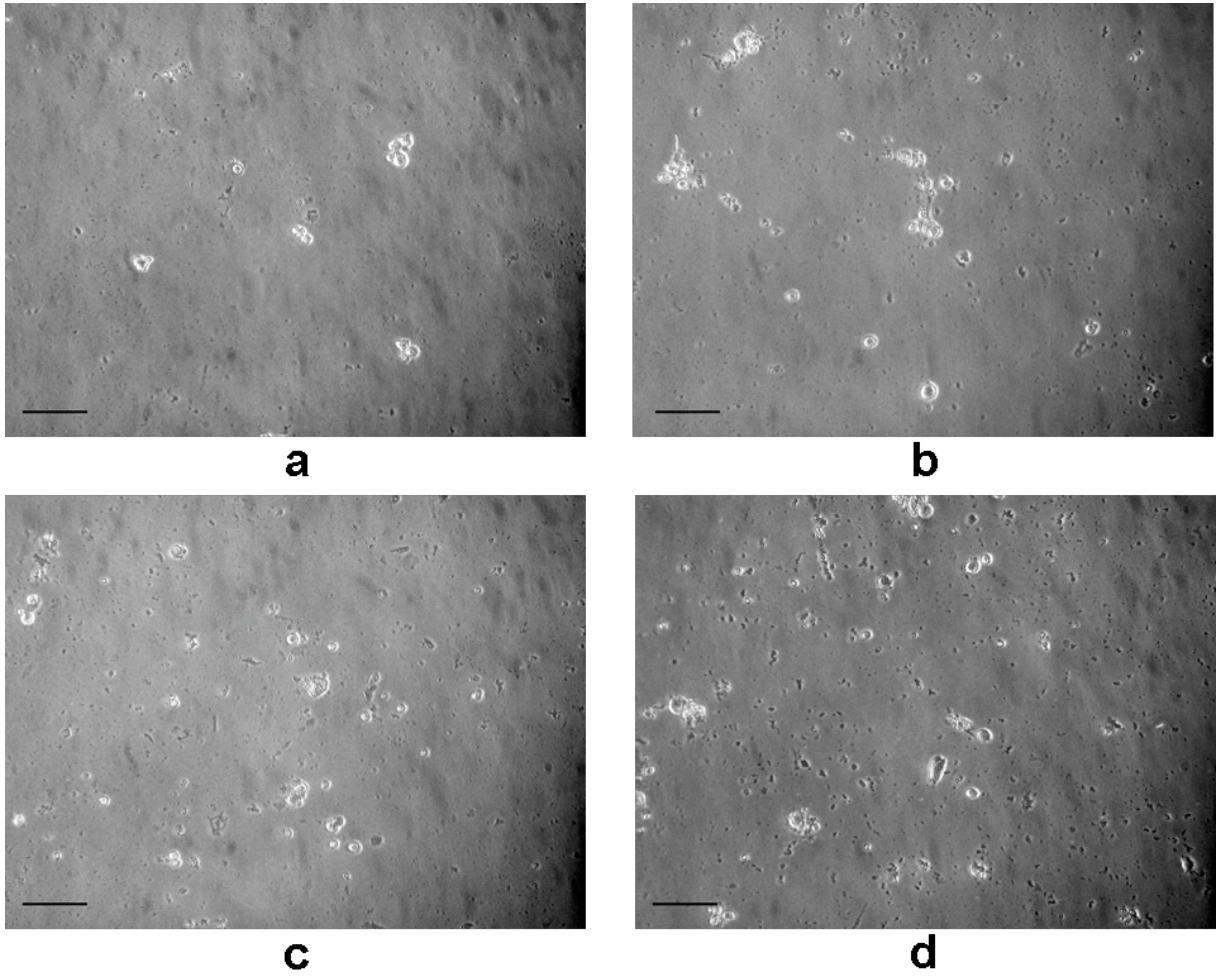


Abb. 9: Verteilung von Osteoblasten unter Zoledronat am 28. Tag. ZOL wirkte toxisch auf die Zellen, weshalb nur wenige Zellen in allen vier Konzentrationen digital darstellbar sind. a) Zoledronat 20 μM , b) Zoledronat 10 μM , c) Zoledronat 5 μM , d) Zoledronat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

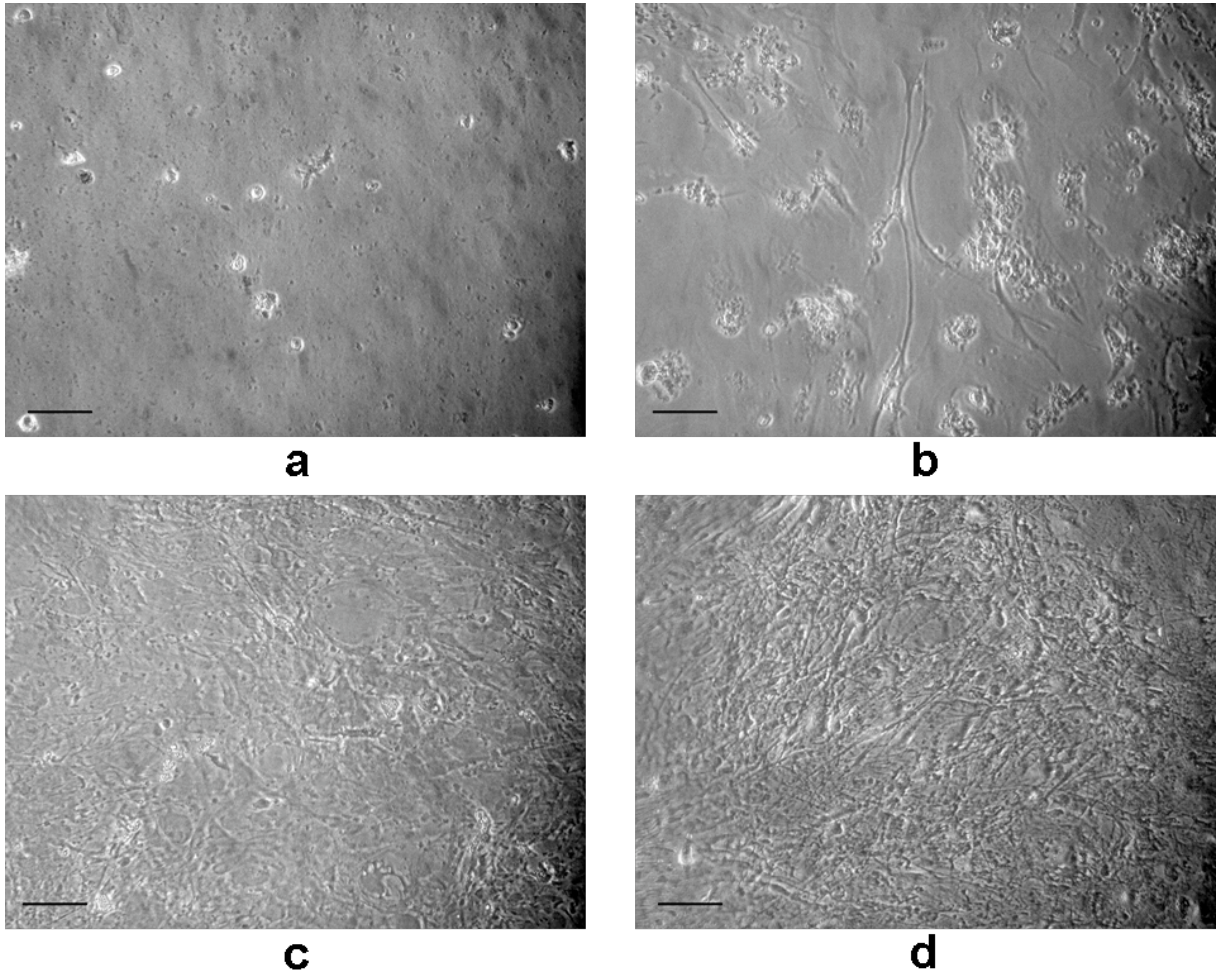


Abb. 10: Digitale Zustandsaufnahmen von Osteoblasten am 28. Tag mit Pamidronat. Eine unterschiedliche Konzentration an Pamidronat wirkt sich unterschiedlich aus. Die toxische Wirkung dokumentiert nur wenige Zellen in a) Pamidronat 20 μM , es wird eine leichte Zunahme der Zellen dargestellt, b) Pamidronat 10 μM , eine deutliche Mengenzunahme von Osteoblasten ist nachweisbar in c) Pamidronat 5 μM und in d) Pamidronat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

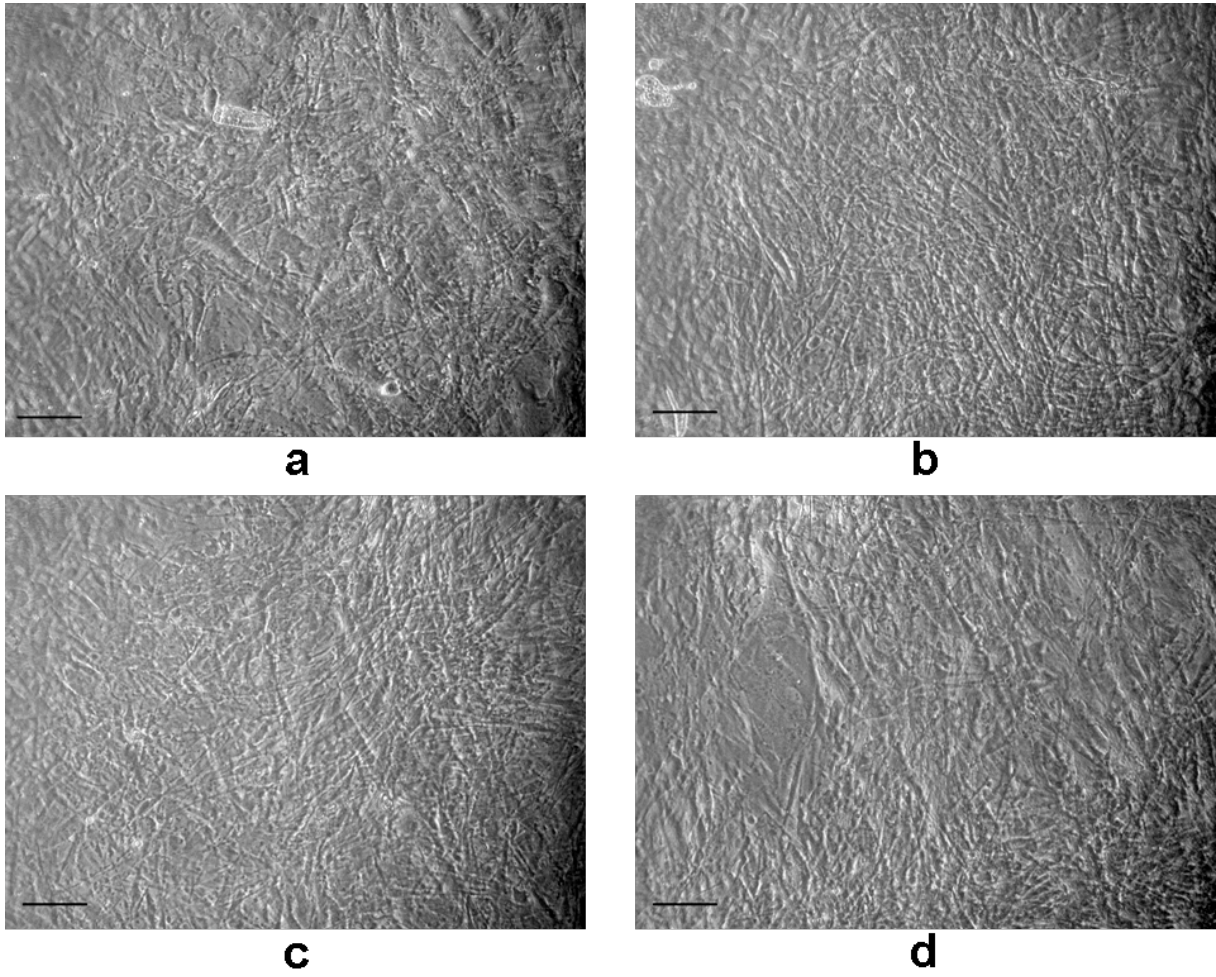


Abb. 11: Verteilung von Osteoblasten am Tag 28 mit Pyrophosphat-Substitution. Bei allen Proben konnte eine deutliche Vermehrung der Zellzahl dargestellt werden. a) Pyrophosphat 20 μM , b) Pyrophosphat 10 μM , c) Pyrophosphat 5 μM , d) Pyrophosphat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

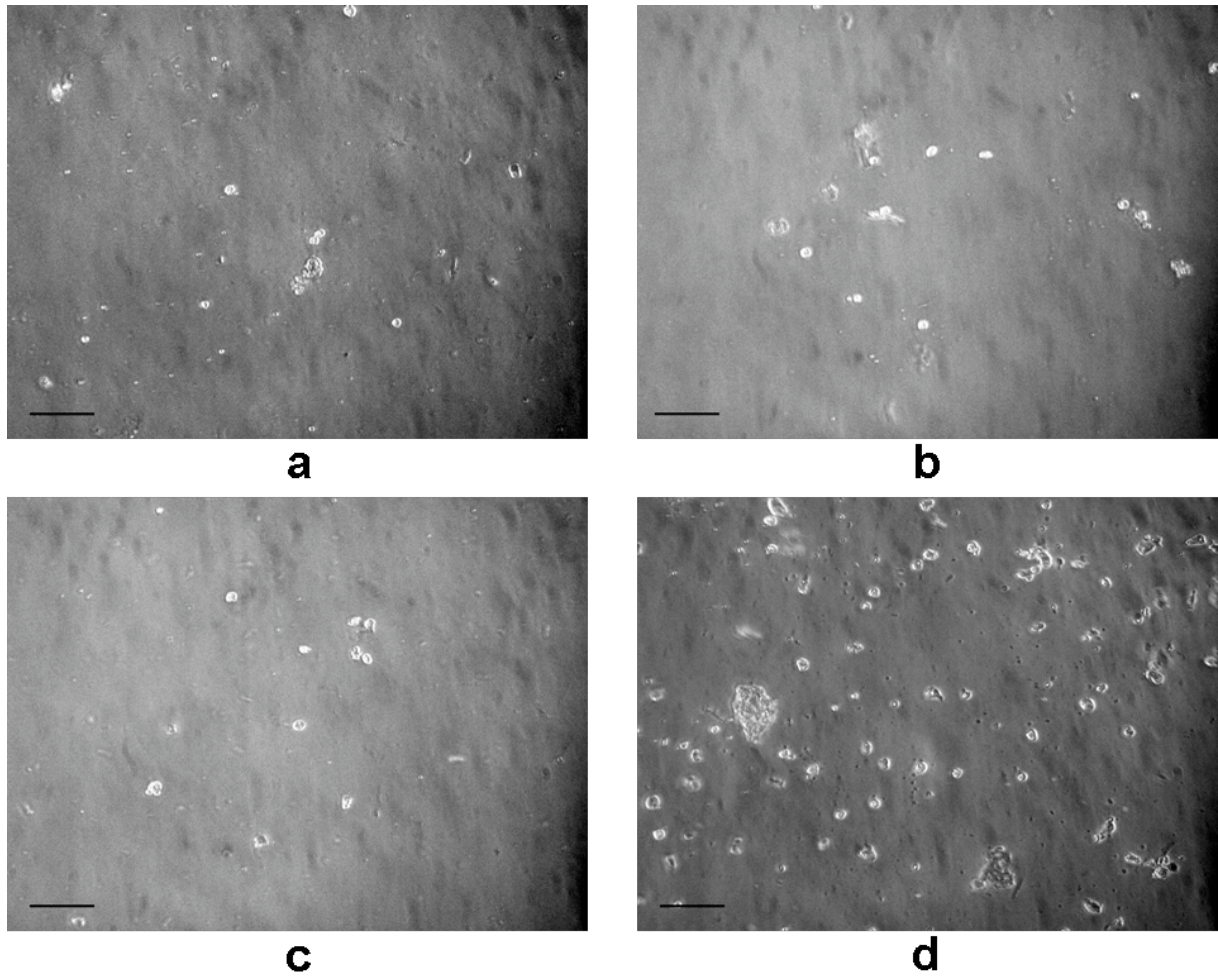


Abb. 12: Digitale Erfassung von SaOS-2-Zellen unter Zoledronat am 28. Tag. Eine verschwindend geringe Anzahl von Zellen konnte bildlich dargestellt werden, schlussfolgernd war der Einfluss von ZOL sehr toxisch. a) Zoledronat 20 μM , b) Zoledronat 10 μM , c) Zoledronat 5 μM , d) Zoledronat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

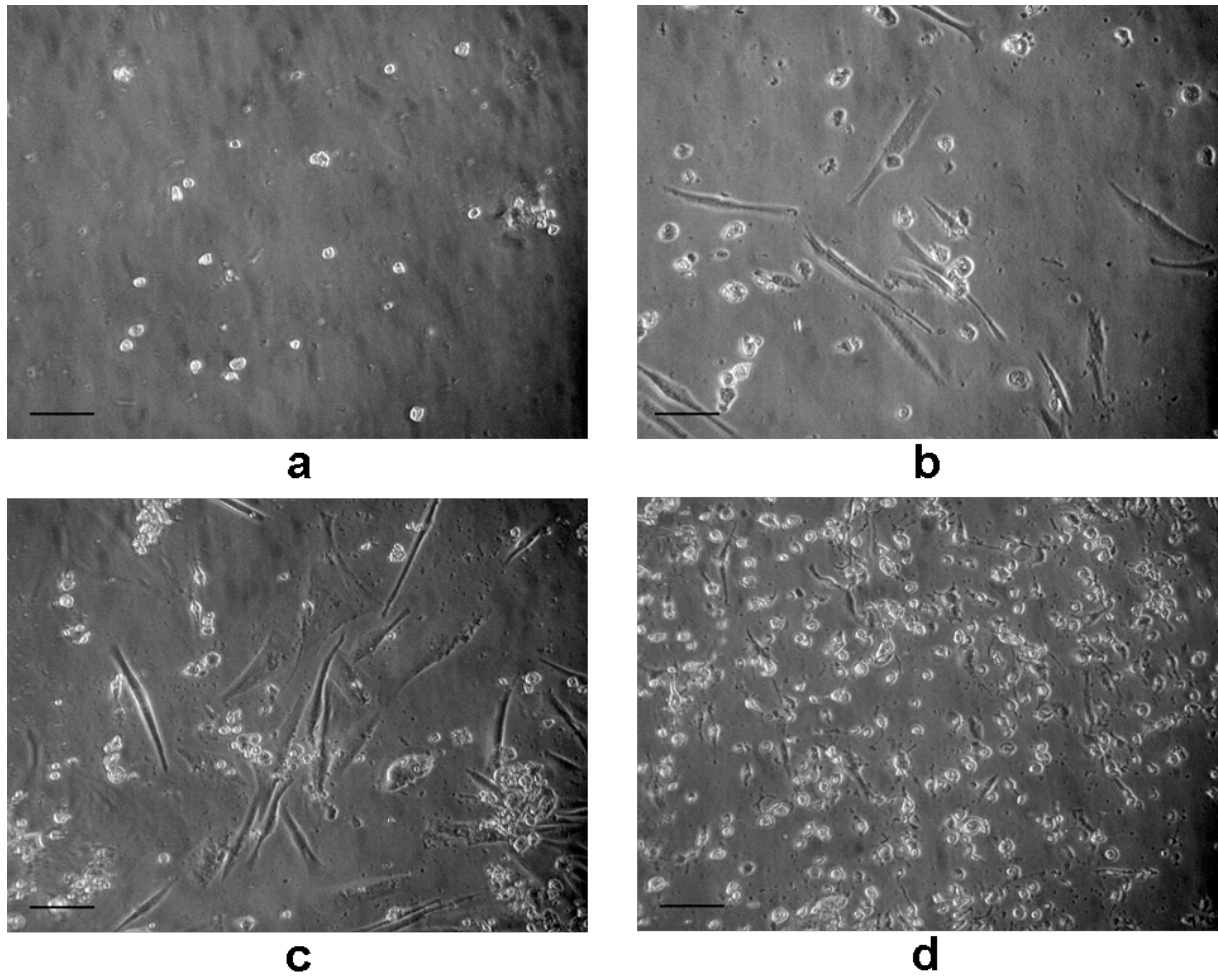


Abb. 13: Verteilung von SaOS-2-Zellen am Tag 28 unter Pamidronat. Die Konzentrationen von Pamidronat von 20 μM wirkte stark toxisch auf die Fibroblastenkulturen. In b) wurde eine Anzahl von Zellen dokumentiert, welche weiterhin in c) und besonders in d) angestiegen ist. a) Pamidronat 20 μM , b) Pamidronat 10 μM , c) Pamidronat 5 μM , d) Pamidronat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

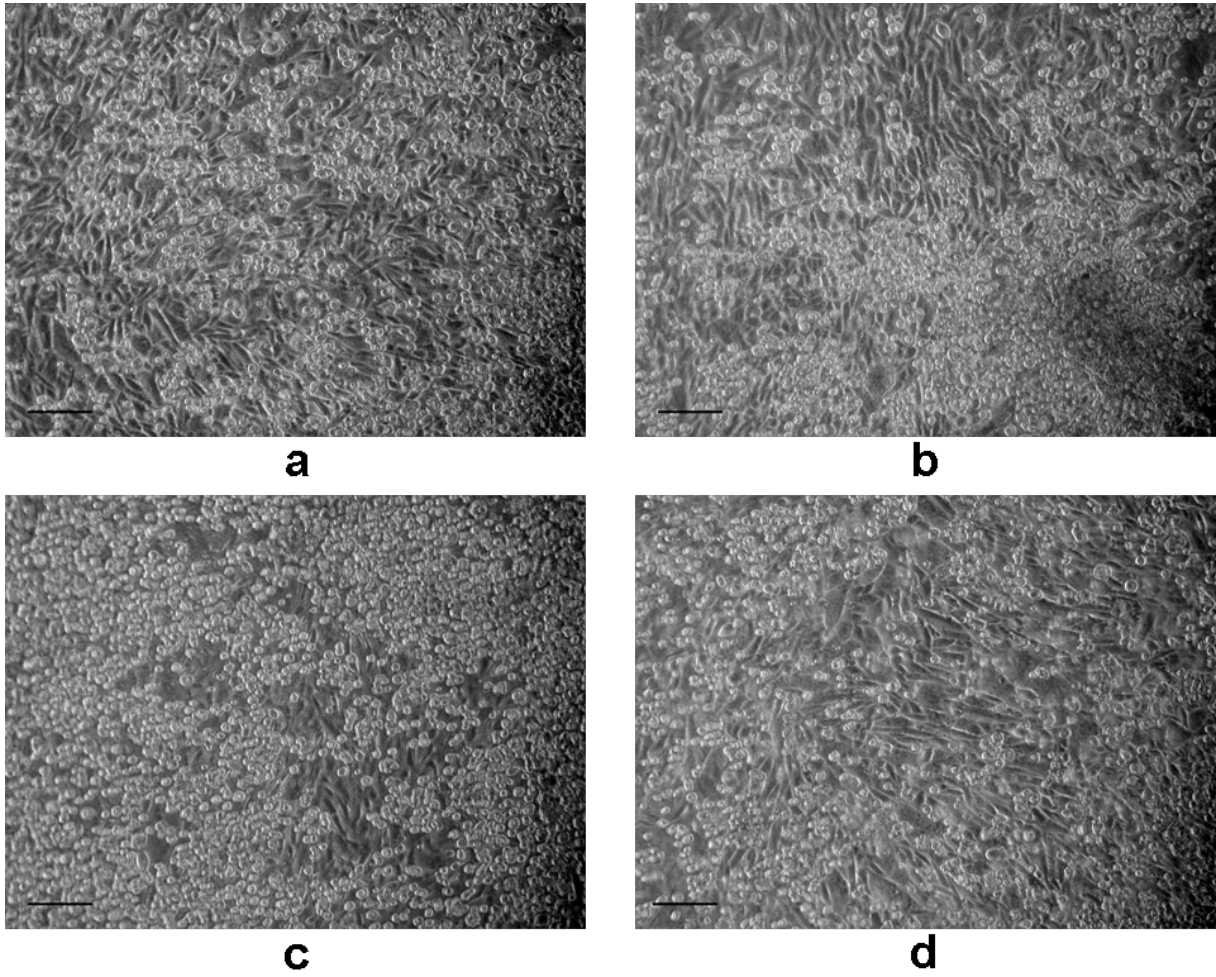


Abb. 14: Digitale Aufnahmen von SaOS-2-Zellen am Tag 28 mit Pyrophosphat-Substitution. Ein starkes Zellwachstum konnte in allen Konzentrationen digital festgehalten werden. Sichtbar ist ein Rasen angehefteter SaOS-2-Zellen unter den vielen freien SaOS-2-Zellen. a) Pyrophosphat 20 μM , b) Pyrophosphat 10 μM , c) Pyrophosphat 5 μM , d) Pyrophosphat 1 μM , Maßstab: Balken = 100 μm .

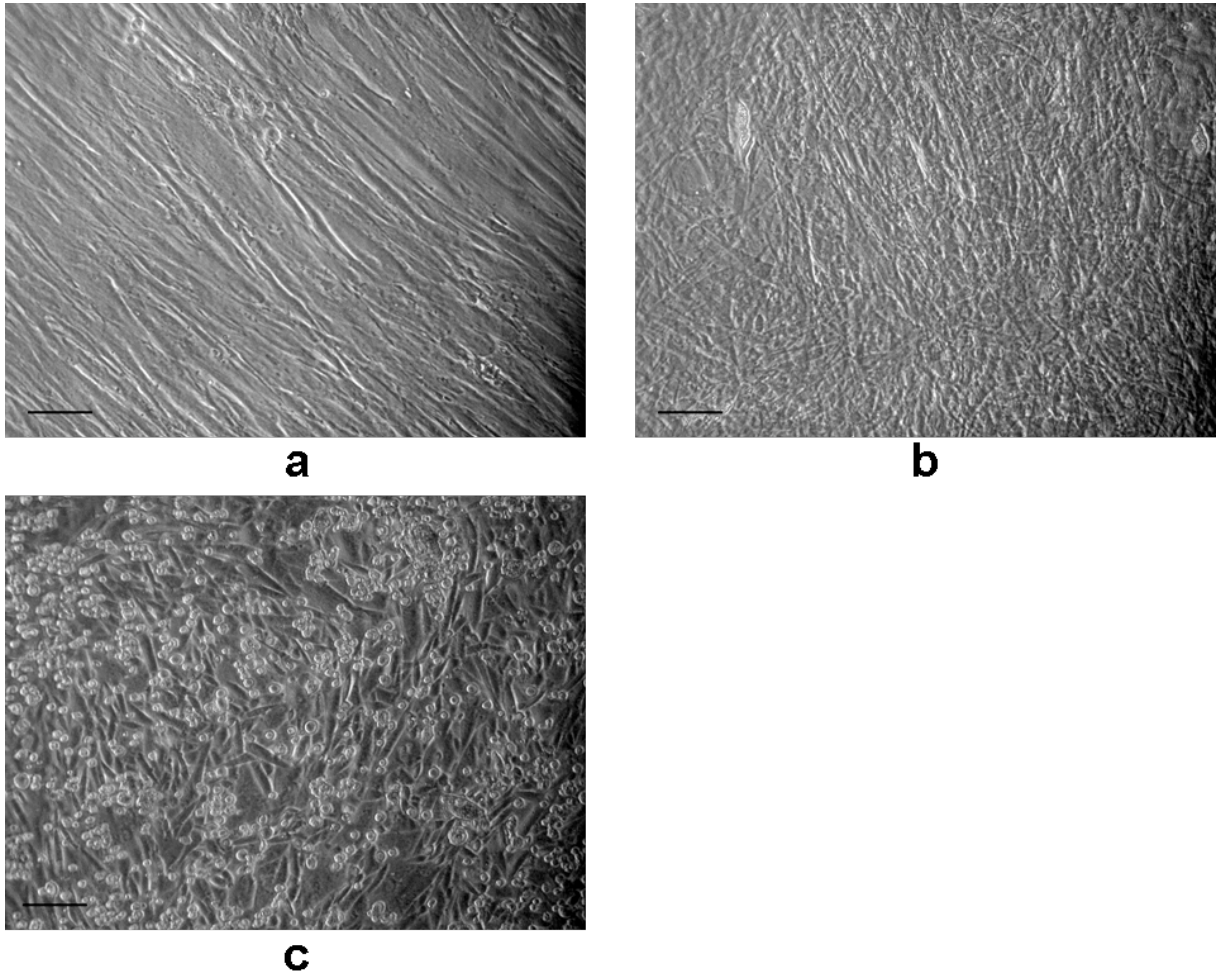


Abb. 15: Digitale Zustandsaufnahmen am Tag 28 von den Kontrollen (nur Nährmedium, kein Zusatz) der 6er-Well-Studie. a) Fibroblasten, b) Osteoblasten, c) SaOS-2-Zellen. Ein deutlich dichteres Zellbild und morphologische Unterschiede sind zu den Proben sichtbar, Maßstab: Balken = 100 μm .

3.2.3 Kollagenbestimmung mittels ELISA

Mit Hilfe des ELISA-Tests wurde die Syntheserate des Kollagen Types I bestimmt. Anhand der ermittelten Ergebnisse, welche aus den wöchentlich gewonnenen Proben stammen, konnte dokumentiert werden, dass weiterhin eine Kollagenproduktion stattfand.

Die Ergebnisse der Kollagenbestimmungen bei Fibroblasten belegen deutlich die negative Einflussnahme von ZOL in den vier gewählten Konzentrationen im Vergleich von Woche 1 zu Woche 4 (Abnahme um 18 bis 26 %) und unter dem Einfluss von PAM bei 20 und 10 μM (Reduktion von 22 bis zu 24 %). Der Vergleich des Einflusses von ZOL und PAM nach der vierten Woche mit der Kontrolle belegt gleichermaßen eine Abnahme um 75 % bei allen Konzentrationen, bis auf PAM bei einer Konzentration von 1 μM mit einer Verminderung um nur 59 %. PP wirkt

positiver als die beiden Bisphosphonate, allerdings sind die Proben vergleichend zur Kontrolle immer noch um 45 % geringer (Abb. 16).

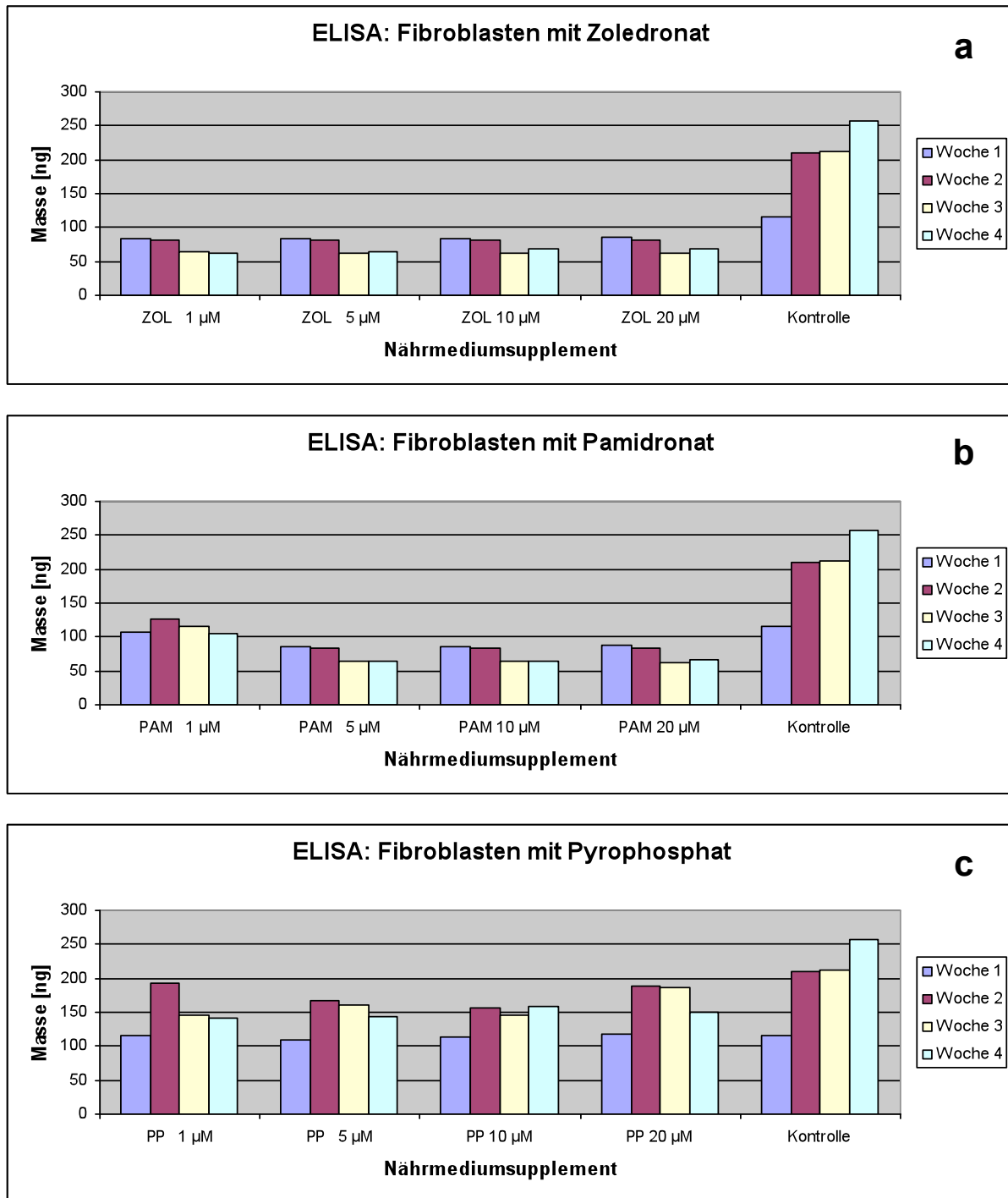


Abb. 16: Darstellung der wöchentlichen ELISA der Fibroblasten unter a) Zoledronat-, b) Pamidronat- und c) Pyrophosphat-Supplementation. Bei allen Supplementationsproben wurde eine geringere Kollagenmenge als in der Kontrolle nachwiesen. (ZOL 1 μM = Zoledronat 1 μM , ZOL 5 μM = Zoledronat 5 μM , ZOL 10 μM = Zoledronat 10 μM , ZOL 20 μM = Zoledronat 20 μM , PAM 1 μM = Pamidronat 1 μM , PAM 5 μM = Pamidronat 5 μM , PAM 10 μM = Pamidronat 10 μM , PAM 20 μM = Pamidronat 20 μM , PP 1 μM = Pyrophosphat 1 μM , PP 5 μM = Pyrophosphat 5 μM , PP 10 μM = Pyrophosphat 10 μM , PP 20 μM = Pyrophosphat 20 μM , K = Kontrolle)

Osteoblasten wurden vom PP nicht sichtlich positiv in der Proteinproduktion beeinflusst, da sich die Proteinmenge nach vier Wochen annähernd äquivalent zur Kontrolle verhält (95 %). Unter dem Einfluss von ZOL wurde proportional zur Zellmenge eine gleichbleibend geringe und leicht abnehmende Konzentration von Proteinen über die Zeit von vier Wochen produziert (Abnahme innerhalb von vier Wochen zwischen 4 und 11 %, im Vergleich zur Kontrolle handelt es sich um eine Reduktion von 88 %). Wie schon zuvor aufgezeigt wurde, ist unter PAM-Supplementation eine leichte und nur kurzzeitige Zunahme der Proteinerzeugung innerhalb von vier Wochen in den Konzentrationen von 5 und 1 μM nachgewiesen worden. Jedoch wurde insgesamt eine starke Abnahme nach vier Wochen dokumentiert (Abb. 17).

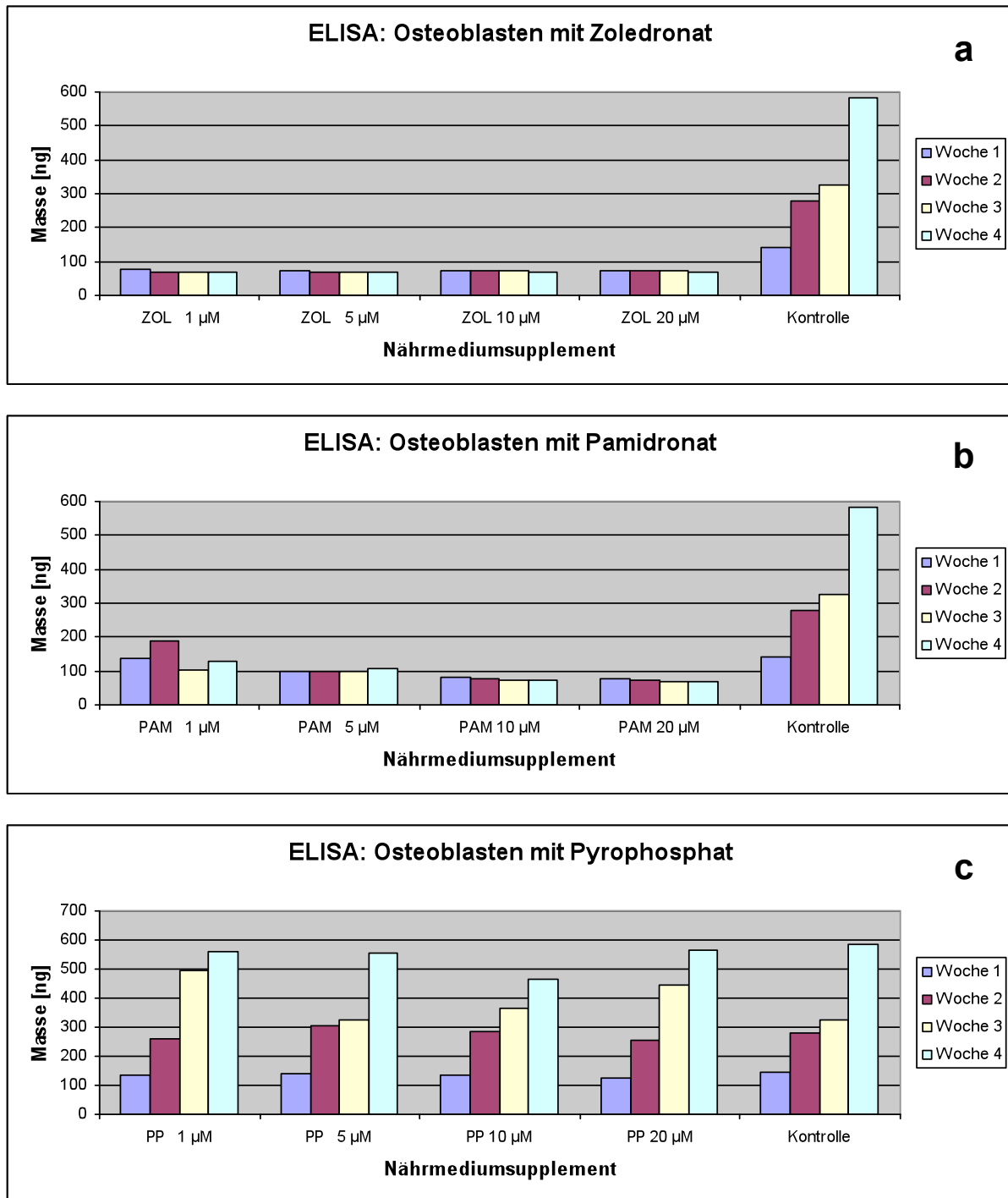


Abb. 17: Diagramme der wöchentlichen ELISA der Osteoblasten unter a) Zoledronat-, b) Pamidronat- und c) Pyrophosphat-Supplementation. ZOL und PAM wirken hemmend auf die Kollagenproduktion, im Gegensatz dazu wird unter PP ein Gewinn in der Kollagenproduktion verzeichnet. (ZOL 1 µM = Zoledronat 1 µM, ZOL 5 µM = Zoledronat 5 µM, ZOL 10 µM = Zoledronat 10 µM, ZOL 20 µM = Zoledronat 20 µM, PAM 1 µM = Pamidronat 1 µM, PAM 5 µM = Pamidronat 5 µM, PAM 10 µM = Pamidronat 10 µM, PAM 20 µM = Pamidronat 20 µM, PP 1 µM = Pyrophosphat 1 µM, PP 5 µM = Pyrophosphat 5 µM, PP 10 µM = Pyrophosphat 10 µM, PP 20 µM = Pyrophosphat 20 µM, K = Kontrolle)

Bei den SaOS-2-Zellen mit beiden Bisphosphonaten in allen der vier gewählten Konzentrationen wurde in den ersten beiden Wochen eine verminderte Kollagenmenge detektiert, welche trotz Zellzahlrückgang in der dritten Woche vergleichend zur zweiten Woche in den Proben angestiegen ist (bei ZOL 20 μ M um 204 %, bei PAM 20 μ M um 288 %) (Abb. 18a, b). Insgesamt ist im Vergleich zu den Kontrollen ein verringerter Kollagengehalt zur Beendigung des Experimentes nach vier Wochen gemessen worden (41 bis 50 %). SaOS-2-Zellen demonstrierten unter PP eine Steigerung um bis zu 27 % in der Kollagenproduktion gegenüber der Kontrolle (Abb. 18c). Diese Zunahme steht im Einklang mit der Zellvermehrung.

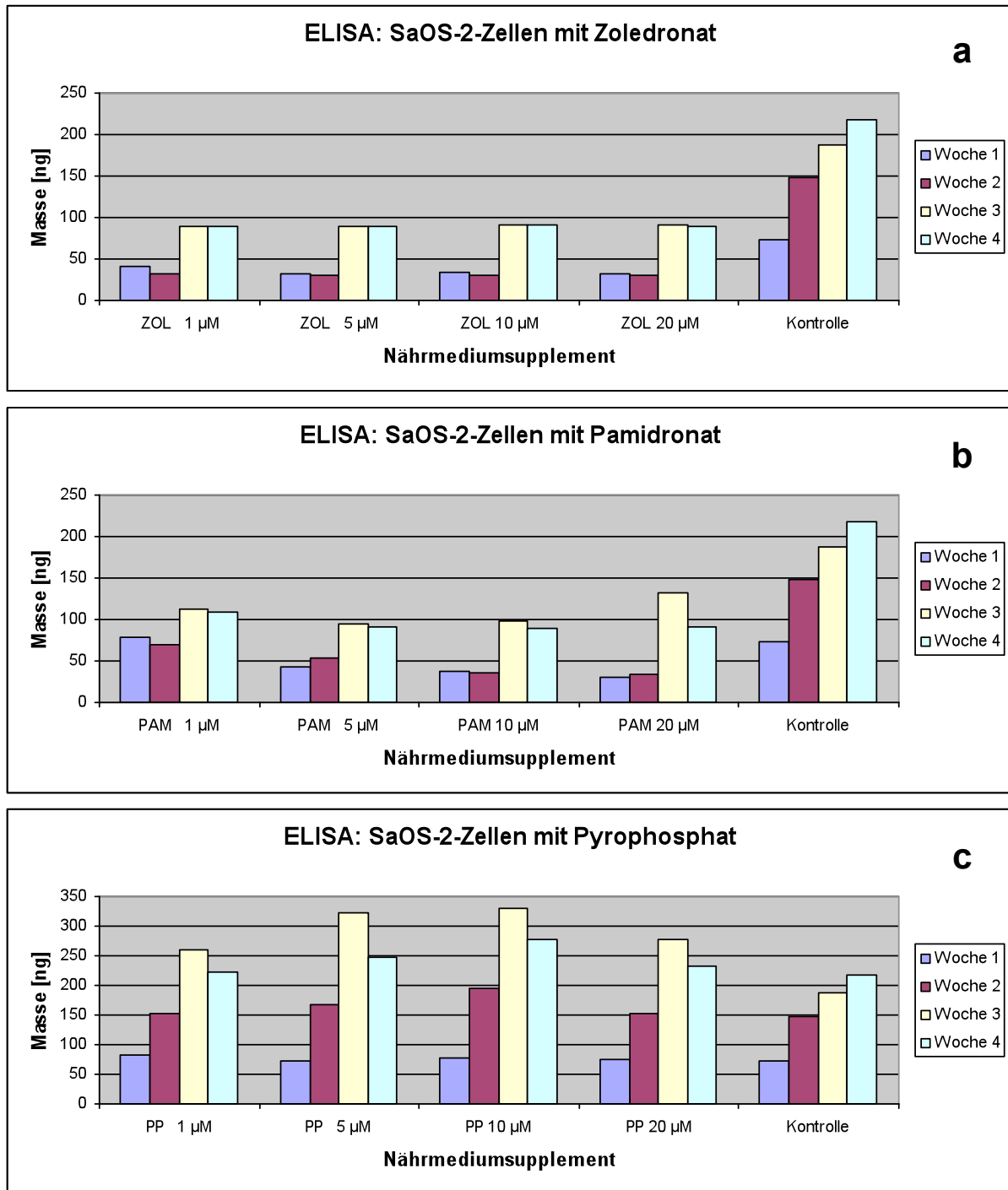


Abb. 18: Diagrammillustrationen der wöchentlichen ELISA der SaOS-2-Zellen unter a) Zoledronat, b) Pamidronat und c) Pyrophosphat-Supplementation. a) ZOL und b) PAM veranschaulichen eine Verminderung in der Kollagenproduktion. Eine Ausnahme bildet die dritte Woche, in welcher die Kollagenproduktion leicht steigt. c) Ein Anstieg der Kollagenprodukte konnte unter PP dokumentiert werden. (ZOL 1 µM = Zoledronat 1 µM, ZOL 5 µM = Zoledronat 5 µM, ZOL 10 µM = Zoledronat 10 µM, ZOL 20 µM = Zoledronat 20 µM, PAM 1 µM = Pamidronat 1 µM, PAM 5 µM = Pamidronat 5 µM, PAM 10 µM = Pamidronat 10 µM, PAM 20 µM = Pamidronat 20 µM, PP 1 µM = Pyrophosphat 1 µM, PP 5 µM = Pyrophosphat 5 µM, PP 10 µM = Pyrophosphat 10 µM, PP 20 µM = Pyrophosphat 20 µM, K = Kontrolle)

3.2.4 HPLC-Analyse und Hyp-Bestimmung

Die HPLC-Untersuchung diente der biochemischen Analyse der extrazellulären Matrix (ECM). Die Proben wurden zum Nachweis der Knochen-Kollagen-Typ-I-spezifischen Quervernetzungsbestandteile (Crosslinks) Hydroxylsilylpyridinolin (HP) und Lsilylpyridinolin (LP) analysiert. Die fotometrische Bestimmung von Hydroxyprolin (Hyp) ist die Erfassung von der gesamten Kollagensynthese. Es konnte demonstriert werden, dass es zu einer Reduktion der Crosslinks kam, insbesondere unter dem Einfluss von ZOL. Die charakteristischen Peaks der Quervernetzungsbestandteile HP und LP unterscheiden sich in den einzelnen Abbildungen deutlich in ihrer Größe, wie anhand der mV-Werte an der x-Achse abzulesen ist. Die Fläche der Peaks entspricht der Menge der detektierten Substanzen, wodurch sich die Mengen der detektierten Komponenten errechnen lassen. Die Fibroblasten reagierten unter ZOL und PAM mit einer starken Reduktion der Crosslinks, selbst bei geringster PAM-Konzentration (1 µM) wurde nur eine geringe Menge von HP (74,421 pmol/ml) detektiert, im Gegensatz zur Kontrolle (103,691 pmol/ml HP) (Abb. 19). Osteoblasten produzierten unter ZOL ebenfalls eine geringe Menge von HP und LP. Einen sichtlichen Unterschied gab zwischen der 5 und 10 µM PAM Konzentration, da eine Zunahme der Crosslinks-Konzentration nur unter 5 µM Konzentration von PAM nachzuweisen war (Abb. 20). PP funktionierte als positiver Faktor auf die Crosslinks-Konzentration in allen Zellreihen. Die SaOS-2-Zellen exprimierten unter ZOL (Abb. 21) sowie unter PAM vermindert Crosslinks. Der Gehalt von Hyp, HP und LP in den gepoolten Nährmedienüberständen nach vier Wochen wird in Tabelle 4 demonstriert. Es zeigt sich eine nicht einheitliche Zunahme der Hyp unter ZOL und PAM parallel zum Anstieg der jeweiligen Konzentration. Osteoblasten sind am stärksten durch die BP beeinflusst, da bei den Osteoblasten die niedrigsten Hyp-Werte gemessen wurden. Die Kalibrierungsgeraden der unterschiedlichen Konzentrationen der Pyridinoline HP und LP sind in Abb. 22 dargestellt.

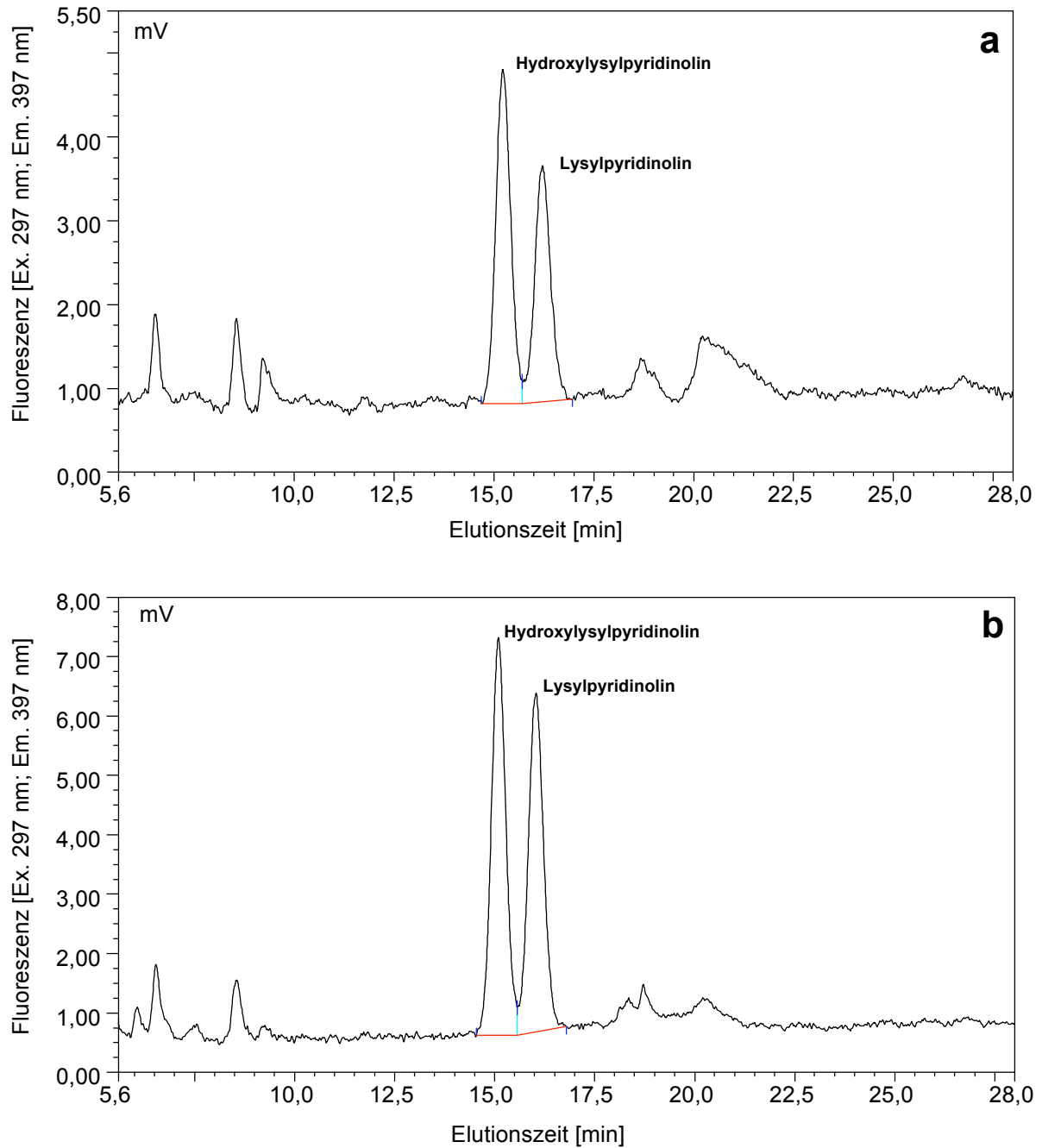


Abb. 19: Chromatogramme von gepoolten und mit 6 M HCl hydrolysierten Nährmedienüberständen

- a) Fibroblasten mit 1 μ M Pamidronat
- b) Kontrollzellkultur der Fibroblasten

Osteoblasten produzierten unter ZOL ebenfalls eine sehr geringe Menge von HP und LP. Besonders war der Unterschied in einer Konzentration von 10 zu 5 μ M unter PAM, welches eine Zunahme der Crosslinks-Konzentration unter 5 μ M nachweist.

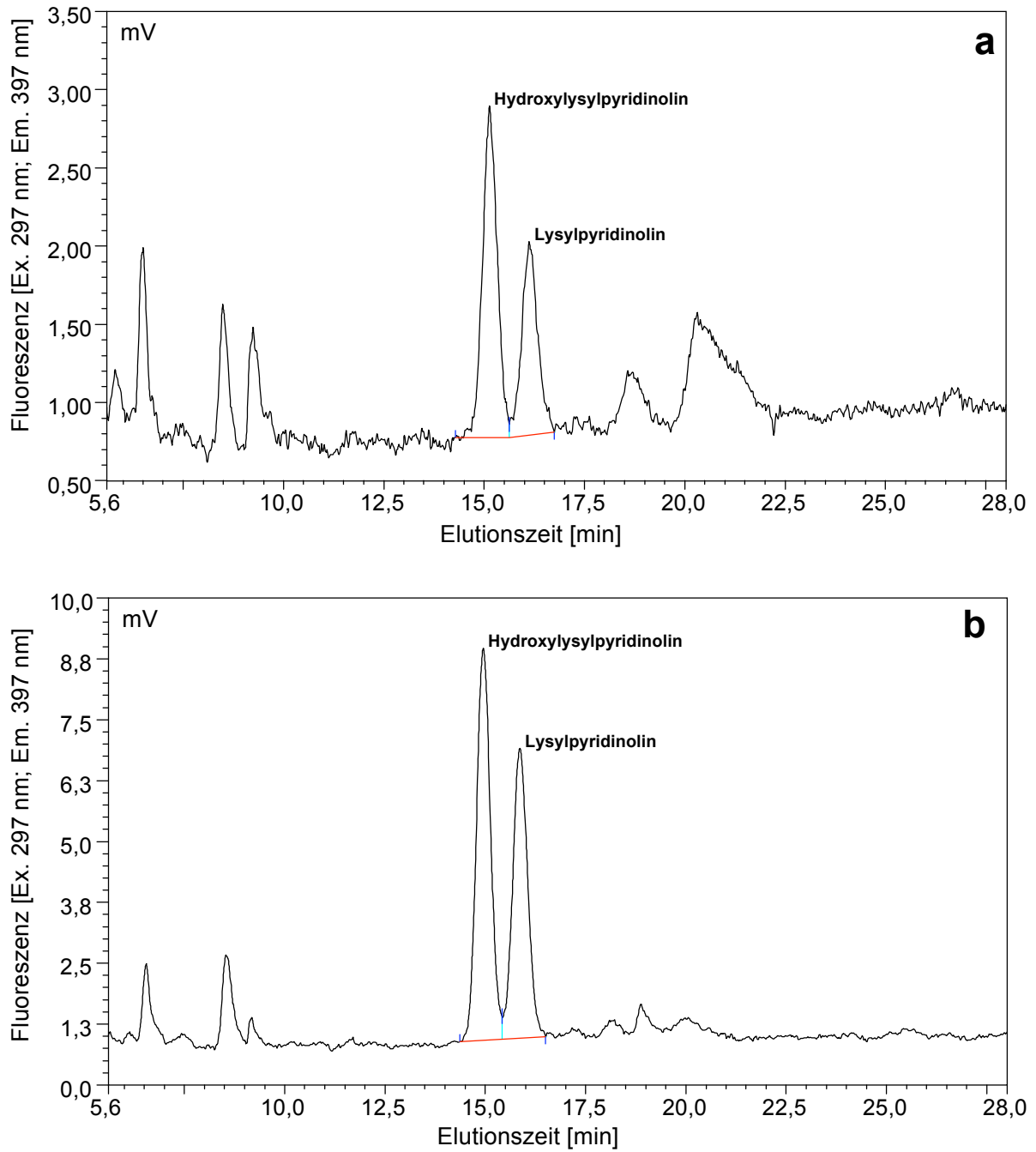


Abb. 20: Chromatogramme von gepoolten und mit 6 M HCl hydrolysierten Nährmedienüberständen
 a) Osteoblasten mit 10 µM Pamidronat
 b) Osteoblasten mit 5 µM Pamidronat
 PP funktionierte als positiver Faktor auf die Konzentration der Crosslinks in allen Zellreihen.

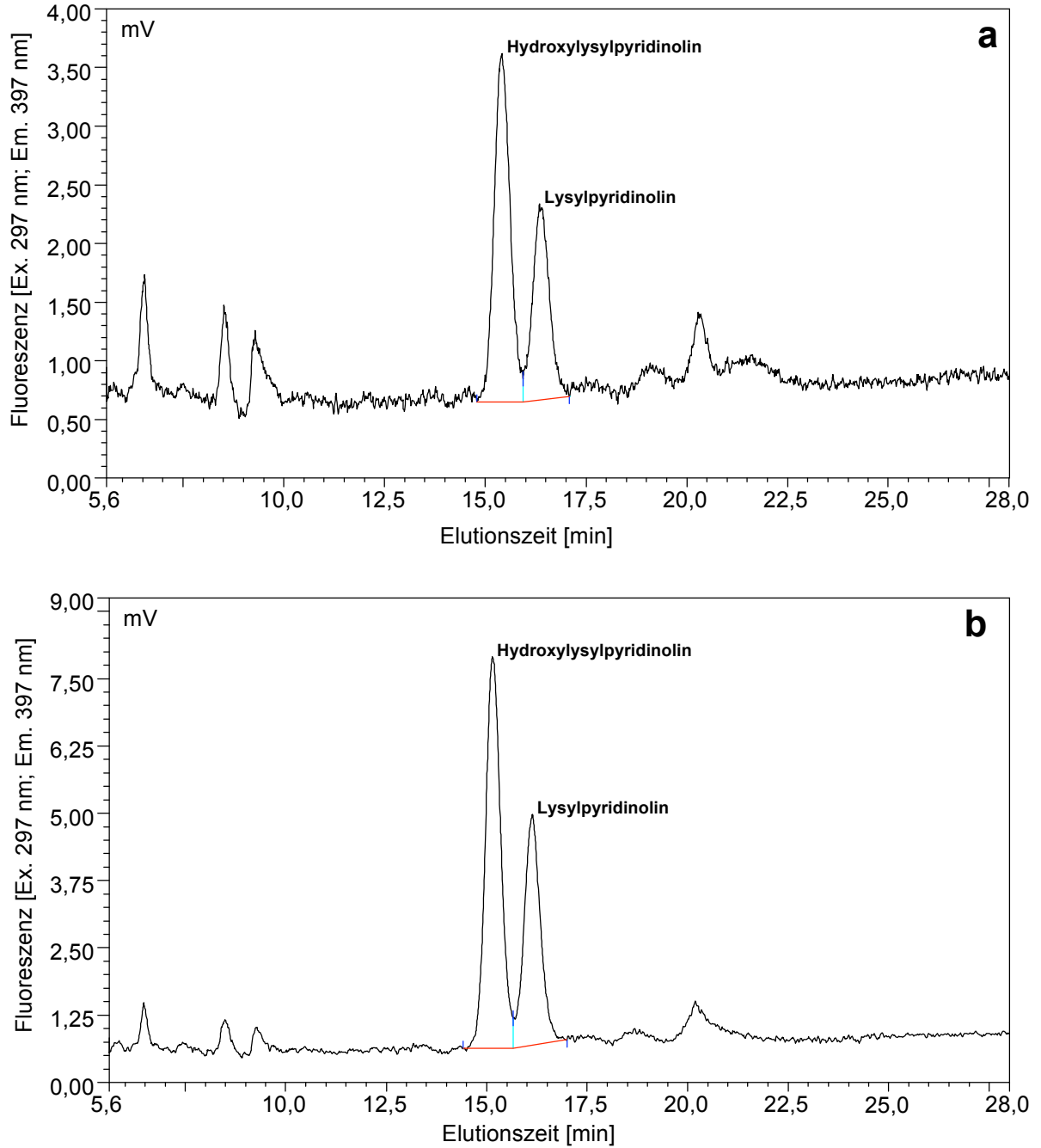


Abb. 21: Chromatogramme von gepoolten und mit 6 M HCl hydrolysierten Nährmedienüberständen
 a) SaOS-2-Zellen mit 20 μM Zoledronat
 b) Kontrollzellkultur der SaOS-2-Zellen
 Die SaOS-2-Zellen exprimierten unter ZOL vermindert Crosslinks. Die Kalibrierungsgeraden der unterschiedlichen Konzentrationen der Pyridinoline HP und LP sind in Abb. 22 dargestellt.

Tab. 4 a–c: Hydroxyprolin (Hyp), Hydroxylsilylpyridinolin (HP) und Lsilylpyridinolin (LP) in den gepoolten Nährmedienüberstände der humanen Fibroblasten (a), Osteoblasten (b) und SaOS-2-Zellen (c) mit der jeweiligen Substrat-Supplementation (ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, PP = Pyrophosphat) und Konzentrationsangabe am Ende der vierwöchigen Studie.

a)

Zelltyp	Substrat	Konzentration	Hyp [µg/ml]	Hyp [%]	HP [pmol/ml]	HP [%]	LP [pmol/ml]	LP [%]
Fibroblasten	-	Kontrolle	1,305	100	103,691	100	94,433	100
Fibroblasten	ZOL	20 µM	1,909	146,28	63,346	61,09	43,392	45,95
Fibroblasten	ZOL	10 µM	1,909	146,28	68,833	66,38	37,736	39,96
Fibroblasten	ZOL	5 µM	2,189	167,74	209,008	201,57	129,967	137,63
Fibroblasten	ZOL	1 µM	1,334	102,22	182,739	176,23	114,811	121,58
Fibroblasten	PAM	20 µM	3,078	235,86	74,217	71,58	40,482	42,87
Fibroblasten	PAM	10 µM	1,586	121,53	73,345	70,73	39,008	41,31
Fibroblasten	PAM	5 µM	1,519	116,40	75,609	72,92	53,206	56,34
Fibroblasten	PAM	1 µM	1,752	134,25	74,421	71,77	56,391	59,72
Fibroblasten	PP	20 µM	1,876	143,75	105,517	101,76	57,185	60,56
Fibroblasten	PP	10 µM	2,318	177,62	173,451	167,28	118,435	125,42
Fibroblasten	PP	5 µM	2,422	185,59	97,994	94,51	61,808	65,45
Fibroblasten	PP	1 µM	1,781	136,48	59,287	57,18	39,356	41,68

b)

Zelltyp	Substrat	Konzentration	Hyp [µg/ml]	Hyp [%]	HP [pmol/ml]	HP [%]	LP [pmol/ml]	LP [%]
Osteoblasten	-	Kontrolle	2,532	100	886,087	100	132,801	100
Osteoblasten	ZOL	20 µM	1,196	47,24	84,263	9,51	52,472	39,51
Osteoblasten	ZOL	10 µM	1,167	46,09	53,826	6,07	32,658	24,59
Osteoblasten	ZOL	5 µM	1,291	50,99	49,593	5,60	47,353	35,66
Osteoblasten	ZOL	1 µM	1,529	60,39	36,28	4,09	30,009	22,60
Osteoblasten	PAM	20 µM	2,46	97,16	51,161	5,77	32,597	24,55
Osteoblasten	PAM	10 µM	1,448	57,19	116,668	13,17	91,976	69,26
Osteoblasten	PAM	5 µM	1,467	57,94	94,538	10,67	54,912	41,35
Osteoblasten	PAM	1 µM	1,666	65,80	53,364	6,02	33,303	25,08
Osteoblasten	PP	20 µM	1,994	78,75	133,682	15,09	95,391	71,83
Osteoblasten	PP	10 µM	1,947	76,90	121,074	13,66	55,819	42,03
Osteoblasten	PP	5 µM	2,175	85,90	249,981	28,21	114,02	85,86
Osteoblasten	PP	1 µM	1,452	57,35	147,226	16,62	140,142	105,53

c)

Zelltyp	Substrat	Konzentration	Hyp [µg/ml]	Hyp [%]	HP [pmol/ml]	HP [%]	LP [pmol/ml]	LP [%]
SaOS-2-Zellen	-	Kontrolle	1,871	100	115,543	100	72,337	100
SaOS-2-Zellen	ZOL	20 µM	1,481	79,16	64,335	55,68	37,772	52,22
SaOS-2-Zellen	ZOL	10 µM	1,4	74,83	96,478	83,50	50,828	70,27
SaOS-2-Zellen	ZOL	5 µM	1,357	72,53	132,152	114,37	106,031	146,58
SaOS-2-Zellen	ZOL	1 µM	1,486	79,42	72,595	62,83	48,637	67,24
SaOS-2-Zellen	PAM	20 µM	1,952	104,33	121,071	104,78	96,696	133,67
SaOS-2-Zellen	PAM	10 µM	1,277	68,25	119,879	103,75	81,332	112,43
SaOS-2-Zellen	PAM	5 µM	1,571	83,97	163,3	141,33	105,837	146,31
SaOS-2-Zellen	PAM	1 µM	1,909	102,03	92,427	79,99	52,209	72,17
SaOS-2-Zellen	PP	20 µM	1,823	97,43	122,052	105,63	95,928	132,61
SaOS-2-Zellen	PP	10 µM	2,199	117,53	160,042	138,51	145,997	201,83
SaOS-2-Zellen	PP	5 µM	2,784	148,80	99,158	85,82	58,732	81,19
SaOS-2-Zellen	PP	1 µM	3,074	164,30	74,451	64,44	54,227	74,96

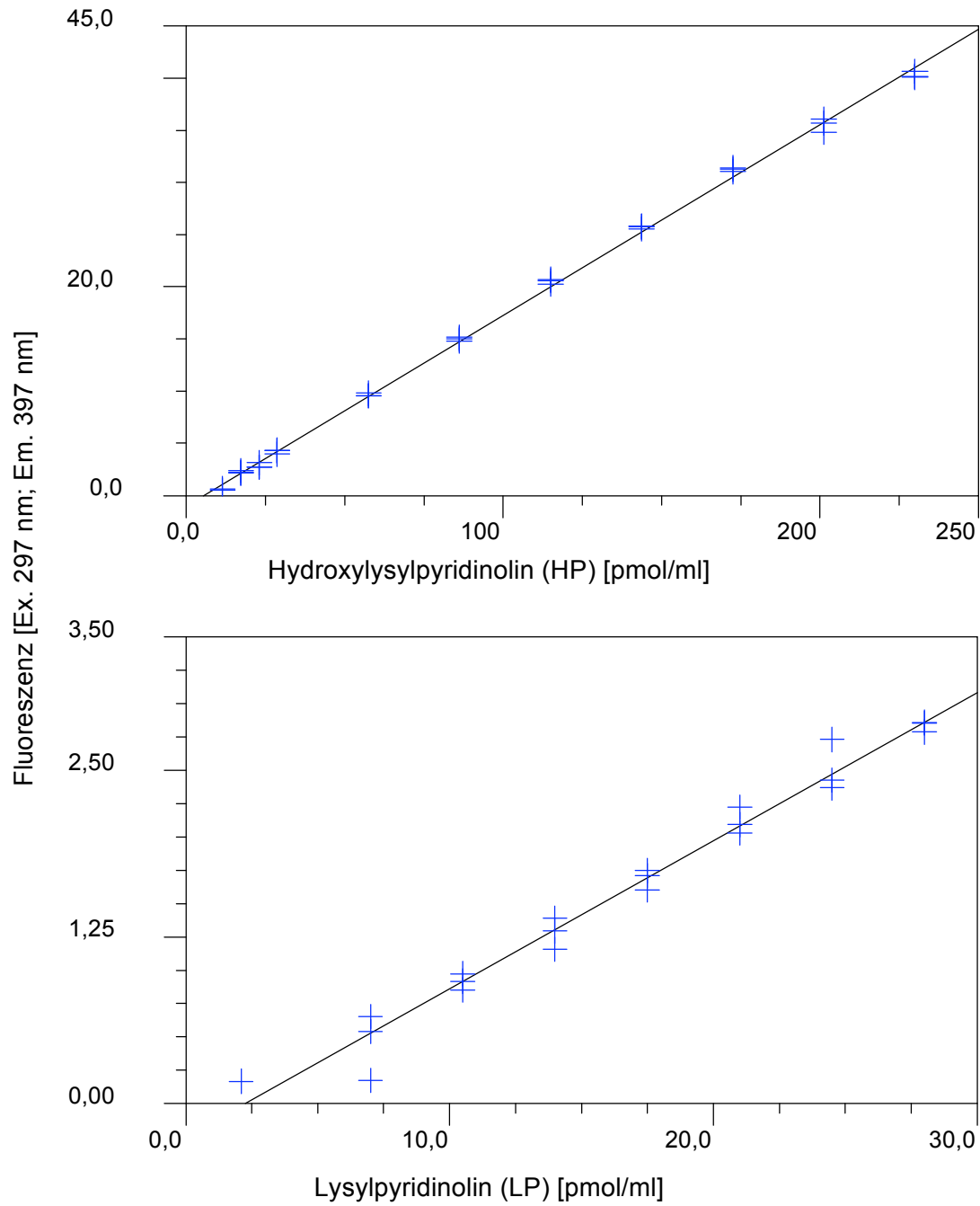


Abb. 22: Eichungsgeraden der unterschiedlichen Konzentrationen der Pyridinoline HP und LP. Verschiedene Verdünnungen der HP- und LP-Standards wurden durch HPLC analysiert und ihre Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Detektor (RF 1002, Gynotek, Germering, Deutschland) gemessen.

3.2.5 SDS-PAGE

Das extrahierte, reife Kollagen aus den gepoolten Nährmedienüberständen der Fibroblasten, Osteoblasten und der SaOS-2-Zellen mit den jeweiligen Substraten ZOL, PAM und PP in der höchsten Konzentration (20 μM) und die dazugehörigen Kontrollen demonstrierten nach der Elektrophorese, dass α -Ketten der Kollagen Typen I, III und V von den untersuchten Zellen synthetisiert werden.

SaOS-2-Zellen weisen eine hohe Kollagen-Typ-I-Syntheserate auf, obwohl die Proben im Gegensatz zu den anderen im Verhältnis 1 : 5 verdünnt worden sind. Es wird deutlich demonstriert, dass unter ZOL-Einfluss die schwächste Intensität des Kollagen Typs I in allen drei Zelltypen nachgewiesen wurde. Fibroblasten weisen eine schwache Bande des Kollagen Typs V nach, allerdings ist diese nur unter PAM und in der Kontrolle sichtbar. Osteoblasten weisen die typischen Banden bei Kollagen Typ I auf, ebenfalls wird eine stärkere Intensität unter PAM beobachtet als unter ZOL (Abb. 23).

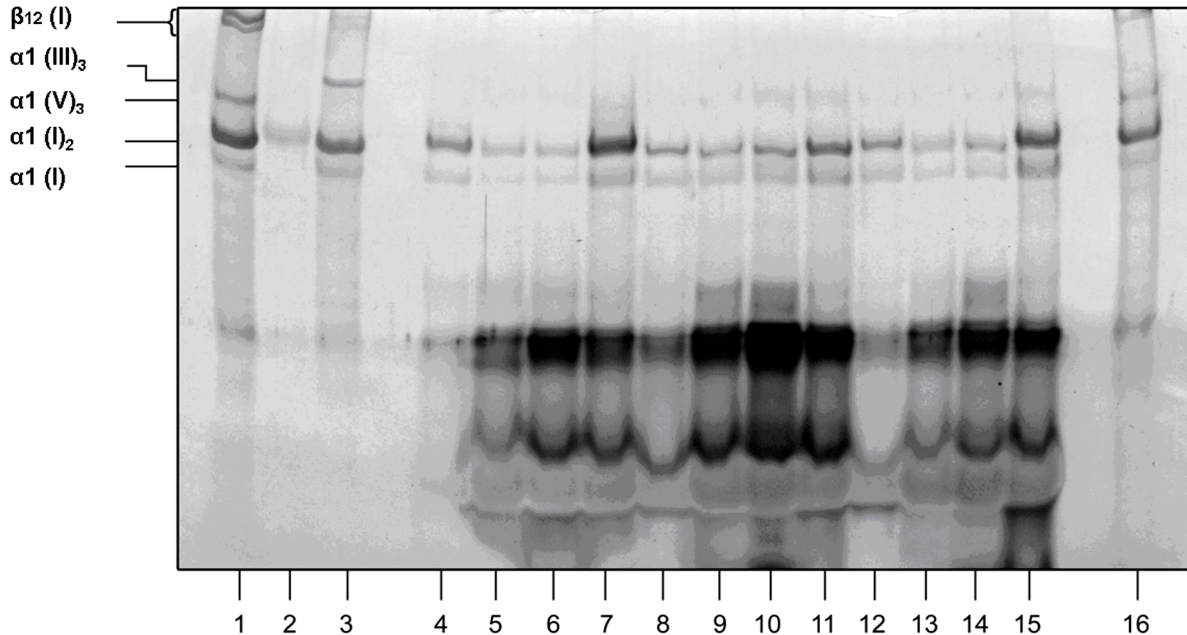


Abb. 23: Der Scan der SDS-PAGE (mit Silberfärbung) nach Kollagenextraktion der Nährmedienüberstände dokumentiert die Auftrennung der verschiedenen Kollagen Typen in ihre α - und β -Ketten. 1 = Knochenstandard (Kollagen Typen I, III und V) mit α - und β -Ketten; 2 = Knorpelstandard (Kollagen Typ II) mit α -Kette; 3 = Hautstandard (Kollagen Typen I und II) mit α -Kette; 4 = SaOS-2-Zellen mit 20 μM Pyrophosphat; 5 = SaOS-2-Zellen mit 20 μM Zoledronat; 6 = SaOS-2-Zellen mit 20 μM Pamidronat; 7 = nur SaOS-2-Zellen als Kontrolle; 8 = Fibroblasten mit 20 μM Pyrophosphat; 9 = Fibroblasten mit 20 μM Zoledronat; 10 = Fibroblasten mit 20 μM Pamidronat; 11 = nur Fibroblasten als Kontrolle; 12 = Osteoblasten mit 20 μM Pyrophosphat; 13 = Osteoblasten mit 20 μM Zoledronat; 14 = Osteoblasten mit 20 μM Pamidronat; 15 = nur Osteoblasten als Kontrolle; 16 = Knochenstandard (Kollagen Typen I, III und V) mit α - und β -Ketten (siehe 1). Proben 4–7 sind 1 : 5 verdünnt worden, um eine Überreaktion zu vermeiden, welche in vorherigen SDS-PAGE aufgetreten war.

3.2.6 Molekularbiologisches Verfahren

Quantitative Bestimmung der RNA

Die Bestimmung der RNA zeigt, wie stark der Einfluss von ZOL als von auch PAM auf das Zellwachstum war. Eine ausreichend bestimmbare Menge der RNA unter ZOL konnte nur in einer Konzentration von 20 μM bei den SaOS-2-Zellen detektiert werden. Unter PAM konnten ebenfalls nur Schwellenwerte in Konzentrationen unter 10 μM bei den Osteoblasten gemessen werden, bei den Fibroblasten war nur ausreichend RNA in 1 μM PAM nachweisbar. Die SaOS-2-Zellen demonstrieren als einzige Zellen eine enorme Produktion von RNA, sogar teilweise mehr als die Kontrollen (Tab. 5).

Tab. 5: Quantitative Bestimmung der RNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ von Osteoblasten, Fibroblasten und SaOS-2-Zellen nach vierwöchiger Behandlung mit den jeweiligen Substraten (PP = Pyrophosphat, ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, Kontrolle = der selbigen Zellreihe, k. S. = kein Schwellenwert/ keine detektierbare Menge)

Substrate mit Konzentrationen	Fibroblasten	Osteoblasten	SaOS-2-Zellen
	Gesamt-RNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]		
PP 20 μM	10,89	15,91	23,72
PP 10 μM	17,37	12,39	31,51
PP 5 μM	18,15	11,25	40,15
PP 1 μM	18,82	16,70	38,94
Kontrolle 1	19,87	16,09	19,87
ZOL 20 μM	k. S.	k. S.	4,26
ZOL 10 μM	k. S.	k. S.	k. S.
ZOL 5 μM	k. S.	k. S.	k. S.
ZOL 1 μM	k. S.	k. S.	k. S.
Kontrolle 2	16,78	17,91	33,22
PAM 20 μM	k. S.	k. S.	4,01
PAM 10 μM	k. S.	k. S.	k. S.
PAM 5 μM	k. S.	3,15	3,72
PAM 1 μM	8,73	13,64	6,15

Qualitative Expression extrazellulärer Proteine

In der Abb. 24 ist beispielhaft das Bild einer Agarosegelelektrophorese aus der qualitativen Bestimmung der Expression des humanen Kollagen Typs I dargestellt. Hierbei handelt es sich um die Darstellung des Kollagen Typs I der humanen Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen.

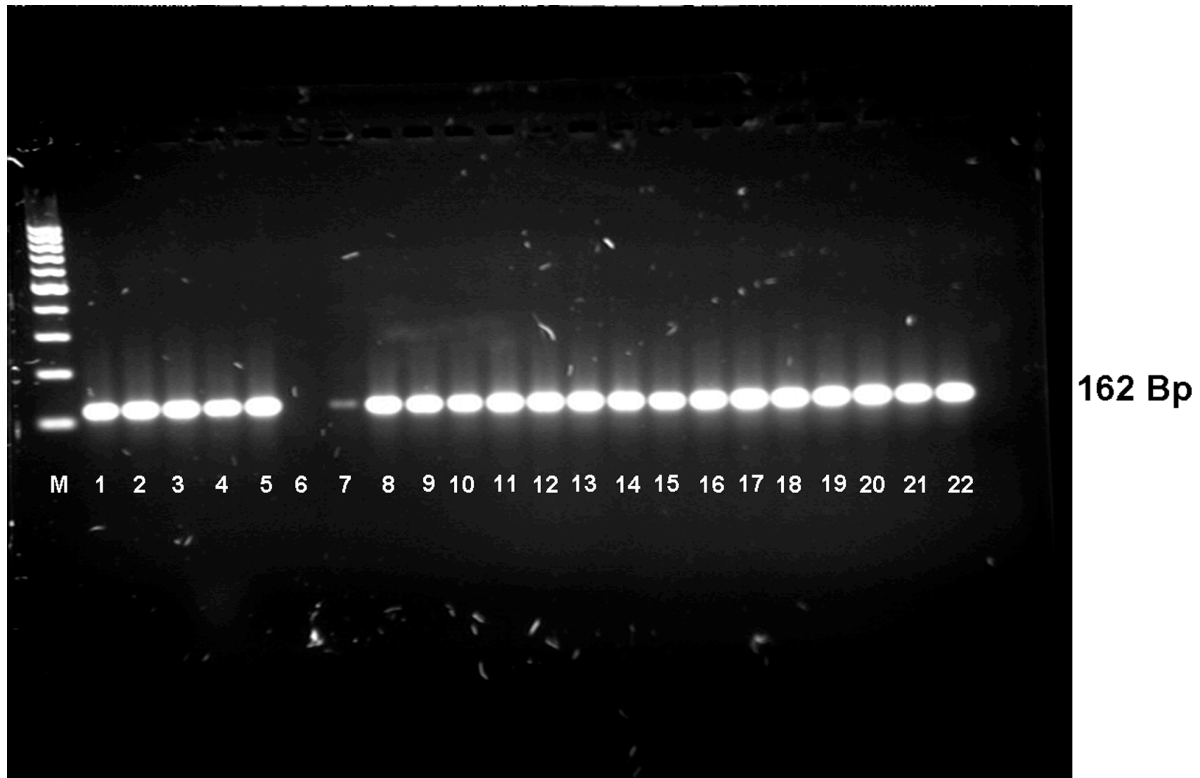


Abb. 24: Expression der mRNA von Kollagen Typ I in 22 Proben aus humanen Zellen, gemessen über RT-PCR. Bahn 1–9 SaOS-2-Zellen: 1 = Kontrolle, 2 = 20 μM Pyrophosphat, 3 = 10 μM Pyrophosphat, 4 = 5 μM Pyrophosphat, 5 = 1 μM Pyrophosphat, 6 = 20 μM Zoledronat, 7 = 20 μM Pamidronat, 8 = 5 μM Pamidronat, 9 = 1 μM Zoledronat; Bahn 10–15 Fibroblasten: 10 = Kontrolle, 11 = 20 μM Pyrophosphat, 12 = 10 μM Pyrophosphat, 13 = 5 μM Pyrophosphat, 14 = 1 μM Pyrophosphat, 15 = 1 μM Pamidronat; Bahn 16–22 Osteoblasten: 16 = Kontrolle, 17 = 20 μM Pyrophosphat, 18 = 10 μM Pyrophosphat, 19 = 5 μM Pyrophosphat, 20 = 1 μM Pyrophosphat, 21 = 5 μM Pamidronat, 22 = 1 μM Pamidronat.

Quantitative Expression extrazellulärer Proteine

Quantitativ ausgewertet wurden die extrazellulären Proteine der Zellkulturen der Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen nach Beendigung der vierwöchigen Studie. Es wurde die relative Expression von Kollagen Typen I, II, III und V, von Osteocalcin, der alkalischen Phosphatase (ALP) und von dem House-Keeping-Protein der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) festgehalten. Eine relative Expression konnte vom Kollagen Typ II nicht ermittelt werden, da es zu keiner Amplifikation in den Zyklen der PCR für das gesuchte Gen gekommen ist. Die relative Expression konnte nur erhoben werden, wo die RNA die Schwellenwerte erreicht hatte und der Zeitpunkt dieses Überschreitens erfasst werden konnte. Die Standardkurve wurde aus den jeweiligen Kontrollen erstellt. Sie ist eine Linearregression, welche umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR ist. Die relative Expression der Proben wird vergleichend mittels der Hilfe der Standardkurve erstellt. Je höher die Werte sind,

desto früher wurde der Schwellenwert in der PCR erreicht und desto höher fällt die Konzentration aus. Trotz der Erfassung einer RNA Konzentration unter einer Konzentration von 20 μM Zoledronat und von 20 μM Pamidronat bei den SaOS-2-Zellen konnte die quantitative Expression nicht genutzt werden, da die Schwellenwerte nicht erreicht wurden und somit die Konzentrationsmengen zu niedrig waren, um von der PCR quantitativ genutzt zu werden. Die logarithmischen Auswertungen der Proben beschreiben vergleichend zu den Kontrollen bei Werten über 1,0 ein früheres Erreichen des Schwellenwertes und eine höhere Konzentration des Produktes. Das Konträre gilt für Werte unterhalb von 1,0. Für die einzelnen Proben sind die logarithmischen Werte der relativen Expression in den Tab. 6 bis Tab. 11 dargestellt.

Tab. 6: Relative Expression des Kollagen Typs I (logarithmische Darstellung) bei den Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen (PP = Pyrophosphat, ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, Kontrolle = der selbigen Zellreihe, n. g. = nicht gemessen).

Substrate mit Konzentrationen	Relative Expression von Kollagen Typ I		
	Fibroblasten	Osteoblasten	SaOS-2-Zellen
PP 20 μM	0,74	1,16	0,86
PP 10 μM	1,06	0,71	0,85
PP 5 μM	1,09	1,39	0,90
PP 1 μM	1,15	0,88	0,96
ZOL 20 μM	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 10 μM	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 5 μM	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 1 μM	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 20 μM	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 10 μM	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 5 μM	n. g.	0,60	1,26
PAM 1 μM	0,81	1,24	8,82
Kontrolle	1,00	1,00	1,00

Tab. 7: Tabellarische Darstellung der relative Expression des Kollagen Typs III bei den Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen (PP = Pyrophosphat, ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, Kontrolle = der selbigen Zellreihe, n. g. = nicht gemessen). Die Werte sind logarithmisch zum Standard (Kontrolle) berechnet worden.

Substrate mit Konzentrationen	Relative Expression von Kollagen Typ III		
	Fibroblasten	Osteoblasten	SaOS-2-Zellen
PP 20 μ M	0,69	1,09	1,21
PP 10 μ M	0,67	0,70	1,05
PP 5 μ M	0,98	1,30	1,53
PP 1 μ M	0,99	0,86	1,12
ZOL 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 5 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 1 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 5 μ M	n. g.	0,04	0,14
PAM 1 μ M	0,08	0,02	0,10
Kontrolle	1,00	1,00	1,00

Tab. 8: Präsentation der Ergebnisse aus der relative Expression des Kollagen Typs V bei den Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen, mit Hilfe der logarithmischen Berechnung zum jeweiligen Standard (Kontrolle), (PP = Pyrophosphat, ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, Kontrolle = der selbigen Zellreihe, n. g. = nicht gemessen).

Substrate mit Konzentrationen	Relative Expression von Kollagen Typ V		
	Fibroblasten	Osteoblasten	SaOS-2-Zellen
PP 20 μ M	0,77	2,43	0,73
PP 10 μ M	0,86	1,44	1,26
PP 5 μ M	1,18	1,89	1,71
PP 1 μ M	1,01	1,35	0,93
ZOL 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 5 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 1 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 5 μ M	n. g.	0,17	0,62
PAM 1 μ M	0,18	0,14	0,29
Kontrolle	1,00	1,00	1,00

Tab. 9: Aufzeichnung der relativen Expression in logarithmischer Darstellung von Osteocalcin bei den Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen (PP = Pyrophosphat, ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, Kontrolle = der selbigen Zellreihe, n. g. = nicht gemessen).

Substrate mit Konzentrationen	Relative Expression von Osteocalcin		
	Fibroblasten	Osteoblasten	SaOS-2-Zellen
PP 20 μ M	n. g.	1,16	0,86
PP 10 μ M	n. g.	0,71	0,85
PP 5 μ M	n. g.	1,39	0,90
PP 1 μ M	n. g.	0,22	0,96
ZOL 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 5 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 1 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 5 μ M	n. g.	0,60	1,26
PAM 1 μ M	n. g.	1,24	8,82
Kontrolle	n. g.	2,99	1,00

Tab. 10: Ergebnisspräsentation der relative Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) bei den Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen (PP = Pyrophosphat, ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, Kontrolle = der selbigen Zellreihe, n. g. = nicht gemessen). Die Auswertung erfolgte mit den Ergebnissen der Crossing-Points der Proben gegen den Logarithmus des Standards (Kontrolle).

Substrate mit Konzentrationen	Relative Expression der alkalischen Phosphatase (ALP)		
	Fibroblasten	Osteoblasten	SaOS-2-Zellen
PP 20 μ M	0,37	4,20	0,66
PP 10 μ M	0,42	1,83	1,12
PP 5 μ M	0,49	2,35	1,33
PP 1 μ M	0,52	1,89	0,89
ZOL 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 5 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 1 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 5 μ M	n. g.	0,24	0,89
PAM 1 μ M	0,01	0,41	1,69
Kontrolle	1,00	1,00	1,00

Tab. 11: Logarithmische Darstellung der relative Expression des House-Keeping-Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bei den Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen (PP = Pyrophosphat, ZOL = Zoledronat, PAM = Pamidronat, Kontrolle = der selbigen Zellreihe, n. g. = nicht gemessen).

Substrate mit Konzentrationen	Relative Expression von GAPDH		
	Fibroblasten	Osteoblasten	SaOS-2-Zellen
PP 20 μ M	0,87	0,99	1,39
PP 10 μ M	1,04	0,72	0,85
PP 5 μ M	1,23	1,42	1,04
PP 1 μ M	0,97	0,70	0,93
ZOL 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 5 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
ZOL 1 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 20 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 10 μ M	n. g.	n. g.	n. g.
PAM 5 μ M	n. g.	1,22	2,50
PAM 1 μ M	0,73	1,69	3,68
Kontrolle	1,00	2,04	0,24

Die Abb. 25 bis Abb. 27 zeigen exemplarisch die Osteocalcin-Produktion der Osteoblasten: die Gesamtdarstellung der Real-Time-PCR, deren qualitative Analyse (Abb. 25), Linearität der Reaktion (Abb. 26) sowie Berechnung der Standardkurve (Abb. 27).

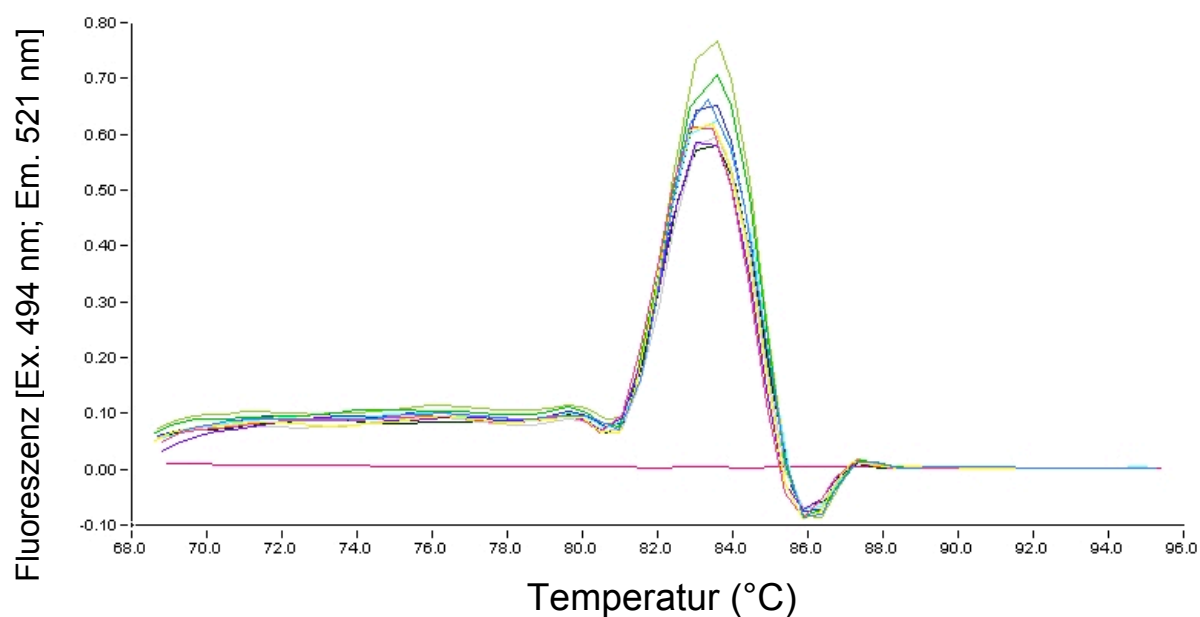


Abb. 25: Darstellung der Schmelzkurve für Osteocalcin der humanen Osteoblasten. Die Negativkontrolle zeigt eine Abweichung von den restlichen Proben.

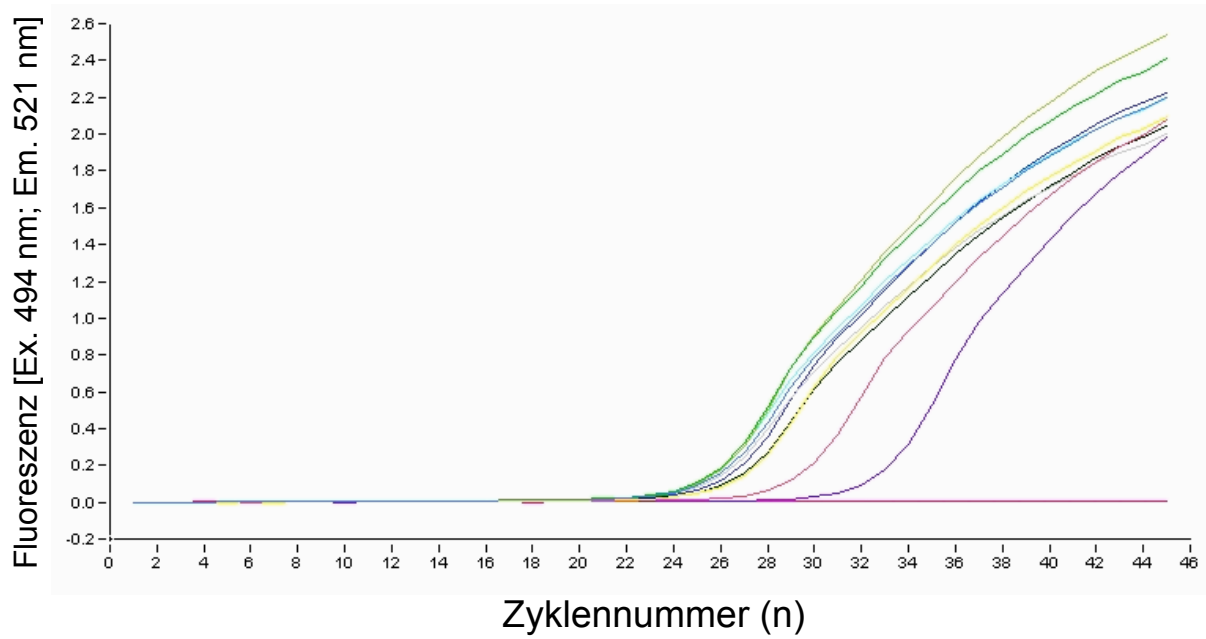


Abb. 26: Aufzeichnung der Proben von Osteoblasten für die Osteocalcinproduktion. 1 : 1 (blau), 1 : 2 (gelb), 1 : 10 (hellviolett), 1 : 100 (dunkelviolett), Pyrophosphat 20 μM (grün), Pyrophosphat 10 μM (olivgrün), Pyrophosphat 5 μM (grau), Pyrophosphat 1 μM (hellblau), Pamidronat 5 μM (schwarz), Pamidronat 1 μM (dunkelgrau), Negativkontrolle (magentarot). Die Konzentration an amplifizierte cDNA verhält sich umgekehrt proportional zur Zyklenzahl.

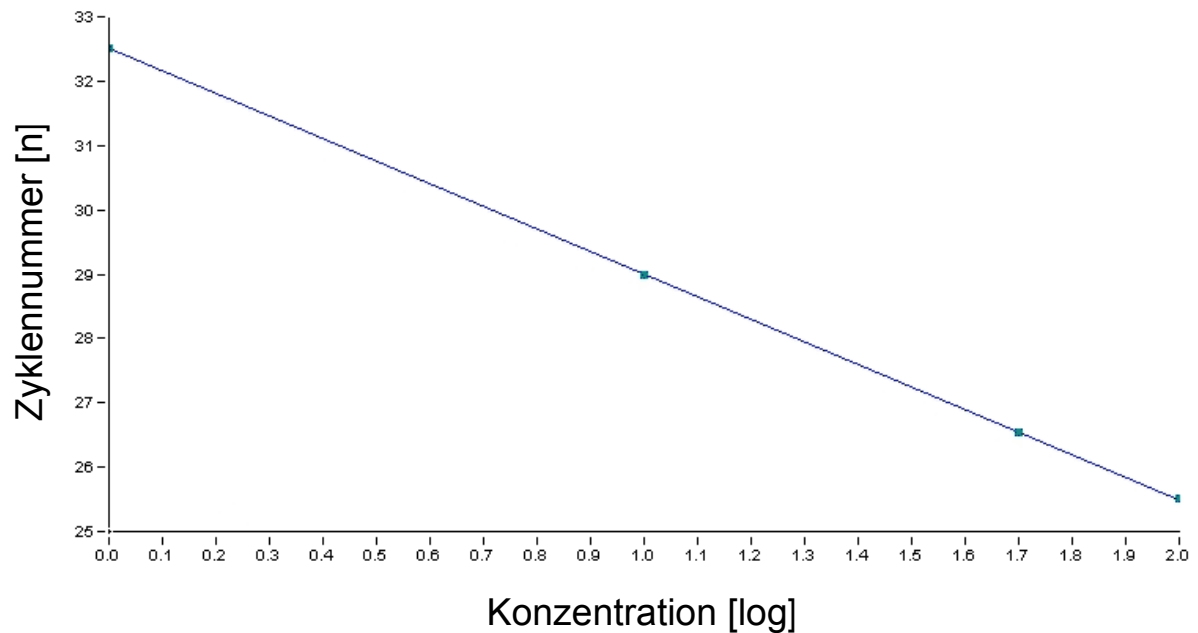


Abb. 27: Standardkurve für die Proben des Standards in der Real-Time-PCR des Osteocalcins von humanen Osteoblasten. Die Steigung dieser Standardkurve ist der Wert für die Effizienz einer quantitativen PCR. Der Wert wird mit einem negativen Vorzeichen angegeben.

4. Diskussion

4.1 Bisphosphonate und ihre Konzentrationen

Die Wahl der Bisphosphonate für die Studie war insofern vorbestimmt, da es sich bei den Bisphosphonaten Zoledronat und Pamidronat um die am häufigsten verwendeten handelt (Felsenberg et al. 2006). Unter diesen zwei Präparaten ereignen sich die meisten Kieferknochennekrosen (Durie et al. 2005; Ficarra et al. 2005; Purcell und Boyd 2005; Abu-Id et al. 2006). Die Wahl der geeigneten Konzentration war dagegen sehr genau zu bedenken. In einigen Studien (Giuliani et al. 1998b; Benford et al. 2001; Coxon et al. 2004) wurden höhere Konzentrationen von ZOL und PAM (bis zu 100 µM) verwendet, und es konnte ein negativer, teils toxischer Effekt auf humanen Osteosarkomazellen (MG-63), humanen und Kaninchen-Osteoklasten sowie Prostatakrebszellen (DU145 und PC-3) beobachtet werden. Andere Studien (Khokher und Dandona 1989; Luckman et al. 1998; Giuliani et al. 1998a) haben bereits nachgewiesen, dass Inhibitionen mit Bisphosphonaten schon ab einer Konzentration von 10 µM beobachtet werden können. Allerdings zeigen Denoyelle und Mitarbeiter in ihrer Studie (2003), dass sich bei Konzentrationen von ZOL < 10 µM keine nennenswerten Reaktionen ereignen könnten. Und Sato und Mitarbeiter (1991) belegen, dass die Konzentration von Bisphosphonaten während der Knochenresorption im Menschen über 100 µM beträgt und dass der Körper höheren Belastungen aufgrund der auftretenden Ergebnisse ausgesetzt sein muss. Wiederum beschreiben Reid und Mitarbeiter (2002) in einer klinischen Studie, dass 24 Stunden nach einer ZOL-Infusion nur noch 1 % des Medikamentenlevels im Blut gemessen wird und dass die Halbwertszeit im Plasma 167 Stunden beträgt. Trotz der sich widersprechenden Ergebnisse wurden die vier Konzentrationen von 1, 5, 10 und 20 µM gewählt, um eine nicht zu toxische Dosis zu benutzen und auch nicht die in vivo beschriebene maximale Dosis zu überschreiten. Die Ergebnisse belegen, dass ZOL in den vier Konzentrationen die Zellen erheblich negativ beeinflusst hatte. Die Konzentrationswahl für PAM belegte teils einen negativen Einfluss, teils zeichnete sich kaum ein inhibitorischer Effekt ab. Der Grund könnten die unterschiedlichen absorptiven Wirkstärken von ZOL und PAM sein (Ramaswamy und Shapiro 2003). Daher ist die Wahl der Konzentrationen als durchaus sinnvoll zu betrachten und sie liefert zugleich einen weiteren Beweis über

die Wirkstärkendifferenz beider Präparate. PP wurde in die Studie als neutraler bzw. positiver Faktor mit aufgenommen und diente als zusätzlicher Parameter. Wie sich herausstellte, war der Einfluss von PP gegenüber der Kontrolle meist nicht zu unterscheiden. Die Dauer der Studie wurde auf vier Wochen angesetzt, um die längerfristigen Reaktionen der Zellen zu sehen. Außerdem galt es zu beobachten, wie die Zellen auf eine permanent hohe Dosis von BP reagieren. Da in vivo der Kieferknochen und seine umgebenden Strukturen durch die regelmäßigen mechanischen Belastungen und Bewegungen einem ständigen Auf- und Abbauprozess unterliegen, werden höhere Konzentrationen von BP in dieser Umgebung erwartet. Andere Studien haben kurze Expositionszeiten (Stunden bis Tage) der Zellen mit BP bereits beschrieben (Benford et al. 2001; Kellinsalmi et al. 2005; Neville-Webbe et al. 2005, Woodward et al. 2005).

4.2 Proliferationseinfluss

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass ZOL und PAM negativ auf die Zellproliferation der Gingivafibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen wirkten. Diese Befunde der Proliferationsreduktion wurden auch in Zellkulturen von Osteoblasten-ähnlichen Zellen, humanen Osteoblasten-ähnlichen Osteosarkomzellen (MG-63) schon unter den weniger potenteren Bisphosphonaten (Etidronat, Clodronat und Alendronat) von Giuliani und Mitarbeitern (1998b) beschrieben. Auch andere, wie Wood und Mitarbeiter (2002) beobachteten schon bei einer Konzentration von 4 μM ZOL eine Inhibition bei humanen umbilikalen Venenendothelzellen (HUVEC), und bei noch höherer Konzentration von ZOL (100 μM) konnten schon nach 48 Stunden über 70 % der HUVEC in der S-Phase des Zellzyklus vorgefunden werden. Die hohe Zahl der Zellen in der S-Phase weist auf eine Verzögerung des Zellzyklus hin.

Einer der Gründe für den negativen Einfluss der Bisphosphonate in der vorliegenden einwöchigen Untersuchung kann weiterhin eine zu hohe Konzentration der Bisphosphonate sein. Ergänzend zu der 48-Stunden-Studie (Wood et al. 2002) konnte die eigene Studie in vier Wochen deutlich darstellen, dass sich keine gesteigerte Proliferation der Zellen unter BP im Vergleich zur Kontrolle ereignete. Darüber hinaus konnten weitere Befunde dieser Wirkungen von Bisphosphonaten in der Osteoklastenkultur nachgewiesen werden, hierbei wurde eine Zellabnahme

registriert (Benford et al. 2001; Kellinsalmi et al. 2005). Auch Neville-Webbe und Mitarbeiter (2005) demonstrierten, wie toxisch ZOL in einer Konzentration von 100 μM auf Brustkrebszellen (MCF 7) wirkt. Sie konnten nachweisen, dass nach einer Exposition von ZOL für 72 Stunden 19,3 % der Zellen apoptotisch untergegangen waren. Mit der Hinzunahme der nekrotisierten Zellen wurde ein Wert von 54,8 % der toxisch beeinflussten Zellen erreicht.

In der vorliegenden Studie wird die beschriebene Potenzdifferenz der Bisphosphonate von Fleisch (1998) erneut belegt, da bei einer Konzentration von 5 und 1 μM von PAM eine Zellproliferation, ganz im Gegensatz zu ZOL, nachgewiesen werden konnte, allerdings lag diese weit unter der Proliferation der Kontrollen. ZOL bewies abermals seine Toxizität und hemmte die Proliferation bei jeder angesetzten Konzentration nahezu komplett in allen drei Zelllinien. PP wirkte positiv und teils neutral auf die Proliferation, da es hier teilweise zu einem enormen Zellzuwachs kam, andererseits wird eine vergleichbare Zellmenge wie in der Kontrolle beschrieben. Die Ursachen hierfür könnten sein, dass PP eine instabilere Struktur als die der Bisphosphonate besitzt (Fleisch 1998). Oder es ist die effektive Maximaldosis erreicht worden, und aus diesem Grund konnte kein positiveres Ergebnis in der Proliferation erzielt werden. Nach dieser einwöchigen Studie ist bereits erkennbar, dass PAM und ZOL keine positiven Effekte auf die Zellen ausüben. Zusätzlich ist ein Wirkungsunterschied zwischen den beiden Substraten, mit einer höheren Potenz bei ZOL, ersichtlich, da unter PAM noch eine geringe Zellproliferation wahrnehmbar war. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen konnten Rogers und Mitarbeiter im Jahre 2000 zeigen, dass die BP keine signifikanten physiologischen Effekte auf die Inhibition der Knochenherstellung, d. h. der Osteoblasten, haben. Sie konnten lediglich sekundäre Effekte der Osteoblasten auf Osteoklasten zeigen (Rogers et al. 2000). Jedoch sind diese Ergebnisse nur bei kurzfristigen Versuchen erzielt worden.

4.3 Kollagendetektion mittels ELISA

Mittels ELISA wurde die Kollagensynthese bestimmt. Somit konnten die negativen Effekte der Bisphosphonate ZOL und PAM auf die Kollagen-Typ-I-Synthese nachgewiesen werden. Ferner konnte bei der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass ZOL eine höhere Wirkungskraft als PAM besitzt, da es in allen vier Konzentrationen einen gleichbleibenden negativen Einfluss auf Fibroblasten,

Osteoblasten und SaOS-2-Zellen nimmt. PAM präsentierte sich in der hier durchgeführten Studie in der Konzentration von 1 und 5 μM in der Einflussnahme auf die Zellkulturen abgeschwächt, da hierbei Kollagene detektiert worden waren. Die Potenzstärken der Bisphosphonate sind zuvor beschrieben worden und stützen diese gewonnenen Ergebnisse (Fleisch 1998; O'Connell und Elliot 2002). Die entarteten Osteosarkomzellen (SaOS-2-Zellen) besitzen einen anderen Metabolismus als normale Osteoblasten. Sie zeichnen sich durch einen erhöhten Metabolismus bzw. eine gesteigerte Mitoserate aus. Aus diesem Grund setzen SaOS-2-Zellen mehr Stoffe, in diesem Fall PP, pro Zeiteinheit um als normale, nichtentartete Zelltypen (Osteoblasten und Fibroblasten). PP kann als physiologische Komponente in den Energiemetabolismus eingreifen und daher den größten positiven Einfluss auf die SaOS-2-Zellen ausüben. Es kann somit auch eine Erklärung für die spärliche Produktionszunahme des Kollagen Typs I unter PP bei den Osteoblasten und Fibroblasten sein, da gegebenenfalls eine maximale Dosis in der vierwöchigen Studie erreicht worden ist und in der kurzen Zeit nicht mehr PP umgesetzt werden könnte, als vorhanden war. Die geringfügige Zunahme des Kollagen Typs I der SaOS-2-Zellen unter ZOL und PAM zum Ende der vierwöchigen Studie ist sonderbar, da sich zuvor keine Tendenz abzeichnete. Bereits zuvor wurde ein positiver Einfluss der Bisphosphonate beschrieben, allerdings in beschränkter Form (Kellinsalmi et al. 2005). Hierbei handelte es sich um einen Vergleich von Proteinlevel von humanem, mesenchyalem Knochenmark abstammenden Stammzell(hMSC)-Osteoblasten nach Behandlung mit PAM und ZOL. Dabei wurden vier Konzentrationen gewählt (nur eine ist übereinstimmend mit der vorliegenden Studie, 1 μM). In dieser Konzentration von 1 μM konnte eine leichte Zunahme der Kollagensynthese unter PAM registriert werden, jedoch lag sie bei 1 μM ZOL unter der der Kontrollgruppe.

4.4 HPLC und SDS-PAGE

Das HPLC diente zur Analyse von Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxylslylpyridinolin (HP), beides sind Crosslinks im reifen Kollagen nach posttranslationaler Modifikation. HP setzt sich aus drei Hydroxylysin-Resten zusammen und LP besteht aus zwei Hydroxylysin-Resten und einem Lysin-Rest. Lysylpyridinolin ist spezifisch für Knochen und Dentin. Beides sind spezifische Marker des Knochengewebes und

zeigen den Abbau von reifen Kollagenen im Urin an. Da Hydroxylsilylpyridinolin und Lysylpyridinolin normalerweise renal eliminiert werden, liegen nur 45 % frei vor, die restlichen 55 % sind mittels Peptidbindung (Di- bis Telopeptidpyridinolin) gebunden. Die beiden Marker sind frei von Umwelteinflüssen, d. h., eine Nahrungsaufnahme kann die Werte nicht so verändern, wie es bei Hydroxyprolin der Fall ist. Somit steht eine sensitive und spezifische Methode zur selektiven Erfassung des Knochenabbaus zur Verfügung. Diese Marker fluoreszieren und sind fotometrisch detektierbar. Hydroxyprolin ist auch ein katabolischer Marker von Kollagenen des Knochengewebes, leider ist er in vielen Geweben vertreten und wie zuvor erwähnt durch Umwelteinflüsse steuerbar (Açil et al. 1993; Açil und Müller 1994). Sowohl die Zellproliferation mittels MTT-Tests als auch die Syntheserate des Kollagen Typs I mittels ELISA werden durch die Analysen der Crosslinks aus der HPLC erneut bekräftigt. Die beiden Bisphosphonate beweisen abermals, wie toxisch sie auf die extrazelluläre Matrixproduktion wirken, mit der Ausnahme von PAM und auch ZOL in der Konzentration von 5 und 1 μM . In diesen Konzentrationen wurde eine leichte Zunahme der Kollagen-Crosslinks verzeichnet, aber sie befinden sich dennoch unter dem Niveau der Kontrolle. Die Crosslink-Produktion nimmt besonders bei den Osteoblasten ab. Selbst Santini und Mitarbeiter (2006) beschreiben in einer klinischen Studie, wie ZOL eine Abnahme von β -crosslinked Kollagen Typ I C Telopeptid (βCTX) schon einen Tag nach der Infusion auslöste. Über den getesteten Zeitraum von bis zu 21 Tagen post infusionem von ZOL wurde eine mediane konstante Abnahme von 67,05 % von Kollagen-Crosslink βCTX verzeichnet.

Die Kollagen-Crosslinks kommen normalerweise in gesunden, gereiften und mineralisierten Geweben vor, jedoch sind diese in der vorliegenden Studie unter BP-Einfluss deutlich reduziert. Dies kann möglicherweise ein Grund dafür sein, warum in vivo der Knochen bei Patienten wenig regeneriert wird, wenn es zu einem Trauma in der Mundhöhle (z. B. einer Zahnextraktion o. Ä.) kommt (Migliorati et al. 2005). Im klinischen Erscheinungsbild wird eine Nekrose des Kieferknochens beschrieben, das bedeutet, es kommt zu keiner Heilung und Regeneration des Knochens und des umliegenden Gewebes. Zumeist wird ein fortschreitender Verlauf beschrieben (Melo und Obeid 2005b). Mithilfe der SDS-PAGE wird die qualitative Menge von Kollagen Typen demonstriert. Hiermit wird klar, dass eine stark verminderte Produktion der Kollagen Typen I, III und V stattfand. Es wird verdeutlicht, dass nicht nur eine geringe Produktion von Kollagen Typ I der Osteoblasten der Einzelfall ist, sondern auch,

dass die anderen Kollagen Typen III und V sowie weitere Zelltypen (Fibroblasten und SaOS-2-Zellen) betroffen sind. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Reinholz und seinen Mitarbeitern (2000), die eine Zunahme in der Kollagen-Typ-I-Produktion nachweisen konnten. Sie verwendeten unsterbliche humane fetale Osteoblasten (hFOB) und setzten sie PAM in den Konzentrationen von 1 bis 10 μM aus.

Die Kollagen Typen I, III und V kommen im Knochen vor und sind auch in anderen Organsystemen vorhanden. Besonders wichtig ist ihr Vorkommen beim Ehlers-Danlos-Syndrom (Açil et al. 1995). Die Kollagen Typen I, III und V sind ein Teil der Bindegewebsmatrix und essentiell für dessen physikochemische Eigenschaften und biomechanische Stabilität. Das könnte eine mögliche Ursache der in vielen klinischen Beispielen (Ficarra et al. 2005; Marx et al. 2005; Schirmer et al. 2005) beschriebenen sichtbaren, freiliegenden Knochen bei den Patienten unter Bisphosphonattherapie sein und ebenfalls eine Lockerung der umliegenden Zähne durch den Untergang des Bindegewebes erklären (Migliorati 2003; Ruggiero et al. 2004; Marx et al. 2005; Felsenberg et al. 2006). Diese Vergleiche sind natürlich rein hypothetisch zu betrachten, da Ergebnisse aus In-vitro-Studien niemals eins zu eins auf In-vivo-Studien oder klinisch beschriebene Ereignisse übertragen werden können. Nichtsdestoweniger sollten diese fiktiven Überlegungen angestrebt werden, da hieraus viele weitere Untersuchungen abgeleitet werden bzw. zukünftige Studien präziser auf gewisse Aspekte abzielen können und überdies bestimmte Faktoren limitiert oder hinzugefügt werden könnten.

4.5 Extrazelluläre Matrix

Eine genauere Analyse der produzierten Proteine der Zellkulturen veranschaulicht die starken negativen Einwirkungen der Bisphosphonate auf ihre spezifischen extrazellulären Produkte. Die Produktion der RNA unter ZOL weist einen stark toxischen Effekt auf alle Zelltypen auf, da kein einziger Schwellenwert in der RNA-Produktion erreicht wurde. Schwellenwerte unter PAM konnten nur in fünf- und einmikromolarer Konzentration erzielt werden. Diese Ergebnisse belegen die zuvor analysierten Potenzstärken von Fleisch (1997). Das Resultat der nicht erreichten Schwellenwerte sind keine nachweisbaren Produkte der Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen, denn die PCR repliziert nur DNA, wo der Schwellenwert erreicht

worden ist. Das heißt, es konnte keine Erzeugung von DNA für Osteocalcin oder diversen Kollagen Typen aufgezeichnet werden. Dieses Faktum lässt Grund zu der Annahme, dass die Dosis eventuell noch zu hoch angesetzt und toxisch oder dass es zu einer sehr starken Inhibition in der extrazellulären Matrixproduktion gekommen war. Letzteres würde eine mögliche Erklärung für die vielen klinischen Vorfälle liefern (Ruggiero et al. 2004; Ficarra et al. 2005; Grötz und Diel 2005). Trotz kurzzeitig reduzierter Knochenformation unter PAM bei einem Rattenversuch beschreiben auch Choi und Mitarbeiter (2007) eine Abnahme der Knochenregeneration. Es kam zu einer kurzzeitigen Knochenformation, welche allerdings nur in der ersten Woche registriert wurde. Ab der zweiten Woche ist dieser gebildete Knochen nekrotisch geworden und es wurde keine weitere Knochenbildung festgestellt. Generell demonstriert diese Studie eine sehr starke Verminderung der Knochenherstellung unter PAM.

Pyrophosphat konnte auch in diesem Fall seinen positiven Einfluss wiederholt belegen. Ein Unterschied zur vorherigen Kollagenanalyse mittels ELISA ist in der Kollagen-Typ-I-Synthese von Osteoblasten und SaOS-2-Zellen gezeigt worden. Im Gegensatz zum ELISA, wo PP deutlich positiver auf die Synthese von Kollagen Typ I bei SaOS-2-Zellen als auf die der Osteoblasten wirkte, wurde in der Analyse der extrazellulären Matrix eine verhältnismäßig gleichwertige Synthese des Kollagen Typs I registriert. Weiterhin überwiegt bei der molekularbiologischen Analyse unter PP die Kollagen-Typ-III-Produktion bei den SaOS-2-Zellen, und wiederum ist die Kollagen-Typ-V-Erzeugung bei den Osteoblasten höher. Die höheren Werte der alkalischen Phosphatase (ALP) bei den Osteoblasten und SaOS-2-Zellen unter PP weisen auf eine tatsächliche Wahrnehmung der knochenbildenden oder -abbauenden Funktion hin. Dennoch müssen die durchschnittlichen Werte genauer betrachtet werden; diese deuten auf eine Zunahme bei den Osteoblasten, aber nicht bei den SaOS-2-Zellen hin. Da bei den entarteten SaOS-2-Zellen geringere Werte dokumentiert wurden, kann die Funktion des Knochenumsatzes vermindert sein und eine Erklärung für die niedrige Konzentration dieses Proteins, der ALP, darstellen.

Die Aktivität der ALP bei Fibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen unter PAM und ZOL lag unterhalb der der Kontrollgruppe. Eine andere Untersuchung (Kellinsalmi et al. 2005) beschreibt keine durchschnittliche Abweichung in der Aktivität der ALP gegenüber der Kontrolle. Abweichungen der ALP sind allerdings bei

höheren Konzentrationen von Bisphosphonaten und den daraus resultierenden erhöhten Abnahmewerten der extrazellulären Matrix angegeben worden. Bei der vorliegenden Studie war eine Abweichung der Messwerte von der Standardkurve minimal (Abb. 27) und sollte somit kein Grund sein, die PCR-Methode für Abweichungen verantwortlich zu machen.

4.6 Schlussfolgerung

Die Studie demonstriert, dass Zoledronat und Pamidronat einen negativen Einfluss auf Fibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen (SaOS-2-Zellen) ausüben. Die Ergebnisse verdeutlichen eine reduzierte Proliferation der Zellen in der Kultur. Zudem ist auch die Proteinsynthese erniedrigt. Zwischen Zoledronat und Pamidronat ließ sich ein Potenzunterschied ermitteln, wobei sich Zoledronat als potenteres Substrat herausstellte. Dahingegen konnte keine Diskrepanz zwischen den beiden Bisphosphonaten auf einen spezifischen Zelltyp erkannt werden; sie zeigten in allen Zelllinien die gleiche toxische Wirkung. Unter Zoledronat sowie unter Pamidronat wurde auch die extrazelluläre Matrixproduktion der Kollagen Typen I, II, III und V herabgesetzt.

Hellsteins und Mareks These, die Bisphosphonate könnten die „Phossy-Jaws“ des 21. Jahrhunderts sein, ließe sich mittels der vorliegenden Studie bestätigen. Die Kieferknochennekrose unter BP-Therapie und die Nekrosen damaliger Fabrikarbeiter der Zündholzindustrie betreffen beide ein limitiertes Menschenspektrum und ähneln sich in ihrem klinischen Erscheinungsbild (Hellstein und Marek 2005).

Mittels der gewonnenen Ergebnisse aus dieser Studie gilt es, diese Beobachtungen eingehender zu untersuchen. Es wurden nicht viele In-vitro-Studien mit diesen humanen Zelltypen durchgeführt und auch nicht in dieser Länge (vier Wochen) vollzogen. Darum bietet dieses Gebiet noch viele weitgehend offene Fragen über mögliche positive Veränderungen in der Kollagenproduktion unter Bisphosphonaten. Dennoch ist deutlich, dass humane Zellen des Gingivafibroblast- und Osteoblasttyps unter Bisphosphonateinfluss eine Verminderung in der Kollagenproduktion aufweisen.

Zusätzlich zu weiteren Studien müssen Hinweise für die Kliniker erstellt werden. Bis dahin sollte ein sehr behutsames Therapieschema für Patienten mit Bisphosphonattherapie, sowohl mit oralen als auch parenteralen Bisphosphonaten, entwickelt werden. Die Zusammenarbeit zwischen Onkologen, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen und Zahnärzten sollte im klinischen Alltag gefördert werden, um somit eventuellen Komplikationen entgegenwirken zu können.

5. Zusammenfassung

Bisphosphonate (BP) sind nichtmetabolisierte Analoga des anorganischen Pyrophosphats (PP). BP haben die Fähigkeit, sich an Knochen zu binden, sie inhibieren die Osteoklastenaktivität und induzieren die Apoptose von Osteoklasten. Aufgrund der guten Knocheneinlagerung muss bei der Gabe von BP an eine lange Halbwertszeit von 3 bis 20 Jahren, abhängig von der Knochenumsatzrate, gedacht werden. In neueren klinischen Berichten wird über eine erhöhte Osteonekroserate (ONJ = osteonecrosis of the jaw) unter Bisphosphonattherapie berichtet. In einem In-vitro-Modell wurde anhand verschiedener Zelllinien die Wirkung von BP auf humane Bindegewebs-, Knochen- und Osteosarkomzellen untersucht. Humane Gingivafibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen (SaOS-2) wurden in 6er Well-Platten angezchtet und 4 Wochen lang mit supplementiertem Nährmedium behandelt. Als Supplement dienten Zoledronat (ZOL), Pamidronat (PAM) und PP in vier verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20 μM). Abschließend wurde die Zellzahl ermittelt und die Zellproliferation untersucht. Die Kollagensynthese wurde durch ELISA, HPLC-Analyse und molekularbiologische Methoden ermittelt. Es wurde eine Hemmung in der Zellproliferation unter BP beobachtet. In der Zellzählung wurde eine Reduzierung der Osteo- und Fibroblasten unter ZOL und PAM, außer bei PAM in einer Konzentration von 1 und 5 μM , festgestellt. PP hatte bei allen Zelllinien einen meist proliferativen Effekt. Im ELISA zeigte sich eine starke Reduktion der Kollagenkonzentration bei Fibroblasten, und bei Osteoblasten wurde eine noch stärkere Reduktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen sichtbar. Die HPLC beschreibt eine Abnahme in der Reifung der Kollagen Typen I und V durch die beiden BP. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung bestätigen die Tendenz der zuvor genannten Ergebnisse der einzelnen BP. In durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass ZOL im Vergleich zu PAM eine höhere toxische Wirkung hat. Neben den bekannten Kurzuntersuchungen über eine Woche konnte im Langzeitversuch über 4 Wochen eine deutliche Verminderung der Proliferation und Reduktion der Kollagensynthese nicht nur auf Osteoblasten, sondern auch bei Gingivafibroblasten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse könnten Gründe für die Entstehung der Osteonekrose liefern.

6. Literaturverzeichnis

Abu-Id MH, Açil Y, Gottschalk J, Kreusch T. Bisphosphonatassoziierte Osteonekrose des Kiefers. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2006; 10: 73–81.

Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, Springer I, Wiltfang J, Açil Y, Russo PA, Kreusch T. „Bis-phossy jaws“ – high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008; 36: 95–103.

Açil Y, Bätge B, Müller PK. Pyridinoline (Quervernetzungs-komponenten des reifen Kollagengewebes) als sensitive und spezifische Marker für den Knochenabbau. *Focus Mul.* 1993; 10: 232–235.

Açil Y, Müller PK. Rapid method for the isolation of the mature collagen crosslinks, hydroxylslypyridinoline and lysylpyridinoline. *J Chromatogr A.* 1994; 44: 183–188.

Açil Y, Vetter U, Brenner R, Müller PK, Brinckmann J. Ehlers-Danlos syndrome type VI: Corss-link pattern in tissue and urine sample as diagnostic marker. *J AM Acad Dermatol.* 1995; 33: 522–524.

Açil Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51: 703–710.

Açil Y, Springer ING, Broek V, Terheyden H, Jepsen S. Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem.* 2002; 86: 90–98.

Acosta FL, Chin CT, Quiñones-Hinojosa A, Ames CP, Weinstein PR, Chou D. Diagnosis and management of adult pyogenic osteomyelitis of the cervical spine. *Neurosurg Focus.* 2004; 17: E2.

Applied Biosystems (2001): User Bulletin #2. Mannheim, Deutschland.

Auf'mkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER. Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int.* 1985; 37: 228–235.

Bauwens SF (2002): Osteoporosis and osteomalacia. In: DiPiro T, ed. *Pharmacotherapy: A pathophysiologic approach*, 1293–1312, 5th ed. McGraw-Hill, New York, NY, USA.

Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*. 2001; 28: 465–473.

Blomen LJ MJ. (1995): History of the bisphosphonates: discovery and history of the non-medical uses of bisphosphonates. In: Bijvoet OLM, Fleisch HA, Canfield RE, Russell RGG, eds. *Bisphosphonate on Bones*, 111–124, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000; 25: 169–193.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002; 29: 23–39.

Choi JY, Kim HJ, Lee YC, Cho BO, Seong HS, Cho M, Kim SG. Inhibition of bone healing by pamidronate in calvarial bone defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103: 321–328.

Colucci S, Minielli V, Zambonin G, Cirulli N, Mori G, Serra M, Patella V, Zambonin Zallone A, Grano M. Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int*. 1998; 63: 230–235.

Coxon JP, Oades GM, Kirby RS, Colston KW. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU International*. 2004; 94: 164–170.

Denoyelle C, Hong L, Vannier J-P, Soria J, Soria C. New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *BJ Cancer*. 2003; 88: 1631–1640.

Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate

synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296: 235–242.

Durie BGM, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med.* 2005; 353 : 99–102.

Felsenberg D, Hoffmeister B, Amling M, Mundlos, Seibel, Fratzl P. Kiefernekrosen nach hoch dosierter Bisphosphonattherapie. *Deutsches Ärzteblatt.* 2006; 46: 3078–3080.

Ficarra FG, Beninati F, Rubio I, Vannucchi A, Longo G, Tonelli P, Pini Prato G. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 1123–1128.

Fitzpatrick LA. (1994): Glucocorticoid-induced osteoporosis. In: Marcus R, ed. *Osteoporosis*, 202-226, Blackwell Scientific Publications. Boston, MA, USA.

Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease. In: *The laboratory to the patient*, 3rd ed. The Parthenon Publishing Group, New York, USA; 1997.

Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocr Rev.* 1998; 19: 80–100.

Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(β,γ -dichloromethylene) triphosphate by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 1997; 12: 1358–1367.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996; 6: 995–1001.

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblasts precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone.* 1998a; 22: 455–461.

Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol.* 1998b; 27: 38–41.

Gonzalez-Moles MA, Bagan-Sebastian JV. Alendronate-related oral mucosa ulcerations. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29: 514–518.

Green JR. Bisphosphonates in cancer therapy. *Curr Opin Oncol.* 2002; 14: 609–615.

Grötz KA, Diel IJ. Osteonekrose des Kiefers unter Bisphosphonat-Langzeittherapie. *Im Focus Onkologie.* 2005; 2: 52–55.

Hellstein JW, Marek CL. Bisphosphonate osteochemonecrosis (Bis-phossy jaw): Is this phossy jaw of the 21st century? *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63: 682–689.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology.* 1993; 11: 1026–1030.

Hoefert S, Eufinger H. Kieferknochennekrosen als mögliche unerwünschte Wirkung von Bisphosphonaten. *Mund Kiefer GesichtsChir.* 2005; 9: 233–238.

Hortobagyi GN, Theriault RL, Porter L, Blayney D, Lipton A, Sinoff C, Wheeler H, Simeone JF, Seaman J, Knight RD, Heffernan M, Reitsma DJ, Kennedy I, Allan SG, Mellars K. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1785–1791.

Hunter D. *The disease of occupations.* 5th ed. London, UK: English Univ. Press; 1969 (127): 374–383.

Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem.* 1981; 112: 70–75.

Jung A, Bisaz S, Fleisch H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calc Tiss Res.* 1973; 11: 269–280.

Karow T, Lang-Roth R. (2006): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 14. Aufl., 665–667, Karow/Lang, Pulheim, Deutschland.

Kasting GB, Francis MD. Retention of etidronate in human, dog, and rat. *J Bone Miner Res.* 1992; 7: 513–522.

Ke LD, Chen Z, Yung WKA. A reliability test of standard based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standard. *Mol Cell Probe*. 2000; 14: 127–135.

Kellinsalmi M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, Leskelä HV, Parikka V, Hämäläinen M, Lehenkari P. In vitro comparison of clodronate, pamidronate and zoledronic acid effects on rat osteoclasts and human stem cell-derived osteoblasts. *Bas Clin Pharm Tox*. 2005; 97: 382–391.

Khokher MA, Dandona P. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. *Metabolism*. 1989; 38: 184–187.

Kumar SKS, Meru MC, Sedghizadeh PP. Osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy: A case series. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 1: 63–69.

Liu W, Saint DA. Validation of quantitative method for real-time PCR kinetics. *Biochem Bioph Res Co*. 2002; 294: 347–353.

Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russel RGG, Roger MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998; 13: 581–589.

Marx RE. Osteoradionecrosis: A new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg*. 1983; 41: 283–288.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61: 1115–1118.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-Induced exposed bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63: 1567–1575.

Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: Risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65: 2397–2410.

Melo MD. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaws: A pathophysiologic paradox? *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62 (supplement): 66.

Melo MD, Obeid G. Osteonecrosis of the jaws in patients with a history of receiving bisphosphonate therapy. *JADA.* 2005a; 136: 1675–1681.

Melo MD, Obeid G. Osteonecrosis of the maxilla in a patient with a history of bisphosphonate therapy. *J Can Dent Assoc.* 2005b; 71(2): 111–113.

Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 4253–4254.

Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *JADA.* 2005; 136: 1658–1668.

Miles AEW. Phosphorus necrosis of the jaw: “Phossy jaw”. *Br Dent J.* 1972; 133: 203–205.

Mönkkönen J, Koponen HM, Ylitalo P. Comparison of the distribution of three bisphosphonates in mice. *Pharmacol Toxicol.* 1990; 66: 294–298

Neville-Webbe HL, Rostami-Hodjegan A; Evans CA, Coleman RE, Holen I. Sequence- and schedule-dependent enhancement of zoledronic acid induced apoptosis by doxorubicin in breast and prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2005; 113: 364–371.

Newton CR, Graham A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Deutschland.

O’Connell MB, Elliot ME (2002): Osteoporosis and osteomalacia. In: DiPiro T, ed. (McGraw-Hill). *Pharmacotherapy: A pathophysiologic approach*, 5th ed, 1690, New York, NY, USA.

Purcell PM, Boyd IW. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *MJA.* 2005; 182: 417–418.

Ramaswamy B, Shapiro CL. Bisphosphonates in the prevention and treatment of bone metastases. *Oncology*. 2003; 17: 1261–1270.

Rauch F, Travers R, Plotkin H, Glorieux FH. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest*. 2002; 110: 1293–1299.

Reid IR. Pathogenesis and treatment of steroid osteoporosis. *Clin Endocrinol*. 1989; 30: 83–103.

Reid IR, Brown JP, Burckhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechsel U, Widmer A, Devogelaer JP, Kaufman JM, Jaeger P, Body JJ, Meunier PJ. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *New Engl J Med*. 2002; 346: 653–661.

Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Research*. 2000; 60: 6001–6007.

Rodan GA, Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanism of action. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2692–2696.

Roelfs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: Current status. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 6222–6230.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates: Skeletal complications of malignancy. *Cancer*. 2000; 88: 2961–2978.

Roggendorf W, Strunz V, Gross UM. Osteoblasten-Zellkulturen. *Z Zahnärztl Implantol*. 1986; 2: 197–202.

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: A review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62: 527–534.

Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Chen B. A randomized, placebo controlled trial of zoledronic

acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 1458–1468.

Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Zheng M. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 879–882.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487–491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning – A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA.

Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, Gavasci M, Rocci L, Triindelli MC, Altomare V, Tocchini M, Bonsignori M, Tonini G. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 2893–2897.

Santini D, Vincenzi B, Hannon RA, Brown JE, Dicuonzo G, Angeletti S, La Cesa A, Coleman RE, Tonini G, Budillon A, Caraglia M, Holen I. Changes in bone resorption and vascular endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. *Oncol Rep.* 2006; 15: 1351–1357.

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest.* 1991; 88: 2095–2105.

Schirmer I, Peters H, Reichart PA, Dürkop H. Bisphosphonate und Osteonekrosen im Kieferbereich. *Mund Kiefer GesichtsChir.* 2005; 9: 239–245.

Sietsema WK, Ebetino FH. Bisphosphonates in development for metabolic bone disease. *Exp Opin Invest Drugs.* 1994; 3: 1255–1276.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnol.* 1999; 75: 291–295.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology Research.* 2002; 3 (7): research0034.1–0034.11.

Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT. The molecular basis of sparse for mouse mutation. *Science.* 1987; 237: 415–417.

Vitté C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology.* 1996; 137: 2324–2333.

Weinstein RS. Glucocorticoid induced osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001; 2: 65–73.

Whyte MP (2002): Osteopetrosis. In: Royce PM, Steinmann B, eds. *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects*, 2nd ed. Wiley-Liss, New York, NY, USA; 789-907.

Whyte MP, Wenkert D, Clements KL, McAlister WH, Mumm S. Bisphosphonate-Induced Osteopetrosis. *N Engl J Med.* 2003; 349: 457-463.

Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *JPET.* 2002; 302: 1055–1061.

Woodward JK, Neville-Webbe HL, Coleman RE, Holen I. Combined effects of zoledronic acid and doxorubicin on breast cancer cell invasion in vitro. *Anti-cancer drugs.* 2005; 16: 845–854.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Y. Açil danke ich sehr für die freundliche Überlassung des Themas und dafür, dass er mir immer vertrauenswürdig mit Rat und Tat betreuend zur Seite stand und mich engagiert bei der Durchführung und Auswertung der Experimente unterstützt hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang für die Bereitstellung von finanziellen Mitteln – für die Durchführung der Experimente – und der wissenschaftlichen Laboratorien der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Niehoff für die Bereitstellung der Medikamente (Pamidronat und Zoledronat), die Nutzung der Literaturrecherche in der radiologischen Klinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und für seine freundliche Unterstützung bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Romanos für seine permanente Motivation und unermüdlichen Unterhaltungen. Für seine Bereitschaft bei der Fertigstellung der Promotionsarbeit bin ich ihm sehr dankbar.

Für die tatkräftige Unterstützung der Experimente und fachkundige Beratung möchte ich mich sehr herzlich bei Frau G. Otto bedanken.

Frau Benning und Herrn Weiner gilt mein Dank für die Hilfe bei der Literaturrecherche.

Natürlich gehört mein besonderer Dank meinen Eltern, meiner Schwester, meiner Freundin und meinen Großeltern für ihre unermüdliche Unterstützung während des Studiums und bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit.

8. Lebenslauf



PERSÖNLICHE DATEN:

Geburtstag: 11. Oktober 1982
Geburtsort: Poznan, Polen
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Eltern: Dr. med. dent. Beata Simon
 Dipl.-Volkswirt Kai Simon
Familienstand: Ledig

SCHULE:

08/1989 – 07/1993 Grundschole in Hamburg
 08/1993 – 07/1999 Gymnasium: Sankt-Ansgar-Schole in Hamburg
 07/1999 – 06/2000 East Henderson High-School, Abschluss in den USA
 08/2000 – 07/2002 Sankt-Ansgar-Schole in Hamburg / Abitur

BUNDESWEHR:

10/2002 – 06/2003 Grundwehrdienst – Sanitätsdienst im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

STUDIUM:

seit 10/2003 Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 09/2005 1. Staatsexamen
 09/2007 - 06/2008 Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, Spanien - ERASMUS
 11/2009 2. Staatsexamen und Approbation in Kiel

PRAKTISCHES JAHR:

08/2008 – 10/2008 Innere Medizin: St. Vincent's Hospital – University of New South Wales, Sydney, Australien
 10/2008 – 12/2008 Innere Medizin: Royal North Shore Hospital – University of Sydney, Sydney, Australien
 12/2008 – 04/2009 Pathologie: Università delgi Studi 'G. d'Annunzio' Chieti e Pescara, Chieti, Italien
 04/2009 – 07/2009 Chirurgie: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein – Campus Kiel

WISSENSCHAFT:

seit 10/2005 Beginn dieser Promotionsarbeit für das Fach der Humanmedizin an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 05/2007 Wissenschaftlicher Beitrag zur 20. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Implantologie
 07/2009 Publikation: Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig.* 2009 Jul 14 [Epub ahead of print]