



# Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Wirkstoffen

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

**Nadja Raaijmakers**

geboren in Deventer, Niederlande

Würzburg, 2013

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

\_\_\_\_\_

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Jakob
2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Högger

Prüfer des öffentlichen Promotionkolloquiums:

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:

Datum des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
3.1	OSTEOPOROSE .....	5
3.1.1	<i>Wirtschaftliche Eckdaten</i> .....	5
3.1.2	<i>Krankheitsbild Osteoporose</i> .....	5
3.1.3	<i>Gestörte Knochenhomöostase bei Osteoporose</i> .....	7
3.1.3.1	Knochenhomöostase.....	7
3.1.3.2	Knochenresorption und -Formation .....	7
3.1.4	<i>Knochenmetastasierung bei Mamma- und Prostatakarzinomen</i> .....	9
3.2	BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN VON OSTEOPOROSE.....	10
3.2.1	<i>Calcium und Vitamin D</i> .....	10
3.2.2	<i>Antiresorptive Therapie</i> .....	11
3.2.2.1	HRT (Hormonersatztherapie).....	11
3.2.2.2	SERMs (Selektive Estrogen-Rezeptor Modulatoren) .....	11
3.2.2.3	Bisphosphonate.....	13
3.2.2.4	RANKL-Antikörper .....	14
3.2.2.5	Cathepsin-K-Antagonisten .....	16
3.2.2.6	Calcitonin.....	16
3.2.3	<i>Osteoanabole Therapie</i> .....	17
3.2.3.1	Teriparatid .....	17
3.2.3.2	Strontiumranelat .....	18
3.2.3.3	SOST-Antikörper .....	18
3.2.3.4	Fluorid .....	19
3.3	TRAUBENSILBERKERZE (CIMICIFUGA RACEMOSA).....	20
3.3.1	<i>Portrait der Pflanze</i> .....	20
3.3.2	<i>Anwendung in der Geschichte</i> .....	21
3.3.3	<i>Vermutete Inhaltsstoffe</i> .....	22
3.3.3.1	Phytoöstrogene? .....	22
3.3.3.2	Triterpene.....	24

3.3.3.3	Phenolsäuren.....	26
3.3.3.4	N-Methylserotonin.....	27
3.4	ZIEL DER ARBEIT .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
4.1	MATERIAL.....	30
4.1.1	<i>Geräte</i> .....	30
4.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	31
4.1.3	<i>Chemikalien/Reagenzien</i> .....	31
4.1.4	<i>Kits</i> .....	32
4.1.5	<i>Primer</i> .....	33
4.1.5.1	Primer für semi-quantitative PCR .....	33
4.1.5.2	Primer für quantitative Realtime-PCR.....	34
4.1.6	<i>Vektoren</i> .....	35
4.1.7	<i>Software und Internetseiten</i> .....	35
4.1.8	<i>Lösungen, Puffer und Medien</i> .....	36
4.1.8.1	Allgemeine Lösungen .....	36
4.1.8.2	Zellkulturmedien .....	39
4.2	METHODEN.....	42
4.2.1	<i>Fraktionierungsprozess von Cimicifuga racemosa</i> .....	42
4.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	43
4.2.2.1	Isolierung von zellulärer RNA.....	43
4.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43
4.2.2.3	Reverse Transkription .....	43
4.2.2.4	Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
4.2.2.5	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion .....	45
4.2.2.5.1	Durchführung .....	45
4.2.2.5.2	Auswertung .....	46
4.2.2.6	Agarosegelelektrophorese .....	47
4.2.2.6.1	Denaturierende Agarosegelelektrophorese.....	47
4.2.2.6.2	Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese.....	48

4.2.2.7	Mikroarray-Analysen .....	48
4.2.2.7.1	Statistische Auswertung von Mikroarray-Daten .....	49
4.2.3	<i>Zellbiologische Methoden</i> .....	49
4.2.3.1	Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) aus Spongiosa/Hüftkopf .....	49
4.2.3.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	50
4.2.3.3	Bestimmung der Zellzahl .....	50
4.2.3.4	Messung der Apoptose .....	51
4.2.3.5	Messung der Proliferation.....	51
4.2.3.6	Berechnung der Populationsverdopplung zur Bestimmung der Seneszenz	51
4.2.3.7	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen .....	52
4.2.3.8	Differenzierung.....	52
4.2.3.8.1	Osteogene Differenzierung von hMSC und SaOs-2.....	52
4.2.3.8.2	Adipogene Differenzierung von hMSC.....	52
4.2.3.8.3	Transdifferenzierung von hMSC.....	53
4.2.3.9	Zytochemische Färbungen .....	53
4.2.3.9.1	Alizarin Rot S-Färbung .....	53
4.2.3.9.2	Ölrot O-Färbung.....	54
4.2.4	<i>Biochemische Methoden</i> .....	54
4.2.4.1	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford .....	54
4.2.4.2	Bestimmung der Biolumineszenz .....	54
4.2.4.3	Bestimmung von oxidativem Stress.....	55
4.2.4.3.1	Messung der Glutathionperoxidase (GPx) .....	55
4.2.4.3.2	Messung der Thioredoxin Reduktase (TrxR) .....	55
4.2.4.4	Untersuchung der Extrakte auf die P16-Promotoraktivität.....	55
4.2.4.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativem Maßstab.....	55
4.2.4.4.2	Transiente Transfektion .....	56
4.2.4.5	Mechanotransduktion.....	57

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
5.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR TOXIKOLOGIE VON CIMICIFUGA RACEMOSA UND DEREN AUFGEREINIGTER SUBFRAKTIONEN.....	59
5.1.1	<i>Apoptose- und Proliferationsstudien in verschiedenen Zellen und Zelllinien.....</i>	59
5.1.1.1	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) .....	59
5.1.1.2	Prostatakarzinomzellen (LNCaP) .....	62
5.1.1.3	Mammakarzinomzellen (MCF7 und MDA-MB-231).....	63
5.1.1.4	Osteosarkomzellen (SaOs-2) .....	66
5.1.1.5	Murine präosteoblastäre Zellen (mc3t3-e1).....	67
5.1.1.6	Murine osteoklastäre Zellen (RAW264.7).....	68
5.1.2	<i>Untersuchungen zum Effekt von Cimicifuga racemosa auf antioxidative Enzyme..</i> .....	69
5.1.2.1	GPx-Aktivität.....	69
5.1.2.2	TrxR-Aktivität.....	70
5.1.3	<i>Untersuchungen zur Seneszenz .....</i>	72
5.1.3.1	Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung in hMSC.....	72
5.1.3.2	Genexpressionsmuster von P16 und PSG5 während der Seneszenz.....	73
5.1.3.3	P16-Promotoranalysen mit Extrakten von Cimicifuga racemosa .....	78
5.2	DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA UND DEREN AUFGEREINIGTER SUBFRAKTIONEN AUF HMSC UND SAOS-2-ZELLEN .....	79
5.2.1	<i>Transdifferenzierungsstudien in hMSC.....</i>	79
5.2.2	<i>Adipogene Differenzierungsstudien in hMSC.....</i>	82
5.2.3	<i>Osteogene Differenzierung.....</i>	88
5.2.3.1	HMSC .....	88
5.2.3.2	SaOs-2-Zellen.....	94
5.3	UNTERSUCHUNGEN VON MECHANOSENSITIVITÄT VON CIMICIFUGA RACEMOSA UND DEREN AUFGEREINIGTER SUBFRAKTIONEN AUF HMSC-TERT .....	100
5.3.1	<i>HMSC-TERT-SP1.....</i>	100
5.3.2	<i>HMSC-TERT-AP1 .....</i>	102
5.4	MIKROARRAY-ANALYSEN VON CIMIFUGA RACEMOSA AUF HMSC .....	105
5.4.1	<i>Comparison-Analyse von C001 auf hMSC .....</i>	105
5.4.1.1	Technische Evaluierung der Comparison-Analyse von C001 auf hMSC.....	105

5.4.2	<i>SAM-Analyse von C001/S auf hMSC</i> .....	108
5.4.2.1	Technische Evaluierung der SAM-Analyse von C001/S auf hMSC.....	109
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>112</b>
6.1	SAFETY VON CR .....	113
6.1.1	<i>Zytotoxizität von Cimicifuga racemosa</i> .....	114
6.1.1.1	Extrakte von CR verbessern das Überleben von hMSC.....	114
6.1.1.2	CR-Extrakte führen zu einem verbesserten Überleben von Tumorzelllinien und saponinhaltige Extrakte wirken anti-proliferativ .....	116
6.1.1.3	CR-Extrakte wirken anti-apoptotisch und proliferations-induzierend auf SaOs-2-Zellen.....	117
6.1.1.4	CR-Extrakte wirken anti-proliferativ auf osteoblastäre Mauszellen.....	118
6.1.1.5	C001 wirkt anti-proliferativ auf osteoklastäre Mauszellen.....	119
6.1.2	<i>Keine antioxidative Wirkeigenschaften von C001/S in SaOs-2-Zellen</i> .....	120
6.1.3	<i>CR-Extrakte haben keinen Einfluss auf die Seneszenz von hMSC</i> .....	120
6.2	DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN MIT CR.....	122
6.2.1	<i>Transdifferenzierungsstudien</i> .....	122
6.2.1.1	Saponinhaltige Extrakte von CR induzieren Osteogenese vs. Adipogenese in hMSC .....	123
6.2.2	<i>Adipogene Differenzierungsstudien mit CR</i> .....	124
6.2.2.1	R3 induziert Adipogenese in hMSC.....	125
6.2.2.2	Saponinhaltige Fraktionen inhibieren die Adipogenese von hMSC.....	125
6.2.2.3	C001 hemmt Adipogenese in hMSC.....	126
6.2.3	<i>Osteogene Differenzierungsstudien mit CR</i> .....	127
6.2.3.1	R3 induziert Osteogenese in hMSC.....	127
6.2.3.2	CR induziert Genexpression von SOST in hMSC.....	128
6.2.3.3	Nettoeffekte vs. Effekte der Subfraktionen werden deutlich anhand des Genexpressionsprofils knochenrelevanter Gene in SaOs-2-Zellen.....	129
6.2.4	<i>CR beeinflusst nicht die zelluläre Mechanosensitivität</i> .....	130
6.2.5	<i>Mikroarray-Analysen sind für Vielstoffgemische wie CR nicht geeignet</i> .....	131
6.2.6	<i>Zusammenfassung</i> .....	132
6.2.7	<i>Ausblick</i> .....	134

<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>148</b>
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	148
8.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	151
8.3	FORMELVERZEICHNIS.....	152
8.4	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....	153
8.5	DANKSAGUNG.....	155

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Osteoporose ist einer der häufigsten Knochenerkrankungen im fortschreitenden Alter und zählt, aufgrund der damit verbundenen hohen direkten und indirekten Behandlungskosten, zu einer der zehn wichtigsten volkswirtschaftlichen Krankheiten. Die Behandlung der Osteoporose ist langjährig und umfasst eine medikamentöse Therapie auf der Basis einer „knochengesunden“ Lebensweise hinsichtlich Ernährung und Bewegung. Im Rahmen von Untersuchungen zur Linderung von postmenopausalen Beschwerden, zeigte ein Extrakt der Pflanze *Cimicifuga racemosa* Potential zu osteoprotektiver Wirksamkeit und rückte somit in den Fokus für eine mögliche Anwendung in der Therapie und Prophylaxe von Osteoporose. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in enger Zusammenarbeit mit der Bionorica SE, welche für die Aufreinigung und Fraktionierung des Pflanzenextraktes zuständig war, und mit der Arbeitsgruppe um Prof. Wuttke, welche parallele Rattenstudien durchführte, Methoden anzuwenden, mit denen osteoprotektive Wirksamkeiten nachgewiesen und auf einzelne Fraktionen des Extraktes limitiert werden können.

Toxizitätsuntersuchen und Analysen des Regenerationspotentials der verschiedenen Extrakte in primären mesenchymalen Stammzellen (hMSC), ausgewählte Tumorzelllinien und Mauszelllinien, zeigten die unterschiedlichen Wirksamkeiten der angereicherten Komponenten in den einzelnen Fraktionen. Ergänzt wurden die Safety-Studien durch Bestimmung des Einflusses der Pflanzenextrakte auf die Replikative Seneszenz und ihrer genotoxischen Wirkung durch Messung des auf oxidativen Stresses in hMSC. Die insgesamt positiven Safety-Studien eignen sich zur Untersuchung von Vielstoffgemischen, wie *Cimicifuga racemosa* und deren aufgereinigten Subfraktionen und erlauben, von diesem Standpunkt aus, eine unbedenkliche Einnahme. Für die Analysen der osteoprotektiven Eigenschaften wurden Differenzierungsstudien mit den einzelnen Fraktionen durchgeführt. Dafür wurde die Wirkung auf die Transdifferenzierungskapazität, die adipogene Differenzierung und osteogener Differenzierung von hMSC untersucht. Zusätzlich wurde das Genexpressionsprofil von ausgewählten fett- und knochenrelevanten Genen untersucht. Die angewandten Methoden zeigten eine erhebliche Komplexität der angereicherten Wirkkomponenten in den einzelnen Fraktionen. So zeigen saponinhaltige Fraktionen eine Zunahme der adipogenen Differenzierung, wohingegen ausgewählte wasserlösliche Inhaltsstoffe zu einer Induktion der

Osteogenese führen. Der Gesamtpflanzenextrakt, der durch die Vereinigung aller Inhaltsstoffe wiederum andere Auswirkungen auf die Differenzierungen aufweist, unterstützt die Umwandlung von Adipozyten zu Osteoblasten in Transdifferenzierungsstudien. Diese vorliegende Komplexität durch das Zusammenspiel einzelner Wirkkomponenten erschwert die Anwendung von Untersuchungsmethoden zur mechanoresponsiven Aktivität der Extrakte und zur Aufklärung des Genexpressionsprofils im Rahmen einer Mikroarray-Analyse, die erst zur Anwendung kommen sollten, wenn eine Fraktion hinsichtlich ihrer osteoprotektiven Eigenschaften optimiert ist.

*Cimicifuga racemosa* enthält definitiv Bestandteile die für eine Anwendung in der Therapie oder sogar in der Prophylaxe von Osteoporose sprechen. Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren werden sich mit zunehmender Anreicherung der wirksamen Inhaltsstoffe noch besser eignen um ein einsetzbares Arzneimittel mit definierten Wirkprofil zu designen.

## 2 SUMMARY

Osteoporosis is one of the most common bone diseases in advancing age and is, due to the associated high direct and indirect costs of treatment, one of the ten most important economic diseases. The treatment of osteoporosis lasts for many years and covers a drug therapy based on a "bone-healthy" lifestyle regarding diet and exercise. As part of investigations for the relief of postmenopausal symptoms *Cimicifuga racemosa* showed potential to osteoprotective effectiveness and thus the focus places special emphasis to the potential application in the treatment and prevention of osteoporosis. The aim of the present study was therefore, in close cooperation with the Bionorica SE, which was responsible for the purification and fractionation of the plant extract and the research group of Professor Wuttke, which conduct parallel rat studies, to investigate methods which demonstrate osteoprotective efficacies and may be limited to individual fractions of the extract.

Analysis of toxicity and of the regeneration potential of different extracts on primary mesenchymal stem cells (hMSCs), selected tumor cell lines and mouse cell lines, showed different activities of the enriched components in the individual fractions. This safety studies were supplemented with the determination of the effect of plant extracts on the replicative senescence of hMSC and genotoxic effects of oxidative stress. The overall positive safety studies are suitable for the study of multicomponent mixtures such as *Cimicifuga racemosa* and their purified subfractions and allow unproblematic intake. For research of osteoprotective properties or possible active components, differentiation studies were performed with the individual fractions. For this, the effect on transdifferentiation capacity, adipogenic differentiation and osteogenic differentiation of hMSC was investigated. In addition, the gene expression profile of selected fat and bone-related genes was analyzed. The methods showed considerable complexity of the enriched active components in the individual fractions. Saponin-enriched fractions showed an increase in adipogenic differentiation, whereas selected water-soluble fractions lead to an induction of osteogenesis. The whole plant extract, which in turn has the union of all the other ingredients, support the transdifferentiation of adipocytes into osteoblasts. This present complexity through the interaction of individual active components complicates the application of research methods to mechanoresponsive activity of the extracts and to investigation of gene expression profiles

in microarray analysis. This methods should not be used until a fraction is optimized in terms of osteoprotective properties.

*Cimicifuga racemosa* definitely contains osteoprotective components quoting for the use in therapy or even in the prevention of osteoporosis. The methods used in this work are, with increasing concentration of the active ingredients, suitable to a deployable design of drugs with defined activity profile.

## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Osteoporose

#### 3.1.1 *Wirtschaftliche Eckdaten*

Osteoporose ist die am häufigsten vorkommende Systemerkrankung des Knochens. Allein in Deutschland sind zwischen 6 bis 8 Millionen Menschen betroffen, weltweit werden über 200 Millionen Krankheitsfälle gezählt. Die Krankheitskosten in Deutschland belaufen sich auf etwa 5,4 Milliarden Euro jährlich und Osteoporose gehört somit zu den teuren Volkskrankheiten wie Diabetes (ca. 5,1 Mrd. Euro) und ischämische Herzerkrankungen (ca. 7 Mrd. Euro). Da die Inzidenz der Krankheitsfälle in den nächsten Jahren um das Doppelte zunehmen wird und die Kosten bis dahin mit etwa 78 Milliarden Euro extrapoliert werden, ist gesundheitspolitisches Handeln dringend geboten. Mit der Behandlung nach einer konsequenten leitliniengerechte Therapie könnte die Hälfte aller auftretenden Fragilitätsfrakturen verhindert werden (Hadji et al., 2013).

#### 3.1.2 *Krankheitsbild Osteoporose*

Osteoporose ist eine Skeletterkrankung, charakterisiert durch Verminderung der Knochenmasse und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Osteoporose als eine Abnahme der Knochensubstanz um mehr als 2,5 Standardabweichungen im Vergleich zu einer jungen Kontrollgruppe (Jap D., 2001). Durch die Reduktion der Festigkeit des Knochengewebes sind die Erkrankten stärker anfällig für Frakturen, die typischerweise den Wirbelkörper, den distalen Radius und den proximalen Femur betreffen. Jede 4. Person über 50 Jahre erkrankt früher oder später an Osteoporose. Dabei wird zwischen einer primären Osteoporose und einer sekundär auftretenden Osteoporose unterschieden. Eine primäre Osteoporose wird in zwei Typen unterteilt. Bei der primären Osteoporose vom Typ I sind überwiegend Frauen zwischen 50 und 70 Jahren betroffen. Sie wird durch die Hormonumstellung in den eintretenden Wechseljahren ausgelöst und basiert somit hauptsächlich auf einen Verlust der weiblichen Geschlechtshormone, der Östrogene. Hinzu kommen weitere Risikofaktoren, wie ein Mangel an Kalzium und Vitamin D, sowie Bewegungsarmut. Die primäre Osteoporose vom Typ II betrifft Männer gleichermaßen wie Frauen. Sie tritt gehäuft ab einem Alter von 70

Jahren auf und wird daher auch als senile Osteoporose bezeichnet. Die Erkrankung ist einerseits auf den fallenden Östrogenspiegel zurückzuführen und andererseits auf den natürlichen Alterungsprozess der Knochen, sowie Kalzium- und Vitamin D Mangel und fehlender Bewegung. Sind keine erkennbaren Gründe für eine Osteoporose vorhanden, wird diese auch idiopathische Osteoporose genannt und zählt zu den primären Osteoporosen. Etwa 5 % der Osteoporose-Erkrankungen zählen zur sekundären Osteoporose und betrifft Frauen gleichermaßen wie Männer. Die sekundäre Osteoporose entwickelt sich häufig aus bereits bestehenden Grunderkrankungen, wovon einige in Tabelle 1 aufgelistet sind.

**TABELLE 1 ÜBERSICHT ÜBER GRUNDERKRANKUNGEN BEI SEKUNDÄRER OSTEOPOROSE ZUSAMMENGEFASST NACH DER „LANGFASSUNG DER LEITLINIEN DES DACHVERBANDES OSTEOLOGIE DVO“ (WWW.DV-OSTEOLOGIE.DE).**

<b>Ursache</b>	<b>Beispiele</b>
Metabolische Grunderkrankungen	Cushing-Syndrom; Hyperthyreose; Akromegalie; Diabetes Mellitus; Hyperparathyreodismus
Medikamentöse Ursachen	Glukokortikoide; Schilddrüsenhormone; Heparine; LH-RH-Analoga; langwirkende Benzodiazepine
Onkologische Grunderkrankungen	Diffuse Knochenmarkskarzinose; Mastozytosen; Mutiples Myelom; lymphoproliferative Erkrankungen
Immunogene Ursachen	Chronische Polyarthritits; Morbus Crohn
Immobilisation	Bettruhe; Paraplegie; Hemiplegie; Raumfahrt
Hereditäre Bindegewebserkrankungen	Osteogenesis imperfecta; Marfan- oder Ehlers-Danlos-Syndrom
Im Rahmen komplexer Osteopathien	Chronische Niereninsuffizienz; chronische Malabsorption

### 3.1.3 *Gestörte Knochenhomöostase bei Osteoporose*

#### 3.1.3.1 Knochenhomöostase

Obwohl der Knochen auf makroskopischer Ebene ziemlich statisch erscheint, zeigt sich in der mikroskopischen Ebene ein dynamisches Gewebe, welches im ständigen Auf- und Abbau ist. Einerseits werden dadurch Reparaturen kleinerer Mikrotraumata der Knochen garantiert, andererseits wird dadurch die Anpassung an sich ändernde Belastungen und Lebensumstände ermöglicht. Die Umgestaltung findet in der sogenannten Basic Multicellular Unit (BMU) statt, welche Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten beinhaltet und aus der Balance zwischen gezielter Knochenresorption und Erneuerung der Knochensubstanz besteht (Frost, 1969). In der Substantia spongiosa, ein aus feinen Knochenbälkchen (Trabekeln) aufgebautes schwammartiges Gewebe im Innern des Knochens, dauert die Neumodellierung beim gesunden Knochen etwa 200 Tage und findet an der Oberfläche der Trabekel statt. Der Prozess wird durch Resorption der Knochensubstanz durch Osteoklasten initiiert, indem diese etwa 60 bis 40  $\mu\text{m}$  tiefe Resorptionslakunen bilden. Nach ungefähr 30-40 Tagen folgt die Knochenbildung durch maturierte Osteoblasten und dauert etwa 150 Tage (Eriksen, 2010). In der Substantia compacta, die äußere Schicht des Knochens, auch Kortikalis genannt, entstehen während des Remodellings durch die Osteoklastenaktivität sogenannte "cutting cones" bzw. Tunnel, welche anschließend durch Osteoblasten in der "closing cone" aufgefüllt werden. Dieser Prozess dauert gemittelt 120 Tage (Agerbaek et al., 1991).

#### 3.1.3.2 Knochenresorption und -Formation

Die Knochenremodellierung wird durch die sensible Balance zwischen Knochenresorption und Knochenformation bestimmt. Die Osteoklasten resorbieren den Knochen, welcher anschließend durch Osteoblasten wieder neu gebildet wird. Osteoklasten bilden sich aus mononukleären, hematopoetischen Stammzellen durch Differenzierung und Zellfusion von Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen (Yavropoulou and Yovos, 2008). Die Differenzierung wird hauptsächlich durch extrazelluläre Signalmoleküle, einschließlich M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  ligand), TNF (tumor necrosis factor), Interferon gamma und Interleukine eingeleitet. Dabei wird ein Expressionsmuster Osteoklasten-spezifischer Gene initiiert und die Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen zu reifen Osteoklasten aktiviert (Asagiri and Takayanagi, 2007).

Die Ausschüttung von bestimmten Zytokinen in der Basic Multicellular Unit (BMU) führt zur Rekrutierung der aktivierten Osteoklasten an die Knochenmatrix. Hierbei bindet der Osteoklast über einer resorptiven Vorderseite an die Knochenmatrix und bildet an dieser Stelle einen Faltsaum ("ruffled border"), wo auch die H<sup>+</sup>-ATPase sitzt. Durch den aktiven Protonentransport der aktivierten Osteoklasten werden die Calcium-Verbindungen im mineralisierten Knochen gelöst und abgebaut. In diesen sogenannten Howship'schen Lakunen herrscht ein isoliertes Mikroklima mit einem pH-Wert von etwa 4,5. Des Weiteren sezernieren Osteoklasten lysosomale Enzyme die für den Abbau der organischen Matrix benötigt werden. Anschließend erfolgen die Rezeptor-vermittelte Endozytose der Matrix-Fragmente und der Aufbau von Knochen durch die Bildung neuer Osteoblasten. Osteoblasten entwickeln sich aus multipotenten humanen Stammzellen (hMSC) die sich außerdem auch noch zu Adipozyten, Chondrozyten und Myoblasten differenzieren können, abhängig von den aktivierten oder inhibierten Signalwegen. Zu den wichtigsten Signalmolekülen und -Wegen zur Differenzierung von Osteoblasten aus MSCs gehören BMPs (bone morphogenetic proteins), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), Wnt-Signalweg, Hedgehog-Signalweg, PTH (Parathormon), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), FGF (fibroblast growth factor) und Notch (Kapinas and Delany, 2011). Mit fortschreitender Knochenneubildung rücken die Osteoblasten auseinander und bauen sich fest in die Knochengrundsubstanz ein. Hierbei verlieren Osteoblasten ihre Teilungsfähigkeit und werden Osteozyten genannt. Ein Teil der Osteoblasten verbleibt inaktiv an der Knochenoberfläche bis es zu einem neuen Zyklus im normalen Knochenumbau kommt. Diese Zellen werden auch "lining cells" genannt (Abbildung 1).

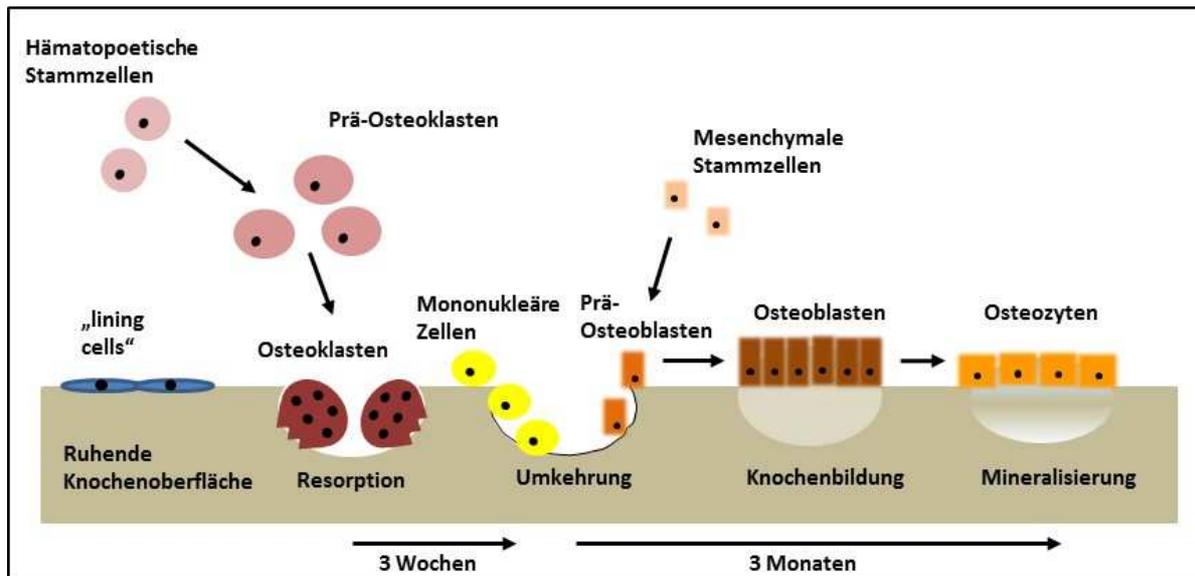


ABBILDUNG 1 ÜBERSICHT DER KNOCHENRESORPTION- UND FORMATION (KAPINAS AND DELANY, 2011).

### 3.1.4 Knochenmetastasierung bei Mamma- und Prostatakarzinomen

Krebserkrankungen der Mamma (Brust) und der Prostata sind die am häufigsten vorkommenden Krebsarten beim Menschen. Eine gefürchtete Komplikation ist die Ausbildung von Knochenmetastasen die mit erheblichen Schmerzen einhergehen und zu einer Instabilität und somit einer erhöhten Frakturanfälligkeit des betreffenden Knochens führen (Patel et al., 2011). Liegen Knochenmetastasen vor, sind die Prognosen für eine Heilung gering. Nur etwa 20 % der Brustkrebspatienten mit Knochenmetastasen haben eine Überlebensrate über fünf Jahre hinaus (Coleman, 2001). Es sind einige Schritte von Nöten bis eine Knochenmetastasierung erfolgt. Zuerst induziert die Tumorzelle die Bildung neuer Blutgefäße, welches einerseits die Versorgung des Tumors selbst mit wichtigen Nährstoffen zur Gewährleistung des Wachstums und andererseits die Route für die Migration bestimmt. Daraufhin folgt das Eindringen in die Basalmembran, was ein Charakteristikum für metastasierende Zellen darstellt, die Adhäsion an den Gefäßendothelien des Zielorgans und abschließend der Einmarsch in das betreffende Gewebe (Roodman, 2004; Weilbaecher et al., 2011). Die dabei entstehenden Metastasen können osteoblastisch (knochenbildend), osteolytisch (knochenabbauend) oder eine gemischte Form aufweisen (Theriault, 2012). Osteolytische Läsionen im Knochen treten vorwiegend bei Brustkrebspatienten auf. Erkrankte an Prostatakarzinomen weisen hauptsächlich osteoblastische Knochenmetastasen auf.

## 3.2 Behandlungsmöglichkeiten von Osteoporose

### 3.2.1 *Calcium und Vitamin D*

Etwa 99 % des Calciums sind im Skelett und in den Zähnen gespeichert und als Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) verleiht es dem Knochen Stabilität und Festigkeit. Innerhalb der Zellen ist Calcium an der Reizübertragung im Nervensystem, dem Glykogenstoffwechsel und bei der Zellteilung beteiligt. Im extrazellulären Raum unterstützt Calcium die Stabilisierung von Zellmembranen und die Blutgerinnung, im Blutserum sollte der Calciumspiegel daher etwa 2,1-2,6 mmol/l betragen und wird im Normalfall durch die tägliche Zunahme über Nahrungsmittel gedeckt. Ist keine ausreichende Aufnahme von Calcium durch Ernährungsgewohnheiten gewährleistet, kann es zu erhöhtem Auftreten von Knochenfragilitätsbrüchen als Ausdruck der Osteoporose kommen. Daher ist es sinnvoll bereits präventiv auf eine ausreichende Calciumzufuhr zu achten. Zur Behandlung von Osteoporose zeigten klinische Studien mit gesunden Frauen im Alter von  $84 \pm 6$  Jahren eine Abnahme der Hüftfrakturen um 43 % der mit Calcium und Vitamin D<sub>3</sub> behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Chapuy et al., 1992). Der Dachverband Osteologie e.V. (DVO) empfiehlt eine tägliche Einnahme von 1000 mg Calcium über kalziumreiche Kost und kalziumreiche Mineralwässer, bei nachgewiesener insuffizienter Aufnahme auch mit entsprechenden Präparaten. Die Gesamtdosis sollte dabei 1500 mg/Tag nicht übersteigen (Dachverband Osteologie, 2011).

Die Basistherapie für die Behandlung von Osteoporose mit Calcium erfolgt immer in Kombination mit Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol). Das Cholecalciferol beeinflusst den Knochenstoffwechsel und die Aufnahme von Calcium ins Knochengewebe. Ein geringer Teil der Vitamin D-Zufuhr wird über die Nahrung gedeckt, der größte Teil wird jedoch über die Exposition der Haut an Sonnenlicht gewährleistet. Durch die Einstrahlung von UV-B im Sonnenlicht wird die Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol zu Vitamin D photochemisch induziert. Das so entstandene Vitamin D<sub>3</sub> wird in der Leber zu 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> hydroxyliert. Der 25-Hydroxy-Vitamin D-Spiegel im Serum sollte über 20 ng/ml bzw. 50 nmol/l betragen. Ein geringerer Serumspiegel ist bei fast 50 % der Patienten mit einer erhöhten Anzahl an Stürzen und dadurch auftretenden Knochenbrüchen vorhanden. Um den Vitamin D-Spiegel anzugleichen werden in der Regel etwa 800-2000 IE Vitamin D/Tag verabreicht

(Dachverband Osteologie, 2011). Die Hydroxylierung zum aktiven Hormon 1,25 Dihydroxy-Vitamin D3 erfolgt in der Niere durch das Enzym 1 $\alpha$ -Hydroxylase.

### 3.2.2 *Antiresorptive Therapie*

#### 3.2.2.1 HRT (Hormonersatztherapie)

Sexualhormone sind laut Vandenput & Ohlsson (2009) maßgeblich an der Skelettformation und dementsprechend auch an der Entwicklung des Knochens beteiligt. Nimmt die Sekretion von Sexualhormonen im höheren Erwachsenenalter ab, vor allem in der Menopause bei Frauen, kann es zu einer primären Osteoporose vom Typ II (senile Osteoporose) führen. Eine hormonelle Substitution, im Sinne der HRT (Hormonersatztherapie), verhindert bis in das hohe Lebensalter hinein wirkungsvoll Knochenmassenverluste und reduziert die Inzidenz von vertebrealen und nicht-vertebrealen Fragilitätsfrakturen. Bei kontinuierlicher Einnahme ließe sich die Zahl der Wirbelkörper- und Oberschenkelhalsfrakturen damit theoretisch halbieren (Pfeilschifter, 2001). Eine dazu durchgeführte Studie an postmenopausalen Frauen der Womens-Health-Initiative (WHI) wurde aufgrund der erhöhten Tendenz von thromboembolischen Komplikationen inklusive Herzinfarkten und Schlaganfällen und der vermehrten Entwicklung von Mammakarzinomen, nach 5,2 anstatt 8,5 Jahren abgebrochen (Rossouw et al., 2002). Aufgrund der Schwere der möglichen Nebenwirkungen wird eine HRT nur zur Prävention einer postmenopausalen Osteoporose bei Patientinnen mit einem hohen Frakturrisiko empfohlen, wenn diese Unverträglichkeiten oder Kontraindikationen gegenüber den zur Osteoporose-Prävention zugelassenen Therapeutika, aufweisen (Mena et al., 2000a) und sollte zusätzlich immer unter gynäkologischer Betreuung erfolgen.

#### 3.2.2.2 SERMs (Selektive Estrogen-Rezeptor Modulatoren)

Eine neue Kategorie therapeutischer Wirkstoffe für die Prävention und Behandlung von Osteoporose und Mammakarzinomen stellen die sogenannten Selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren, SERMs, dar (Jordan, 2004). Im Knochen, in der Leber und im kardiovaskulärem System wirken SERMs als Agonisten (Cosman and Lindsay, 1999), wohingegen eine antagonistische Pharmakologie in der Brust und im Gehirn bekannt ist. Im Uterus wirken SERMs als Agonisten und Antagonisten gleichzeitig. Diese Effekte sind für eine Therapie von Osteoporose mit SERMs erstrebenswert, wie eine positive Wirkung auf Knochen und Herz-

Kreislauf-System ohne die unerwünschten Nebenwirkungen auf Brust und Uterus (Lewis and Jordan, 2005).

Tamoxifen, einer der ersten SERMs zur Behandlung von ER-positiven Mammakarzinomen, zeigte eine Erhaltung der Knochendichte und eine nicht-signifikante Abnahme von Fragilitätsfrakturen bei postmenopausalen Frauen (Love et al., 1992). Aufgrund der hohen Spezifität von Tamoxifen bei Brustkrebsindikationen und eine hohe Anzahl von auftretenden Nebenwirkungen, wie Hyperplasien des Endometriums, wurde vom Einsatz als Osteoporosetherapeutikum abgesehen (Guerra-Fernandez and Diez-Perez, 2012). Raloxifen, ein Benzothiophenderivat, erhält die Knochenmasse und vermindert das Auftreten osteoporotischer Wirbelkörperfrakturen, vermeidet aber viele Nebenwirkungen der Östrogene, die für deren geringe Langzeitcompliance verantwortlich sind, wie Blutungen, Brustspannung und Brustkrebs (Rossouw et al., 2002). Raloxifen reduziert sogar deutlich das Risiko der Entstehung eines Mammakarzinoms (Lewis and Jordan, 2005).

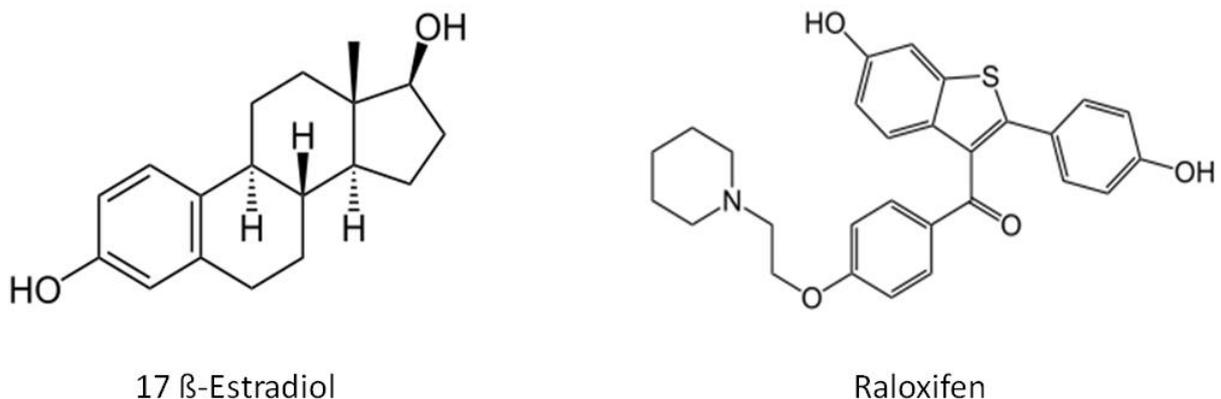


ABBILDUNG 2 CHEMISCHE STRUKTUREN VON 17 β-ESTRADIOL UND RALOXIFEN ([HTTP://DE.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/ESTRADIOL](http://de.wikipedia.org/wiki/Estradiol) BZW. /RALOXIFEN).

SERMs, wie Raloxifen, sind nichtsteroidale Wirkstoffe im Vergleich zu dem Steroid 17 β-Östradiol, weisen stattdessen jedoch eine tertiäre Struktur auf, welche die Bindung an den Östrogen-Rezeptor ermöglicht (Riggs and Hartmann, 2003). Der klassische Wirkmechanismus von Östrogenen beruht auf der Bindung des Agonisten, wie Östradiol, an die inaktive Form des Östrogen-Rezeptors im Zytosol und dem nachfolgenden nukleären Transfer des Komplexes in die Zielzelle. Durch die Bindung wird die Konformation des Rezeptors modifiziert und kann erst jetzt mit spezifischen DNA-Sequenzen, sogenannten ERE (Estrogen Responsiven Elementen) wechselwirken und so die Transkriptionsaktivität von östrogenresponsiven Genen

modulieren (Lewis and Jordan, 2005; Riggs and Hartmann, 2003). Binden SERMs an den Östrogenrezeptor wird die Konformation so verändert, dass je nach agonistischer oder antagonistischer Wirkung, weitere Proteine, Coaktivatoren und Corepressoren mit dem Rezeptor interagieren können und spezifische DNA-Bindungsstellen ansprechen (Shang and Brown, 2002). Sowohl Östrogene, als auch Raloxifen zeichnen sich durch die große Vielfalt zusätzlicher Wirkungen aus, welche in die Beratung und individuelle Entscheidungsfindung beim Einsatz dieser Therapien für die Prophylaxe oder Therapie der postmenopausalen Osteoporose mit einbezogen werden sollten (Pfeilschifter, 2001).

### 3.2.2.3 Bisphosphonate

Als eines der ersten Aminobisphosphonate für die Therapie von Osteoporose wurde Alendronat in 1995 in den USA auf den Markt gebracht, nachdem Studien eine Abnahme der Frakturanfälligkeit von 50 % bei Patienten mit erhöhtem Frakturrisiko nach täglicher Einnahme gezeigt haben (Jirecek et al., 1999). Da Bisphosphonate im Darm nach oraler Gabe sehr schlecht resorbiert werden und um die Compliance der Patienten zu gewährleisten, wurden bald modifizierte und neuere Bisphosphonate zugelassen. So zum Beispiel Risedronat, welches zu den oral zu verabreichenden Therapeutika gehört. Dieses kann, je nach Dosis, täglich, wöchentlich oder monatlich eingenommen werden. Zoledronat, eines der neuesten Aminobisphosphonate, wird einmal pro Jahr intravenös verabreicht (Khajuria et al., 2011).

Bisphosphonate sind Verbindungen der Phosphonsäure mit der allgemeinen Konstitutionsformel  $((\text{O}_3\text{P})_2\text{-C-R}^1\text{R}^2)^{4-}$  und zählen zu den Diphosphat-Analoga, in denen das Sauerstoffatom (O) in der Phosphat-Verbindung durch ein Kohlenstoffatom (C) ersetzt wurde. Die Moleküle werden über eine Radikalreaktion an der Knochenoberfläche verankert und wirken antiresorptiv, indem diese von Osteoklasten über Phagozytose aufgenommen werden. Im Zellinneren inhibieren sie das Enzym Farnesylpyrophosphatsynthase (FPPS), woraufhin Prenylierungsreaktionen, d.h. die Übertragung eines Farnesylrestes gestört werden (Mena et al., 2000b). FPPS ist ein Schlüsselenzym im Mevalonat-Stoffwechselweg für die Synthese von Cholesterol, weitere Sterole und Isoprenoiden (Drake and Cremers, 2010). Viele Proteine können ohne Isoprenylrest nicht an Phospholipid-Membranen gebunden werden, dazu zählen auch Moleküle, welche an der Regulation des Zytoskeletts, der Zelladhäsion und der Weiterleitung der Signale von Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Im Verlauf führt es zu einer

Hemmung der Adhäsion von Osteoklasten an den Knochen und somit zu einer Inaktivierung der Aktivität bis zur Induktion der Apoptose.

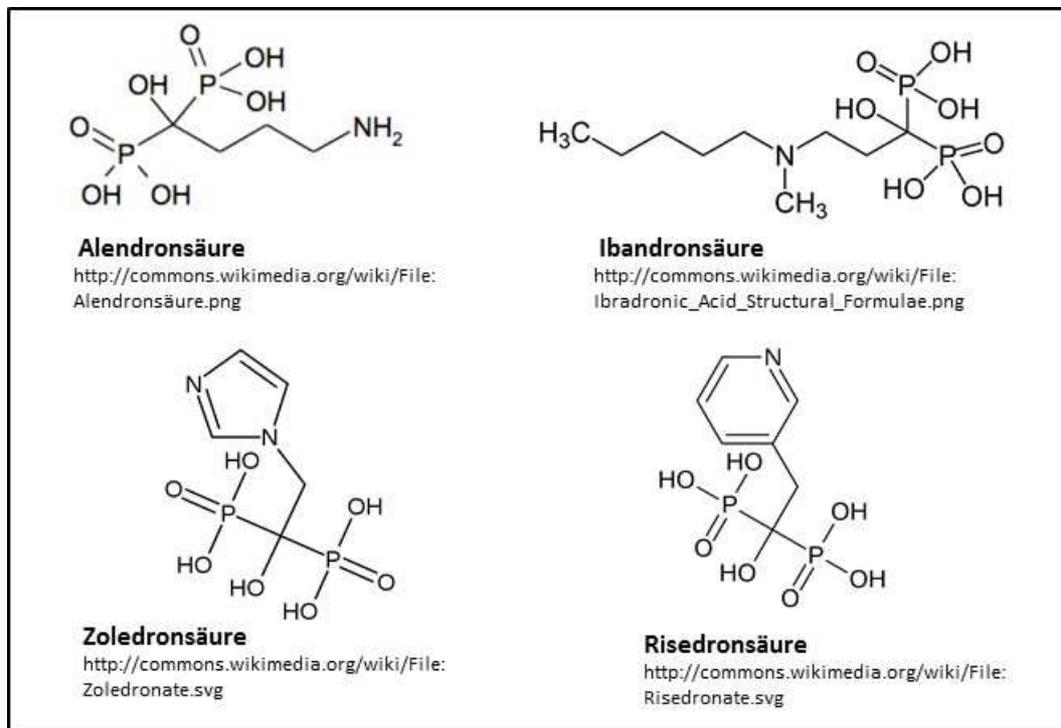


ABBILDUNG 3 ÜBERSICHT ÜBER DIE CHEMISCHEN STRUKTUREN BEI OSTEOPOROSE EINGESETZTEN BISPHOSPHONATEN

Die Langzeittherapie mit Bisphosphonaten kann jedoch zu einer Verlangsamung des Knochenumsatzes führen, was eine Häufung und Zusammenführung von Mikrofrakturen im Knochen verursacht und die mechanischen Eigenschaften des Knochen beeinflussen kann (McClung, 2003). Schwerwiegend assoziierte Nebenwirkungen der Bisphosphonate sind Osteonekrosen des Kiefers und atypische subtrochantäre Frakturen (Khosla et al., 2007; Shane et al., 2010).

#### 3.2.2.4 RANKL-Antikörper

Seit Juni 2010 wird der humane monoklonale IgG-2-Antikörper Denosumab (Prolia®, Firma Amgen) als neues Therapieprinzip zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt. Die Therapie besteht aus einer zweimal jährlichen subkutanen Injektion und führt zu einer Erhöhung der Knochenmineraldichte und eine Senkung der Frakturnrate an Wirbelkörpern (Miller, 2011). Der Antikörper richtet sich gegen den RANK-Liganden (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) und hemmt somit die Interaktion mit seinem Rezeptor RANK an der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoklasten (Yee and Raje, 2012).

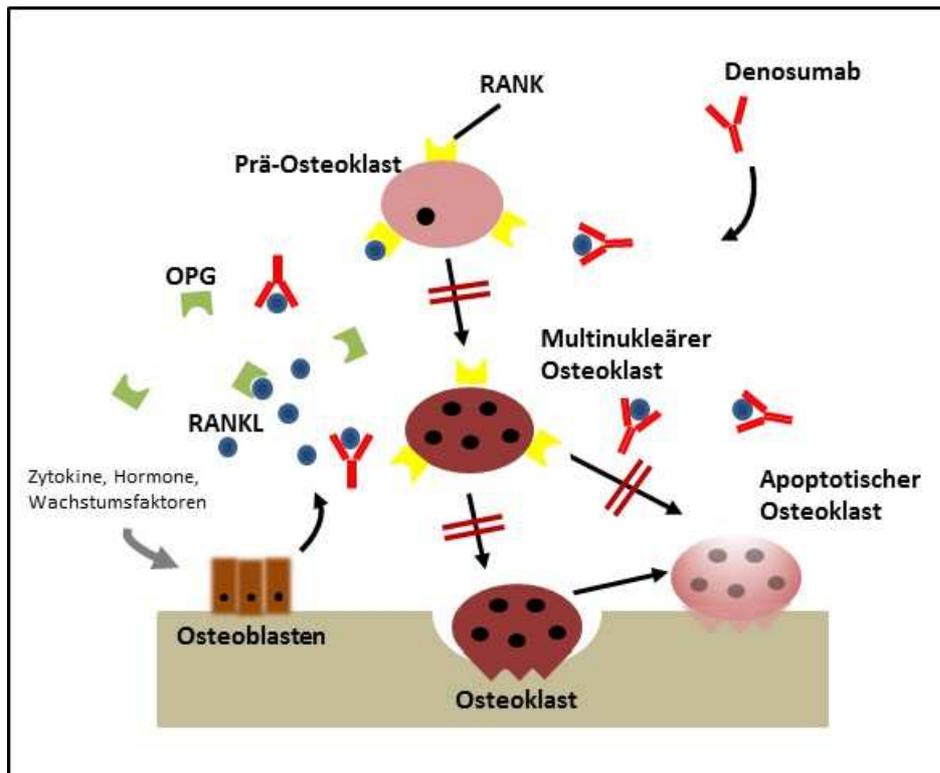


ABBILDUNG 4 WIRKUNG VON RANKL- ANTIKÖRPER DENOSUMAB AUF DEN KNOCHENUMSATZ. DENOSUMAB BINDET AN DEN VON OSTEOBLASTEN SYNTHETISIERTEN RANKL UND HINDERT SOMIT DIE BINDUNG VON RANKL AN DEN RANK-REZEPTOR (MILLER, 2011).

RANKL, ein Glycoprotein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF), wandelt Vorläuferzellen in aktive Osteoklasten um und sichert somit das Überleben der für die Knochenresorption zuständigen Zellen (Miller, 2011). RANKL wird ebenso wie OPG (Osteoprotegerin), ein "Decoy"-Rezeptor für RANKL, in den Osteoblasten synthetisiert. RANKL und OPG sind molekulare Konkurrenten deren Gleichgewicht die Knochenresorption reguliert (Bekker et al., 2001). Bei der postmenopausalen Osteoporose, also in einem östrogenarmen Zustand, liegt das Gleichgewicht zugunsten von RANKL, der vermehrt an den RANK-Rezeptor auf der Osteoklastenoberfläche binden kann. Dadurch wird die Differenzierungskapazität und somit die Aktivität der Osteoklasten angeregt und führt zu einer erhöhten Knochenresorption. Liegt das Gleichgewicht auf der OPG-Seite, werden die RANK-Moleküle blockiert und somit die Differenzierungskapazität der Osteoklasten, was zu einem verminderten Knochenabbau führt (Boyle et al., 2003).

### 3.2.2.5 Cathepsin-K-Antagonisten

Cathepsine sind lysosomale Proteasen und gehören zu der Familie der Papainähnlichen Zysteinproteasen. Es werden 11 unterschiedliche Cathepsine (B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, W) beschrieben, wobei CatK, aufgrund der hohen Collagenase-Aktivität, die wichtigste Bedeutung für den Knochen übernimmt (Gauthier et al., 2008). CatK wird von Osteoklasten exprimiert und fördert den Kollagenabbau unter sauren Konditionen am Knochen (Stoch and Wagner, 2008).

Es gibt Studien zu drei Cathepsin-K-Antagonistische Wirkstoffe (Balicatib, Relacatib, Odanacatib) die jedoch noch nicht zur therapeutischen Behandlung bzw. Prävention bei Osteoporose zugelassen sind (Bone et al., 2010). Balicatib ist ein hochselektiver Inhibitor für CatK in enzymatischen Assays, verliert diese Eigenschaft jedoch bei der Anwendung auf lebende Zellen (Falgueyret et al., 2005). Relacatib ist ein nicht-selektiver Antagonist für die Cathepsine K, L, V und S und setzt die Knochenresorptionsrate in ovariectomierten Affen herab. Auch reduziert Relacatib die Knochenformation in der Substantia spongiosa, während die Formation in der Substantia compacta des Femur erhöht wird (Bone et al., 2010; Kumar, 2005). Der Einsatz von Relacatib als CatK-Antagonist wurde nicht weiter verfolgt, als Wechselwirkungen mit Paracetamol, Ibuprofen und Atorvastatin in den klinischen Studien der Phase I bekannt wurden (Podgorski, 2009). Der Cathepsin-K-Antagonist Odanacatib (MSD Sharp & Dome) inhibiert selektiv und reversibel das Enzym Cathepsin-K (CatK) und zeigt hervorragende pharmakokinetische Parameter, wie kurze Halbwertszeiten und orale Bioverfügbarkeit. Er verhindert in Affen, den durch Ovariectomie ausgelösten, vertebrealen und femoralen Knochenverlust, erhöht die Knochenfestigkeit und reduziert, wie Relacatib, die Knochenformation in der Substantia spongiosa, während die Formation in der Substantia compacta des Femurs, sowie die kortikale Dichte, erhöht wird (Jerome et al., 2011). Odanacatib befindet sich zurzeit in klinischen Studien der Phase III.

### 3.2.2.6 Calcitonin

Calcitonin ist ein körpereigenes Hormon welches von den parafollikulären Zellen der Schilddrüse sezerniert wird und den Calcium-Phosphat-Stoffwechsel reguliert (Deftos et al., 1968). Diese Zellen werden daher auch als C-Zellen (C von Calcitonin) bezeichnet. Calcitonin bindet direkt an Rezeptoren auf der Oberfläche von Osteoklasten und setzt hier kurzfristig die

Bindungskapazität zur Knochenoberfläche herab und somit die Resorptionsaktivität am Knochen (Shyu et al., 2007). Dabei wird durch Calcitonin nicht die Anzahl der Osteoklasten und somit der Anzahl der Resorptionslakunen beeinflusst, sondern lediglich die Tiefe der Lakunen (Henriksen et al., 2010; Ikegame et al., 2004).

Als Arzneimittel wird synthetisch hergestelltes Calcitonin vom Lachs verwendet (salmon calcitonin) und intranasal mit einer Dosis von 200 IE täglich verabreicht. In der "Proof study" konnte nach regelmäßiger Einnahme über fünf Jahren eine Abnahme des vertebrealen Frakturrisikos gezeigt werden (Chesnut et al., 2000). Eine ungenügende Compliance der Studienteilnehmern, sowie inkonsistente Studiendaten bezüglich Knochendichte und Abbaumarkern, führten dazu, dass intranasal verabreichtes Calcitonin nicht zu den Osteoporosetherapeutika der ersten Wahl gehören (Hamdy and Daley, 2012; MacLean et al., 2008).

### 3.2.3 *Osteoanabole Therapie*

#### 3.2.3.1 Teriparatid

Teriparatid wurde im November 2003 in Deutschland unter den Markennamen Forsteo® (Lilly Pharma) für die Therapie von postmenopausaler Osteoporose und zur Behandlung von Osteoporose bei männlichen Patienten zugelassen (Neer et al., 2001). Teriparatid ist das rekombinant hergestellte, aktive N-terminale Fragment (rhPTH 1-34) des humanen endogenen Parathormons (PTH 1-84). Die empfohlene Tagesdosis beträgt 20 µg Teriparatid und wird subkutan injiziert.

Die Verabreichung von Teriparatid und auch 1-84 PTH führt zu einer Inhibition der Apoptose von Präosteoblasten und somit zu einer Erhöhung der Knochenvorläuferzellen und ihrer Proliferation, so dass eine Umwandlung von "bone lining cells" zu aktiven Osteoblasten begünstigt wird (Dobnig and Turner, 1995; Manolagas, 2000). In einer randomisierten Doppelblindstudie mit 1637 Frauen mit einer postmenopausalen Osteoporose zeigte die Teriparatid-Behandlung eine signifikante Reduktion der Frakturrate von über 65 % der vertebrealen Brüche und 54 % der nicht-vertebrealen Brüchen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Zusätzlich resultierte die Behandlung in einer Zunahme der Knochendichte der Lendenwirbel, des Hüftknochens und des gesamten Skeletts (Neer et al., 2001).

### 3.2.3.2 Strontiumranelat

Strontium ist ein chemisches Element der Erdalkaligruppe, in der auch Calcium vertreten ist, (2. Hauptgruppe im Periodensystem) und wird als radioaktives Isotop bei der Therapie schmerzhafter Knochenmetastasen verwendet ( $^{89}\text{Sr}$ , radioaktives Isotop). Aufgrund seiner chemischen und physikalischen Verwandtschaft zu Calcium zeigt es eine hohe Affinität zum menschlichen Skelett (Holleman, 2007). Als nichtradioaktives Isotop findet es in Form von Strontiumranelat, des Strontiumsalzes der Ranelicsäure (5-[bis (carboxymethyl)amino]-2-carboxy-4-cyano-3-thiophenacetic acid strontium salt), Verwendung in der Therapie und Prävention von Osteoporose (Yalin et al., 2012). Durch die Aktivierung von Calciumrezeptoren auf der Osteoblastenoberfläche wird die Proliferation, die Differenzierung und die Mineralisierung von Osteoblasten angeregt (Chattopadhyay et al., 2007; Takaoka et al., 2010). Zwei klinischen Studien waren maßgebend für die Anwendung von Strontiumranelat in der Osteoporosetherapie: die STRATOS- (The Strontium Ranelate for Treatment of Osteoporosis) und die SOTI- (The Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention) Studie. Die STRATOS-Studie an 353 an postmenopausaler Osteoporose erkrankten Frauen, ergab eine Zunahme der Knochendichte im Lendenwirbelbereich, wie eine Abnahme der Inzidenz neuer Frakturen in diesem Bereich mit einer täglichen Dosis von 2,0 g (Meunier et al., 2002). Bei der SOTI-Studie an 1649 erkrankten Patientinnen wurde bereits nach einem Jahr mit einer Kombinationstherapie aus 2,0 g Strontiumranelat, bis zu 1000 mg Calcium und 400-800 IU/Tag Vitamin D3 eine Abnahme der Lendenwirbelfrakturen erreicht (Meunier et al., 2004).

### 3.2.3.3 SOST-Antikörper

Sclerostin ist ein monomeres Glycoprotein und wird von Osteozyten und anderen terminal differenzierten Zellen der Knochenmatrix (z.B. mineralisierte, hypertrophe Chondrozyten) sezerniert. Sclerostin inhibiert die Differenzierung, Aktivität und das Überleben von Osteoblasten, indem es den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg über die Bindung an LRP5 und LRP6 antagonisiert (Poole et al., 2005).

Eine Loss-of-function-Mutation im SOST-Gen, welches für das Protein Sclerostin kodiert, führt zu einer erhöhten Knochendichte und extremer Knochenbildung (Hamersma et al., 2003). Ist die Mutation im SOST-Gen homozygot, liegt eine Sklerosteose vor, eine autosomal-rezessiv erbliche Skelettdysplasie ohne messbaren Sclerostinspiegel im Blut, die mit Riesenwuchs,

Kieferfehlbildungen, erhöhtem intrakraniellen Druck und frühzeitigem Ableben einhergeht. Liegt die Mutation heterozygot vor, weisen die Betroffenen einen unauffälligen Phänotyp mit normaler Lebensdauer auf und zeigen aufgrund ihrer hohen Knochendichte ein geringes Frakturrisiko (Beighton et al., 1977). Antikörper, welche die Sclerostinexpression unterbinden, könnten die osteoblastische Knochenformation anregen und somit einen osteoanabolischen Effekt bewirken. In präklinischen Studien zeigten monoklonale SOST-Antikörper eine Zunahme der Knochenformation ohne die Knochenresorption zu erhöhen (Li et al., 2010; Ominsky et al., 2010). Der Antikörper CDP-7851/AMG 785 (Amgen) befindet sich derzeit in den klinischen Studien der Phase III.

#### 3.2.3.4 Fluorid

Seit den 60er Jahren wurden hauptsächlich Fluoride zur Stimulation des Knochenaufbaus bei Erkrankungen mit verminderter Knochendichte eingesetzt. Seit Anfang der 90er Jahren ist der Einsatz von Fluoriden nach amerikanischen Studien (Riggs et al., 1990) jedoch sehr umstritten, nachdem, bei den mit Fluoriden behandelten Patienten, zwar eine erhebliche Zunahme der Knochendichte, aber auch eine erhöhte Knochenbruchrate im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt wurde (Rosen and Bilezikian, 2001). Die erhöhte Knochenbruchrate lässt sich auf den erhöhten Einbau von Fluorapatit vs. Calciumapatit zurückführen. Deshalb besteht eine Therapie mit Fluoriden in der heutigen Zeit aus einer Kombination von bioverfügbaren Fluoridionen und Calcium, um somit eine Untermineralisierung des Knochens vorzubeugen, wobei die Dosis 15-20 mg Fluorid nicht übersteigen sollte (Ringe, 2001).

### 3.3 Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*)

In den vergangenen Jahren war der Einsatz der Hormonersatztherapie (HRT) bei klimakterischen postmenopausalen Beschwerden wie Gemütsschwankungen, Hitzewallungen und vermehrtes Schwitzen weit verbreitet. Die Zunahme kardiovaskulärer und thromboembolischer Erkrankungen sowie erhöhtes Brustkrebsrisiko jedoch während der Behandlung mit HRT indizieren die Suche nach einer Medikation ohne die östrogen-abhängigen Nebenwirkungen. Pflanzenextrakte aus Soja, Rotklee und Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*) sind die vielversprechendsten Alternativen zur HRT. Untersuchungen mit *Cimicifuga racemosa* an ovariectomierten Mäusen zur Bestimmung von Knochenstoffwechsel-Surrogatparameter lassen für diesen Pflanzenextrakt eine osteoprotektive Wirksamkeit vermuten. Bei dieser Studie wurden die CrossLaps um ca. 25% reduziert. Dieser mit der HRT vergleichbare Effekt lässt vermuten, dass die Knochenmineraldichte erhalten bleibt oder zunimmt, wodurch eine mögliche Prophylaxe und Therapie von Osteoporose nahe liegt (Wuttke et al., 2003).

#### 3.3.1 Portrait der Pflanze

Name: Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*)

Ordnung: Hahnenfußartige (Ranunculales)

Familie: Hahnenfußgewächse  
(Ranunculaceae)

Unterfamilie: Ranunculoideae

Synonyme: Wanzenkraut, Schwarze  
Schlangenwurzel, Frauenwurzel



ABBILDUNG 5 TRAUBENSILBERKERZE (*CIMICIFUGA RACEMOSA*) ([HTTP://DE.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/TRAUBENSILBERKERZE](http://de.wikipedia.org/wiki/Traubensilberkerze))

Die Traubensilberkerze (CR) war ursprünglich im Nordosten der USA und in Kanada beheimatet und wächst bevorzugt an schattigen Standorten wie Böschungen, lichten Wäldern oder Waldrändern. Die mehrjährige Pflanze erreicht dabei Höhen von etwa 2,5 m und ist aus mehreren traubigen Teilblütenständen zusammengesetzt. Die Früchte der Traubensilberkerze bestehen aus etwa 6 mm langen, lederartigen Samen, die bei starkem Wind gegeneinander schlagen und mit dem Warngeräusch einer Klapperschlange vergleichbar ist, weswegen die Pflanze auch als Schlangenzunge bekannt ist. Für pharmazeutische Zubereitungen werden hauptsächlich Rhizom (Wurzelstock) und Wurzel verwendet zur Linderung von Wechseljahresbeschwerden, prämenstruellem Syndrom und schmerzhaften Menstruationsbeschwerden (<http://www.docjones.de/wirkstoffe/traubensilberkerze-cimicifuga>).

### 3.3.2 Anwendung in der Geschichte

Bereits die Indianischen Stämme Nordamerikas und Kanadas hatten sich die Wirkung der Traubensilberkerze für vielseitige Anwendungen zunutze gemacht. Dabei war die Verwendung innerhalb der verschiedenen Stämme nicht einheitlich geregelt. Der Einsatz der Pflanze richtete sich nach dem jeweiligen Krankheitsbild, sowie nach dem tageszeitlichen Erntezeitpunkt der Pflanze (Beuscher, 1995). Der Stamm der Irokesen verwendete einen Sud aus der Wurzel um den Milchfluss zu fördern und als Fußbad um die Beschwerden bei Rheumatismus zu lindern. Des Weiteren wurde ein Umschlag aus den Blättern der Traubensilberkerze verwendet um Halsschmerzen bei Kleinkindern zu behandeln. Bei vielen Stämmen wurde ein Tee aus den Wurzeln der Pflanze zur Erleichterung von Erkältungen, Husten, Müdigkeit, Verstopfung und Rückenschmerzen eingesetzt (Foster, 1998). Der Stamm der Cherokees verwendete Cimicifuga als alkoholischen Extrakt der Wurzel bei rheumatischen Beschwerden. Neben den tonisierenden, schmerzstillenden und leicht adstringierenden Effekten, wurde eine diuretische Wirksamkeit beschrieben und die im Nordosten beheimateten Algonquins nutzten die Wurzeln somit auch bei Nierenproblemen (Foster, 1998). Erst im 18. Jahrhundert fand die Traubensilberkerze über Kolonialisten und Siedler den Weg nach Deutschland und Europa, mit der Anwendung bei Gelenkschmerzen, Myalgien, Neuralgien und Rheumatismus. Das wichtigste Einsatzgebiet war nach wie vor in der Frauenheilkunde bei klimakterischen und gynäkologischen Symptomen, sowie Schmerzen während der Geburt. Im 19. Jahrhundert entwickelte Lydia Pinkham ein Kräutertonikum mit

Traubensilberkerze als Hauptbestandteil, mit falschem Einkorn und Bockshornklee unter den Namen "Vegetable's Compound". Es wurde zur Linderung von Krämpfen und Atemnot, aufgrund zu eng geschnürter Korsetts, und bei vielen gynäkologischen Symptomatiken verabreicht (Dempsey, 2009). Ende des 19. Jahrhunderts verlor sich das Interesse an der Pflanze und die medizinische Verwendung wurde auf die Behandlung von Lungenschwindsucht und Rheumatismus beschränkt. Hierfür wurde CR in einer Zubereitung als Harz, auch "macrotys" genannt, als Mittel der ersten Wahl bei akuten oder chronischen Fällen von Rheumatismus, pulmonale Leiden oder neurologischen Erkrankungen eingesetzt (Foster, 1998). Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Traubensilberkerze hauptsächlich in homöopathischen Zubereitungen verwendet. Erst später, in den frühen 50er Jahren, wurde CR zur Behandlung von gynäkologischen Beschwerden wiederentdeckt und etablierte erfolgreich zum angesehenen Phytotherapeutikum (Fischer, 2006).

### 3.3.3 *Vermutete Inhaltsstoffe*

Die Wirksamkeit der Pflanze wird in erster Linie den Triterpenglykosiden zugeschrieben, wozu Actein und Cimifugosid zählen. Der Wurzelstock enthält außerdem biologisch aktive Wirkstoffe wie Alkaloide, Flavonoide und Tannine (Kligler, 2003). Der wirkungsvolle Einsatz bei Wechseljahresbeschwerden und gynäkologischen Indikationen beruht auf dem Verdacht, Traubensilberkerze enthalte östrogenähnliche Inhaltsstoffe welche ER- $\beta$ -Rezeptoren ansprechen (Low Dog et al., 2001; McKenna et al., 2001). Obwohl die Wirksamkeit oft auf den Gesamtextrakt zurückzuführen ist, werden im Folgenden einige Inhaltsstoffe aufgezählt und dessen Beitrag zur Wirkung erläutert.

#### 3.3.3.1 Phytoöstrogene?

Phytoöstrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe die eine strukturelle Ähnlichkeit mit Östrogenen aufweisen. Dadurch können Phytoöstrogene an die Östrogen-Rezeptoren binden und eine östrogene bzw. antiöstrogene Wirkung in den jeweiligen Zielorganen bewirken (Kurzer and Xu, 1997). Phytoöstrogene werden in zwei Gruppen unterteilt: die Isoflavone und die Lignane. Das Haupteinsatzgebiet von Phytoöstrogenen liegt in der Behandlung von Hitzewallungen die üblicherweise nach dem Eintreten der Menopause erscheinen. Auffällig ist dabei die Tatsache, dass postmenopausale Frauen in Asien weit weniger an Hitzewallungen leiden wie Frauen in USA und Europa. Begründet wurde dieses mit dem erhöhten Anteil an

Sojabohnen und sojahaltigen Nahrungsmitteln in der asiatischen Ernährung (Freeman and Sherif, 2007; Oddens, 1994). Die Sojabohne ist reich an Isoflavonoiden wie Genistein und Daidzein und wird schon lange in Bezug auf die Anwendung bei Hitzewallungen diskutiert. In einer randomisierten Doppelt-Blind-Studie mit 91 perimenopausalen Frauen wurden in drei Gruppen 1) Isoflavon-reiches Sojaprotein, 2) Isoflavon-armes Sojaprotein und 3) Eiweiß-Protein, über 12 Wochen, verabreicht. Im Anschluss an die Studie konnten keine Veränderungen in Art und Anzahl der Hitzewallungen zwischen den drei Studiengruppen festgestellt werden (St Germain et al., 2001). In einer weiteren klinischen Studie mit Doppelcross-Komponente an 177 Frauen, die bereits eine Brustkrebserkrankung erfolgreich überstanden haben, wurden sojahaltige Tabletten oder Placebos verabreicht. Nach 4 Wochen konnte kein Unterschied in der Frequenz von Hitzewallungen festgestellt werden. Im Gegenteil, nach der Studie wollten mehr Frauen das Placebo weiterhin einnehmen anstatt der sojahaltigen Tablette (Quella et al., 2000). Auch Wiesenkleesäure ist reich an den Isoflavonen Promensil und Rimostil. Jedoch konnten auch hier in klinischen Studien an 252 menopausalen Frauen keine nennenswerten Veränderungen in Anzahl der auftretenden Hitzewallungen bestimmt werden (Tice et al., 2003).

Lignane, eine weitere Unterklasse der Phytoöstrogene, sind vor allem im ganzen Korn, Hülsenfrüchte und Gemüse zu finden. Einen besonders hohen Anteil an Lignanen enthält Leinsamen (Pachman et al., 2010). Eine Pilotstudie mit 30 Frauen zur Untersuchung des Effekts von Leinsamen auf Hitzewallungen führte nach einer tägliche Dosis von 40 mg, in einem Zeitrahmen von 6 Wochen, zu einer Abnahme der Frequenz um bis zu 50 % (Pruthi et al., 2007). Eine weitere randomisierte Doppel-Blind-Studie mit 87 Frauen wurde mit Muffins durchgeführt, die einmal 25 g Leinsamen, einmal 25 g Soja und einmal Weizenmehl enthielten. Nach 16 Wochen konnte bei den Patientinnen mit Leinsamen oder Soja zwar kein Einfluss auf die Frequenz, jedoch auf die Intensität der Hitzewallungen festgestellt werden (Lewis et al., 2006).

Lange Zeit wurde geglaubt, dass *Cimicifuga racemosa* als Phytotherapeutikum zur Behandlung von Hitzewallungen eingesetzt werden kann. Viele dieser Studien sind aus den 80er Jahren, neuere Studien konnten diese Wirksamkeit jedoch nicht eindeutig belegen. Eine klinische Studie aus dem Jahre 2009 verglich die Wirksamkeit von Traubensilberkerze, Wiesenkleesäure und HRT an 89 Frauen für 12 Monate. Die Studie erforderte Einnahmen einer täglichen Dosis von

128 mg (Traubensilberkerze), 120 mg Wiesenklees, Placebo oder einer Kombination aus 625 µg Östrogen mit 2,5 mg Progesteron. Am Ende der Studie konnten keine signifikante Abnahme der Hitzewallungen nach Behandlung mit Traubensilberkerze oder Wiesenklees im Vergleich zum Placebo gemessen werden (Geller et al., 2009). Im Gegensatz zu dieser Studie konnte in Versuchen an ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten um die Arbeitsgruppe Kapur et al. (2010) eine Stabilisierung der Körpertemperatur der Tiere mit 25 mg Cimicifuga-Extrakt/Tag/Tier in einem 3 h Intervall gemessen werden. Tiere, welche sojafreies Futter erhielten, zeigten dagegen messbare Temperaturschwankungen nach jeweils 20-40 min während einer dreistündigen Messperiode.

### 3.3.3.2 Triterpene

Die Triterpene gehören zur Naturstoffgruppe der Isoprenoide und stellen somit eine umfangreiche Klasse der Terpene dar. Alle Triterpene lassen sich von dem azyklischen C<sub>30</sub>-Kohlenwasserstoff Squalen ableiten, was von allen Organismen durch hydrierende Dimerisierung von Farnesyldiphosphat synthetisiert wird. Die Zyklisierung des Squalens wird durch die Epoxidierung einer endständigen Doppelbindung eingeleitet und führt im weiteren Verlauf einerseits zu tetra- bzw. pentacyklischen Triterpenen und andererseits über Cycloartenol zu den Cucurbitacinen (Bitterstoffe). Die Steroide zählen auch zu den Triterpenen, obwohl sie weniger als 30 C-Atome enthalten. Sie entstehen durch die oxidative Abspaltung von 3 Methylgruppen vom Cycloartenol und können alle über das Stoffwechselintermediärprodukt Cholesterol gebildet werden (Hänsel, 2007).

Entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften können Triterpene in 3 Hauptgruppen unterteilt werden:

- Lipophile Triterpene: Phytosterole und deren Ester mit höheren Fettsäuren im Blattwachs höherer Pflanzen; Triterpensäuren und Triterpenalkohole in Harzen, Milchsäften sowie in Borken von Holzgewächsen.
- Hochoxydierte Triterpene: Triterpene mit mittlerer Polarität; die Funktionalisierung des Kohlenstoffskeletts mit Hydroxyl-, Carbonyl-, Carboxyl-, Epoxy- und Lactongruppen führen zu biologisch hochaktive und auch oft hochtoxischen Derivaten.
- Hydrophile glykosidische Triterpene: Saponine

Die in *Cimicifuga racemosa* enthaltenen Triterpene sind C<sub>30</sub>-Triterpene und enthalten einen, für diese Stoffklasse, typischen Cyclopropanring, der auf die strukturelle Zugehörigkeit zum Cycloartenol schließen lässt. Die in CR vorkommenden Triterpene zählen zu den Monodesmoiden, d.h. Saponinen die nur eine Zuckerkette tragen. Als Zucker sind bisher nur  $\beta$ -D-Xylose und  $\alpha$ -L-Arabinose beschrieben, welche am C-3 glykosidisch gebunden sind (Hänsel, 2007). Zu den Haupttriterpenglykosiden im Rhizom von CR zählen Actein, 27-Deoxyactein, Acetylshengmanol-3-oxylsido, Cimigenol-3-O-arabinsido und Cimigenol-3-O-xylosid (He et al., 2006).

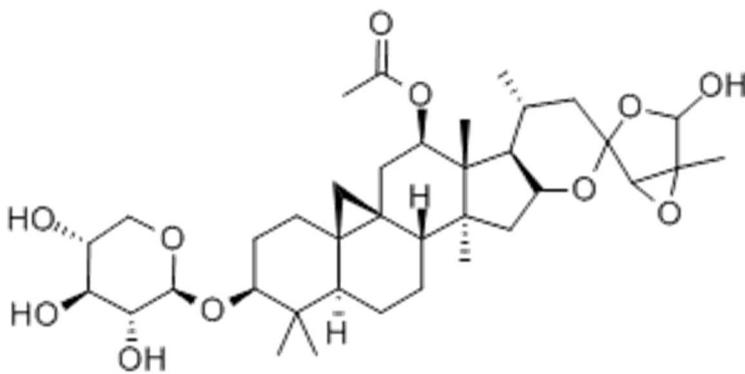
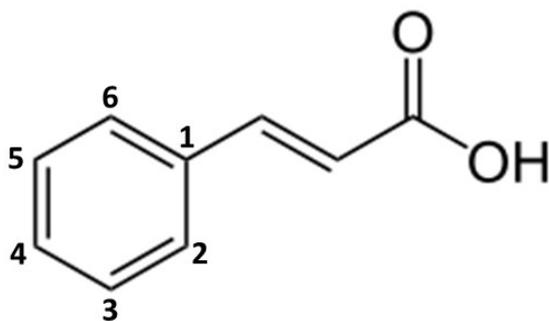


ABBILDUNG 6 CHEMISCHE STRUKTUR VON ACTEIN ([HTTP://WWW.CHEMICALBOOK.COM/CHEMICALPRODUCTPROPERTY\\_DE\\_CB2365802.HTM](http://www.chemicalbook.com/chemicalproductproperty_DE_CB2365802.HTM))

In einer Studie zu antiresorptiven Wirkprinzipien von *Cimicifuga racemosa* auf Knochenmarksmakrophage haben Qiu et al. (2007) verschiedene Triterpenglykoside, darunter ACCX (25-acetylcimigenol xylopyranosid), isoliert und ihre Wirkung auf, durch RANKL und TNF $\alpha$  induzierte, Osteoklastengenesen untersucht. ACCX hemmt die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen, welches durch das Fehlen von typischen Osteoklastenproteinen, wie Cathepsin K und  $\beta$ 3-Integrin, gezeigt werden konnte. In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von drei Triterpenglykosiden, isoliert aus CR, auf die Formation und Resorptionsaktivität auf osteoklastenähnliche Zellen untersucht. Alle drei Substanzen (cimicidanol-3-O- $\beta$ -D-xyloside, acetylacteanol-3-O- $\beta$ -D-xyloside, cimicidol-3-O- $\beta$ -D-xyloside), führten zu einer Abnahme der Osteoklastenformation und -Resorption als Einzelsubstanz und in einer Mischung aus allen Substanzen (Li et al., 2007).

### 3.3.3.3 Phenolsäuren

In nahezu allen Früchten und Gemüsesorten sind einfache Phenolderivate und Phenolsäuren reichlich vorhanden. Sie umfassen die Zimtsäurederivate, wie Kaffee-, Ferula- oder Chlorogensäure, sowie die Benzoessäurederivate Gallussäure und ihr zyklisches Dimer, die Ellagsäure. Benzoessäurederivate liegen im Allgemeinen nur in niedrig dosierter Form im Pflanzenreich vor und sind somit für die Analytik weniger aufschlussreich. Zimtsäurederivate dahingegen, sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet und liegen in höheren Konzentrationen vor. Aufgrund ihrer hohen Strukturvielfalt durch Substituierung von Methyl-, Methylen- oder glykosidischen Resten entfalten Phenolsäuren ein breites Wirkungsspektrum (Hänsel, 2007).



Substituenten	
3,4-Di-OH	Kaffeesäure
3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	Ferulasäure
3-OH, 4-OCH <sub>3</sub>	Isoferulasäure
4,5-Di-OH	Fukinolsäure

#### Zimtsäure

ABBILDUNG 7 HYDROXYZIMTSÄURE UND DAVON ABGELEITETE DERIVATE ([HTTP://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:ZIMTS%C3%A4URE\\_-\\_CINNAMIC\\_ACID.SVG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ZIMTS%C3%A4URE_-_CINNAMIC_ACID.SVG))

In *Cimicifuga racemosa* enthaltene Phenolsäuren, wie Kaffee-, Ferula-, Isoferula- und Fukinolsäure, zeigen antioxidatives Potential bei Menadion-induzierten DNA-Schäden in S30-Brustkrebszellen in Abhängigkeit der verwendeten Dosis (Burdette et al., 2002). Auch im Knochenstoffwechsel könnten antioxidativ wirksame Phenolsäuren von Bedeutung sein. Dai et al. (2007) beobachtete eine Stimulation der Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten nach Zugabe des antioxidativen Polyphenols Resveratrol aus Knöterichgewächsen. Im Knochenstoffwechsel sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erforderlich für die Differenzierung von Osteoklasten, führen jedoch in hohen Konzentrationen zu einer Inhibition der Osteoblastenfunktion.

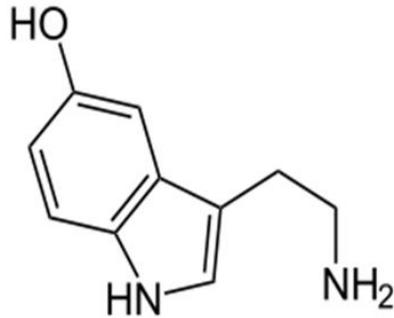


ABBILDUNG 8 ÜBERSICHT ÜBER DIE WIRKUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) UND ANTIOXIDATIVE ENZYMEN (TEILABBILDUNG SIEHE: [HTTP://WWW.ACTIVEFIT.CO.AT/MODULES.PHP?NAME=CONTENT&PID=26](http://www.activefit.co.at/modules.php?name=content&pid=26)).

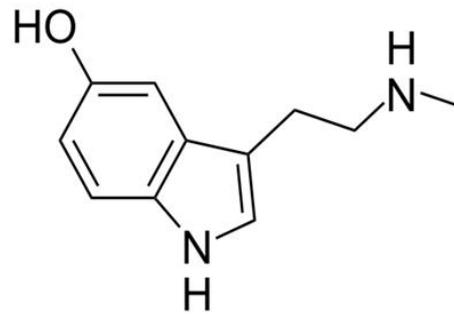
Des Weiteren können Phenolsäuren sowohl die Promotion als auch die Initiation der Kanzerogenese hemmen. Ihr Mechanismus umfasst die Hemmung der Phase-I-Enzyme wie Cytochrom P450 und die Aktivierung von Phase-II-Enzymen wie Glutathion-S-Transferase. Kaffee- und Ferulasäure wirken sowohl als Inhibitoren indem sie die Karzinogenbildung aus Vorläufern vermeiden, als auch indem sie Karzinogenreaktionen mit kritischen zellulären Makromolekülen blockieren (Stich and Rosin, 1984).

#### 3.3.3.4 N-Methylserotonin

Die Anwendung von *Cimicifuga racemosa* bei Menopausebeschwerden wie Hitzewallungen, Depressionen und Stimmungsschwankungen ist nach jahrzehntelanger positiver Erfahrungswerte unumstritten, der zugrundeliegende Mechanismus jedoch noch unbekannt. Nachdem die Wirkung nicht auf Phytoöstrogene oder östrogenähnliche Inhaltsstoffe zurückzuführen ist, wurde eine Erklärung nach anderen möglichen Wirkprinzipien gesucht. Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI: selektive serotonin re-uptake inhibitors) entfalten ihre Wirkung am Serotonin-Transporter und erleichtern das Menopausesymptom der Hitzewallungen. Ebenso sind einige Serotoninrezeptoren, wie 5-HT<sub>7</sub> und 5-HT<sub>1A</sub> an der Thermoregulation beteiligt (Hedlund and Sutcliffe, 2004). So war es naheliegend Extrakte aus *Cimicifuga racemosa* nach Agonisten für solche Rezeptoren zu analysieren.



**5-Hydroxytryptamin (Serotonin)**



**N-Methylserotonin**

ABBILDUNG 9 CHEMISCHE STRUKTUREN VON 5-HYDROXYTRYPTAMIN UND N-METHYLSEROTONIN ([HTTP://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:SEROTONIN\\_%285-HT%29.SVG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serotonin_%285-HT%29.svg); [HTTP://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:NORBUFOTENINE\\_%28SMALL%29.SVG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Norbufotinine_%28SMALL%29.svg))

Untersuchungen zu serotoninerger Wirkprinzipien eines isopropanolischen Extrakts von CR zeigten starke Bindungsaffinitäten zu den Serotoninrezeptor-Subtypen 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> und 5-HT<sub>7</sub> (Burdette et al., 2003). Weitere klinische Studien zur Untersuchung des Extrakts auf ihren Einfluss auf intrazelluläre Messwerte von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in HT<sub>7</sub>-transfizierten HEK 293-Zellen ergaben eine agonistische Wirkung der aktiven Substanzen auf den HT<sub>7</sub>-Rezeptor. Die Identifizierung von N-Methylserotonin als biologisch aktive Komponente im Extrakt erfolgte über massenspektrometrische Messungen und kann demnach für die Linderung von serotoninerger Menopausensymptomen verantwortlich sein (Powell et al., 2008).

Eine Vielzahl von knochenrelevanten Signalwegen und den zugrundeliegenden Mechanismen, darunter Wnt/frz/LRP5 Signalweg, wurden bereits aufgeklärt. Dass jedoch auch serotoninerge Signalwege für den Knochen bedeutsam sein könnten ist Mittelpunkt neuerer Studien. So führt zum Beispiel der Knockout des Serotoninrezeptors HT<sub>2A</sub> in mesoblastischen Zellen aufgrund verminderter Osteoblastenaktivität zu einer Osteopenie, was für eine Erhöhung des Knochenumsatzes über serotoninerge Signalwege spricht (Collet et al., 2008; Locker et al., 2006). Eine Studie von Yadav et al. (2010) wiederum beobachtete eine knochenhemmende Wirkung von Serotonin in ovariectomierten Ratten und Mäusen. Dafür wurde ein Wirkstoff entwickelt, der das Enzym Tryptophanhydroxylase-1, das die Umwandlung der Aminosäure L-Tryptophan in 5-Hydroxytryptamin katalysiert, hemmt. Bereits geringe Dosen des Wirkstoffs im Futter über einen Zeitraum von sechs Wochen führten zu einer Verhinderung der Entwicklung einer Osteoporose und zur Heilung bereits erkrankter Tiere.

### 3.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der geplanten Untersuchungen soll einerseits in Zusammenarbeit mit Bionorica SE eine Inhaltsstoffprofilierung durch Fraktionierung von *Cimicifuga racemosa* hinsichtlich enthaltener osteoprotektiver Wirkstoffe erfolgen und andererseits Methoden untersucht werden, die zur Bestimmung der Osteoprotektivität aktiver Fraktionen angewendet werden können. Dazu dienen in erster Linie Untersuchungen die zu einer fundierten Safety-Aussage der verwendeten Extrakte beitragen können. Apoptose- und Proliferationsstudien an humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), ausgewählte Tumorzelllinien und verschiedenen Mauszellen sollen eine mögliche Toxizität der Extrakte bzw. Einflüsse auf das Regenerationspotenzial der untersuchten Zellen aufdecken. Des Weiteren werden Untersuchungen zum Einfluss auf die zelluläre Seneszenz und genotoxischem Stresspotenzial die Safety-Analysen ergänzen. Um osteoprotektive Wirkeigenschaften der einzelnen Fraktionen zu untersuchen, werden Differenzierungsstudien in hMSC und, in der Differenzierung weiter fortgeschrittenerer, Zellen wie Osteoblasten und Adipozyten durchgeführt. Diese Studien werden in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Wuttke von der Universität Göttingen stattfinden, die gleichzeitig die zu untersuchenden Extrakte in Rattenstudien anwenden werden. Zur Ergänzung der Fragestellung, welche Methoden sich für eine Aussage bezüglich osteoprotektiver Eigenschaften von *Cimicifuga racemosa* eignen würden, sollen weitere Methoden, die in der Arbeitsgruppe Prof. Jakob bereits erfolgreich etabliert wurden, wie Untersuchungen zur Mechanosensitivität und Mikroarray-Analysen, angewendet werden.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Accu-jet Pipettierer	Brand, Wertheim, Deutschland
AxioCam MRC	Zeiss, Jena, Deutschland
Axioskop 2	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank, Inkubator HERAccl 240	Heraeus, Kleinostheim, Deutschland
Consort E835 Power Supply	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Elektrophoresekammern	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
GeneChip Scanner 3000	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK
Hochleistungs pH-mV-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Microplate-Reader, Tecan Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Mikropipetten 1µl, 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Wilovert, Bonn, Deutschland
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland
Sonifikator Sonoplus	BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus Lamin Air®, Burladingen, Deutschland
Thermocycler MJ Research	Biozym Diagnostik GmbH, Hessian Oldendorf, Deutschland
Thermocycler peQSTAR	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler Primus	MWG-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland
Thermocycler Primus 25	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
UV-Transilluminator mit Video, Kamera Modul	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin, Deutschland
6 well, 12 well, 96 well Platten	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
Filter (0,2 mm, 0,45 mm)	Satorius Stedim biotech, Göttingen, Deutschland
Kryoröhrchen	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
LP Strip Tubes, 8-Strip, weiß	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
NucleoSEQ Columns	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Optical Flat Cap Stripes	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR Softtubes 0,2ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
Zellschaber 24cm, 30cm	Biochrom, Berlin, Deutschland

#### 4.1.3 Chemikalien/Reagenzien

2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Alizarin Rot S	Chroma-Gesellschaft Schmidt & Co., Stuttgart, Deutschland
Ammoniaklösung (25 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Azeton	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) für Zellkultur	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Roti <sup>®</sup> -Quant (5x)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
dNTP Set	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HPLC-H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

KAPA SYBR®FAST QPCR MasterMix	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Loading-Dye (6x)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Methanol	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
M-MLV-Puffer (5 x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
NaCl	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Oligo-(dT)-Primer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Puffer Y (10 x)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
peQGold 100bp DNA Leiter Plus	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
peQGold 1kbp DNA Leiter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
QuantTect Primer Assays	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti®-Quant	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green I (10000 x) nucleic acid gel stain	BioWhittaker Molecular Application, Rockland, ME, USA
TEMED	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Tris	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tryptanblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Trypton	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Pflanzenextrakt und Subfraktionen von <i>Cimicifuga racemosa</i> , gereinigt und fraktioniert	Bionorica SE, Neumarkt/Oberpfalz, Deutschland
Luciferin	PJK GmbH, Kleinbittersdorf, Deutschland

#### 4.1.4 Kits

Caspase-Glo® 3/7Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleo Spin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleo Spin® Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

### 4.1.5 Primer

#### 4.1.5.1 Primer für semi-quantitative PCR

Alle Primer für die semi-quantitative PCR wurden von der Firma biomers.net GmbH in Ulm, Deutschland bezogen.

TABELLE 2 LISTE DER VERWENDETEN PRIMER FÜR SEMI-QUANTITATIVE PCR. INKLUSIVE SEQUENZEN, LÄNGE DES PCR-PRODUKTES IN BP, ANNEALING-TEMPERATUR (T<sub>A</sub>) UND MGCL<sub>2</sub>-KONZENTRATION IN NM.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Amplikon-Länge [bp]	TA [°C]	MgCl <sub>2</sub> [nM]
ALPL	TGGAGCTTCAGAAGCTCAA CACCA	ATCTCGTTGTCTGAGTACC AGTCC	490	51	1,5
BGLAP	ATGAGAGCCCTCACACTCC TC	GCCGTAGAAGCGCCGATA GGC	293	58	1,5
BMP2	CAAGCCAAACACAAACAGC G	TAGCGACACCCACAACCCT	343	54	
CD24	AGGGCAATGATGAATGAG AAT	CTGGGCGACAAAGTGAGA	163	58	2,0
COL1A2	GGACACAATGGATTGCAAG G	TAACCACTGCTCCACTCTGG	461	52	
COMP	AGCATGCAGACTGCGTCC	CTTCTGGGACCGGCAGT	310	60	2,0
CTNNB1	AGAGTAGCTGCAGGGGTC CT	TCTTGTGGCTTGTCTCAGA	170	60	3,0
DKK1	ATGATGGCTCTGGGCGCAG	TTAGTGTCTCTGACAAGTG TGA	800	60	2,5
DMP1	GAACAGGCAAATGAAGAC CC	CATTCCCTCATCGTCCAAC	500	55	2
EEF1A1	AGGTGATTATCCTGAACCA TCC	AAAGGTGGATAGTCTGACT GTTG	235	54	1,5
EGR2	ATGGGAGGAACATAGC	CAAGGCACCAAGGACA	244	50	2,5
FABP4	AACCTTAGATGGGGGTGTC C	ATGCGAATCCAGGT	177	60	
FGFR2	CTCCTCCATGAACTCCAAC	CTGGCTTATCCATTCTGTG	872	53	2,0
HDAC7	CCCAGCAAACCTTCTACCA A	CCACCCTGTTACCCAGAAG A	453	59	
HELLS	ATGCTGCCAGAACTAA	TGTAACAAGGCGATAA	354	46	2,0
IGFBP5	GAATCCTTTGCGGTCACAA T	GACCGCAGAAAGAAGCTG AC	210	55	1,5
LPL	GAGATTTCTCTGTATGGCA CC	CTGCAAATGAGACACTTTC TC	276	62	
NOG	GCCAGCACTATCTCCACA	CAGCAGCGTCTCGTTCA	119	50	2,5
OCT4	CCGCCGTATGAGTTCTGTG	GATGGTCGTTTGGCTGAAT A	360	59	2,5
PPAR <sub>γ</sub> 2	GCTGTTATGGGTGAAACTC TG	ATAAGGTGGAGATGCAGG CTC	352	61	

PSG5	TACAAAGGACAACCTGATGG ACC	CTGGGGAGGTCTGGACCAT	289	54	2,5
SOST	CTCTGCCACTAACTTGCT	GGCGGATGTGATTTCTA	480	50	2,0
SPP1	ACGCCGACCAAGGAAAAC C	GTCCATAAACCACTATC ACCTCG	443	51	1,5
VEGFA	TCTTCAAGCCATCCTGTGTG	TGTTGTGCTGTAGGAAGCT CA	165	59	2,5
WNT5B	ATTTACTGTCTGTCCACCAC G	TCCCGCCACCTTCATAG	149	56	2,0

#### 4.1.5.2 Primer für quantitative Realtime-PCR

Selbst-designte Primer für die quantitative PCR wurden von der Firma biomers.net GmbH in Ulm, Deutschland bezogen. Ansonsten wurden Primer-Assays von der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland verwendet.

**TABELLE 3 LISTE DER VERWENDETEN PRIMER FÜR QUANTITATIVE PCR.INKLUSIVE SEQUENZEN, LÄNGE DES PCR-PRODUKTES IN BP, ANNEALING-TEMPERATUR (T<sub>A</sub>). DIE PCRS WURDEN MIT DEM KAPA SYBR®FAST QPCR MASTERMIX VON PEGLAB DURCHFÜHRT.**

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Amplikon-Länge [bp]	TA [ °C]
ALPL	TCAACACCAACGTGGCTAA G	AAGGGGAACCTGTCCATCT C	145	56
BGLAP	CAGGCGCTACCTGTATCAA TG	TCAGCCAACTCGTCACAGT C	108	58
DMP1	AAGGGTCATTTGGCTCAGG	TACTGGGGTCTTCATTTGC	104	56
EEF1A1	QuantiTect Primer Assay		unbekannt	60
FABP4	TACTGGGCCAGGAATTTGA C	GACACCCCATCTAAGGTT ATG	77	60
GAPDH	QuantiTect Primer Assay		unbekannt	57
HRPT1	QuantiTect Primer Assay		unbekannt	57
LPL	CCGTTTATCAACTGGATG G	TGGTCAGACTTCCTGCAAT G	110	58
OPG	TTGCAGTGTCTTTGGTCTCC	TGAAGAATGCCTCCTCACA C	128	58
PPAR $\gamma$ 2	GGAGTTCATGCTTGTGAAG G	GGCATTCTGAAACCGACA G	142	57
RANKL	TCGTTGGATCACAGCACAT C	TTCAAGCTTGCTCCTCTTGG	83	59
SOST	CGGAGCTGGAGAACAACA AG	TCACGTAGCGGGTGAAGTG	126	60
SPP1	TATGATGGCCGAGGTGATA G	CATTCAACTCCTCGCTTTCC	133	60

### 4.1.6 Vektoren

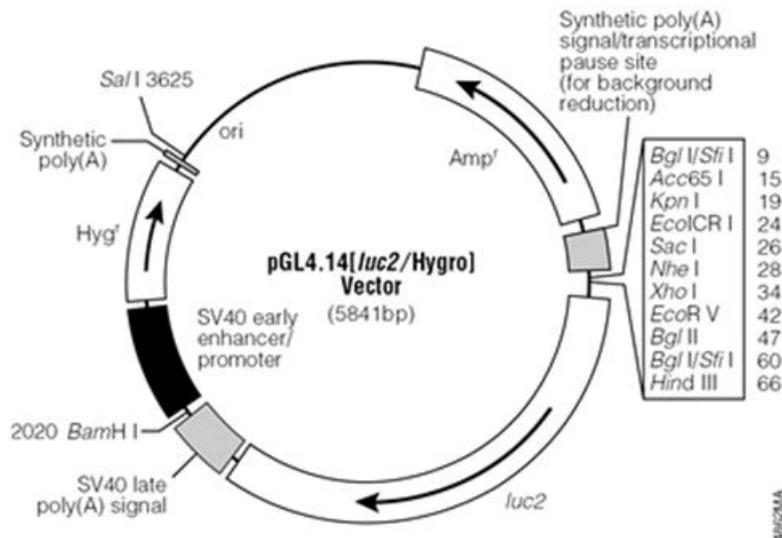


ABBILDUNG 10 VEKTORKARTE VON PGL4.14[LUC 2/HYGRO] VON PROMEGA GMBH, MANNHEIM, DEUTSCHLAND

### 4.1.7 Software und Internetseiten

Affymetrix NetAffx Analysis Center

<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>

BioCapt MW, Version 99

LTF, Wasserburg, Deutschland

BioEdit

Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA

BioProfil Bio I.D., Version 99

LTF, Wasserburg, Deutschland

DNA Engine Opticon®2

BioRad, München, Deutschland

GeneCards

<http://www.genecards.org>

GeneChip Operating Software 1.2

Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK

NCBI Blast

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

NCBI Pubmed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Primer3Plus

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

Significance Analysis of Mikroarrays

Tool erhalten von <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>

CarmaWeb

[www.carmaweb.com](http://www.carmaweb.com)

EndNote X5

[www.endnote.com](http://www.endnote.com)

#### 4.1.8 *Lösungen, Puffer und Medien*

##### 4.1.8.1 Allgemeine Lösungen

###### 10 x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer), pH 8,3

0,89 M Tris

0,89 M Borsäure

0,2 M EDTA (pH 8)

Add a 1 l Aqua bidest.

###### DNA-Ladepuffer

5,4 M Glycerol

0,5 M EDTA (pH 8)

4,64 mM Xylencyanolblau

3,73 mM Bromphenolblau

Add a 50 ml Aqua bidest.

###### DNA-Marker

0,05 µg/µl peQGold 100bp/ 1kb DNA Leiter

0,6 x Loading Dye

Add a 1 ml Aqua bidest.

###### dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)

dATP 20 mM

dCTP 20 mM

dGTP 20 mM

dTTP 20 mM

Add a 100 µl HPLC-H<sub>2</sub>O

### Denaturierungs-Mix

10 % deionisiertes Formamid

7,4 % Formaldehyd (pH > 4)

1,5 x MOPS

1,4 x DNA-Ladepuffer

Add a 10 ml HPLC-H<sub>2</sub>O

### 10 x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH 7,6

1,37 M NaCl

27 mM KCl

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,76 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Add a 1 l Aqua bidest.

### 10 x TBS (Tris-gepufferte Saline), pH 7,2 - 7,4

0,2 M Tris-base

1,5 M NaCl

Add a 1 l Aqua bidest.

### 1 x TTBS (Tween Tris-gepufferte Saline ), pH 7,2 - 7,4

1 % Tween-20

1 x TBS

Add a 1 l Aqua bidest.

### Alizarin Rot S-Lösung

1 % Alizarin Rot S (Alizarin sulfosaures Natrium)

0,25 % Ammoniaklösung (25 %)

Add a 100 ml Aqua bidest.

### Kernechtrot-Lösung

0,5 g/l Aluminiumsulfat  
0,01 g/l Kernechtrot  
Add a 100 ml Aqua bidest.

### Trypanblau-Lösung

0,4 % Trypanblau  
0,9 % NaCl  
Add a 40 ml Aqua bidest.

### Luciferin-Lösung

100 mg Luciferin  
7,59 ml Luciferase-Puffer

### Luciferase-Puffer

0,1 mM EDTA  
2 mM DTT  
5 mM ATP  
2,67 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM Tricine

### Pufferlösung GPx, pH 7,4

250 mM Sucrose  
20 mM HEPES  
1 mM EDTA

### Reaktionsmischung GPx, pH 8,0

0,1 M Tris  
0,5 M EDTA  
200 mM NADPH  
2 mM Glutathion  
1 U/ml Glutathionreduktase

Pufferlösung TrxR, pH 7,5

1 mM EDTA

50 mM Tris

pH 7,5

Reaktionsmischung TrxR, pH7,0

100 mM Kaliumphosphat

10 mM EDTA

0,2 mM NADPH

2,5 mM 5,5'-Dithio-bis-Nitrobenzoesäure

4.1.8.2 Zellkulturmedien

Nährlösungen und Reagenzien für den Umgang mit eukaryotischen Zellen wurden von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland, bezogen, mit Ausnahme von Ascorbat (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland).

hMSC-Medium

500 ml DMEM Ham`s F12

10 % FCS (fetal calf serum)

1 x Penicillin/Streptomycin (100x)

50 µg/ml Ascorbat

hMSC-TERT-Medium

500 ml DMEM with Earle`s Salt

10 % FCS (fetal calf serum)

1 x Penicillin/Streptomycin (100x)

1 % L-Glutamin

### MCF7-Medium

500 ml DMEM (hG)  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 x Penicillin/Streptomycin (100x)  
1 % L-Glutamin  
500 µl Pyruvat  
500 µl Insulin (10 mg/ml)

### MDA-MB-231-Medium

500 ml DMEM/Ham's F12  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 x Penicillin/Streptomycin (100x)  
1 % L-Glutamin

### LNCaP-Medium

500 ml RPMI 1640  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 x Penicillin/Streptomycin (100x)  
1 % L-Glutamin

### mc3t3-e1-Medium

α-MEM  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 % L-Glutamin

### SaOs-2-Medium

500 ml McCoy's 5A  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 x Penicillin/Streptomycin (100x)  
1 % L-Glutamin

### HEK293-Medium

DMEM high Glucose  
1 mM Pyruvat  
10 % FCS (fetal calf serum)

### Adipogenes Differenzierungsmedium

500 ml DMEM (hG)  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 x Penicillin/Streptomycin (100x)  
1 % L-Glutamin  
100 mM Indomethacin (1000x)  
500 mM IBMX (1000x)  
1 mM Dexamethason (1000x)  
500 µl Insulin (10 mg/ml)

### Osteogenes Differenzierungsmedium

#### **hMSC**

500 ml DMEM High Glucose (4,5g/l)  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 x Penicillin/Streptomycin (100x)  
50 µg/ml Ascorbat  
10 mM β-Glycerolphosphat  
100 nM Dexamethason

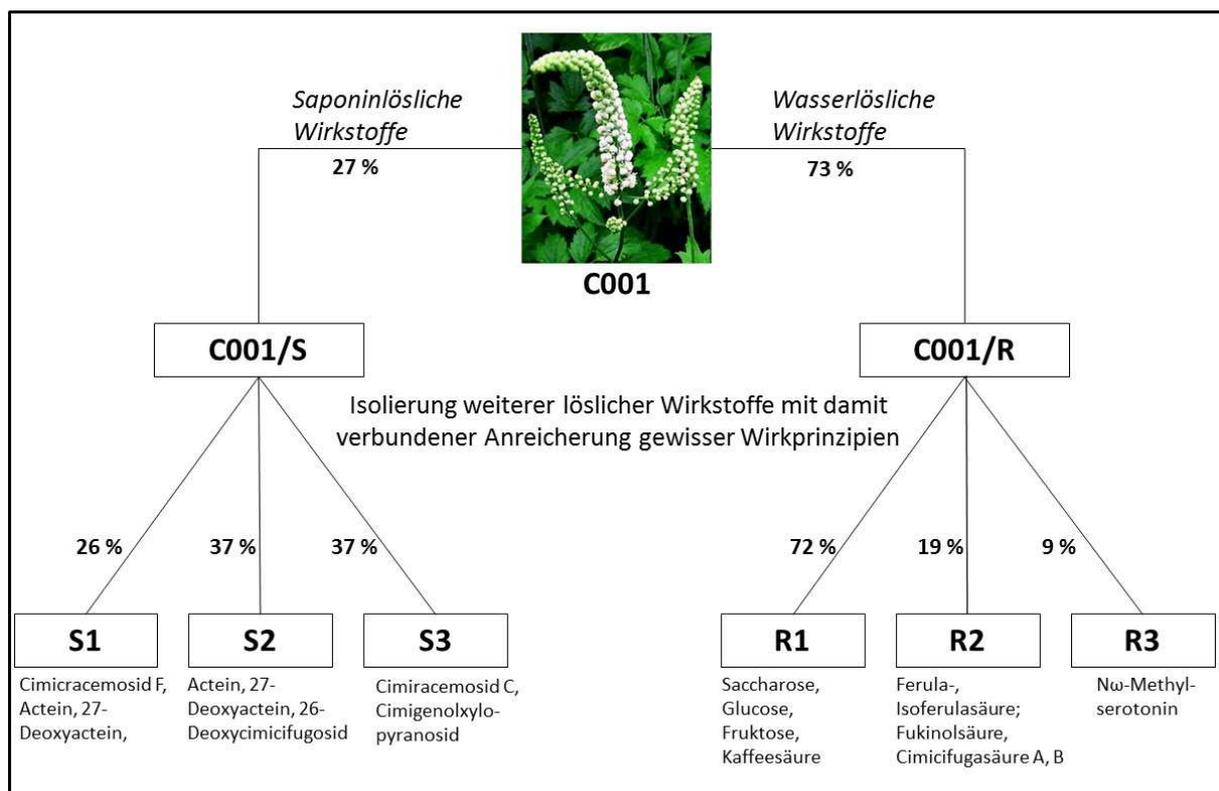
#### **SAOS-2**

500 ml McCoy's 5A  
1,5 mM L-Glutamin  
10 % FCS (fetal calf serum)  
1 x Penicillin/Streptomycin (100x)  
50 µg/ml Ascorbat  
10 mM β-Glycerolphosphat  
100 nM Dexamethason

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Fraktionierungsprozess von *Cimicifuga racemosa*

Der verwendete Pflanzenextrakt wurde von der Firma Bionorica SE aufgereinigt, fraktioniert und analytisch charakterisiert und für die verschiedenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Ausgehend von aufgereinigtem Rohextrakt, C001 genannt, folgte eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. Durch die Verteilung des Extraktes zwischen wässriger und Dichlormethanphase wurde die Anreicherung gewisser Pflanzenwirkstoffe erreicht. Die so erhaltenen Fraktionen C001/S (saponinhaltig) und C001/R (wässrige Restfraktion) wurden weiter subfraktioniert unter Verwendung von Normaldruck-Silica-Umkehrphasenchromatographie (Abbildung 11). Die getrockneten und pulverisierten Pflanzenextrakte wurden je in 58 %igem Ethanol gelöst (1 mg/ml) und zur vollständigen Auflösung der Bestandteile anschließend sonifiziert.



**ABBILDUNG 11 FRAKTIONIERUNGSPROZESS VON CIMICIFUGA RACEMOSA. NACH FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION DES HAUPTEXTRAKTES C001 ERFOLGT EINE ANREICHERUNG VON SAPONINLÖSLICHEN WIRKSTOFFEN IN C001/S UND EINE ANREICHERUNG VON WASSERLÖSLICHEN WIRKSTOFFEN IN C001/R. NACH WEITERER SUBFRAKTIONIERUNG DER ERHALTENEN TOCHTEREXTRAKTE MITTELS NORMALDRUCK-SILICA-UMKEHRPHASENCHROMATOGRAPHIE WURDEN JE DREI WEITERE ENKELFRAKTIONEN MIT UNTERSCHIEDLICH ANGEREICHERTEN WIRKSTOFFEN ERHALTEN.**

## 4.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.2.1 Isolierung von zellulärer RNA

Zur Isolierung der zellulären RNA wurden die Zellen nach gründlichem Entfernen von Zellmedium mit einem Gemisch aus 350  $\mu$ l RA1-Puffer und 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und mit einem Zellschaber gelöst. Nach Überführung in ein steriles, RNase-freies 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß wurden die Proben mindestens über Nacht bei -20 °C gelagert. Die RNA-Isolation und Reinigung erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Kits (Macherey-Nagel, Düren) durch reversible Bindung an eine Silicamatrix. Die Isolierung und Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Bestimmung der Konzentration wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

### 4.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich spektralphotometrisch mit Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmen, indem die Extinktion (optische Dichte OD) beim Absorptionsmaximum von 260 nm bestimmt wird ( $OD_{260}$ ). Durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) kann eine Aussage bezüglich der Reinheit der untersuchten Nukleinsäure getroffen werden, da hier das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste liegt. Reine RNA liegt bei einem  $OD_{260}/OD_{280}$  von 2,0 vor. Die aufgereinigten Proben wurden auf Konzentrationen im messbaren Bereich (0,05-50  $\mu$ g/ $\mu$ l) mit 1 mM Tris-HCl (ph 7,5) verdünnt, in speziellen UV-durchlässige Küvetten überführt und gemessen. Als Referenzwert diente 1 mM Tris-HCl (ph 7,5).

### 4.2.2.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription katalysieren RNA-abhängige DNA-Polymerasen, auch Reverse Transkriptasen genannt, die Umschreibung von RNA in komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA).

Je 2  $\mu$ g RNA wurden mit Oligo-(dT)-Primern (50 pmol/ $\mu$ l) versetzt und auf 16  $\mu$ l mit HPLC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Denaturierung sowie Bindung der Oligo-(dT)-Primer an Poly(A)-Sequenzen der mRNA wurden durch 5-minütige Erhitzung bei 70 °C mit anschließender Inkubation auf Eis erreicht. Der Ansatz wurde mit einem Mix aus 1 x M-MLV Puffer, 0,8 mM dNTP, 8 U/ $\mu$ l M-MLV

Reverse Transkriptase und HPLC-H<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt. Die Elongation der cDNA erfolgte im Thermocycler bei 42 °C für 1 h und wurde abgestoppt durch eine 10-minütige Inkubation bei 95 °C.

Um eine genomische DNA-Kontamination ausschließen zu können, wurde bei jeder Reversen Transkription eine Negativ-Kontrolle ohne RNA pipettiert. Diese wurde mittels des Haushaltsgens *EEF1α1* bei der semi-quantitativen PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft.

#### 4.2.2.4 Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein von Mullis et al. (1986) entwickeltes Verfahren, bei dem unter Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen eine DNA-Matrize in einer zyklischen Reaktion exponentiell amplifiziert werden kann. Als Ausgangsmaterial dient die zu amplifizierende doppelsträngige DNA-Sequenz, zu der hohe Konzentrationen von synthetischen Oligonukleotidprimern zugesetzt werden, deren Sequenzen jeweils zum 3'-Ende einer der beiden DNA-Stränge komplementär sind. Zusätzlich werden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase zugesetzt.

Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer. Sie sollte 5 °C unter der Schmelztemperatur des Primers mit der geringeren Schmelztemperatur liegen. Die primerspezifische Schmelztemperatur kann näherungsweise errechnet werden:

$$T_m(^{\circ}C) = 4x (G + C) + 2x (A + T)$$

##### FORMEL 1 BERECHNUNG DER PRIMERSPEZIFISCHEN SCHMELZTEMPERATUR MIT DER WALLACE-REGEL

Die Elongationszeit wurde je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments und nach der Polymerisationsgeschwindigkeit der verwendeten Polymerase gewählt.

In einem allgemeinen PCR-Ansatz werden 1 x PCR-Puffer Y, 2,5 mM dNTP, 0,5 pmol/µl spezifischer Vorwärtsprimer, 0,5 pmol/µl spezifischer Rückwärtsprimer, gegebenenfalls zusätzlichem MgCl<sub>2</sub> und 0,03 U/µl hitzestabiler Taq DNA-Polymerase pipettiert. Pro Ansatz wurden 80 ng cDNA eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente bei jeder PCR ein Ansatz ohne cDNA, um mögliche DNA-Kontaminationen in den verwendeten Reagenzien zu überprüfen. Die Standardbedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tabelle 4 ersichtlich.

TABELLE 4 STANDARDBEDINGUNGEN FÜR SEMI-QUANTITATIVE PCR IM THERMOCYCLER MIT WELCHEM DIE PCR-KONSTRUKTE DIESER ARBEIT HERGESTELLT WURDEN.

Schritt	Temperatur [ °C]	Zeit	Zyklenanzahl
<b>Initiale Denaturierung</b>	94	5 min	1
<b>Denaturierung</b>	94	30 sek	} Primerspezifisch
<b>Annealing</b>	Primerspezifisch	30 sek	
<b>Elongation</b>	72	30 sek	
<b>Finale Elongation</b>	72	10 min	1

Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie an möglichst viele bzw. alle isoformen Sequenzen des jeweiligen Gens binden und in mindestens 2 verschiedenen Exons lokalisiert sind, um ungewollte Kontaminationen mit genomischer DNA ausschließen zu können.

#### 4.2.2.5 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit PCR oder Real-Time-quantitative PCR, ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Das System basiert auf der Erzeugung von fluoreszierenden PCR-Produkten die am Ende eines jeden PCR-Zyklus detektiert werden. Am Ende eines Laufs wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase, da hier eine Verdoppelung der Zielsequenz unter optimalen Reaktionsbedingungen stattfindet, vorgenommen.

##### 4.2.2.5.1 Durchführung

In einem allgemeinen Ansatz für qRT-PCR wurden 10 µl KAPPA Mastermix, 1 µl 0,5 pmol/µl spezifischer Vorwärtsprimer, 1 µl 0,5 pmol/µl spezifischer Rückwärtsprimer oder 2,5 µl Quantitec Primer mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde jeweils dreimal wiederholt. Pro Ansatz wurden 8 ng cDNA eingesetzt. Die Standardbedingungen für die qPCR-Reaktion sind in Tabelle 5 ersichtlich.

TABELLE 5 BEDINGUNGEN FÜR QUANTITATIVE PCR

Schritt	Temperatur [ °C]	Zeit	Zyklenanzahl
<b>Initiale Denaturierung</b>	94	5 min	1
<b>Denaturierung</b>	94	5 sek	} 40
<b>Annealing</b>	Primerspezifisch	15 sek	
<b>Elongation</b>	72	5 sek	
<b>Plate read</b>			
<b>Finale Elongation</b>	72	2 min	1
<b>Plate read</b>			
<b>Melting Curve</b>	55-95	0,3/T	1

## 4.2.2.5.2 Auswertung

Die Auswertung wurde mit dem Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodell abgeleitet von der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt. Annahme bei diesem Modell ist, dass eine optimale Effizienz, d.h. die Verdopplung der Zielsequenz mit jedem Zyklus, nicht der Praxis entspricht. Geringste Schwankungen in der Effizienz eines Gens können zu enormen Abweichungen in den relativen Expressionsunterschieden führen:

$$Ratio = \frac{E_{Zielgen}^{\Delta CT_{Zielgen} (Kontrolle-Behandlung)}}{E_{Referenzgen}^{\Delta CT_{Referenzgen} (Kontrolle-Behandlung)}}$$

## FORMEL 2 EFFIZIENZ-KORRIGIERTES RELATIVES QUANTIFIZIERUNGSMODELL

Idealerweise ist das Referenzgen nicht reguliert und sowohl in der Behandlung als auch in der Kontrolle sind die CT-Werte identisch. In diesem Fall wird der Nenner gleich eins und das Modell vereinfacht sich:

$$Ratio = E_{Zielgen}^{\Delta CT_{Zielgen} (Kontrolle-Behandlung)}$$

## FORMEL 3 VEREINFACHTES EFFIZIENZ-KORRIGIERTES QUANTIFIZIERUNGSMODELL

Die Ermittlung der Effizienz eines jeden Gens erfolgt über die Erstellung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Wird anschließend der Logarithmus der Verdünnungsstufen gegenüber den CT-Werten aufgetragen, lässt sich aus der Steigung m die Effizienz ermitteln.

$$E = 10^{(-1/m)} - 1$$

**FORMEL 4 BERECHNUNG DER EFFIZIENZ AUS DER STEIGUNG M DER STANDARDKURVE**

Dafür wurde eine Mischprobe aus verschiedenen cDNA-Proben erstellt und diese in verschiedene Stufen von 1:5; 1:10; 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:10000 verdünnt. Die PCR-Reaktion wurde wie oben beschrieben pipettiert und laut Tabelle 5 durchgeführt. Aufgrund der hohen Sensitivität der qRT-PCR wurden alle Proben in Triplikaten gemessen, um Fehlerquellen wie Pipettierungenauigkeiten zu reduzieren. Die ermittelten Effizienzen sind abhängig vom untersuchten Gen, müssen demnach nur einmalig bestimmt werden.

#### 4.2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen (RNA oder DNA) nach ihrer Größe. Dabei wird ein elektrisch angelegtes Feld (80-120 V) verwendet um die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix wandern zu lassen. Hierbei bewegen sich kleinere Moleküle schneller und ermöglichen so eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 1- bis 2 %-ige Agarosegele (w/v) verwendet. Nach Abkühlen des Agarosegels auf 60 °C wurde der Lösung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt. Die Detektion der DNA-Fragmente im Gel erfolgte durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (302 nm) im UV-Transilluminator. Die Densitometrie der detektierten Banden wurde mit der BioCapt MW Software Version 99 durchgeführt.

##### 4.2.2.6.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zur Detektion von RNA-Degradation wurden denaturierende Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Hierfür wurde je 1 µg isolierte RNA mit 5 µl Denaturierungs-Mix vermischt und bei 65 °C 10 min inkubiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Intakte RNA zeigt sich an den 28S- und 18S-Banden, wobei die 28S-Bande doppelt so stark fluoresziert im Vergleich zur 18S-Bande. Ist die RNA degradiert ist dieses Verhältnis gestört. Weitere Degradationsprodukte sind als Schmier bei geringer Größe sichtbar.

#### 4.2.2.6.2 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zur Detektion von DNA-Moleküle wurden je 2 µl DNA-Ladepuffer mit der zu detektierenden DNA vermischt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenmarker dienten ein 100 bp-Marker oder ein 1 kb Marker.

#### 4.2.2.7 Mikroarray-Analysen

Mikroarray-Analysen ermöglichen die parallele Untersuchung von mehreren tausend Gene in einer geringen Menge biologischen Probenmaterials und finden Anwendung bei Untersuchungen der differentiellen Genexpression zwischen verschiedenen Organismen oder Zelltypen. Für die Analyse wird RNA aus den zu untersuchenden Proben isoliert und nach Umschreibung in cDNA und Transkription zu cRNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Im Anschluss erfolgt die Hybridisierung auf den Chip, indem markierte einzelsträngige cRNA-Stücke am komplementären Stück auf dem Array binden. Nach diversen Waschschritten folgt die Auswertung, indem die Intensität der Fluoreszenzemission proportional zur Menge an gebundener cRNA gemessen wird.

Für die vorliegenden Transkriptom-Analysen wurden hMSC unterschiedlicher Spender mit Extrakte von *Cimicifuga racemosa* in unterschiedlichen Konzentrationen für 24 h inkubiert und anschließend die zelluläre RNA isoliert. Die RNA-Proben wurden mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese vor der Verwendung hinsichtlich ihrer Qualität überprüft. Alle folgenden Schritte wurden von PD Dr. L. Klein-Hitpass am Institut für Zellbiologie, Genchip Labor an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Die RNA-Proben wurden mit den entsprechenden Kits nach dem Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Protokoll (Version 2) in cRNA umgeschrieben. Alle Proben wurden auf je einem GeneChip HG-U 133 Plus 2.0 hybridisiert. Auf diesen Microchips sind Oligonukleotide für über 54'000 Probesets gebunden, die wiederum 47'400 Transkriptvarianten bzw. 38'500 Genen entsprechen. Hybridisierung, Waschen und Färben der Microchips wurde nach dem Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Protokoll (Version 2) durchgeführt. Die Hybridisierungssignale wurden mit dem GeneChip Scanner 3000 detektiert und mit der GeneChip Operating Software 1.2 analysiert. Bei allen Hybridisierungen wurden Hybridisierungs-Kontrollen zur cRNA gegeben, um die Werte verschiedener Chips normalisieren zu können.

#### 4.2.2.7.1 Statistische Auswertung von Mikroarray-Daten

Die Normalisierung der Daten wurde von PD Dr. L. Klein-Hitpass vorgenommen, die Transkriptom-Vergleiche von stimulierter und Kontroll-RNA wurden entweder mit Comparison-Analysis (Probenanzahl <3) oder „Significance Analysis of Mikroarrays“ (SAM; Probenanzahl >3) nach Tusher et al. (2001) berechnet. Nur jene Probesets – bzw. Genprodukte – die in mindestens einer der beiden hMSC-Gruppen in mindestens 50 % der RNA-Proben exprimiert waren (= „present“), wurden weiter analysiert. Differentielle Gen-expression wurde durch folgende Kriterien definiert: Der Foldchange (FC), also die Stärke der Genexpressionsänderung zwischen zwei Vergleichsgruppen musste < 0,667 für erniedrigte Expression und > 1,5 für erhöhte Expression betragen, dies entspricht einer 1,5fachen Genexpressionsänderung im Vergleich zur Kontroll-RNA. Zusätzlich wurden nur jene FC als aussagekräftig betrachtet, deren q-Wert < 10 % betrug. Dieser Wert bezeichnet die Falscherkennungsrate in Prozent, die sich wiederum aus den Daten von 500 Permutationen zusammensetzt.

### 4.2.3 Zellbiologische Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 4.2.3.1 Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) aus Spongiosa/Hüftkopf

Die Isolation von hMSC fand unter Einverständniserklärung der Patienten, sowie der Befürwortung der Lokalen Ethik Kommission der Universität Würzburg statt. Dafür wurde den Patienten in der Orthopädie des König-Ludwig-Hauses aufgrund von Alters-bedingter Arthrose oder Dysplasie ein Hüftkopf entfernt und durch eine Prothese ersetzt. Aus der dabei anfallenden Spongiosa des Hüftkopfes oder der Beckenpfanne wurden die hMSC nach dem leicht abgeänderten Protokoll von (Noth et al., 2002) isoliert.

Die Spongiosa wurde mittels einer Kürette aus dem Hüftkopf entfernt, in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit DMEM/Ham's F12 mit Penicillin/Streptomycin aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1200 Umdrehungen, wurde das überstehende Medium entfernt. Nach Zugabe von erneut 20 ml Medium wurden die hMSC durch kräftiges Schütteln aus den Trabekeln gelöst. Nach Absinken großer Knochenstücke

wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Nach zweimaliger Wiederholung oder mindestens solange, dass der Überstand nicht mehr blutrot ist, wurde nochmals bei 1200 Umdrehungen 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 20 ml hMSC-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Aussaat von ca.  $1 \times 10^9$  Zellen pro 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen in je 25 ml hMSC-Medium. Nach 3-4 Tagen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 %iger Luftfeuchtigkeit wurden nicht-adhärenente Zellen (Erythrozyten, Leukozyten etc.) entfernt und die adhärenenten Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Es folgten Mediumwechsel alle 3-4 Tage bis zur Konfluenz (70-80 %) der Zellen. Daraufhin konnte die Subkultivierung der hMSC in Passage 1 (P1) erfolgen.

#### 4.2.3.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung aller beschriebenen Zellarten fand in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 %iger Luftfeuchtigkeit statt. Alle Kulturmedien enthielten 1 % Penicillin/Streptomycin, sowie 10 % Hitze-inaktiviertes FCS und wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Mediumwechsel erfolgten alle 3-4 Tage. Soweit nicht anders erwähnt, fand die Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen mit 20 ml von, der jeweiligen Zellart, entsprechendem Medium statt.

Die Subkultivierung erfolgte bei einer durchschnittlichen Konfluenz von 70-80 %. Danach wurde das verbrauchte Medium vollständig abgenommen und mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen für 10 min bei 37 °C mit 1-2 ml 1x Trypsin/EDTA (0,5 g/l) inkubiert. Das Ablösen wurde durch Zugabe von Zellmedium unterbrochen und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 4 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und im entsprechenden Verhältnis auf neue Kulturflaschen verteilt.

#### 4.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl sowie Zellvitalität wurden mittels Anfärbung mit Trypanblau und anschließender Auszählung mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension mit 40 µl unsterilem PBS und 50 µl Trypanblau vermischt und auf die Zählkammer aufgetragen. Mit der Zählkammer lässt sich die Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit ermitteln, wobei für die Bestimmung der Zellzahl nur die intakten, und deshalb ungefärbten, Zellen in 4 Quadraten gezählt werden. Der Mittelwert der Zellzahl aller

4 Quadrate wurde mit dem Verdünnungsfaktor 10 und  $10^4$  multipliziert, um die Anzahl an Zellen pro ml Zellsuspension zu erhalten.

#### 4.2.3.4 Messung der Apoptose

Es wurden 1000 Zellen/Well auf einer 96er Wellplatte ausgesät und 24 h in je 100  $\mu$ l Zellmedium kultiviert. Im Anschluss erfolgte der Mediumwechsel mit dem jeweiligen Pflanzenextrakt (0, 10, 100 und 1000 ng/ml) für 72 h. Zur Bestimmung der Apoptose wurden je 100  $\mu$ l vom Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7-Reagenz pro Well dazugegeben und für 2 Minuten bei 350 U/min homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 30 Minuten wurde die Lumineszenz bestimmt.

#### 4.2.3.5 Messung der Proliferation

Der CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in der Kultur. Die Messmethode beruht auf der quantitativen Bestimmung von ATP, das die Präsenz von metabolisch aktiven Zellen wiedergibt. Es wurden 1000 Zellen/Well auf einer 96er Wellplatte ausgesät und 24 h in je 100  $\mu$ l Zellmedium kultiviert. Im Anschluss erfolgte der Mediumwechsel mit dem jeweiligen Pflanzenextrakt (0, 10, 100 und 1000 ng/ml) für 72 h. Zur Bestimmung der Proliferation wurden je 100  $\mu$ l Luciferase pro Well dazugegeben und für 2 Minuten bei 350 U/min homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 10 Minuten wurde die Lumineszenz bestimmt.

#### 4.2.3.6 Berechnung der Populationsverdopplung zur Bestimmung der Seneszenz

Für die Bestimmung der Seneszenz sind die Gesamtzahl der Zellteilungen bzw. die kumulative Anzahl der Populationsverdopplungen ausschlaggebend. Seneszente Zellen zeigen starke morphologische Veränderungen, wie Vergrößerung, Abflachung und Granulierung. Für die *in vitro*-Alterung wurden hMSC aus Patienten ab Passage  $P_1$  subkultiviert bis sie die seneszente Passage ( $P_x$ ) erreichten, in der innerhalb von 3 Wochen keine 70-90 %ige Konfluenz erreicht wurde. Da die Anzahl lebender hMSC bei Aussaat in  $P_0$  nicht bestimmbar ist, wurde die PD erst ab Aussaat in  $P_1$  festgehalten. Ebenso wurde keine PD für die letzte Passage ( $P_x$ ) bestimmt. Von  $P_0$  bis  $P_x$  wurden hMSC in 3 x 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen in einem Verhältnis von 1:3 ausgesät. In jeder Passage wurden Zellen für RNA-Analysen isoliert. Die Populationsverdopplung lässt sich wie folgt berechnen:

$$PD = \ln 2 \left( \frac{\text{Anzahl lebender Zellen nach Ernte}}{\text{Anzahl lebender Zellen nach Aussaat}} \right)$$

#### FORMEL 5 BERECHNUNG DER POPULATIONSVERDOPPLUNG

Der Kumulative PD beschreibt die Anzahl an Populationsverdopplungen im Verlauf der Zeit.

#### 4.2.3.7 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Zur Aufbewahrung von Zellsukulturen wurden Kryokonserven angelegt. Die Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen expandiert und nach Erreichen von 70-90 % Konfluenz trypsinisiert. Mindestens 2 x 10<sup>8</sup> Zellen wurden mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 10 % DMSO in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag folgte die Überführung in -80 °C über Nacht, mit anschließender Konservierung in flüssigem Stickstoff.

#### 4.2.3.8 Differenzierung

Mesenchymale Stammzellen weisen ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential auf. Adulte Stammzellen aus Spongiosa und vielen anderen Geweben lassen sich *in vitro* in unterschiedliche Gewebe, wie z.B. Muskeln, Fett und Knochen differenzieren.

##### 4.2.3.8.1 Osteogene Differenzierung von hMSC und SaOs-2

Zur Bestimmung der Mineralisierungskapazität wurden 1 x 10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> in 6-Well-Platten in entsprechendem Zellkulturmedium ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium durch osteogenes Differenzierungsmedium ersetzt und mit Extrakt (1; 10; 100; 1000 ng/ml bzw. anteilig errechnete Konzentrationen) stimuliert. Medienwechsel fanden alle 3-4 Tage statt. Als Negativ-Kontrolle diente die Kultivierung in hMSC-Medium. Die Dauer der osteogenen Differenzierung variierte zwischen 14 Tagen und 4 Wochen. Färbung erfolgte mit Alizarinrot S nach Protokoll und die Quantifizierung wurde mit der AxioVisio Software von Zeiss durchgeführt. Um die osteogene Differenzierung auf RNA-Ebene zu verfolgen, wurden hMSC in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen ausgesät, mit Extrakt inkubiert und nach Erreichen der Konfluenz 14 Tage mit osteogenem Medium differenziert und die RNA isoliert.

##### 4.2.3.8.2 Adipogene Differenzierung von hMSC

Zur Bestimmung der adipogenen Differenzierungskapazität wurden 1 x 10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> auf Deckgläschen in 6-Well-Platten in entsprechendem Zellkulturmedium ausgesät. Nach

Erreichen der Konfluenz wurde das Medium durch adipogenes Differenzierungsmedium ersetzt und mit Extrakt (1; 10; 100; 1000 ng/ml bzw. anteilig errechnete Konzentrationen) stimuliert. Medienwechsel fanden alle 3-4 Tage statt. Als Negativkontrolle diente die Kultivierung in hMSC-Medium. Die Dauer der adipogenen Differenzierung betrug 3 Wochen. Färbung erfolgte mit Ölrot nach Protokoll und die Quantifizierung mit der Axio Visio Software von Zeiss. Um die adipogene Differenzierung auf RNA-Ebene zu verfolgen, wurden hMSC in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen ausgesät, mit Extrakt inkubiert und nach Erreichen der Konfluenz 7 Tage mit adipogenem Medium differenziert und die RNA isoliert.

#### 4.2.3.8.3 Transdifferenzierung von hMSC

Für die Bestimmung der Transdifferenzierungskapazität von hMSC wurde eine adipogene Differenzierung induziert und nach zwei Wochen, durch Umstellung des Zellmediums, eine Umdifferenzierung zur Mineralisierung erzwungen. Dafür wurden hMSC zwei Wochen adipogen (wie oben beschrieben) andifferenziert und anschließend für weitere vier Wochen im osteogenen Medium weiterkultiviert. Die Stimulation mit Extrakt erfolgte einmal mit 100 bzw. 1000 ng/ml bei Beginn der osteogenen Differenzierung und einmal mit 100 bzw. 1000 ng/ml Extrakt bei Beginn der adipogenen Differenzierung. Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Färbung erfolgte mit Alizarinrot S nach Protokoll und die Quantifizierung wurde mit der AxioVision Software von Zeiss durchgeführt.

#### 4.2.3.9 Zytochemische Färbungen

Vor jeder Fixierung wurden die Zellen 1 x mit 1 x PBS gewaschen. Alle zytochemischen Färbungen wurden mit einem Axioskop 2, einer AxioCam MRC und dem Programm AxioVision aufgenommen.

##### 4.2.3.9.1 Alizarin Rot S-Färbung

Für die Detektion von mineralisierten Zellen wurde eine Färbung mit alkalischem Alizarin Rot S durchgeführt. Für die Fixierung wurden die Zellen mit 10 % Formaldehyd 10 min inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O bidest gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 1 ml 40 mM Alizarin Rot S-Lösung (pH 4,1) für 20 min. Nach 4x Waschen mit H<sub>2</sub>O bidest wurde die Platte an der Luft getrocknet und konnten bis zur Quantifizierung bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.2.3.9.2 Ölrot O-Färbung

Für die Detektion von Adipozyten wurde eine Färbung mit Ölrot O durchgeführt. Für die Fixierung wurden die Zellen 10 min mit 4 % Paraformaldehyd inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O bidest gewaschen. Nach einer 5 minütigen Vorinkubation mit 60 %igem 2-Propanol wurden die fixierten Zellen mit Ölrot O Färbelösung 10 min inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit 60 %igem 2-Propanol wurden die Zellen mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Die Kerngegenfärbung erfolgte durch 1 minütiger Inkubation mit Hämalaun. Im Anschluss wurde etwa 5 min mit Leitungswasser gespült. Die Deckgläschen wurden in Glyceringelatine zur mikroskopischen Auswertung eingebettet.

### 4.2.4 Biochemische Methoden

#### 4.2.4.1 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie-Blue R reagiert mit basischen Aminosäuren. Die rote Form des Farbstoffes wird nach der Bindung in die blaue Form umgewandelt, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm führt. Aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten des gebildeten Komplexes weist die Bradford-Methode eine hohe Sensitivität auf.

Zur Proteinbestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA von 0 bis 2000 µg/ml als Kalibrierungsprotein ermittelt. 12 µl der zu messenden Probe wurde auf eine 96er Wellplatte mit 200 µl Bradfordlösung (1:5 verdünnt) vermischt. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion mittels ELISA-Reader bestimmt. Durch Vergleich mit der Eichgerade konnte der Gesamtproteingehalt bestimmt werden.

#### 4.2.4.2 Bestimmung der Biolumineszenz

Biolumineszenz ist ein Vorgang, bei dem bestimmte Enzyme, auch Luciferasen genannt, Licht produzieren. Luciferasen werden oft als Reportergene verwendet, um die Aktivität eines Promotors in der Zelle zu detektieren. Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 20 µl der zu messenden Probe auf 96er Wellplatten (weiß) pipettiert und mit Hilfe des Orion Microplate Luminometer durch automatische Zugabe von 100 µl Luciferasepuffer detektiert.

#### 4.2.4.3 Bestimmung von oxidativem Stress

Glutathionperoxidase und Thioredoxin Reduktase sind selenabhängige Enzyme, welche Peroxide zu Wasser reduzieren und somit die Bildung freier Radikale unterbinden.

##### 4.2.4.3.1 Messung der Glutathionperoxidase (GPx)

SAOS-2-Zellen und hMSC-TERT-Zellen wurden kultiviert und pro Versuchsansatz eine Woche vor Stimulierung einmal mit und ohne Selen (100 nM) behandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 1, 10 und 100 ng/ml C001/S-Extrakt für 72 h. Die behandelten Zellen wurden in Pufferlösung GPx sonifiziert und die GPx-Aktivität nach der Methode von Dreher, welche als Substrat t-Butylhydroperoxid verwendet, bestimmt (Dreher et al., 1997). Das zu untersuchende Zelllysate wurde mit der Reaktionsmischung GPx auf ein Gesamtvolumen von 1 ml vermischt und die Reaktion mit Zugabe von 7  $\mu$ M t-Butylhydroperoxid gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 1-1,5 min wurde die Oxidation in nM NADPH/min/mg Protein bei 340 nm gemessen. Unspezifisches, oxidiertes NADPH wurde durch Zugabe von 100 mM Mercaptosuccinat (GPx-Inhibitor) beim Starten der Reaktion gemessen. Jede Messung erfolgte als Duplikat.

##### 4.2.4.3.2 Messung der Thioredoxin Reduktase (TrxR)

Zur Bestimmung der TrxR-Aktivität wurden die Zellen wie bei der GPx-Aktivität kultiviert und anschließend in Pufferlösung TrxR sonifiziert. Die Reaktion wurde mit 100  $\mu$ l Zellextrakt durch Zugabe der Reaktionsmischung TrxR bei einem Gesamtvolumen von 0,5 ml gestartet. Die TrxR-Aktivität wurde als mU/mg Protein bei 412 nm für 2 min gemessen. Jede Messung erfolgte als Duplikat.

#### 4.2.4.4 Untersuchung der Extrakte auf die P16-Promotoraktivität

##### 4.2.4.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativem Maßstab

Zur Präparation im präparativen Maßstab wurden vorerst 2 ml LB-Selektionsmedium mit einer *E. coli*-Bakterienkolonie mit dem entsprechenden Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach Überführen der Vorkultur in 200 ml LB-Medium und einer 4-6 stündigen Wachstumsphase wurde die Kultur für 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Nucleobond® Xtra Maxi Kit. Dafür

wurde das enthaltene Pellet in RES-Puffer resuspendiert und mit dem NaOH/SDS-haltigem LYS-Puffer lysiert. Neutralisation des Lysatgemisches erfolgte nach Zugabe des NEU-Puffers. Zur Entfernung sämtlicher Zellbestandteile und restlichen Trümmern wurde die Suspension durch einen beigefügten Filter gereinigt und anschließend zur weiteren Aufreinigung auf die Silikamembran der Nucleobond® Xtra Säule gegeben. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Plasmid-DNA von der Säule eluiert. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA wurde Isopropanol zugegeben und zentrifugiert. Im Anschluß wurde das Pellet durch Zugabe von 70 %igem Ethanol erneut gewaschen, zentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Zugabe von 100 µl DNase-freiem H<sub>2</sub>O konnte die isolierte Plasmid-DNA nach etwa 60 min gelöst werden. Die Endkonzentration wurde auf 1,5 µg/µl eingestellt.

#### 4.2.4.4.2 Transiente Transfektion

Für die Untersuchung der P16-Promotor-Aktivität wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) wie bereits oben beschrieben in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit 10 ml Medium und Zentrifugation der Zellsuspension wurden die Zellen resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Aussaat der Zellen erfolgte auf vier 24er Wellplatten mit je 2 x 10<sup>4</sup> Zellen/Well/2 ml. Die Platten wurden für 24 h über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am darauffolgenden Tag folgte die transiente Transfektion. In der ersten Spur wurde der Leervektor pGL4.14 basic und in den weiteren Spuren der Platte der Vektor pGL4.14 mit P16-Promotor transient in die HEK293-Zellen transfiziert. Dabei wurde das Transfektionsgemisch laut Tabelle 6 zusammengesetzt.

TABELLE 6 ZUSAMMENSETZUNG DES TRANSFEKTIONSGEMISCHS FÜR DIE TRANSFIZIERUNG DES PGL4.14-VEKTORS

	Pro Well	pGL4.14 basic (24 Wells)	pGL4.14_p16_prom (24 Wells)
DNA (1,5 µg/µl)	0,6 µl $\triangleq$ 0,9 µg	14,4 µl $\triangleq$ 21,6 µg	14,4 µl $\triangleq$ 21,6 µl
Lipofectamin 2000	2 µl	28 µl	28 µl
Serumfreies Medium	98 µl	2352 µl	2352 µl

Die Mischung wurde gut durchmischt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 375 µl serumfreies Medium zu den beiden Mischungen

zugegeben und nach guter Durchmischung zwei 24er Wellplatten mit pGL4.14 basic und zwei 24er Wellplatten mit pGL4.14\_p16\_prom mit je 500 µl/Well pipettiert. Im Anschluss wurden die Platten 5 h bei 37 °C transient transfiziert.

Nach der fünfstündigen Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Extrakt stimuliert. Dafür wurden jeweils in der ersten Spur der 24er Wellplatten nur Medium ohne Extrakt mit 2 ml /Well pipettiert (Kontrolle) und in den restlichen Spuren wurden die Extrakte (Platte1: C001, C001/S, S1, S2, S3 und Platte 2: C001/R, R1, R2, R3) mit einer Konzentration von 1000 ng/ml in Vierfachbestimmung mit 2 ml/Well pipettiert. Nach 72 h bei 37 °C wurden das Medium gründlich abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. nach Zugabe von 150 µl Reporter-Lysis-Puffer/Well konnten die Platten bis zur Bestimmung von Gesamtprotein und Luciferasewerte bei -20 °C aufbewahrt werden.

#### 4.2.4.5 Mechanotransduktion

Für die Bestimmung der Mechanosensitivität wurden hMSC-TERT-Zellen, die stabil einen Luciferasereporter mit einem SP1 bzw. AP1 responsiven Element (pGL4basic-SP1 bzw. pGL4basic AP1) beinhalten in einer Konzentration von  $3 \times 10^4$  -Zellen/Well/1ml auf 24 Well-Polyurethan (PU)-Schalen ausgesät. Der Ansatz pro Versuch erfolgte in zweifacher Ausführung, wovon eine Platte gedehnt wurde und eine Platte zur Kontrolle ungedehnt mitgeführt wurde. In der ersten Spur wurde als Negativkontrolle hMSC-TERT Zellen ausgesät, die den Leervektor pGL4.14basic stabil beinhalten. Nach 24 h wurden die Zellen mit Extrakt für 24 h stimuliert. Die Dehnung wurde im Bioreaktor mit einer 1 %iger Extension bei 1 Hz durchgeführt (Abbildung 12). Dabei wurden je zwei Zyklen von einstündiger Dauer mit halbstündiger Pause dazwischen gefahren. Nach einer Ruhepause von weiteren 24 h wurden die Platten mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 150 µl Reporter-Lysis-Puffer/Well versetzt. Für die Proteinbestimmung wurden die Luciferasewerte und das Gesamtprotein am selben Tag bestimmt (Seefried et al., 2010).

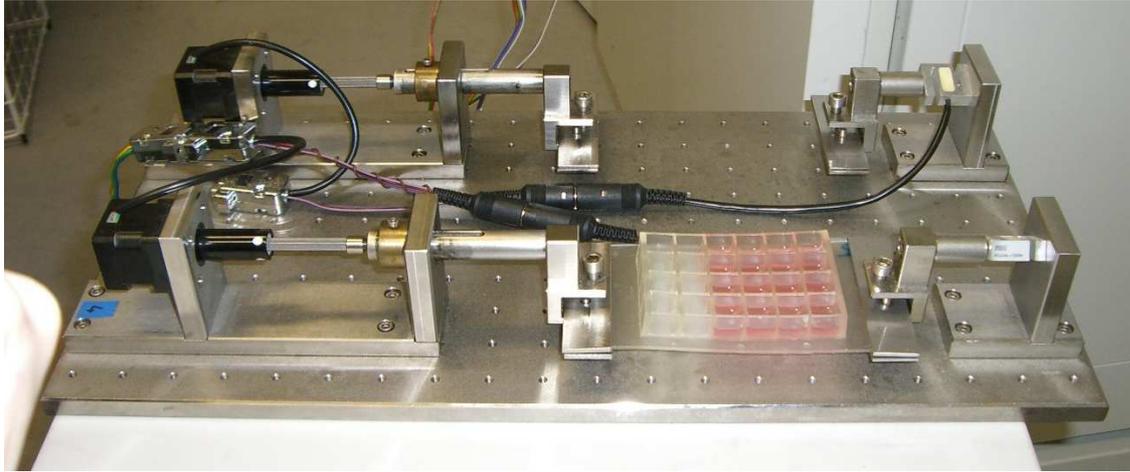


ABBILDUNG 12 BIOREAKTOR MIT EINGESPANNTER POLYURETHANSCHALE (SEEFRIED ET AL., 2010).

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Untersuchungen zur Toxikologie von *Cimicifuga racemosa* und deren aufgereinigter Subfraktionen

#### 5.1.1 *Apoptose- und Proliferationsstudien in verschiedenen Zellen und Zelllinien*

Um eine geeignete Safety-Aussage zur Behandlung mit *Cimicifuga racemosa* treffen zu können, wurden vorerst Untersuchungen zur Apoptose, also dem programmierten Zelltod einer Zelle als einer der vielen Hinweise auf Zelltoxizität, und zum Regenerationspotential bzw. Proliferation in verschiedenen Zellen und Zelllinien durchgeführt. Dazu zählten in erster Linie primäre humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und Tumorzelllinien aus Prostata (LNCaP) und Mamma (MCF7 und MDA-MB-231). Des Weiteren wurden die, in der osteogenen Differenzierung weiter fortgeschrittenen, humanen SaOs-2-Zelllinie (präosteoblastäre Osteosarkomzelllinie) und die murinen Zelllinien mc3t3-e1 (Osteoblastenvorläufer) und RAW264.7 (Osteoklastenvorläufer) untersucht. Zur Analyse der Apoptose- und Proliferationsrate wurden mindestens drei verschiedene hMSC-Populationen (hMSC) bzw. drei verschiedene Passagen (Zelllinie) für 72 h mit Extrakt inkubiert und anschließend die Aktivität mittels Lumineszenz gemessen.

##### 5.1.1.1 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Der Gesamtextrakt C001 hat eine hoch-signifikante anti-apoptotische Wirkung auf die primären hMSC, welche auch in den R-Subfraktionen R1, R2 und R3 zu beobachten ist. Eine teils hochsignifikante Inhibition der Apoptose in hMSC ist auch mit den Extrakten C001/S, S1, S2 und S3 messbar, diese nimmt jedoch mit zunehmendem Fraktionierungsprozess ab. Das Regenerationspotential von hMSC mit den getesteten Extrakten bleibt unverändert nach 72 stündiger Inkubation mit allen Extrakten in den gezeigten Konzentrationen. Lediglich die Stimulierung mit C001/S und S1 führt zu einer leichten teils aber hochsignifikanten Zunahme der gemessenen Proliferationsrate von 4 bis 5 % (Tabelle 7). Um die zuständigen Wirkstoffe für die anti-apoptotischen Effekte im Gesamtextrakt zu ermitteln, wurden die Gewichtsanteile der beiden Subfraktionen C001/S und C001/R im Gesamtextrakt errechnet und die Apoptose-

und Proliferationsrate in hMSC gemessen. C001/S mit einem Gewichtsanteil von 27 % zeigt einen Trend zur geringfügigen Hemmung der Apoptoserate, wohingegen C001/R3 mit einem Gewichtsanteil von 73 % eine hochsignifikante Inhibition der Apoptoserate zur Folge hat. Die Proliferationsrate wird nach Inkubation mit C001/R signifikant gehemmt und erreicht ein Minimum von 89 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) mit 73 ng/ml. Die Proliferationsrate wird durch C001/S hingegen nicht beeinflusst (Tabelle 8).

TABELLE 7 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONS DATEN VON HMSC MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 UNABHÄNGIGEN SPENDERN. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
C001	78***	75***	72***	69***	101	102	104	102
C001/S	87***	87***	84***	93	101	104*	99	104*
C001/S1	98	92**	102	112	104***	101	105***	103**
C001/S2	93**	93*	98	109	98	98	100	100
C001/S3	92***	89***	89***	103	99	98	99	99
C001/R	88***	84***	92	93	100	102*	101	102
C001/R1	82***	84***	76***	74***	99	96	96*	96
C001/R2	83***	77***	78***	75***	96**	95**	100	95*
C001/R3	88***	81***	78***	76***	100	100	97**	95*

TABELLE 8 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN HMSC MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML ANTEILIG) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 UNABHÄNGIGEN SPENDERN. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml
C001/S (27%)	91	93	104	99	92	94	105	100
C001/R (73%)	76***	69***	69***	67***	92*	92***	89***	91**

Um zu untersuchen, ob und welche Konzentration von C001 zelltoxische Wirkungen auf hMSC ausübt, wurden Studien mit sehr hohen Dosen (bis zu 1000-fach mehr) in Höhe von 1, 10, 100 und 1000 µg/ml Extrakt durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen starke, hochsignifikante, anti-apoptotische und proliferationsinhibierende Effekte bis hin zu 14 % der Kontrolle nach 72 stündiger Inkubation mit 1000 µg/ml Hauptextrakt. Inkubation mit 270 µg/ml Extrakt C001/S führt zu Inhibierung der Apoptoserate um 59 % im Vergleich zur Kontrolle mit einer Signifikanz von  $P \leq 0,001$  nach "student's" t-Test. In den niedrigeren Konzentrationen (je 27 % der angegebenen Konzentration) ist eine Hemmung der Apoptose um bis zu 15 % bis keine Hemmung messbar (Tabelle 9).

TABELLE 9 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN HMSC MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 µG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 UNABHÄNGIGEN SPENDERN. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml
C001	81***	76***	85***	14***	96***	99	78***	0,84***
C001/S (27%)	85***	83***	101	41***	97	100	84***	0,50***

Werden die Apoptosedaten in einem Liniendiagramm dargestellt, sind die Apoptose-induzierenden Eigenschaften der S-Subfraktionen und die anti-apoptotischen Wirkungen der R-Subfraktionen deutlich hervorgehoben (Abbildung 13), während eine diskrete Apoptose-induzierende Aktivität in den S-Fraktionen vorhanden zu sein scheint. Die gegenläufigen Aktivitäten neutralisieren sich im Gesamtextrakt. Werden die Signifikanzen zwischen Stimulierung mit 1 ng/ml und 1000 ng/ml nach t-Test berechnet, zeigen sich signifikante Änderungen mit  $P \leq 0,05$  mit den Extrakten C001/S2 und C001/S3. Änderungen der Apoptoserate mit Signifikanzen von bis zu  $P \leq 0,01$  werden mit den Extrakten C001, C001/R1 und C001/R2 erreicht. Lediglich die Inkubation mit C001/R3 führt zu einer hochsignifikanten dosisabhängigen Änderung von  $P \leq 0,001$ . Die verbleibenden Extrakte zeigen nur einen Trend in den hohen Konzentrationen im Vergleich zu 1 ng/ml (Signifikanzen wurden nicht im Liniendiagramm dargestellt).

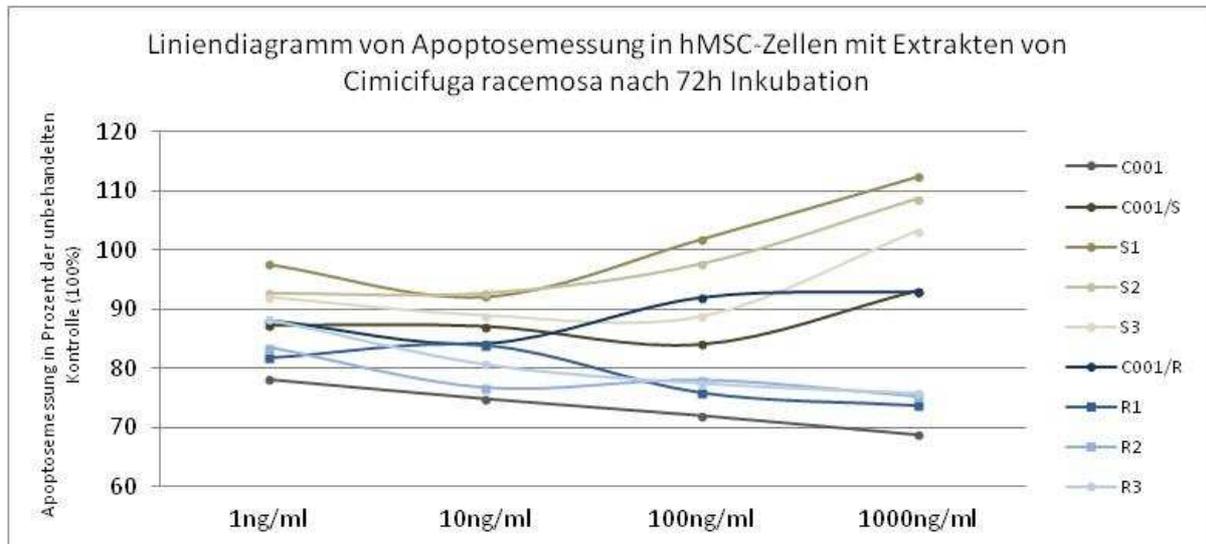


ABBILDUNG 13 LINIENDIAGRAMM DER APOPTOSEMESSUNGEN AUS TABELLE 7 ZUR DARSTELLUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN WIRKKOMPONENTEN AUF HMSC MIT DEN EXTRAKTEN C001 UND DEREN SUBFRAKTIONEN NACH 72 H INKUBATION.

#### 5.1.1.2 Prostatakarzinomzellen (LNCaP)

In den Prostatakarzinomzellen LNCaP wird die Apoptoserate nach Inkubation mit C001, C001/S, S1 und C001/R um bis zu 16 % in den angegebenen Konzentrationen gesenkt. Die Messungen sind teils hochsignifikant. Die Messungen nach Stimulierung mit S2 und S3 ergeben eine leichte Schwächung der Apoptoserate um bis zu 8 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Proliferationsmessungen zeigen nach Inkubation mit S1, S2 und S3 einen konzentrationsabhängigen Trend zur Induktion um bis zu 10 %. Die Messung mit dem Hauptextrakt C001 ergibt in den beiden höheren Konzentrationen eine signifikante Proliferationssteigerung von 6 und 9 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ähnliche Effekte sind nach Stimulierung mit den Extrakten C001/S und C001/R messbar, wobei vor allem der C001/R-Extrakt hochsignifikante Zunahmen bei 100 ng/ml um bis zu 19 % induziert (Tabelle 10).

Nach Inkubation der Prostatakarzinomzellen mit den anteilig errechneten Konzentrationen von C001/S (27 %) und C001/R (73 %) zeigen beide Extrakte eine Hemmung der Apoptoserate um bis zu 20 % in allen getesteten Konzentrationen mit jeweils einer Signifikanz von  $P \leq 0,001$ . Messung der Proliferationsrate mit C001/S ergibt einen Trend zur Inhibition in den niedrigen Konzentrationen und eine Steigerung um 6 % mit 270 ng/ml. Inkubation mit Extrakt C001/R induziert eine Zunahme der Proliferationsrate um bis zu 6 %, wobei bei dieser Messung auch nur ein Trend vorhanden ist (Tabelle 11).

TABELLE 10 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN LNCAP MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
C001	92	85***	85***	83***	102	102	106*	109*
C001/S	89***	90***	88***	87***	107	112***	108*	106
C001/S1	87***	86	84***	85***	101	100	99	105
C001/S2	94	90**	95	100	100	101	110	103
C001/S3	96*	94**	92**	89***	105	100	108	91
C001/R	84***	88***	84***	86***	102	112**	119***	111**

TABELLE 11 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN LNCAP MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML ANTEILIG) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml
C001/S (27%)	84***	80***	80***	79***	96	95	99	106
C001/R (73%)	84***	80***	80***	82***	106	106	96	105

### 5.1.1.3 Mammakarzinomzellen (MCF7 und MDA-MB-231)

Untersuchungen der Apoptose- und Proliferationsraten in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomzellen MCF7 ergeben teils hochsignifikante anti-apoptotische Effekte bei allen untersuchten Extrakten in den getesteten Konzentrationen. Proliferationshemmende Wirkungen sind bei Inkubation mit fast allen Extrakten bis zu 18 % bei den höchsten Konzentrationen messbar, bis auf Stimulierung mit Extrakt C001/R, welcher eine leichte aber signifikante Zunahme um 4 % in allen Konzentrationen induziert (Tabelle 12). Werden MCF7-Zellen mit den anteilig errechneten Konzentrationen inkubiert, entsprechen die berechneten Apoptoseraten denen der höheren Konzentrationen. Lediglich die Proliferationsrate wird durch den Extrakt C001/S in den höheren Konzentrationen signifikant gehemmt. Der Extrakt

C001/R zeigt keine messbaren Auswirkungen auf die Proliferationsrate, außer eine leichte Hemmung um 3 % mit 730 ng/ml (Tabelle 13).

**TABELLE 12 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN MCF7 MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST. P ≤ 0,05 \*; P ≤ 0,01 \*\*; P ≤ 0,001 \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
C001	80***	76***	72***	75***	104	99	95*	90***
C001/S	80***	80***	77***	81***	99	97*	97*	91***
C001/S1	84**	88**	88*	92*	100	100	96*	82**
C001/S2	85***	81***	81***	83***	95	94**	92***	91**
C001/S3	83***	75***	75***	79***	98	99	93***	92**
C001/R	85***	82***	84***	80***	104*	104*	104*	104*
C001/R1	80***	74***	73***	78**	96*	99	97	97
C001/R2	91***	87***	91*	95	102	102	103	97
C001/R3	86***	87***	88***	92*	98	98	95*	91***

**TABELLE 13 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN MCF7 MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML ANTEILIG) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST. P ≤ 0,05 \*; P ≤ 0,01 \*\*; P ≤ 0,001 \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml
C001/S (27%)	85***	75***	74***	80***	99	94***	87***	84***
C001/R (73%)	80***	74***	70***	74***	98	101	99	97*

Messungen in der Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 ergeben starke, teils hochsignifikante, anti-apoptotische Effekte nach Inkubation mit den Extrakten C001, C001/S, C001/R, R1 und R2 um bis zu 22 %. Stimulierung mit den Extrakten S1, S2, S3 und R3 führen zur Inhibition der Apoptoserate um bis zu 11 % nach 72 h in den untersuchten Konzentrationen. Effekte auf die Proliferationsrate sind nur schwach bis gar

nicht vorhanden und nehmen mit zunehmender Fraktionierung in S3 und den R-Enkelfraktionen teils signifikant um bis zu 8 % zu (Tabelle 14).

**TABELLE 14 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN MDA-MB-231 MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST. P≤ 0,05 \*; P≤ 0,01 \*\*; P≤ 0,001 \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
<b>C001</b>	87***	84***	80***	85***	98	101	96**	98
<b>C001/S</b>	87***	89***	83***	84***	103*	100	98*	94***
<b>C001/S1</b>	89***	94	85***	93*	100	102	99	100
<b>C001/S2</b>	93*	92**	91***	90***	103*	100	100	99
<b>C001/S3</b>	97	93*	96	95*	104*	105**	104	104
<b>C001/R</b>	93***	80***	78***	80***	102*	101	100	101
<b>C001/R1</b>	90***	89**	86***	87***	102	103*	103*	108***
<b>C001/R2</b>	88***	84***	83***	85***	103	104*	106*	106
<b>C001/R3</b>	93	91**	91***	81***	100	103*	102	99

Inkubation mit den anteilig errechneten Konzentrationen von C001/S (27 %) und C001/R (73 %) führen zu vergleichbaren apoptotischen Wirkungen auf MDA-MB-231-Zellen. Proliferationsinhibierende Effekte werden von der saponinhaltigen Fraktion C001/S in allen getesteten Konzentrationen im Vergleich zu C001/R dominiert, wohingegen nur C001/R in einer Konzentration von 7,3 ng/ml eine signifikante Abnahme von 7 % induziert (Tabelle 15).

**TABELLE 15 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN MDA-MB-231 MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML ANTEILIG) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST. P≤ 0,05 \*; P≤ 0,01 \*\*; P≤ 0,001 \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml	0,27 bzw. 0,73 ng/ml	2,7 bzw. 7,3 ng/ml	27 bzw. 73 ng/ml	270 bzw. 730 ng/ml
<b>C001/S (27%)</b>	93	85***	88**	85***	97*	99	95**	95**
<b>C001/R (73%)</b>	83***	90**	88**	88**	99	93*	102	106

#### 5.1.1.4 Osteosarkomzellen (SaOs-2)

Untersuchungen in der transformierten und in der osteogenen Differenzierung weiter fortgeschrittenen humanen Osteosarkomzelllinie SaOs-2 mit Extrakt C001 führen zu einer Zunahme der Apoptoserate, welche bei Inkubation mit 1 ng/ml Extrakt eine signifikante Erhöhung von 15 % erreicht. Messungen mit den Extrakten C001/S, S1, S2, C001/R, R2 und R3 ergeben eine leichte, teils signifikante, Inhibition der Apoptoserate. S3 und R1 zeigen einen gewissen Trend zur Apoptoseinduktion nach 72 h. Die Proliferationsrate wird, bis auf die Inkubation mit C001/S und S1, in allen getesteten Fraktionen induziert. Der größte Effekt von bis zu 26 % Erhöhung wurde nach Stimulierung mit dem Extrakt S3 beobachtet (Tabelle 16). Auch hier zeigt sich somit eine Proliferationssteigerung in den Subfraktionen, besonders C001/S3, die im Gesamtextrakt neutralisiert wird.

**TABELLE 16 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN SAOS-2 MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST. P ≤ 0,05 \*; P ≤ 0,01 \*\*; P ≤ 0,001 \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
<b>C001</b>	115*	106	98	103	103	108**	109*	103
<b>C001/S</b>	94	97	94*	98	96	95	104	97
<b>C001/S1</b>	96	94	92	96	103	101	95	95
<b>C001/S2</b>	88*	95	106	98	108	113*	119**	101
<b>C001/S3</b>	98	100	106	104	120***	126***	120***	121**
<b>C001/R</b>	94	92***	88***	92***	101	105	104	107***
<b>C001/R1</b>	103	101	97	101	106**	110***	109**	111***
<b>C001/R2</b>	97*	96*	93*	99	102	110***	107**	108**
<b>C001/R3</b>	97	96	94	95	101	112***	108***	108***

### 5.1.1.5 Murine präosteoblastäre Zellen (mc3t3-e1)

In der osteoblastären murinen Zelllinie mc3t3-e1 wurden Apoptose-inhibierende Effekte mit allen untersuchten Extrakten gemessen, wobei die stärksten Effekte mit C001, und den S-Fractionen gemessen wurden. Leichte proliferationsinhibierende Effekte sind auch hier mit C001 und den S-Fractionen messbar, wohingegen die R-Fractionen keine Auswirkungen auf das Regenerationspotential dieser Zellen haben. Vor allem der Extrakt S3 zeigt die stärksten Auswirkungen auf beide Messgrößen in den hohen Konzentrationen (Tabelle 17).

**TABELLE 17 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN MC3T3-E1 MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST. P ≤ 0,05 \*; P ≤ 0,01 \*\*; P ≤ 0,001 \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
<b>C001</b>	89***	83***	80***	76***	99	94	97	91**
<b>C001/S</b>	90***	89***	87***	90*	100	103	101	94***
<b>C001/S1</b>	82***	87***	84**	92	97	96	95*	91***
<b>C001/S2</b>	70***	69***	70***	72**	95**	95**	92***	91***
<b>C001/S3</b>	86***	82***	82***	82***	99	97*	97	90***
<b>C001/R</b>	91***	91***	91***	96	98	98*	99	98*
<b>C001/R1</b>	92**	92**	93*	105	98	101	99	99
<b>C001/R2</b>	96**	99	101	109***	102	100	101	98
<b>C001/R3</b>	95**	95	98	106	98*	96**	98	100

### 5.1.1.6 Murine osteoklastäre Zellen (RAW264.7)

Für die Analysen in prä-osteoklastären Mauszellen RAW264.7 wurden nur der Gesamtextrakt und die Saponinhaltigen Fraktionen untersucht, da diese in den begleitenden Rattenstudien um die Arbeitsgruppe Prof. Wuttke in Göttingen zu entsprechenden Effekten geführt haben. Inkubation mit C001, C001/S und S3 führen zur Inhibition der Apoptoserate um bis zu 11 % in den getesteten Konzentrationen. Die Extrakte S1 und S2 haben nur geringfügige Auswirkungen bis zu einer leichten Zunahme in den höheren Konzentrationen mit S1. Ein proliferationsinhibierender Effekt ist nur mit C001 messbar, ansonsten induzieren die S-Fraktionen die Proliferation osteoklastärer Mauszellen um bis zu 33 %, wobei diese Zunahme statistisch eher einem Trend entspricht. Lediglich mit 1000 ng/ml C001/S ist eine hochsignifikante Steigerung von 20 % messbar (Tabelle 18).

**TABELLE 18 APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMESSUNGEN IN RAW MIT FRAKTIONIERTEN UND GEREINIGTEN PFLANZENEXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1-1000 NG/ML) NACH 72 H INKUBATION IN PROZENT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE (100 %) MIT N=3 VERSCHIEDENEN PASSAGEN. STATISTIK: T-TEST. P ≤ 0,05 \*; P ≤ 0,01 \*\*; P ≤ 0,001 \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Extrakt	Apoptosemessungen in % der unbehandelten Kontrolle				Proliferationsmessungen in % der unbehandelten Kontrolle			
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
<b>C001</b>	96	90***	90***	97	96	94**	84***	91***
<b>C001/S</b>	89***	97	91***	90***	98	99	105	120***
<b>C001/S1</b>	95	96	107	104	106	104	133	115
<b>C001/S2</b>	103	102	96	95	105	99	105	104
<b>C001/S3</b>	99	95*	91**	83***	108**	115**	110	117***

### 5.1.2 *Untersuchungen zum Effekt von Cimicifuga racemosa auf antioxidative Enzyme*

Um zu untersuchen, ob ein Effekt der Extrakte auf die Expression bzw. Aktivität potenter antioxidativer Enzyme besteht, wurden Experimente zur Aktivität von Glutathionperoxidase (GPx) und Thioredoxin Reduktase (TrxR), zweier selenabhängiger Enzyme, mit Extrakt C001/S durchgeführt. Der saponinhaltige Extrakt C001/S erwies sich zu diesem Zeitpunkt als die Fraktion mit den knochenprotektivsten Eigenschaften. Die Enzyme reduzieren Peroxide zu Wasser und wirken so einer Radikalbildung und somit zellschädigenden Wirkung im Körper entgegen. Dafür wurden drei verschiedene Passagen von SaOs-2-Zellen, mit und ohne Selen, kultiviert und mit Extrakt inkubiert. Nach 72 h wurde die jeweilige Enzymaktivität mittels Proteinmessung bestimmt.

#### 5.1.2.1 GPx-Aktivität

Die GPx-Aktivität in hMSC-TERT-Zellen, welche als Indikator für die Validität des Versuches mitgeführt wurde, steigt nach einer Behandlung von einer Woche mit Selensupplementation wie erwartet um bis zu 15 % im Vergleich zu den ohne Selen kultivierten Zellen an (Abbildung 14). Die Untersuchung des Extraktes C001/S auf SaOs-2-Zellen mit und ohne Selen ergab einen Trend zur Abnahme der GPx-Aktivität in den Zellen ohne Selen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um bis zu 20 % mit 10 ng/ml Extrakt. Eine Messung mit den selensupplementierten Zellen ergab einen leichten Trend zur Inhibition der GPx-Aktivität im Vergleich zu den jeweiligen GPx-Messungen der nicht-supplementierten Zellen (Abbildung 15). Nach Inkubation mit 10 ng/ml Extrakt wurde kein Unterschied zwischen selen- und nichtsupplementierten Zellen gemessen. Eine hohe Schwankungsbreite der durchgeführten Messungen wird durch die Höhe der Fehlerbalken, welche die Standardabweichungen des Versuches darstellen, abgebildet.

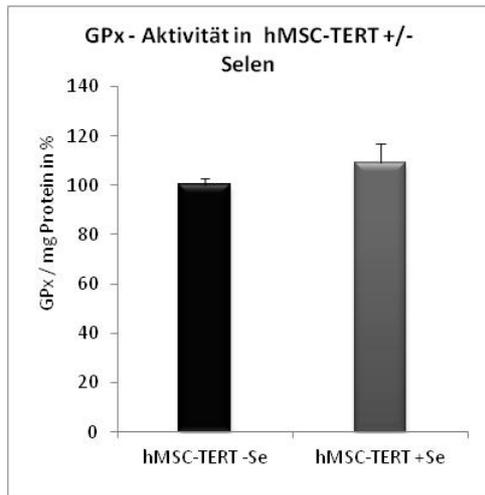


ABBILDUNG 14 GPX-AKTIVITÄT VON HMSC-TERT-ZELLEN MIT UND OHNE SELEN PRO MG PROTEIN IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE OHNE SELEN (=100 %). N=3. KEINE SIGNIFIKANZ NACH T-TEST. DIE EINGETRAGENEN FEHLERBALKEN STELLEN DIE STANDARDABWEICHUNGEN DES VERSUCHES DAR.

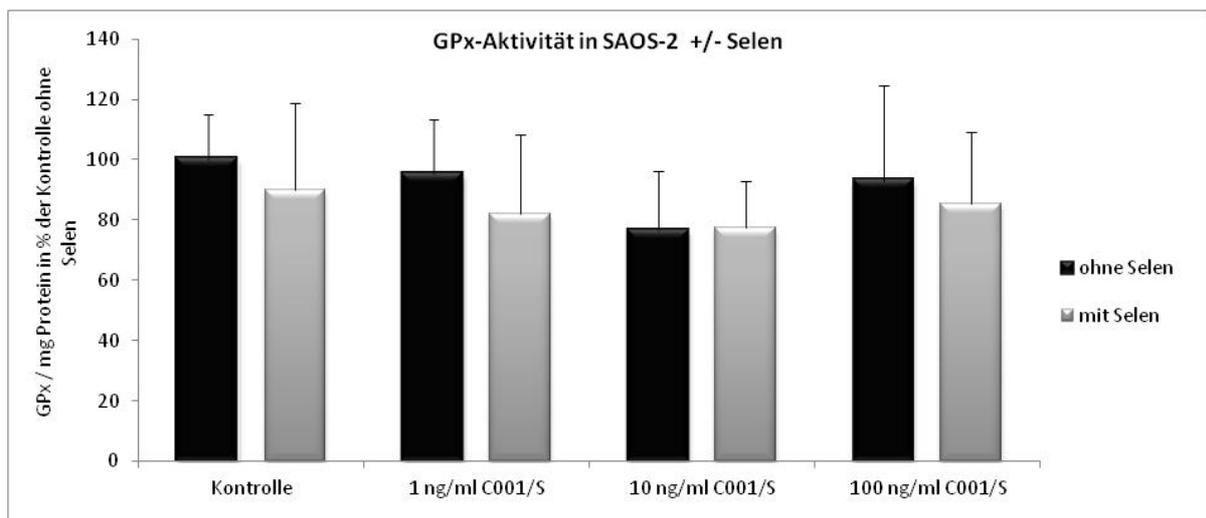
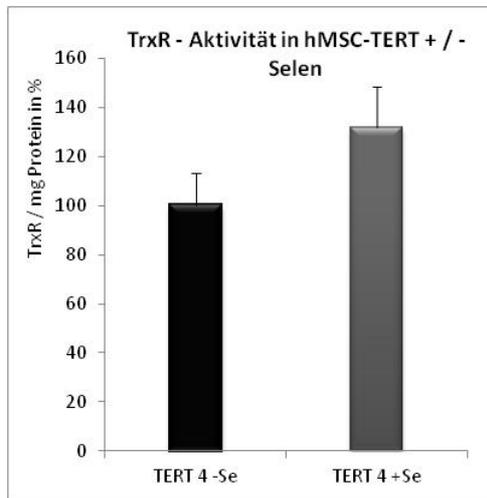


ABBILDUNG 15 BESTIMMUNG DER GPX-AKTIVITÄT IN SAOS-2-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT C001/S (0, 1, 10, 100 NG/ML) FÜR 72 H PRO MG PROTEIN MIT UND OHNE SELEN BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE ZELLEN (KONTROLLE = 100 %) IN % MIT N=3. DIE EINGETRAGENEN FEHLERBALKEN STELLEN DIE STANDARDABWEICHUNGEN DES VERSUCHES DAR.

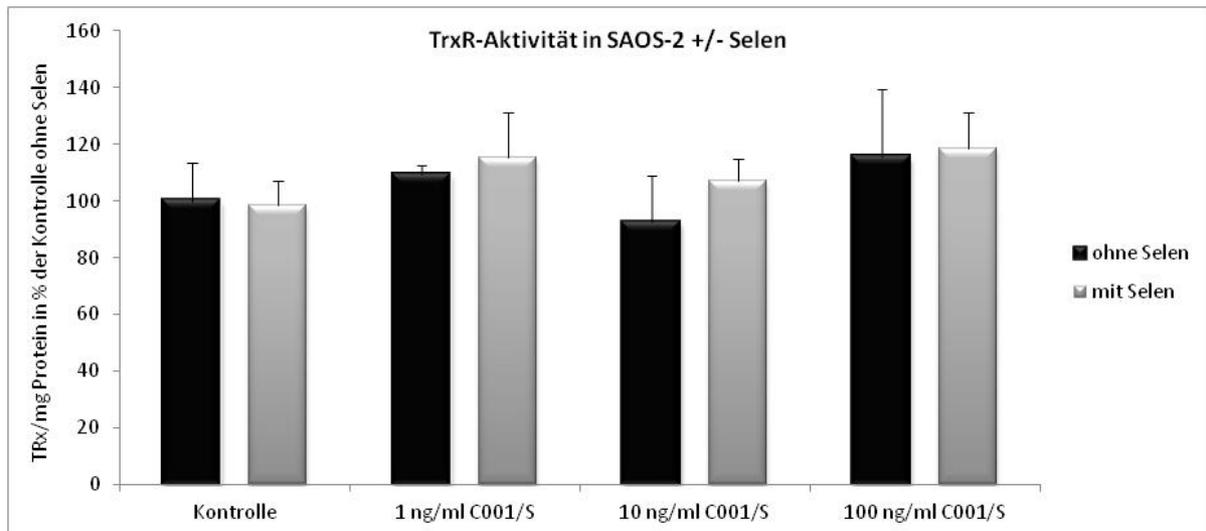
### 5.1.2.2 TrxR-Aktivität

Die Messungen der TrxR-Aktivität in den Kontrollzellen hMSC-TERT zeigen wie erwartet eine Zunahme von knapp 40 % in den selensupplementierten Zellen im Vergleich zu den nicht-supplementierten Zellen (Abbildung 16). Die Untersuchung des Extraktes C001/S zeigten keinen Einfluss auf die nichtbehandelte Kontrolle (selensupplementiert) im Vergleich zur nicht-supplementierten Kontrolle. Die Behandlung mit Extrakt 1, 10 und 100 ng/ml zeigen einen Trend zur Induktion der TrxR-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, der lediglich mit 10

ng/ml C001/S etwas geringer ausfällt und der insgesamt wegen der hohen Streuung keine Signifikanz erreicht (Abbildung 17).



**ABBILDUNG 16 TRXR-AKTIVITÄT VON HMSC-TERT-ZELLEN MIT UND OHNE SELEN PRO MG PROTEIN IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE OHNE SELEN (=100 %). N=3. KEINE SIGNIFIKANZ NACH T-TEST. DIE EINGETRAGENEN FEHLERBALKEN STELLEN DIE STANDARDABWEICHUNGEN DES VERSUCHES DAR.**



**ABBILDUNG 17 BESTIMMUNG DER TRXR-AKTIVITÄT IN SAOS-2-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT C001/S (0, 1, 10, 100 NG/ML) FÜR 72 H PRO MG PROTEIN MIT UND OHNE SELEN BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE ZELLEN (KONTROLLE = 100 %) IN % MIT N=3. DIE EINGETRAGENEN FEHLERBALKEN STELLEN DIE STANDARDABWEICHUNGEN DES VERSUCHES DAR**

### 5.1.3 Untersuchungen zur Seneszenz

#### 5.1.3.1 Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung in hMSC

Zur Ergänzung der Safety-Untersuchungen von *Cimicifuga racemosa* wurde der Einfluss der Hauptextrakte C001, C001/S und C001/R auf die Replikative Seneszenz, also die Alterung, von hMSC untersucht. Dafür wurden drei hMSC-Populationen ab Passage P1 subkultiviert bis die seneszente Passage Px erreicht wurde, welche mit einer Abflachung und Granulierung der Zellen und einem Proliferationsstopp einhergeht. Mit jeder Passagierung wurde die kumulative Anzahl der Populationsverdopplung (CPD) bestimmt. Bei zwei von drei untersuchten Spendern war die Replikative Seneszenz bei P7 erreicht. Lediglich bei der hMSC-Population 807 konnte eine verfrühte Seneszenz ab Passage 6 beobachtet werden.

Im Vergleich zur Kontrolle konnte bei P2 kein Einfluss der Extrakte auf die CPD festgestellt werden. Erst ab P3 zeigt sich ein Trend der beiden fraktionierten Extrakte C001/S und C001/R zur Abnahme der CPD im Vergleich zur Kontrolle und mit C001/1 behandelten Zellen, der sich bis P6 durchsetzte. In der Inkubation mit C001/R zeigte sich ein Trend zur Verzögerung des Seneszenz-Eintritts in P6 und P7. Ab P7 nähern sich alle behandelten Zellen dem CPD der Kontrolle an (Abbildung 18).

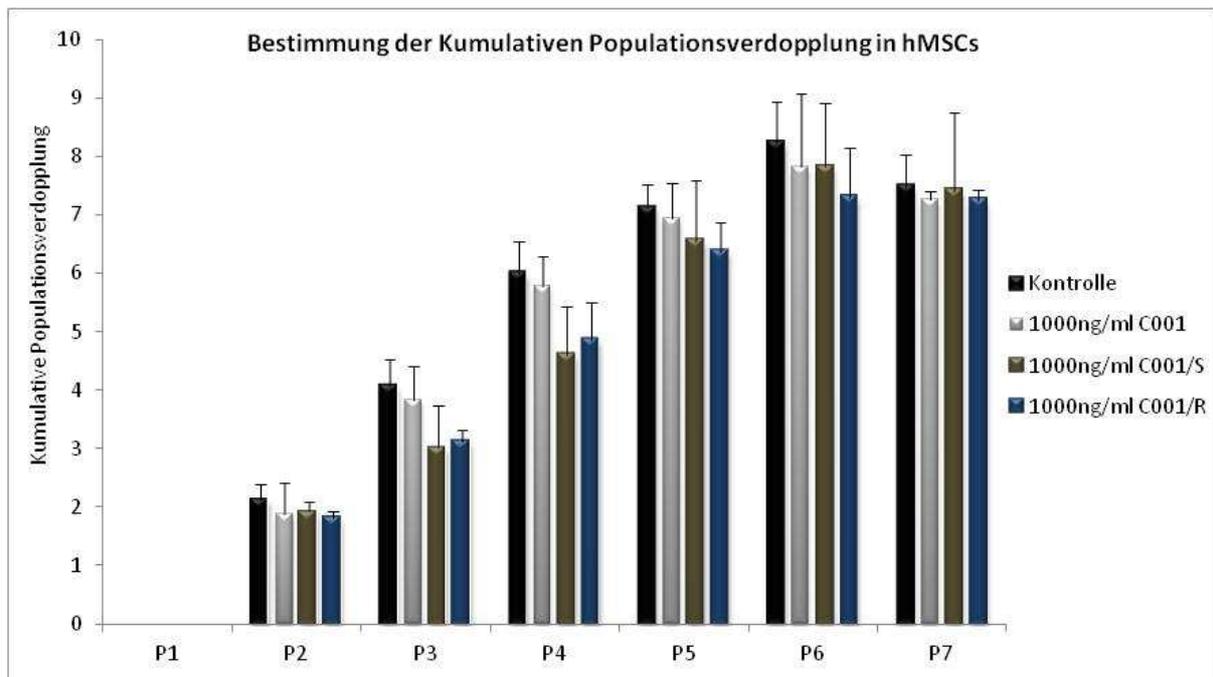


ABBILDUNG 18 BALKENDIAGRAMM DER BESTIMMUNG DER KUMULATIVEN POPULATIONSVERDOPPLUNG VON C001, C001/S UND C001/R AUF HMSC MIT N=3.

Die Auftragung im Liniendiagramm für den Verlauf der *in vitro*-Alterung von hMSC mit Extrakt zeigt übersichtlicher, dass die Zellen der Kontrollgruppe die Replikative Seneszenz früher einleiten, als die mit Extrakt stimulierten Zellen, wie bereits erwähnt wurde.

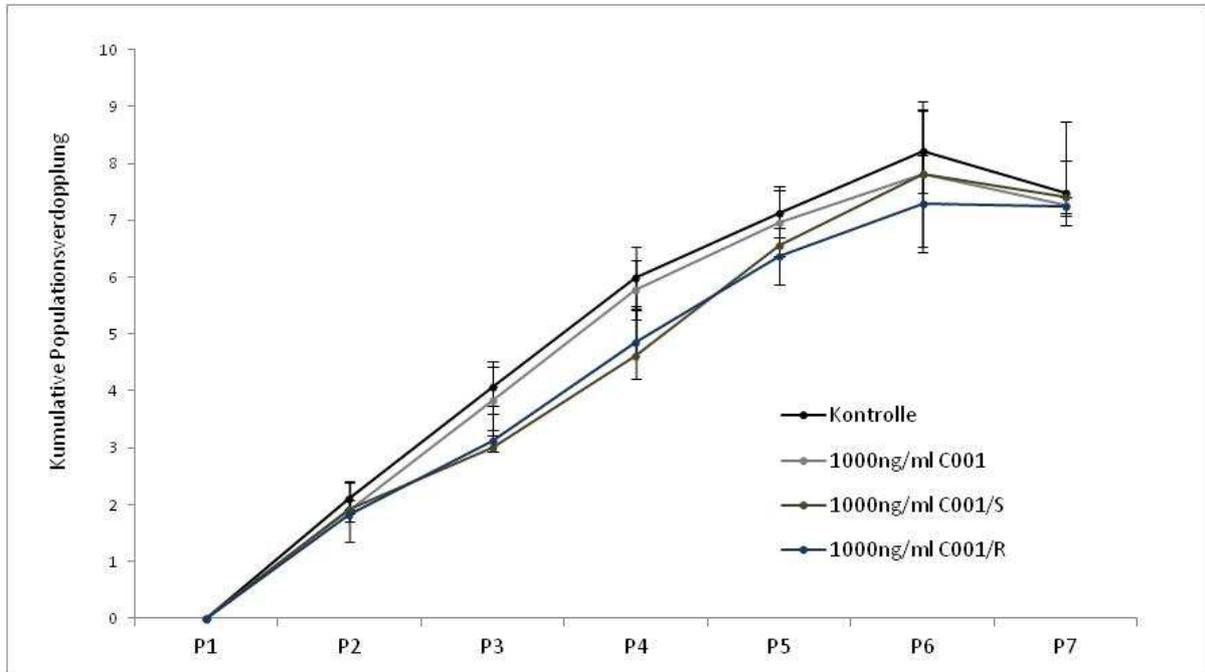


ABBILDUNG 19 LINIENDIAGRAMM DER BESTIMMUNG DER KUMULATIVEN POPULATIONSVERDOPPLUNG VON C001, C001/S UND C001/R AUF HMSC MIT N=3.

#### 5.1.3.2 Genexpressionsmuster von P16 und PSG5 während der Seneszenz

Um das Genexpressionsmuster des gesamten Verlaufs der *in-vitro*-Alterung zu verfolgen, wurden semiquantitative PCRs von Seneszenzmarkern (PSG5, P16) aus jeder Passage der drei Spender durchgeführt. Nach anschließender densitometrischer Auswertung und Normalisierung auf das Haushaltsgen *EEF1A1* zeigt die Inkubation der hMSC mit Extrakt C001 eine kontinuierliche Zunahme des Seneszenzmarkers PSG5 in der hMSC-Population 794 in Bezug auf die jeweilige Kontrolle. In den beiden weiteren Spendern sind starke Schwankungen der Genexpression in den unterschiedlichen Passagen messbar, wobei die Expression bei allen Spendern in P7 bzw. P6 abnimmt (Abbildung 20, A). Nach Inkubation mit Extrakt C001/R sind auch hier starke spenderabhängige Schwankungen messbar. Die hMSC-Populationen 794 und 807 zeigen eine Abnahme der PSG5-Expression in Passage 2, welche in den nächsten 3 Passagen wieder ansteigt. In zwei von drei Spendern nimmt die Genexpression in Passage 7 wieder ab (Abbildung 20, B). Nach Stimulierung der hMSC-Zellen mit C001/S sind auch hier starke Variabilitäten messbar. Zwei von drei Spendern zeigen einen Trend zur Zunahme in den

ersten Passagen der Seneszenz, wobei Spender 795 eine zwischenzeitliche Abnahme in P5 und P6 aufweist. Alle Spender erreichen in der seneszenten Passage P7 einen Wert der dem der Kontrolle gleicht (100 %) (Abbildung 20, C).

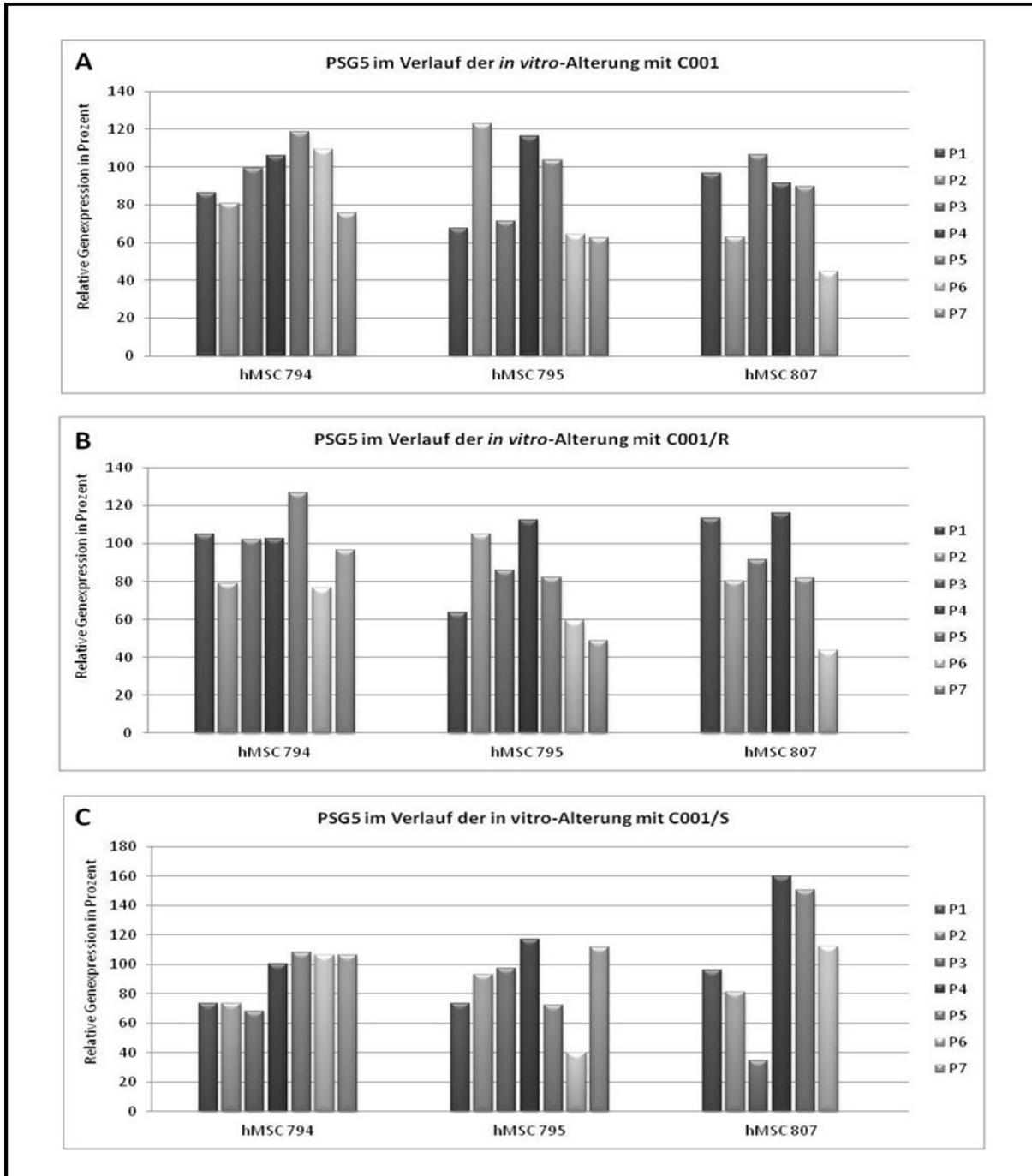
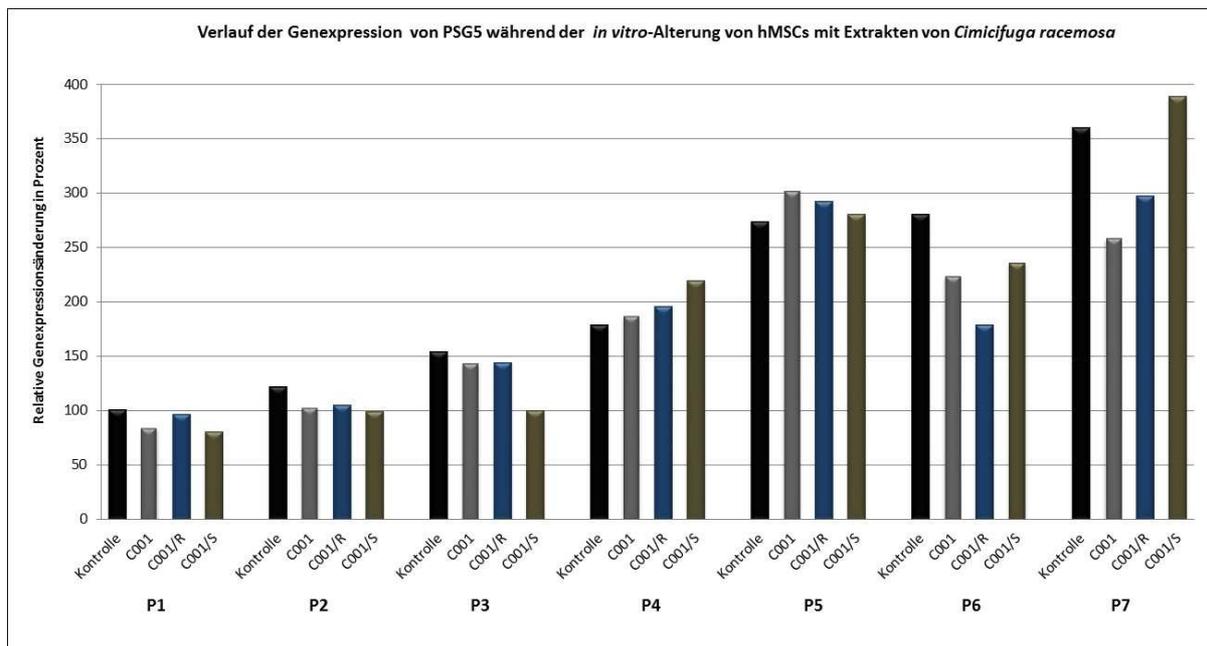


ABBILDUNG 20 GENEXPRESSIONSMUSTER VON PSG5 IM VERLAUF DER *IN VITRO*-ALTERUNG IN HMSC MIT EXTRAKT VON DREI HMSC-POPULATIONEN. DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG VON SEMIQUANTITATIVEN PCRS VON PSG5 (PREGNANCY SPECIFIC BETA-1-GLYCOPROTEIN 5) MIT A: C001, B: C001/R UND C: C001/S JE 1000 NG/ML. ES WURDEN CDNA-PROBEN AUS JEDER PASSAGE VON DREI HMSC-POPULATIONEN AUF EEF1A1 (EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 ALPHA 1) NORMALISIERT UND ANSCHLIEßEND AUF DIE JEWEILIGE KONTROLLE DER EINZELNEN PASSAGEN NORMIERT. FÜR DIE RELATIVE GENEXPRESSION IN PROZENT WURDEN ALLE DATEN IM VERHÄLTNISS ZU 1, D.H. KEINE GENEXPRESSIONSÄNDERUNG, GESETZT UND ANSCHLIEßEND IN PROZENT UMGERECHNET.

Werden die Mittelwerte der drei hMSC-Populationen ermittelt, sind kontinuierliche Zunahmen der Genexpression von PSG5 mit allen Extrakten bis Passage 5 messbar. Ab P6 nimmt die Expression von PSG5 im Vergleich zu unbehandelten hMSC-Zellen mit allen Extrakten ab. In P7 steigt das Expressionsniveau in allen Gruppen im Vergleich zur Expression in P6 an. Dabei sind im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und die mit C001/S behandelten Zellen die Genexpressionsniveaus von PSG5 der mit C001 und C001/R behandelten Zellen wesentlich geringer (Abbildung 21).



**ABBILDUNG 21 MITTELWERTE DER RELATIVEN GENEXPRESSIONSÄNDERUNG VON PSG5 IM VERLAUF DER *IN VITRO*-ALTERUNG VON DREI HMSC-POPULATIONEN INKUBIERT MIT EXTRAKT (1000 NG/ML). ES WURDEN CDNA-PROBEN AUS JEDER PASSAGE VON DREI HMSC-POPULATIONEN AUF EEF1A1 (EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 ALPHA 1) NORMALISIERT. FÜR DIE RELATIVE GENEXPRESSIONSÄNDERUNG WURDEN DIE NORMALISIERTEN DENSITOMETRIEWERTE FÜR P1 DER KONTROLLE AUF 100% GESETZT UND DIE RESTLICHEN GENEXPRESSIONSDATEN HIERZU IM VERHÄLTNIS GERECHNET.**

Wird das Expressionsniveau von P16, einem Marker für zelluläre Seneszenz, in hMSC nach Inkubation von 1000 ng/ml C001 untersucht, ist in den frühen Passagen bei zwei von drei Spendern vorerst eine geringfügige Abnahme im Vergleich zur Kontrolle messbar. In Spender 794 erreicht die Expression in P3 seinen Höhepunkt, welche bei zunehmender Seneszenz wieder abnimmt. Starke Schwankungen sind beim Spender 795 beobachtbar. Das Expressionsniveau schwankt um etwa 100 % mit einer Ausnahme in Passage 6 mit einer Zunahme von P16 um 500 %. Die hMSC-Population 807 tendiert zu einer Zunahme der P16-Genexpression bis P6, bevor die Zellen in den Seneszenzzustand übergehen (Abbildung 22, A). Ähnliche Verläufe sind bei Inkubation mit C001/R und C001/S in den angegebenen Spendern

vorhanden. Auffällig ist die hohe Expression von P16 in Passage P6 des Spenders 795 bei allen Extrakten. Außerdem zeigt die hMSC-Population 807 jeweils in P5 mit allen Extrakten eine vorübergehende Abnahme der Genexpression von P16 (Abbildung 22, B und C).

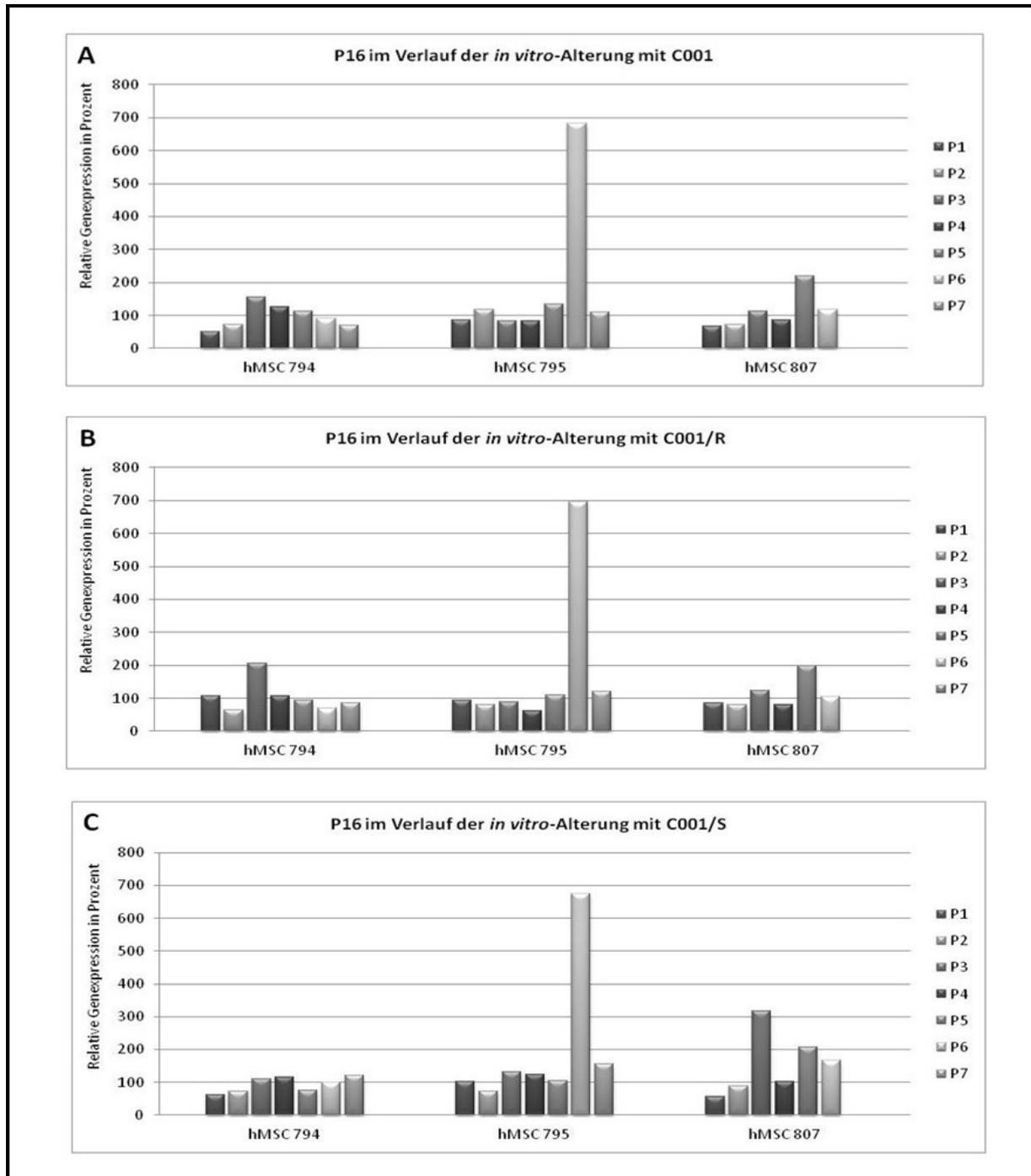
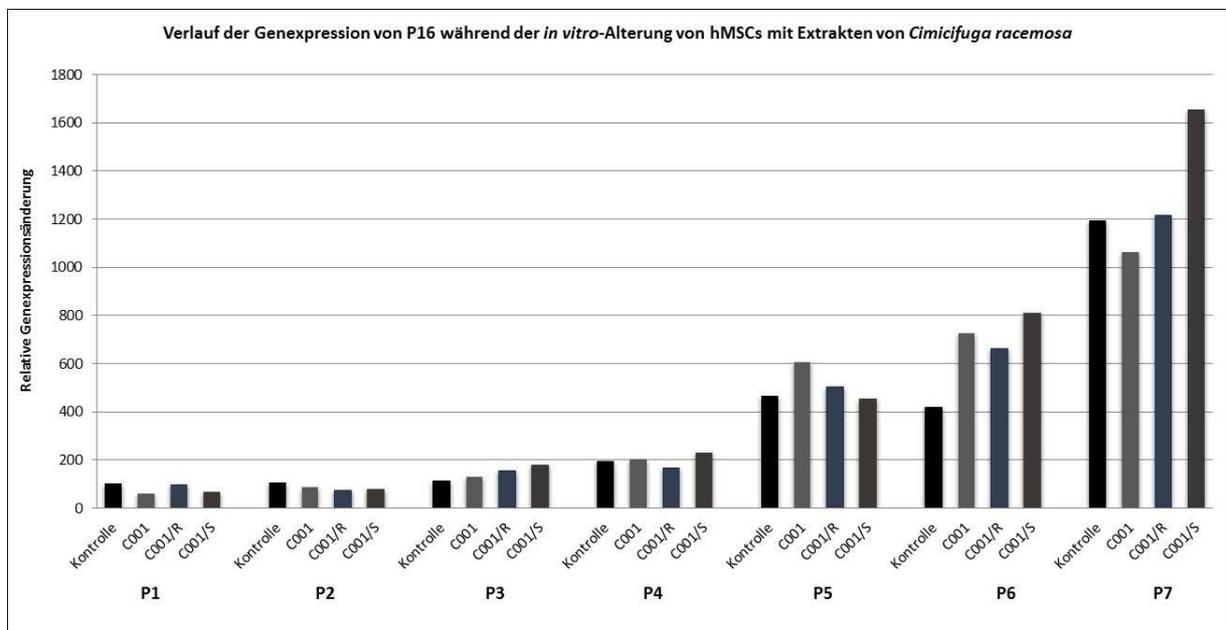


ABBILDUNG 22 GENEXPRESSIONSMUSTER VON P16 IM VERLAUF DER *IN VITRO*-ALTERUNG IN HMSC MIT EXTRAKT VON DREI HMSC-POPULATIONEN. DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG VON SEMIQUANTITATIVEN PCRS VON P16 MIT A: C001, B: C001/R UND C: C001/S JE 1000 NG/ML. ES WURDEN CDNA-PROBEN AUS JEDER PASSAGE VON DREI HMSC-POPULATIONEN AUF EEF1A1 (EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 ALPHA 1) NORMALISIERT UND ANSCHLIEßEND AUF DIE JEWEILIGE KONTROLLE DER EINZELNEN PASSAGEN NORMIERT. FÜR DIE RELATIVE GENEXPRESSION IN PROZENT WURDEN ALLE DATEN IM VERHÄLTNISS ZU 1, D.H. KEINE GENEXPRESSIONSÄNDERUNG, GESETZT UND ANSCHLIEßEND IN PROZENT UMGERECHNET.

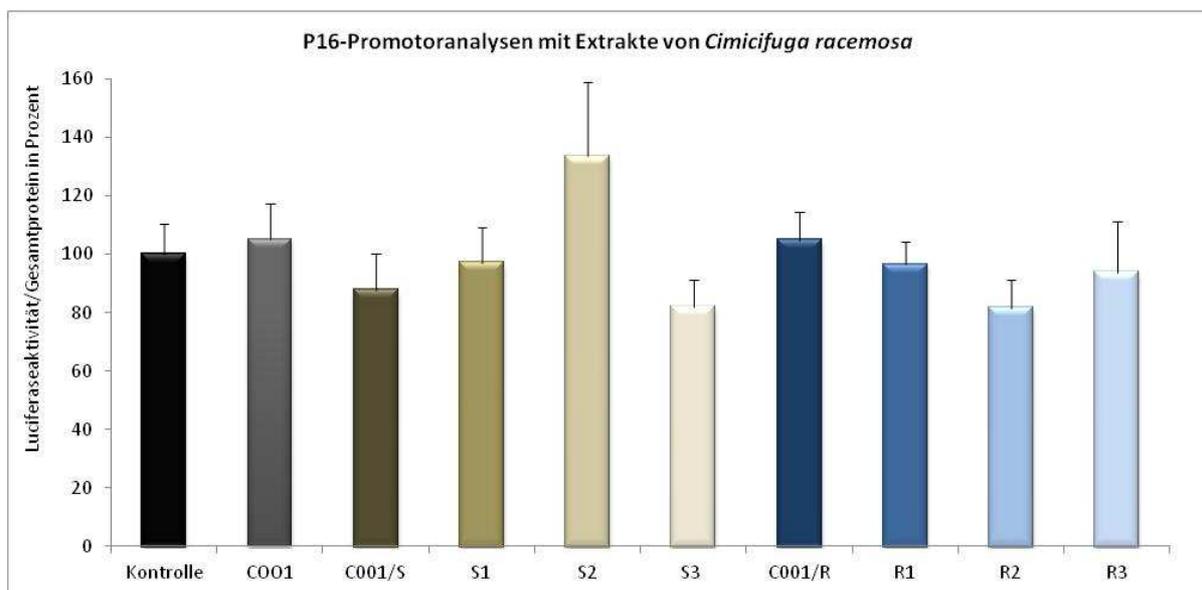
Werden die Mittelwerte der drei hMSC-Populationen ermittelt, sind in den ersten beiden Passagen kaum Einflüsse auf die Genexpression von P16 im Vergleich zur Kontrolle (P1) messbar. Erst ab P3 nimmt das Expressionsniveau mit allen Extrakten im Vergleich zur Kontrolle zu. Dieser Trend setzt sich mit zunehmender Seneszenz fort, wobei innerhalb der Passagen unterschiedliche Expressionsniveaus mit den jeweiligen Extrakten erreicht werden. In P5 ist das Niveau von P16 mit C001/R vergleichbar mit dem Niveau der unbehandelten Zellen, steigt aber in den weiteren Passagen umso stärker an. In P7 sind die Expressionsniveaus von C001 und C001/R niedriger bzw. gleich hoch in Bezug auf die Kontrolle der gleichen Passage. Die Expression von P16 ist nach Inkubation mit C001/S in P7 auf hMSC stark erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 23).



**ABBILDUNG 23 MITTELWERTE DER RELATIVEN GENEXPRESSIONSÄNDERUNG VON P16 IM VERLAUF DER *IN VITRO*-ALTERUNG VON DREI HMSC-POPULATIONEN INKUBIERT MIT EXTRAKT (1000 NG/ML). ES WURDEN CDNA-PROBEN AUS JEDER PASSAGE VON DREI HMSC-POPULATIONEN AUF EEF1A1 (EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 ALPHA 1) NORMALISIERT. FÜR DIE RELATIVE GENEXPRESSIONSÄNDERUNG WURDEN DIE NORMALISIERTEN DENSITOMETRIEWERTE FÜR P1 DER KONTROLLE AUF 100% GESETZT UND DIE RESTLICHEN GENEXPRESSIONSDATEN HIERZU IM VERHÄLTNISS GERECHNET.**

### 5.1.3.3 P16-Promotoranalysen mit Extrakten von *Cimicifuga racemosa*

Für die P16-Promotoranalysen wurden HEK-293-Zellen mit pGL4.14\_P16 transient transfiziert und anschließend mit je 1000 ng/ml Extrakt für 48 h stimuliert. Nach Messung der Luciferaseaktivität in Bezug auf das Gesamtprotein konnte der Einfluss der Extrakte auf die zelluläre Seneszenz über die P16-Promotoraktivität bestimmt werden. Die Stimulierung mit C001 zeigt eine geringfügige Zunahme der Luciferaseaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Ein ähnlicher Effekt ist mit Extrakt C001/R messbar. Nach Inkubation mit C001/S dagegen, wird die Luciferaseaktivität um etwa 10 % inhibiert. S1 und S3 zeigen, vergleichbar mit C001/S, eine Abnahme der Aktivität. Lediglich die Stimulierung mit S2 führt zu einer Induktion um bis zu 40 % nach 48 h. Alle weiteren getesteten R-Subfraktionen zeigen inhibierende Auswirkungen auf die Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



**ABBILDUNG 24 P16-PROMOTORANALYSEN IN HEK-293-ZELLEN (N=4) MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA NACH 48 H NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION. MESSWERTE ALS LUCIFERASEAKTIVITÄT/GESAMTPROTEIN IN PROZENT DER UNSTIMULIERTEN KONTROLLE (100 %). DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN.**

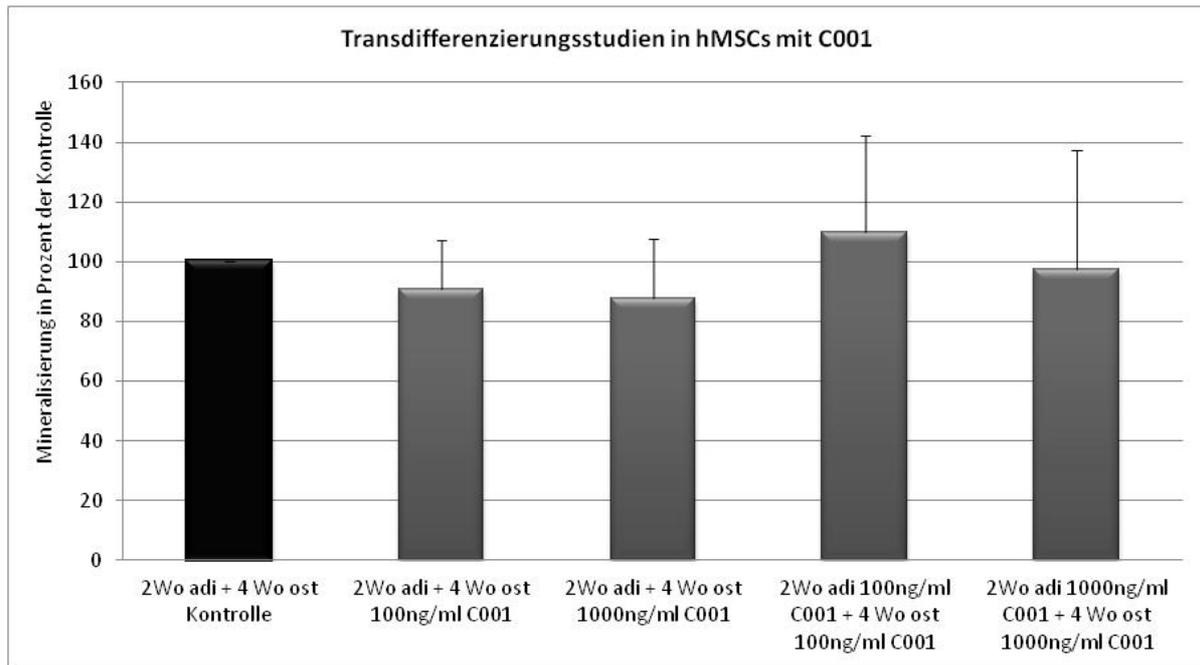
## 5.2 Differenzierungsstudien von *Cimicifuga racemosa* und deren aufgereinigter Subfraktionen auf hMSC und SaOs-2-Zellen

In Bezug auf publizierte Studien im Nager-Modell (Seidlova-Wuttke et al., 2012), die eine Abnahme der Knochenmarksverfettung, sowie deutliche antiosteoporotische Wirksamkeiten zeigten, wurden Differenzierungsstudien in hMSC und teilweise SaOs-2-Zellen durchgeführt, um ähnliche Effekte im humanen Modell *in vitro* zu untersuchen.

### 5.2.1 *Transdifferenzierungsstudien in hMSC*

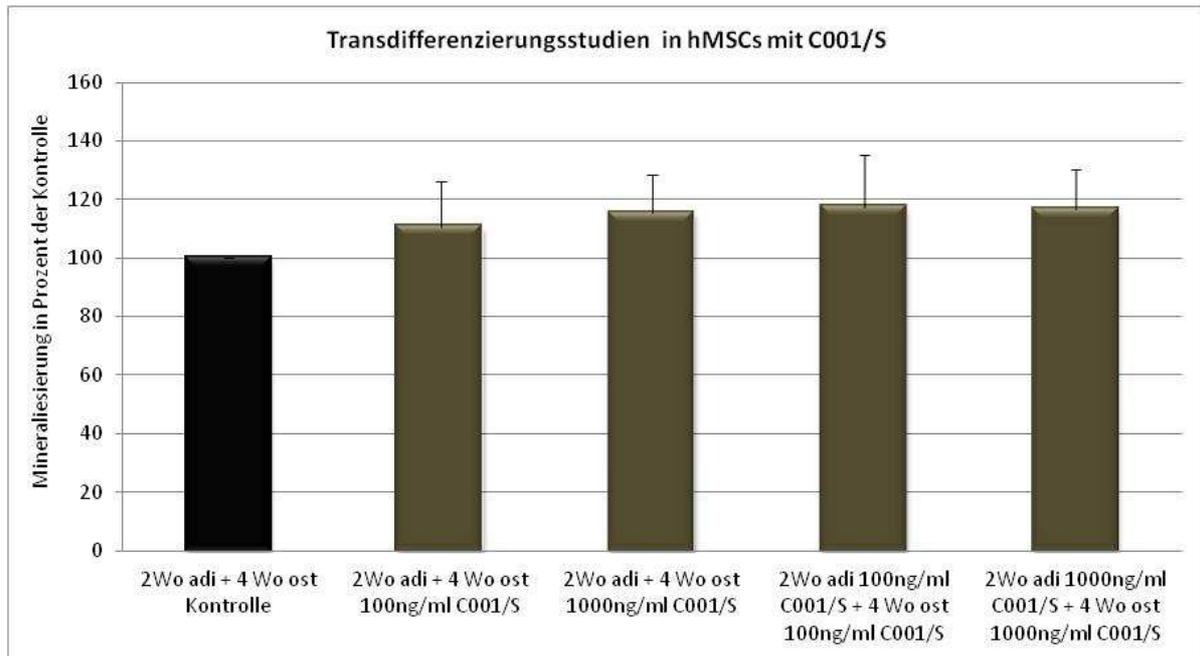
Um zu untersuchen, ob die Extrakte in der Lage sind eine Reversibilität der zunehmenden Knochenmarksverfettung im Alter zugunsten einer Zunahme der Knochenmasse zu erreichen, wurden Transdifferenzierungsstudien in hMSC-Populationen dreier verschiedener Spender mit den Extrakten C001, C001/S und C001/R durchgeführt. Dazu wurde eine adipogene Differenzierung für zwei Wochen induziert und anschließend, durch Umstellung des Zellmediums, eine osteogene Differenzierung eingeleitet. Die Mineralisierungsmatrizes wurden mit Alizarinrot S angefärbt, mikroskopisch detektiert und anschließend quantifiziert.

Werden hMSC-Zellen zwei Wochen adipogen differenziert und anschließend mit 100 ng/ml C001 und osteogenem Medium transdifferenziert, wird die Mineralisierung im Vergleich zur Kontrolle (hMSC-Zellen ohne Extrakt) um bis zu 10 % inhibiert. Wird von Beginn der adipogenen Differenzierung 100 ng/ml C001 zugegeben und diese den ganzen Zeitraum der Differenzierung beibehalten, wird die Mineralisierung um 20 % induziert im Vergleich zur Extraktzugabe ab osteogener Differenzierung. Wird mit 1000 ng/ml C001 ab osteogenem Mediumwechsel stimuliert wird die Mineralisierung bis zu 15 % im Vergleich zur Kontrolle inhibiert. Wird bereits zu Beginn der adipogenen Differenzierung 1000 ng/ml Extrakt zugegeben, wird der Trend zur Inhibition der Transdifferenzierung wieder aufgehoben (Abbildung 25).

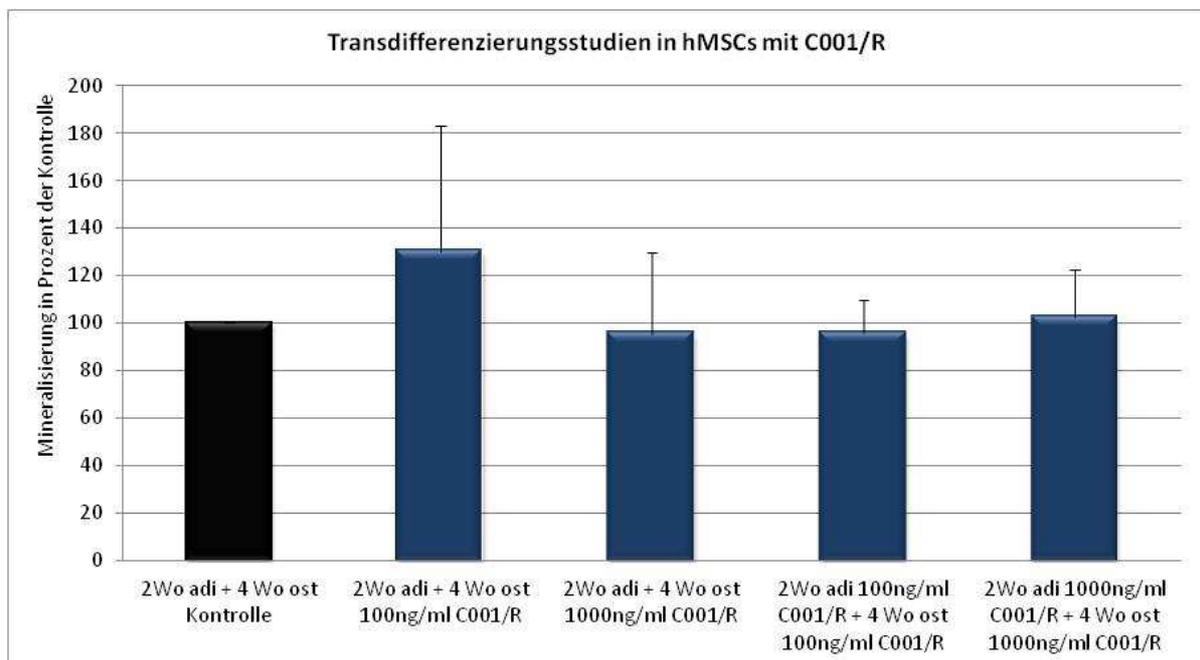


**ABBILDUNG 25** TRANSDIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI HMSC-POPULATIONEN MIT ZWEI KONZENTRATIONEN VON C001 UND ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN ZUGABEZITPUNKTEN. DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE MINERALISIERUNG NACH 6 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER.

Wird der Versuch mit Extrakt C001/S durchgeführt erhöht sich die Mineralisierungsmatrix bei Zugabe von 100 ng/ml bei Wechsel auf osteogenes Medium um etwa 15 %. Dieser Trend wird auch bei Zugabe zu Beginn der adipogenen Differenzierung beobachtet, wobei hier eine weitere Zunahme um insgesamt 19 % im Vergleich zur Kontrolle messbar ist. Wird mit 1000 ng/ml C001/S unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe stimuliert, ist eine Induktion der Mineralisierung von etwa 19 % quantifizierbar. Insgesamt zeigt C001/S in allen getesteten Konzentrationen und Zeitpunkten einen Trend zur Zunahme der Mineralisierungskapazität von hMSC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 26). Nach Inkubation mit C001/R mit 100 und 1000 ng/ml zu Beginn der adipogenen und ab osteogener Differenzierung ist keine Zunahme, sondern ein minimaler Trend zur Inhibition der Mineralisierung messbar. Lediglich nach Zugabe von 100 ng/ml C001/R bei der Umstellung auf osteogenes Medium wird die Mineralisierung um knapp 30 % induziert. Die hohen Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen und spiegeln somit die Spendervariabilitäten im Versuch wieder (Abbildung 27).



**ABBILDUNG 26** TRANSDIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI HMSC-POPULATIONEN MIT ZWEI KONZENTRATIONEN VON C001/S UND ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN ZUGABEZITPUNKTEN. DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE MINERALISIERUNG NACH 6 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER.

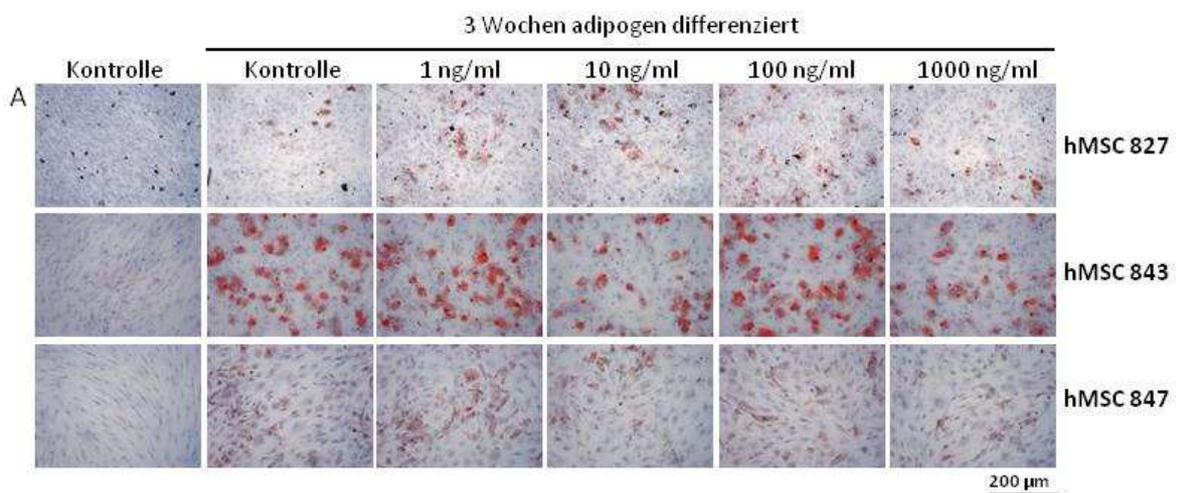


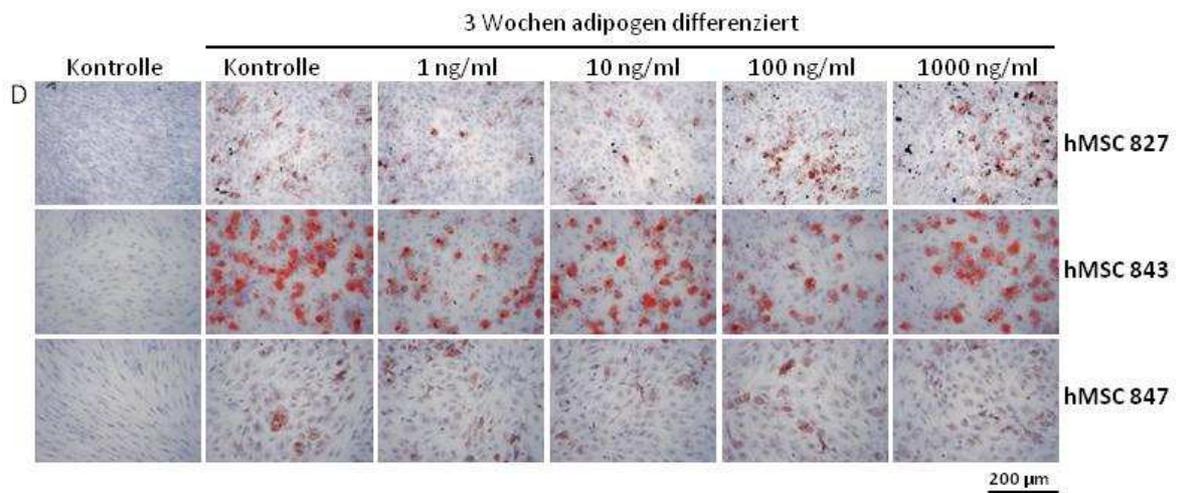
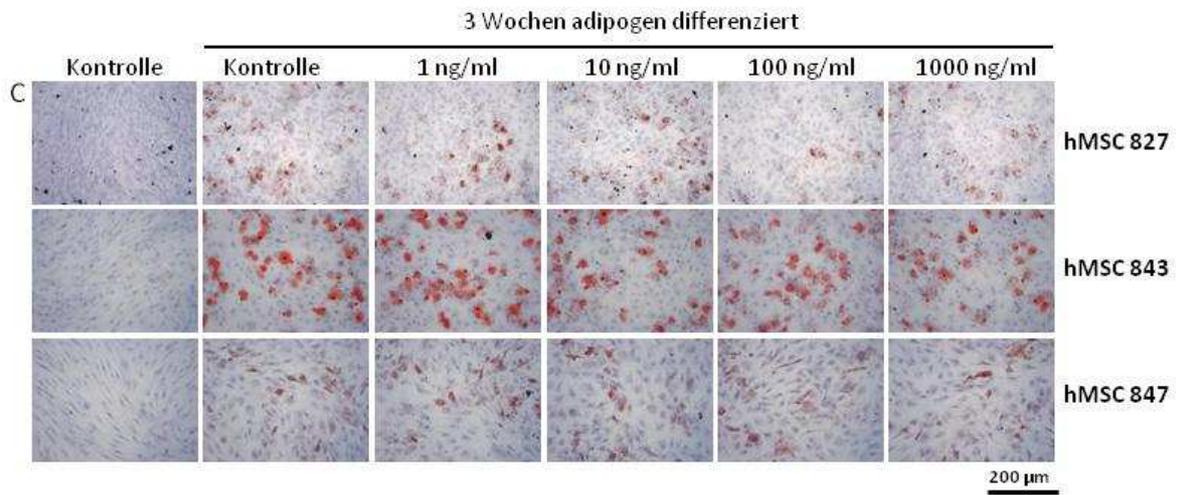
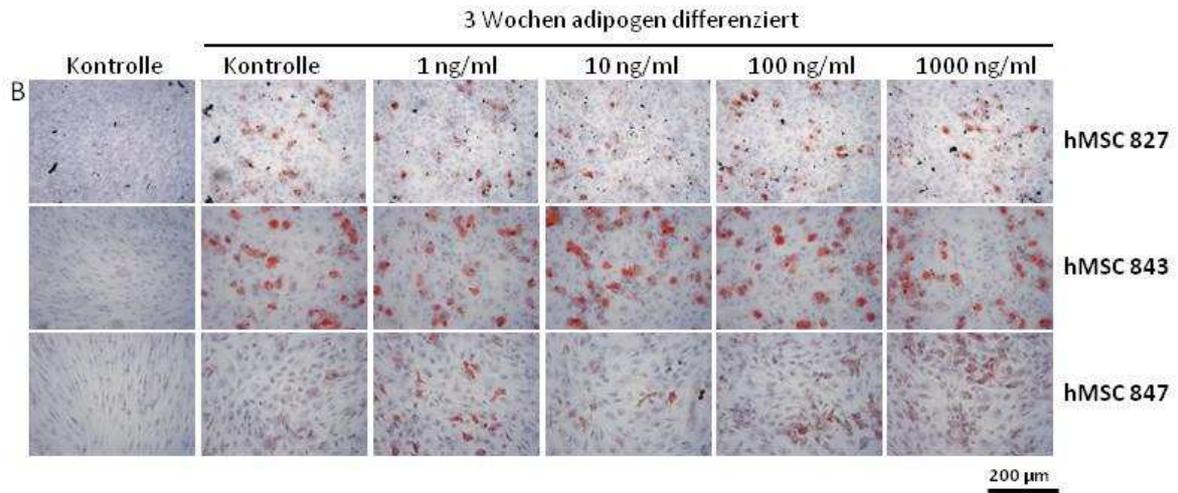
**ABBILDUNG 27** TRANSDIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI HMSC-POPULATIONEN MIT ZWEI KONZENTRATIONEN VON C001/R UND ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN ZUGABEZITPUNKTEN. DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE MINERALISIERUNG NACH 6 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER.

### 5.2.2 Adipogene Differenzierungsstudien in hMSC

Um die Knochenmarksverfettung *in vitro* zu untersuchen, wurden adipogene Differenzierungsstudien in hMSC durchgeführt. Diese zeigen an, ob und in welchem Ausmaß Adipozyten mit Extrakt im Vergleich zur Kontrolle, welche nur mit Lösungsmittel behandelt wurde, vermehrt bzw. vermindert nach Differenzierungsinduktion gebildet werden. Die Anfärbung der entstandenen Lipidtröpfchen erfolgte mittels Ölrot O Färbung und wurde anschließend mikroskopisch detektiert und quantifiziert.

In Abbildung 28 (A-E) sind die adipogenen Differenzierungen unter Verwendung der verschiedenen Extrakte in den drei unterschiedlichen Spendern dargestellt. Die Auswahl erfolgte aus je 6 Bildern pro Konzentration und Extrakt und zeigt nur eine Übersicht über den Erfolg der Differenzierung. Nach Anfärbung der Lipidtröpfchen waren bei Spender 827 viele Zelltrümmer vorhanden, welche die Färbung erschwerten. Spender 843 zeigte die stärkste adipogene Differenzierungskapazität, gefolgt von Spender 847. Die Übersicht zeigt deutlich wie variabel die Färbungsergebnisse in den humanen mesenchymalen Stammzellen sein können.





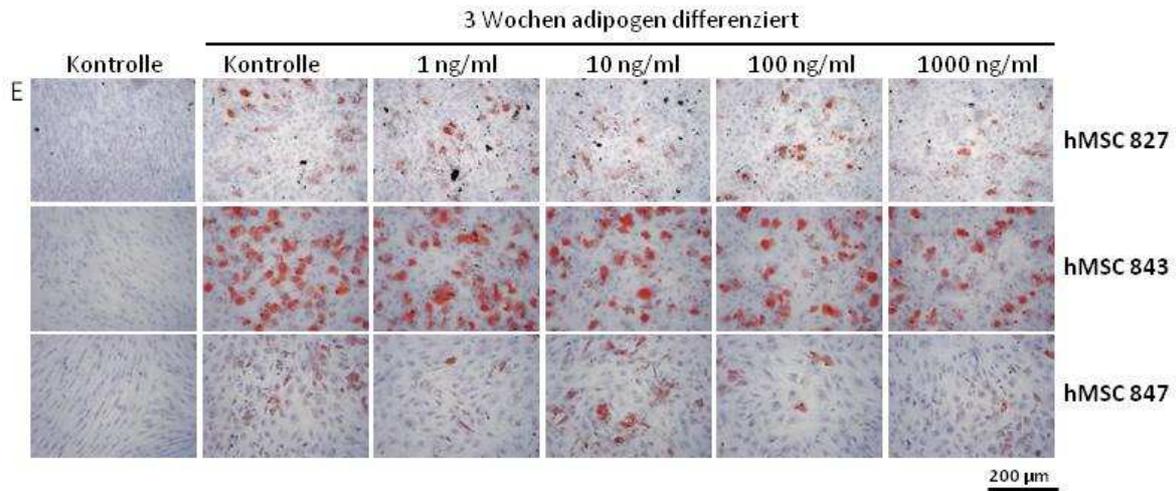


ABBILDUNG 28 ADIPOGENE DIFFERENZIERUNG VON HMSC MIT GESAMTEXTRAKT C001 (A), C001/S (B), S2 (C), C001/R (D) UND R3 (E) MIT JE 1-1000 NG/ML EXTRAKT. HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN AUS DREI VERSCHIEDENEN SPENDERN WURDEN 3 WOCHEN IN EXPANSIONSMEDIUM (KONTROLLE) UND ADIPOGENEM DIFFERENZIERUNGSMEDIUM MIT EXTRAKT KULTIVIERT. DIE ANFÄRBUNG DER GEBILDETEN LIPIDTRÖPFCHEN ERFOLGTE MIT ÖLROT O UND WURDE ANSCHLIEßEND MIKROSKOPISCH AUSGEWERTET (A-E).

Im Anschluss wurden die mikroskopischen Bilder quantifiziert und im Balkendiagramm graphisch dargestellt. Die Inkubation mit C001 in hMSC nach 3 Wochen Differenzierung führt zu einer Inhibition der Adipogenese, die bei 10 ng/ml C001 eine Signifikanz von  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle aufweist. Die Inhibition wird mit 100 ng/ml geringer, beträgt jedoch immerhin noch 80 % der Kontrollgruppe. Werden hMSC mit C001/S in den angegebenen Konzentrationen untersucht, ist eine signifikante Abnahme von etwa 30 % in der niedrigsten Konzentration von 1 ng/ml messbar. Wird die Konzentration auf 10 ng/ml erhöht, beeinflusst der Extrakt die Adipogenese von hMSC nicht. Erst bei Zunahme bis zu 1000 ng/ml ist eine hochsignifikante Abnahme um bis zu 15 % messbar. Nach Inkubation mit der Subfraktion S2 wird die inhibierende Wirkung des Hauptextraktes C001/S bestätigt. In allen Konzentrationen ist ein Trend zur Abnahme der Adipogenese beobachtbar. Nach Stimulierung der hMSC-Populationen mit C001/R findet in den niedrigen Konzentrationen eine Inhibition der Adipogenese um bis zu 40 % statt, die zum Teil hochsignifikant sind (10 ng/ml C001/R) mit  $P \leq 0,005$ . In der hohen Konzentration hat der Extrakt keinen messbaren Einfluss auf die adipogene Differenzierung von hMSC. Wird mit dem subfraktionierten Extrakt R3 stimuliert, ist eine Induktion von bis zu 20 % in allen getesteten Konzentrationen quantifizierbar. Mit 1000 ng/ml R3 ist die Änderung der Adipogenese signifikant ( $P \leq 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 29).

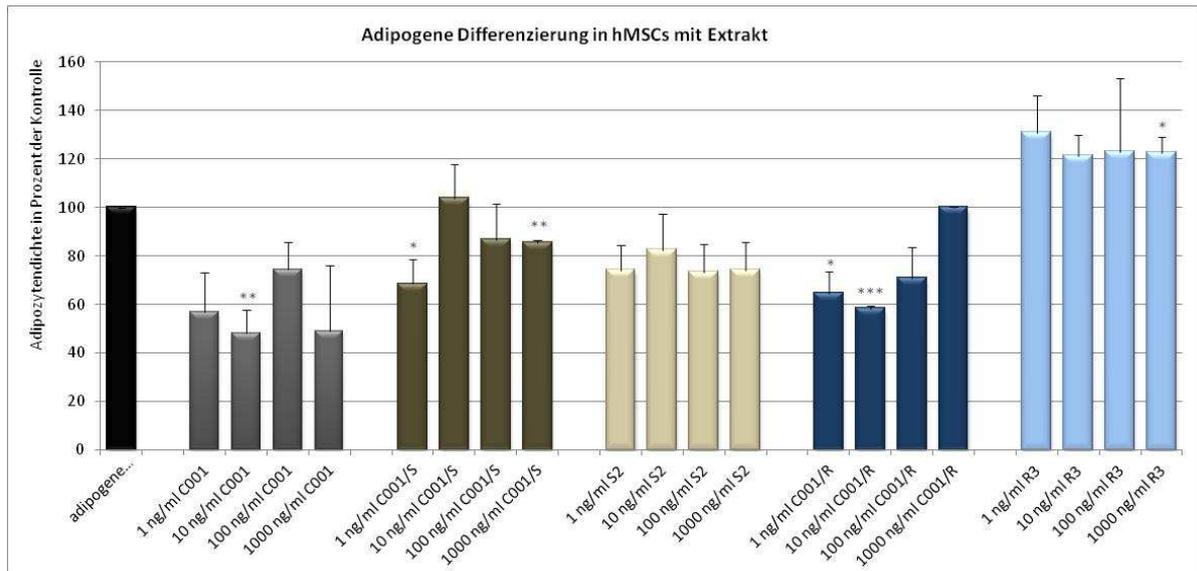
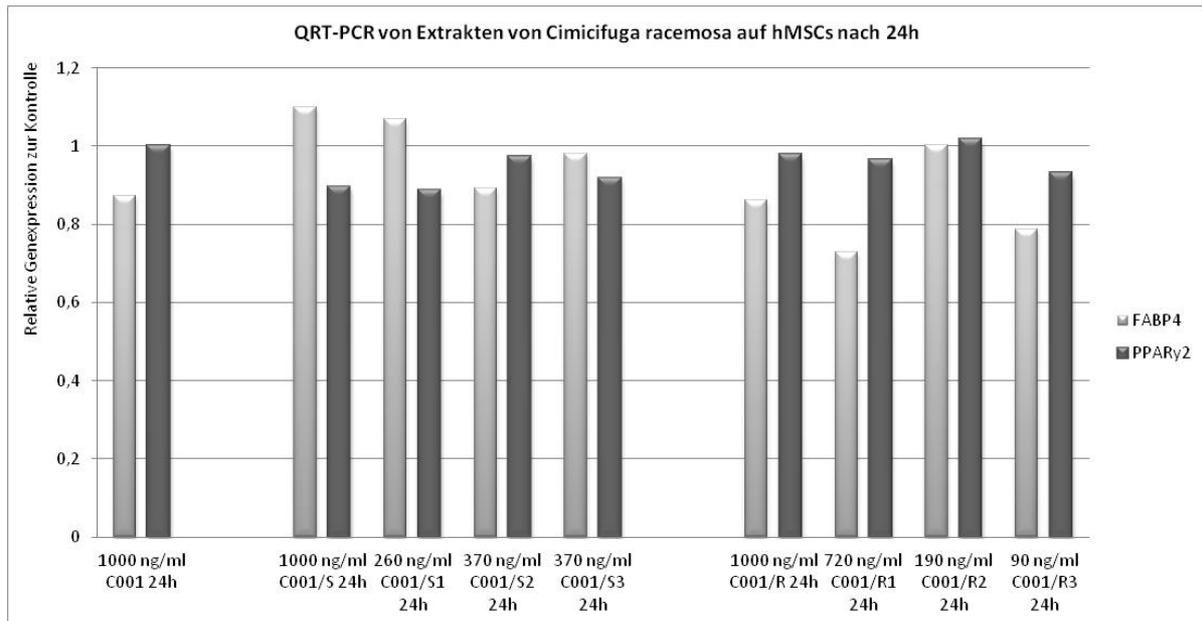


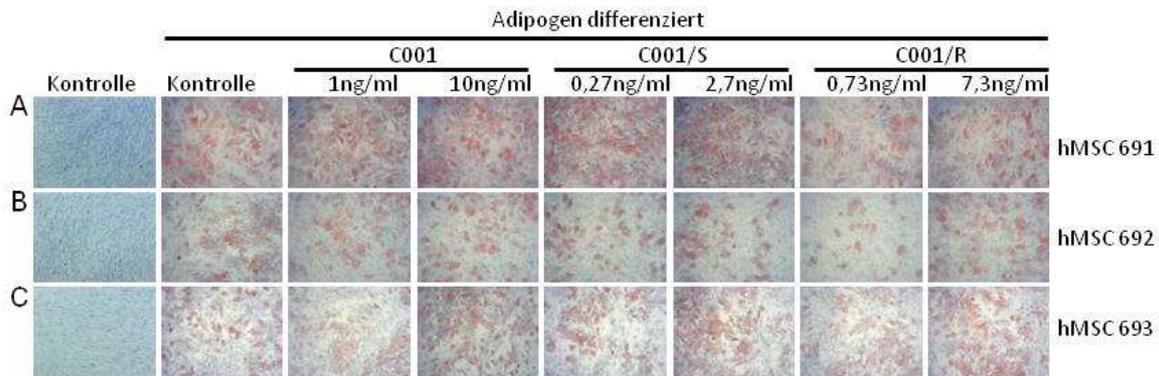
ABBILDUNG 29 ADIPOGENE DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI HMSC-POPULATIONEN MIT AUSGEWÄHLTEN EXTRAKTEN VON *CIMICIFUGA RACEMOSA*. DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE ADIPOGENESE NACH 2 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

Wird das Genexpressionsniveau von Fettmarkern wie FABP4 in hMSC nach Inkubation von 1000 ng/ml C001 in drei hMSC-Populationen nach 24 h untersucht, ist eine geringfügige Abnahme im Vergleich zur Kontrolle messbar. Lediglich nach Stimulation mit C001/S (1000 ng/ml) und S1 (260 ng/ml) wird das Genexpressionsniveau tendenziell auf das 1,1 fache erhöht. S2 (370 ng/ml) und S3 (370 ng/ml) inhibieren die Genexpression von FABP4 (Abbildung 30). 1000 ng/ml C001/R führen zu einer Abnahme der Expression auf etwa 0,85 im Vergleich zur Kontrolle. Den stärksten Trend zur Reduktion der Genexpression ist nach Inkubation mit 720 ng/ml R1 messbar, wobei auch mit 90 ng/ml R3 eine Inhibition beobachtbar ist. 190 ng/ml R2 haben keinen messbaren Einfluss auf die Genexpression von FABP4 nach 24 h. Wird das Genexpressionsniveau von PPAR $\gamma$ 2 nach Inkubation von 1000 ng/ml C001 in drei verschiedenen hMSC-Populationen bestimmt, ist kein Einfluss im Vergleich zur Kontrolle messbar. Nach Inkubation mit den saponinhaltigen Fraktionen ist ein Trend zur Reduktion des Genexpressionslevels von PPAR $\gamma$ 2 beobachtbar (Abbildung 30). Der Gesamt-S-Extrakt und S1 reduzieren das Niveau auf das 0,9 fache der Kontrolle. Nach Stimulation mit den R-Extrakten ist nur ein wenig ausgeprägter Trend zur Abnahme des PPAR $\gamma$ 2-Levels messbar.



**ABBILDUNG 30** RELATIVE GENEXPRESSION VON FETTMARKERN (FABP4: FATTY ACID BINDING PROTEIN 4 UND PPAR $\gamma$ 2: PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR  $\gamma$  2) NACH INKUBATION VON DREI VERSCHIEDENEN HMSC-POPULATIONEN MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1000 NG/ML) UND DEN ANTEILIG ENTHALTENEN SUBFRAKTIONEN S1, S2, S3, R1, R2 UND R3 NACH 24 H INKUBATION. DIE AUSWERTUNG DER QRT-PCR-DATEN ERFOLGTE NACH DEM EFFIZIENZ-KORRIGIERTEN QUANTIFIZIERUNGSMODELL UND EINER ANSCHLIEßENDEN NORMALISIERUNG AUF DIE JEWEILS UNBEHANDELTE HMSC-POPULATION. EINE RELATIVE GENEXPRESSION VON 1 ENTSpricht SOMIT KEINE ÄNDERUNG IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE.

Um den Einfluss der, in den Subfraktionen C001/S und C001/R, enthaltenen Wirkkombinationen auf die Gesamtfraktion C001 zu untersuchen, wurden Differenzierungsstudien mit den anteilig errechneten Konzentrationen durchgeführt. Dabei zeigten die mit Expansionsmedium behandelten Zellen normales Zellwachstum nach 3 Wochen Kultivierung (Abbildung 31, A, B, C; Kontrolle). Die Inkubation der drei hMSC-Populationen mit adipogenem Medium ohne Extrakt führt, wie erwartet, zur Bildung von Lipidtröpfchen in unterschiedlich starkem Maß, ausgehend vom jeweiligen Spender (Abbildung 31, A, B, C; Kontrolle adipogen differenziert). Spender 691 zeigt eine Zunahme der Differenzierungskapazität in beiden untersuchten Konzentrationen (1 und 10 ng/ml), welche auch in den untersuchten Konzentrationen von C001/S (0,23 und 2,3 ng/ml) wieder zu finden ist. Stimulation mit 0,73 ng/ml C001/R führt zu verringerter Lipidtröpfchenbildung im Vergleich zur adipogenen Kontrolle. Mit 7,3 ng/ml C001/R nimmt die Differenzierung wieder zu. In den nächsten beiden Spendern liegt ein vergleichbarer Trend vor. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen eine optische Zunahme vor allem mit den Extrakten C001 und C001/S. C001/R scheint in den niedrigen Konzentrationen eine Hemmung der Adipogenese zu erwirken, welche in der höheren Dosis aufgehoben wird (Abbildung 31).



**ABBILDUNG 31 ADIPOGENE DIFFERENZIERUNG VON HMSC MIT GESAMTEXTRAKT C001 UND DEN ANTEILIG ENTHALTENEN FRAKTIONEN C001/S (27 %) UND C001/R (76 %).** HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN AUS DREI VERSCHIEDENEN SPENDERN WURDEN 3 WOCHEN IN EXPANSIONSMEDIUM (KONTROLLE) UND ADIPOGENEM DIFFERENZIERUNGSMEDIUM MIT EXTRAKT KULTIVIERT. DIE ANFÄRBUNG DER GEBILDETEN LIPIDTRÖPFCHEN ERFOLGTE MIT ÖLROT O UND WURDE ANSCHLIEßEND MIKROSKOPISCH AUSGEWERTET (A-C).

Abbildung 31 zeigt jedoch nur eine Auswahl mikroskopischer Bilder. Werden die Mittelwerte aus allen Aufnahmen berechnet wird, im Vergleich zur adipogenen Kontrolle, die adipogene Differenzierungskapazität in allen untersuchten Extrakten und den jeweiligen Konzentrationen nach drei Wochen Inkubation erhöht (Abbildung 32). Die Inkubation mit C001 in hMSC nach drei Wochen Differenzierung führt zu einer tendenziellen Induktion der Adipogenese mit 1 und 10 ng/ml um 30 bzw 20 %. Nach Stimulation mit 2,3 ng/ml C001/S wird die Adipogenese bis zu 40 % erhöht. Die hohen Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen des Versuches und spiegeln die hohe Spendervariabilität wider. Werden hMSC mit 0,73 ng/ml C001/R inkubiert, wird eine signifikante Zunahme der Adipogenese um bis zu 38 % gemessen. Diese Zunahme ist mit 7,3 ng/ml nur noch tendenziell vorhanden (Abbildung 32).

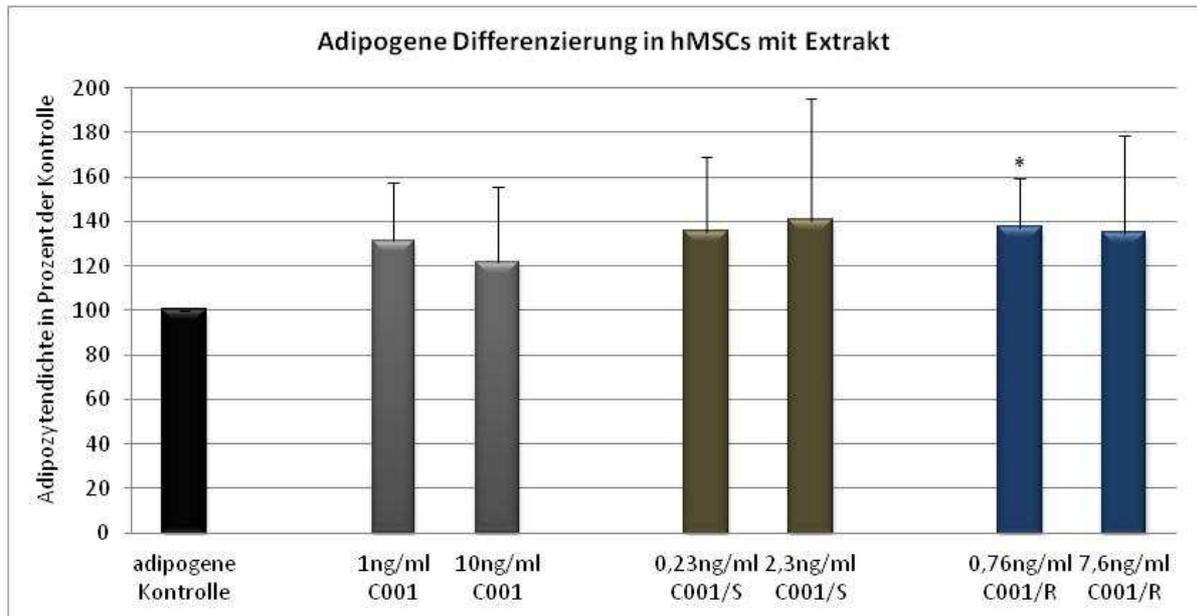


ABBILDUNG 32 ADIPOGENE DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI HMSC-POPULATIONEN MIT GESAMTEXTRAKT C001 UND DEN ANTEILIG ENTHALTENEN FRAKTIONEN C001/S (27 %) UND C001/R (73 %). DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE ADIPOGENESE NACH 2 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTE ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

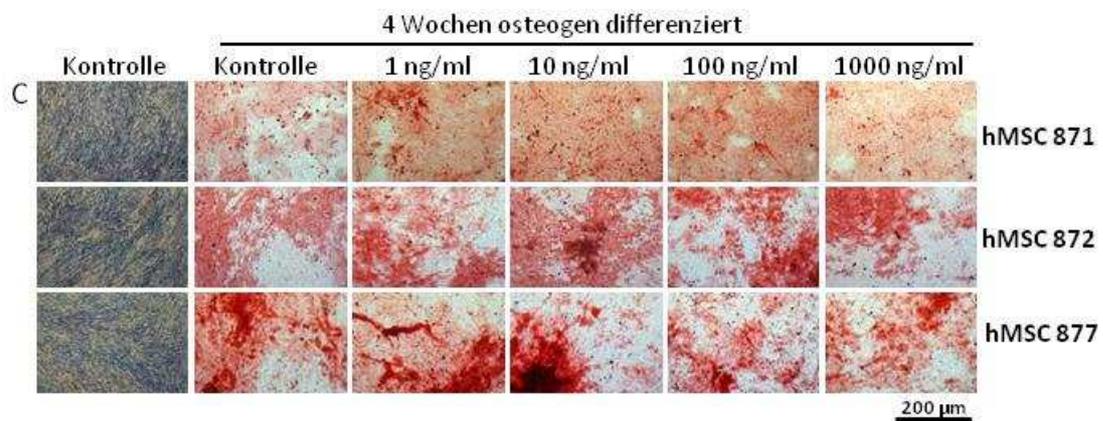
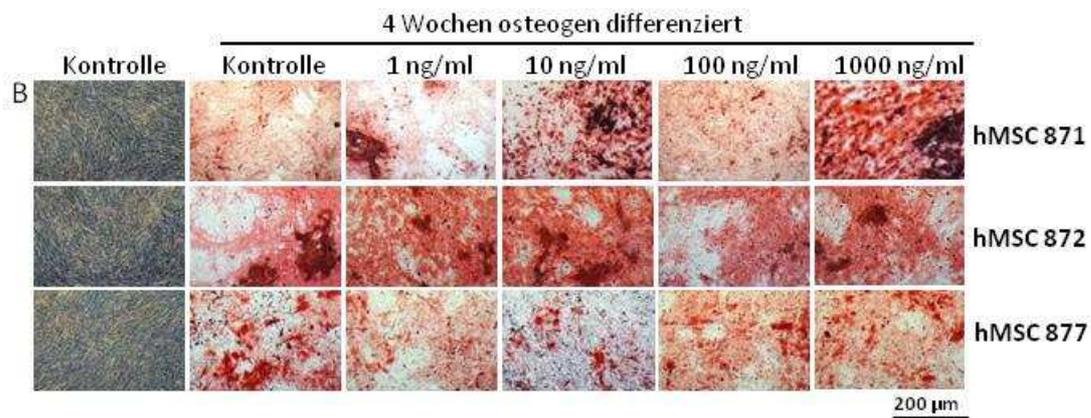
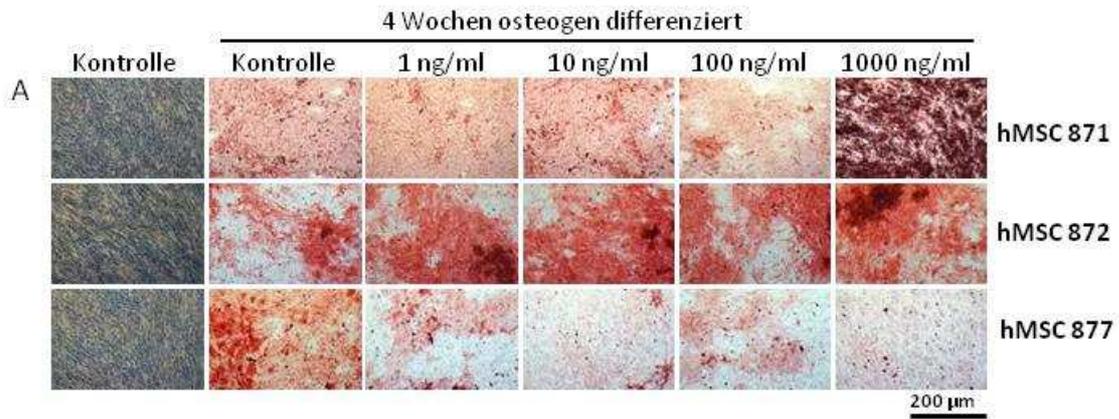
### 5.2.3 Osteogene Differenzierung

Um die Auswirkungen auf die knochenbildende Wirksamkeit der Extrakte zu untersuchen, wurden osteogene Differenzierungsstudien in hMSC und in der etwas weiter osteogen differenzierten Zelllinie SaOs-2 durchgeführt. Die Anfärbung der Mineralisierungsmatrix erfolgte mittels Alizarinrot S-Färbung und wurde anschließend mikroskopisch detektiert und ausgewertet.

#### 5.2.3.1 HMSC

Zur Untersuchung des Einflusses von Cimicifuga-Extrakt auf hMSC wurden drei unterschiedliche Spender mit Extrakt inkubiert und osteogen differenziert. Nach 4 Wochen erfolgte die Auswertung von je 6 Bildern pro Konzentration pro Extrakt. Abbildung 33 (A-E) zeigt eine Übersicht über den durchgeführten Versuch. Auch hier ist sehr deutlich die starke Spendervariabilität zu erkennen. Die mit Expansionsmedium behandelten Zellen zeigten bei keinem der drei Spender eine spontane osteogene Differenzierung (Abbildung 33 A-E, Kontrolle). Die Anfärbung der Mineralisierungsmatrices von Spender 871 und 872 wiesen eine

gleichmäßige Färbung auf, wohingegen Spender 877 nach 4 Wochen eine erhöhte Anzahl von abgestorbenen Zellen aufwies.



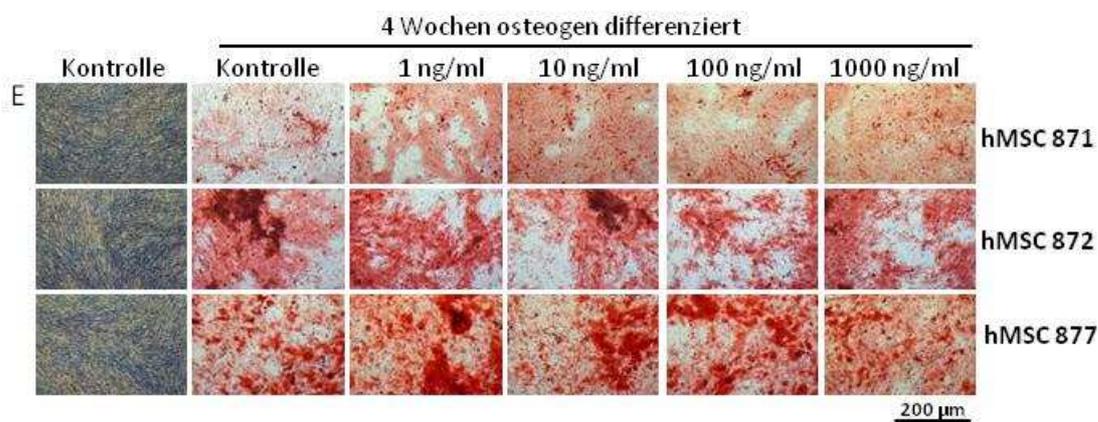
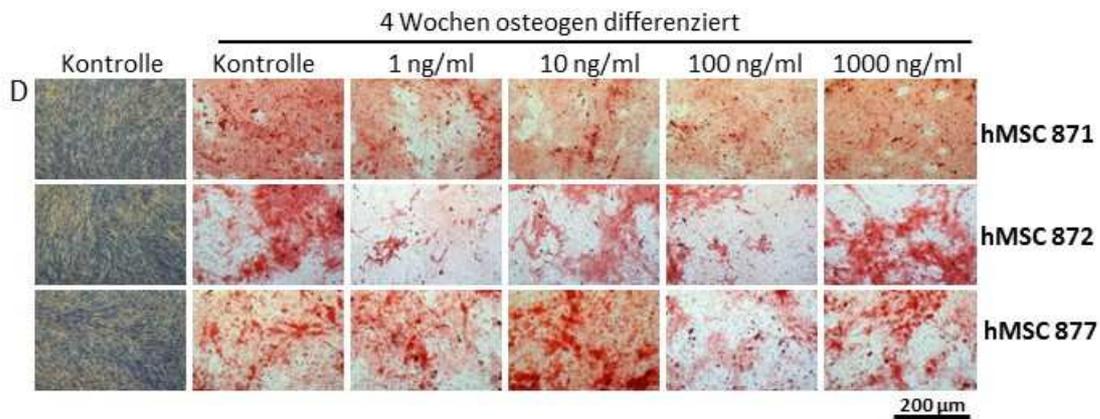
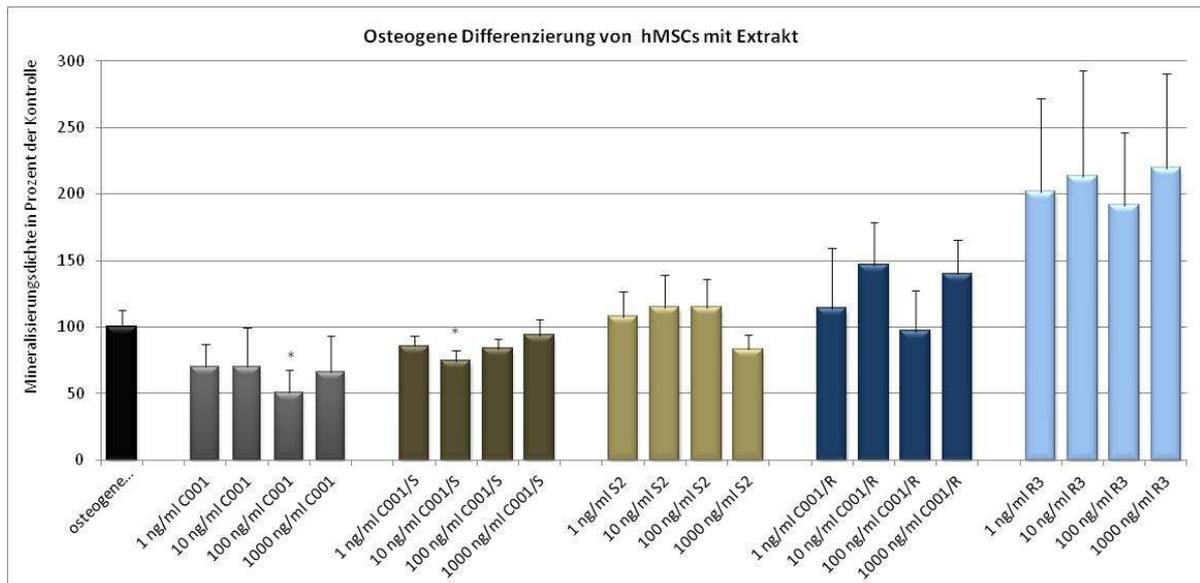


ABBILDUNG 33 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG VON HMSC MIT GESAMTEXTRAKT C001 (A), C001/S (B), S2 (C), C001/R (D) UND R3 (E) MIT JE 1-1000 NG/ML EXTRAKT. HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN AUS DREI VERSCHIEDENEN SPENDERN WURDEN 4 WOCHEN IN EXPANSIONSMEDIUM (KONTROLLE) UND OSTEOGENEM DIFFERENZIERUNGSMEDIUM MIT EXTRAKT KULTIViert. DIE ANFÄRBUNG DER GEBILDETEN MINERALISIERUNGSMATRIX ERFOLGTE MIT ALIZARINROT-S UND WURDE ANSCHLIEßEND MIKROSKOPISCH AUSGEWERTET (A-E).

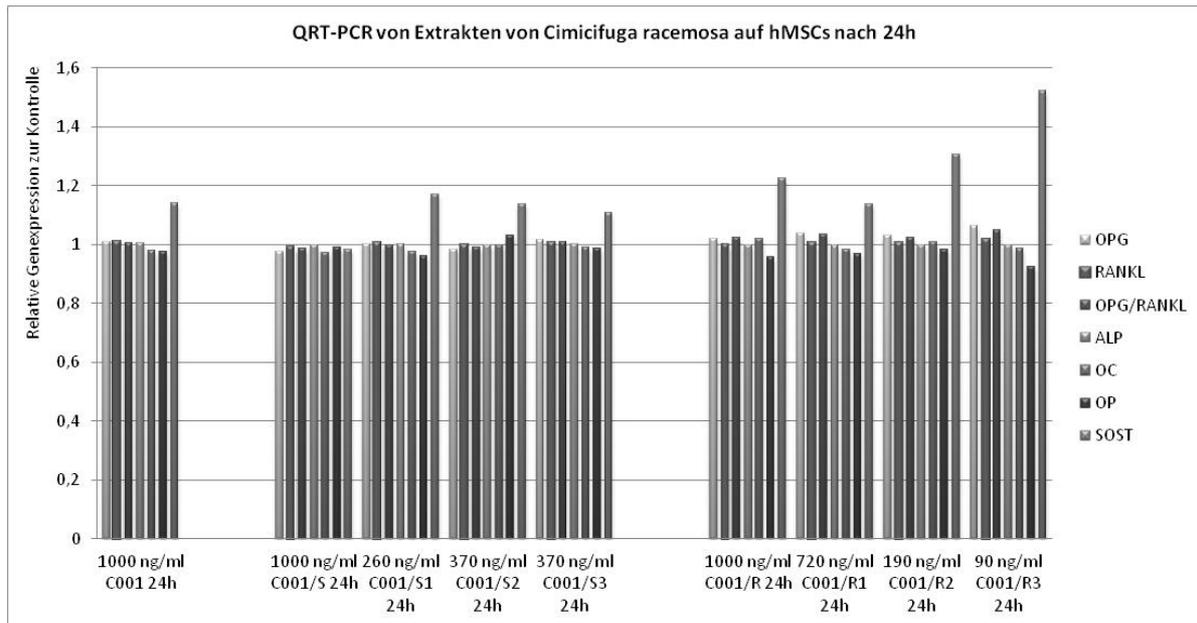
Im Anschluss wurden die mikroskopischen Bilder quantifiziert und im Balkendiagramm graphisch dargestellt. Die Inkubation mit C001 in hMSC nach 4 Wochen Differenzierung führt zu einer Inhibition der Mineralisierung, die bei 100 ng/ml C001 am stärksten beobachtbar ist. Dieser Wert weist eine Signifikanz von  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 34). Werden hMSC mit C001/S in den angegebenen Konzentrationen untersucht, ist eine Abnahme von etwa 10 % in der niedrigsten Konzentration von 1 ng/ml messbar. Wird die Konzentration auf 10 ng/ml erhöht, führt dieses zu einer signifikanten Hemmung der Mineralisierung um etwa 20 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei Erhöhung der Konzentration nähert sich der gemessene Wert dem der Kontrolle an. Nach Inkubation mit der Subfraktion S2 wird die inhibierende Wirkung des Hauptextraktes C001/S nahezu aufgehoben und führt zu einer tendenziellen Induktion der osteogenen Differenzierung in den drei niedrigen Konzentrationen. Nach Stimulierung der hMSC-Populationen mit C001/R ist ein Trend zur

Erhöhung der Differenzierungskapazität in hMSC nach 4 Wochen messbar, welcher mit 100 ng/ml kurzzeitig auf den Wert der Kontrolle zurückfällt. Wird mit dem subfraktionierten Extrakt R3 stimuliert, ist eine tendenzielle Induktion von bis zu 100 % in allen getesteten Konzentrationen quantifizierbar. Die Inkubation von hMSC mit der Subfraktion R3 führten zu starken Varianzen in den einzelnen Spendern, welche durch die Höhe der Fehlerbalken verdeutlicht wird (Abbildung 34, R3).



**ABBILDUNG 34 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI hMSC-POPULATIONEN MIT AUSGEWÄHLTEN EXTRAKTE VON CIMICIFUGA RACEMOSA. DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE MINERALISIERUNG NACH 4 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Wird das Genexpressionsniveau von ausgesuchten Knochenmarkern in hMSC nach Inkubation von 1000 ng/ml C001 in drei hMSC-Populationen nach 24 h untersucht, sind keine messbaren Veränderungen im Expressionsniveau von OPG, RANKL, ALP, OP und OC zu beobachten. Dieser Trend setzt sich nach Inkubation mit allen Extrakten in den gegebenen Konzentrationen durch. Das einzig auffällige ist die Genexpression von SOST, welche durch den Gesamtextrakt und die S-Subfraktionen gering und durch alle wasserlöslichen Fraktionen (alle R-Extrakte) deutlich induziert wird (Abbildung 35).



**ABBILDUNG 35** RELATIVE GENEXPRESSION VON KNOCHENMARKERN (OPG: OSTEOPROTEGERIN; RANKL: RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR KAPPA-B LIGAND; ALP: ALKALINE PHOSPHATASE; OC: OSTEOCALCIN; OP: OSTEOPONTIN; SOST: SCLEROSTIN) NACH INKUBATION VON DREI VERSCHIEDENEN HMSC-POPULATIONEN MIT EXTRAKTE VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1000 NG/ML) UND DEN ANTEILIG ENTHALTENEN SUBFRAKTIONEN S1, S2, S3, R1, R2 UND R3 NACH 24 H INKUBATION. DIE AUSWERTUNG DER QRT-PCR-DATEN ERFOLGTE NACH DEM EFFIZIENZ-KORRIGIERTEN QUANTIFIZIERUNGSMODELL UND EINER ANSCHLIEBENDEN NORMALISIERUNG AUF DIE JEWEILS UNBEHANDELTE HMSC-POPULATION. EINE RELATIVE GENEXPRESSION VON 1 ENTSpricht SOMIT KEINE ÄNDERUNG IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE.

Um den Einfluss der, in den Subfraktionen C001/S und C001/R, enthaltenen Wirkkombinationen auf die Gesamtfraktion C001 zu untersuchen, wurden Differenzierungsstudien mit den anteilig errechneten Konzentrationen durchgeführt. Dabei zeigten die mit Expansionsmedium behandelten Zellen normales Zellwachstum nach 4 Wochen Kultivierung (Abbildung 36, A-B, Kontrolle). Beim Spender 708 ist die osteogene Kontrolle nach 4 Wochen stärker mineralisiert als beim Spender 710. Auch die mit Extrakt behandelten Zellen differenzieren bei diesem Spender im Durchschnitt vermehrt im Gegensatz zum Spender 710. Sehr deutlich werden diese Unterschiede bei der graphischen Auswertung der Differenzierung von hMSC mit 0,27 ng/ml C001/S (Abbildung 37). Die Standardabweichung, d.h. die Streuung der Messwerte um den Mittelwert der Datenpunkte, erreicht einen Wert von knapp 60 %. Wird die Inkubation mit 1 und 10 ng/ml C001 mit dem Kontrollwert (100 %) verglichen, ist ein Trend zur Abnahme der osteogenen Differenzierung zu verzeichnen, welcher mit der höheren Konzentration ein Minimum von etwa 85 % erreicht. Die Behandlung der Zellen mit C001/S führt mit 0,27 ng/ml zu einer Inhibition der Mineralisierung von 20 %, die mit Zunahme der Konzentration um den Faktor 10 tendenziell

aufgehoben wird. Die Differenzierung mit C001/R führt zu keinem Einfluss im Vergleich zu den ohne Extrakt behandelten Zellen mit 0,73 ng/ml Extrakt. Erst bei Erhöhung auf 7,3 ng/ml wird eine Tendenz zur Inhibition um etwa 10 % beobachtet.

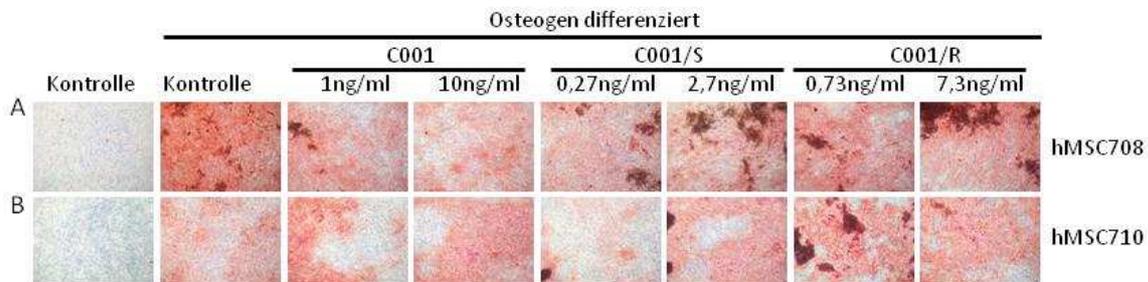


ABBILDUNG 36 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG VON hMSC MIT GESAMTEXTRAKT C001 UND DEN ANTEILIG ENTHALTENEN FRAKTIONEN C001/S (27 %) UND C001/R (76 %). HUMANE MESENCHYMALLE STAMMZELLEN AUS ZWEI VERSCHIEDENEN SPENDERN WURDEN 4 WOCHEN IN EXPANSIONSMEDIUM (KONTROLLE) UND OSTEOGENEM DIFFERENZIERUNGSMEDIUM MIT EXTRAKT KULTIViert. DIE ANFÄRBUNG DER GEBILDETEN MINERALISIERUNGSMATRICES ERFOLGTE MIT ALIZARINROT-S UND WURDE ANSCHLIEßEND MIKROSKOPISCH AUSGEWERTET (A-B).

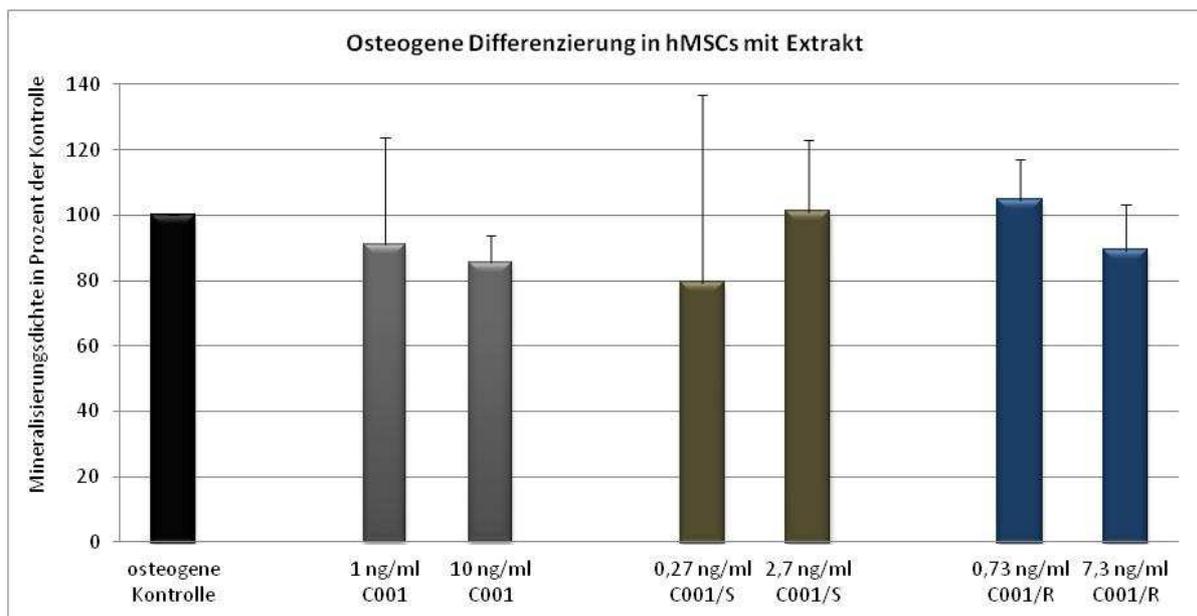
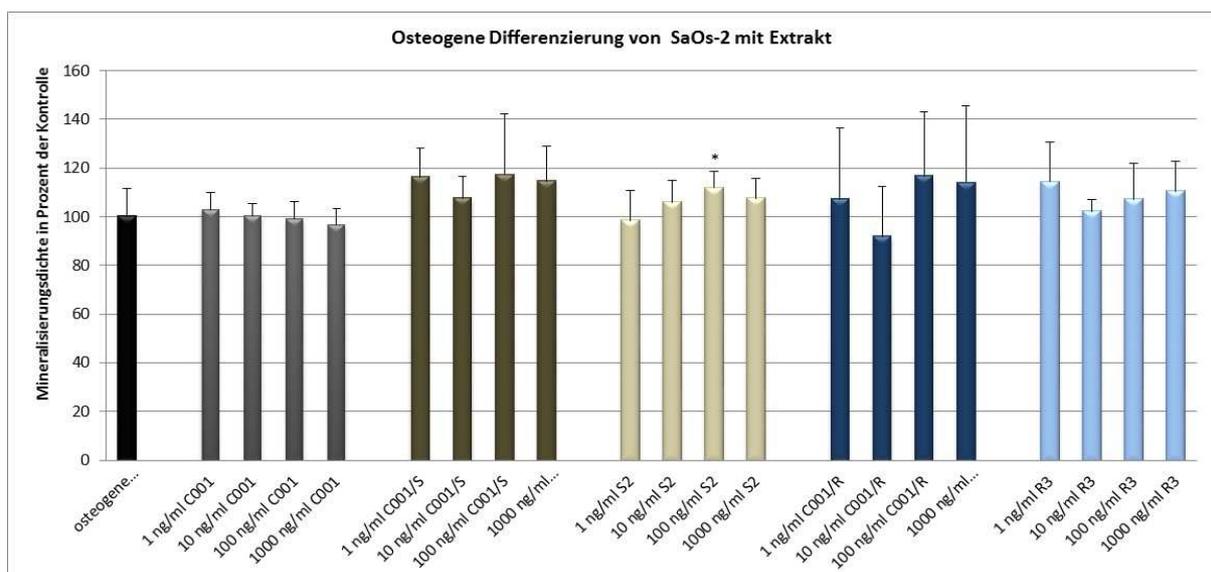


ABBILDUNG 37 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN ZWEI hMSC-POPULATIONEN MIT GESAMTEXTRAKT C001 UND DEN ANTEILIG ENTHALTENEN FRAKTIONEN C001/S (27 %) UND C001/R (73 %). DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEZEIGT UND BEZIEHEN SICH AUF DIE MINERALISIERUNG NACH 4 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER ZWEI SPENDER. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

### 5.2.3.2 SaOs-2-Zellen

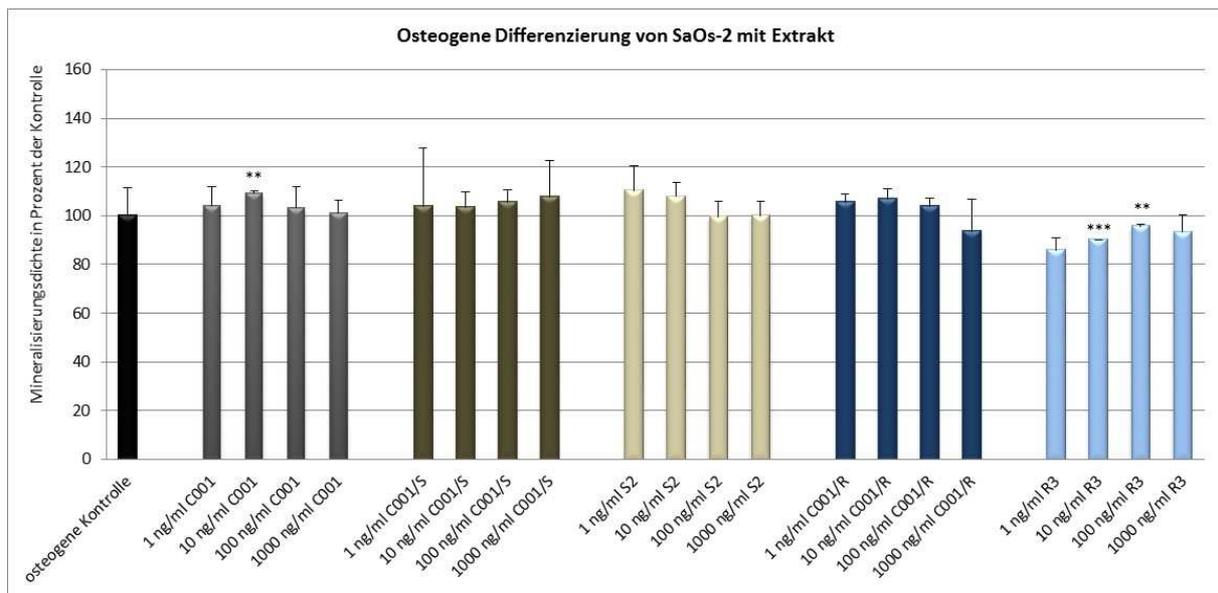
Zur Analyse des Einflusses von Cimicifuga-Extrakt auf hMSC wurden drei unterschiedliche Passagen von SaOs-2-Zellen mit Extrakt inkubiert und osteogen differenziert. Der Vorteil von SaOs-2-Zellen liegt darin, dass diese viele osteoblastische Funktionen widerspiegeln und somit eine Untersuchung in der späten Phase der osteogenen Differenzierung erlauben. Nach 2 und 4 Wochen erfolgte die Auswertung von je 6 Bildern pro Konzentration pro Extrakt.

Nach 2 Wochen Inkubation mit C001 ist eine leichte Tendenz zur Abnahme der osteogenen Differenzierungskapazität mit zunehmender Konzentration beobachtbar. C001/S zeigt in allen getesteten Konzentrationen eine nicht signifikante Induktion der Mineralisierungskapazität um bis zu knapp 20 %. Diese Induktion ist auch nach Inkubation mit der Subfraktion S2 messbar, wobei hier die höchste Mineralisierung mit 100 ng/ml mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  erreicht wurde. Die Auswertung mit Extrakt C001/R nach 2 Wochen ergibt eine Induktion der Mineralisierungskapazität bis auf 10 ng/ml, welche zu einer nicht signifikanten Inhibition von bis zu 10 % führt. Der Subextrakt R3 zeigt die stärkste Zunahme nach Inkubation mit 1 ng/ml und reduziert die osteogene Differenzierungskapazität mit Erhöhung der Konzentration auf 10 ng/ml kurzzeitig auf etwas knapp über 100 % der Kontrolle. Anschließend nimmt die Kapazität tendenziell wieder zu (Abbildung 38).



**ABBILDUNG 38** OSTEOGENE DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI SAOS-2-PASSAGEN MIT AUSGEWÄHLTEN EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA. DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE MINERALISIERUNG NACH 2 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.

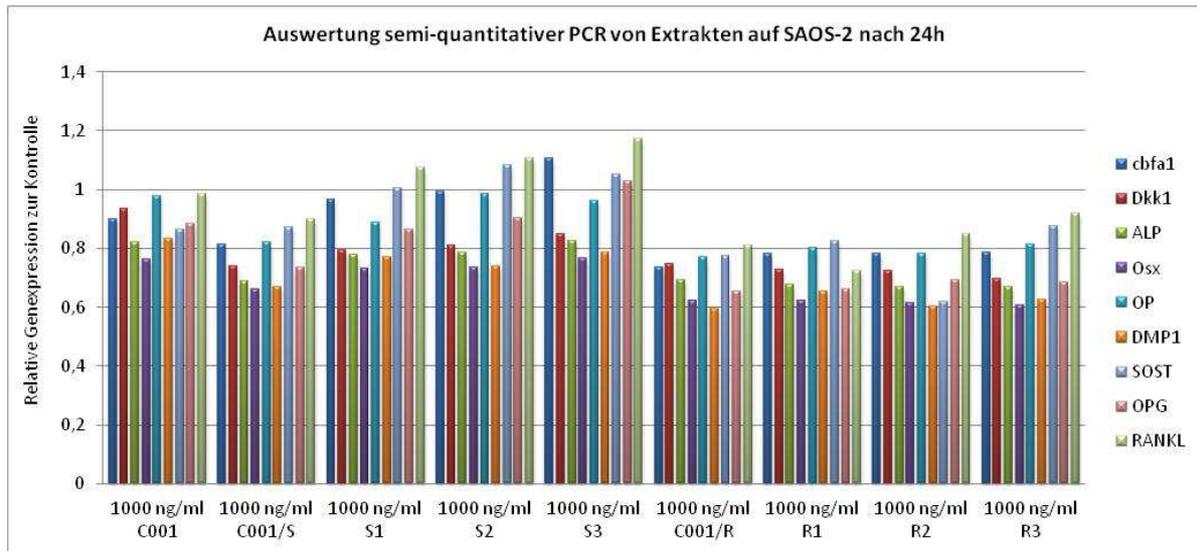
Nach 4 Wochen erhöht sich insgesamt die Mineralisierungskapazität von C001 auf SAOS-2-Zellen in allen untersuchten Konzentrationen. Mit 10 ng/ml wird eine signifikante Zunahme von bis zu 10 % erreicht. Die Stimulierung mit C001/S zeigt einen Trend zur geringfügigen Zunahme mit Erhöhung der Konzentration. Dieser Trend ist in der Subfraktion S2 nach 4 Wochen nur in den beiden niedrigen Konzentrationen 1 und 10 ng/ml messbar. Bei 100 und 1000 ng/ml werden keine Einflüsse auf die Mineralisierungskapazität beobachtet. Nach Inkubation mit den wässrigen Fraktionen C001/R und R3 ist eine Abnahme der Differenzierungskapazität messbar. Die R-Fraktion führt zu einer geringfügigen Zunahme der osteogenen Differenzierung in den niedrigeren Konzentrationen. Bei 1000 ng/ml nimmt die Differenzierung abrupt ab. Mit der Subfraktion R3 ist insgesamt eine Inhibition der Mineralisierungskapazität zu beobachten. Diese nimmt jedoch innerhalb der untersuchten Konzentrationen zu und ist signifikant mit 10 und 100 ng/ml (Abbildung 39).



**ABBILDUNG 39 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN AN DREI SAOS-2-PASSAGEN MIT AUSGEWÄHLTEN EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA. DIE WERTE WURDEN IN PROZENT ANGEGEBEN UND BEZIEHEN SICH AUF DIE MINERALISIERUNG NACH 4 WOCHEN DIFFERENZIERUNG IN DEN UNBEHANDELTEN ZELLEN, WELCHE AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER DREI SPENDER. STATISTIK: T-TEST.  $P \leq 0,05$  \*;  $P \leq 0,01$  \*\*;  $P \leq 0,001$  \*\*\*. SIGNIFIKANZ BEZOGEN AUF UNBEHANDELTE KONTROLLE.**

Werden die Genexpressionsniveaus von ausgesuchten Knochenmarkern nach 24 h Inkubation in SaOs-2-Zellen untersucht, ist bei den meisten der untersuchten Gene eine Herunterregulation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen messbar. Die Genexpression von *cbfa1* wird mit 1000 ng/ml Hauptextrakt C001 geringfügig herunterreguliert. Dieser Effekt wird nach Inkubation mit 1000 ng/ml C001/S nochmals verstärkt. Werden SaOs-2-Zellen mit

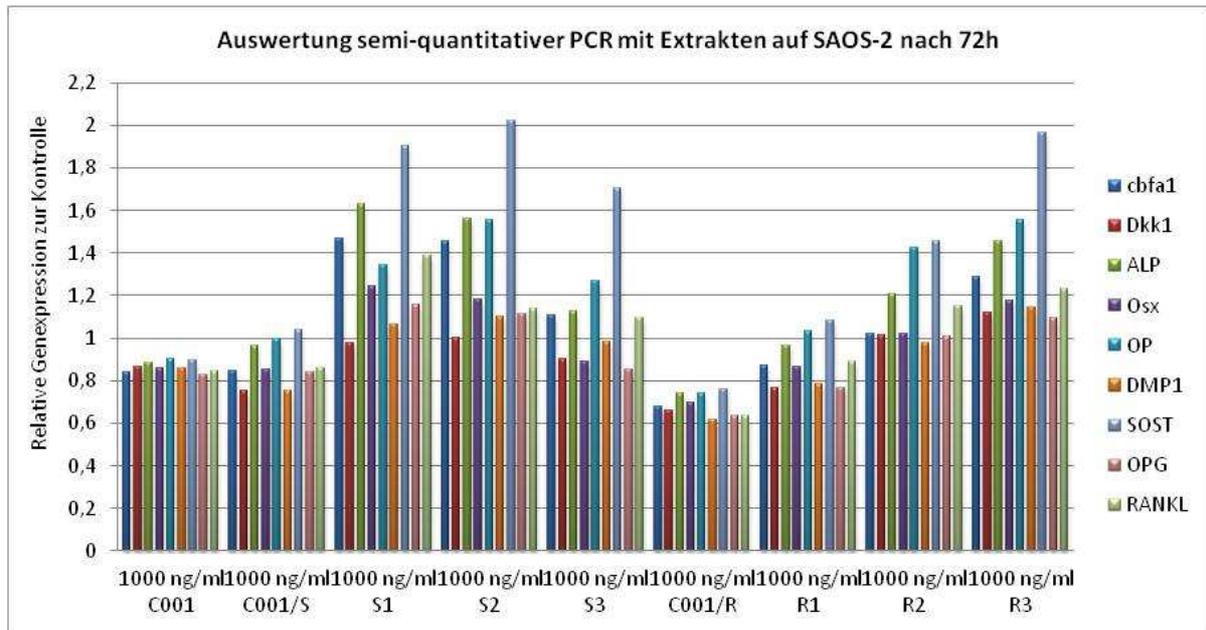
den S-Subfraktionen stimuliert, nähert sich die Genexpression von *cbfa1* mit S1 und S2 wieder einem Wert von 1, d.h. keine Genexpressionsänderung von behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nach 24 h, an. Mit S3 wird die Genregulation von *cbfa1* nach 24 h leicht erhöht. Stimulation mit den R-Extrakten liefert bei allen getesteten Fraktionen eine Abnahme der Genexpression auf einen Wert von ungefähr 0,8. Die relative Expression von *DKK1* nimmt mit allen Extrakten von *Cimicifuga racemosa* ab. Mit C001 nur tendenziell gering, jedoch mit zunehmender Fraktionierung sinkt die Genexpression von *DKK1*. Von den S-haltigen Extrakten zeigt die stärkste Hemmung der C001/S-Extrakt, die geringste Hemmung der S3-Extrakt. Bei den R-Extrakten liegt die Hemmung der Genexpression von *DKK1* bei allen Extrakten bei etwa 0,7 (Abbildung 40). Ähnliche Genexpressionsniveaus wurden für *ALP* und *Osx* berechnet. Beide Genexpressionen wurden nach Stimulation mit 1000 ng/ml der untersuchten Extrakte herunter reguliert. Die Inkubation von Extrakt C001 und S2 hat keinen Einfluss auf die Expression von *Osteopontin*. Mit den restlichen Extrakten wird das Genexpressionsniveau gehemmt, wobei mit den saponinhaltigen Fraktionen eine Inhibition um das knapp 0,2fache der Kontrolle erreicht wird. Mit den wässrigen Substanzen liegen die Werte über einer 0,2fachen Abnahme der Expression im Vergleich zum Expressionsniveau von *Osteopontin* der unbehandelten Zellen. Entsprechende Auswirkungen haben die Extrakte auf das Genexpressionslevel von *DMP1*. Zusätzlich hemmen hier die Extrakte C001 und S2 die Expression in den getesteten Konzentrationen. Werden die Genexpressionsniveaus von *SOST* untersucht, ist nach Stimulation mit allen Hauptextrakten (C001, C001/S und C001/R) gehemmt. Mit den fraktionierten Extrakten S1 und S3 wurde kein Einfluss auf die Expression von *SOST* gemessen, lediglich mit S2 ist eine Erhöhung messbar. Die R-Subfraktionen hemmen die Expression von *SOST*, vor allem die Inkubation mit R2 führt zu einer Abnahme um das 0,4fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das Verhältnis der Genexpressionsniveaus von *OPG* und *RANKL* liegt bei allen analysierten Extrakten zugunsten von *RANKL*. Die Genexpression der beiden korrelierenden Gene ist nach Inkubation mit Extrakt C001 gehemmt. Mit den S-haltigen Extrakten liegt das geringste Expressionsniveau nach Stimulation mit C001/S vor. Dieses Niveau nähert sich dem Kontrollwert mit zunehmender Subfraktionierung an. Mit den R-Extrakten wird die Expression von *OPG* um das 4fache inhibiert. Im Verhältnis dazu, wird das *RANKL*-Expressionsniveau weniger stark gehemmt. Nach Inkubation mit 1000 ng/ml R1 wird *RANKL* auf das 0,7fache der Kontrolle gehemmt. Das Verhältnis *OPG*/*RANKL* ist hier am geringsten (Abbildung 40).



**ABBILDUNG 40** RELATIVE GENEXPRESSION VON KNOCHENMARKERN (CBFA1: CORE-BINDING FACTOR SUBUNIT ALPHA-1; DKK1: DICKKOPF HOMOLOG 1; ALP: ALKALINE PHOSPHATASE; OSX: OSTERIX; OP: OSTEOPONTIN; DMP1: DENTINMATRIX ACIDIC PHOSPHOPROTEIN 1; SOST: SCLEROSTIN; OPG: OSTEOPROTEGERIN; RANKL: RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR KAPPA-B LIGAND) NACH INKUBATION VON DREI VERSCHIEDENEN SAOS-2-PASSAGEN MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1000 NG/ML) FÜR 24 H. DIE AUSWERTUNG ERFOLGTE DURCH SEMI-QUANTITATIVER PCR MIT ANSCHLIEßENDER DENSITOMETRIE. EINE RELATIVE GENEXPRESSION VON 1 ENTSPRICHT KEINE ÄNDERUNG IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE.

Wird die Genexpression nach 72 h Inkubation in SaOs-2-Zellen untersucht, wurde eine Inhibition bei allen untersuchten Genen nach Inkubation mit 1000 ng/ml C001 bis etwa 0,2fach im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Nach Stimulation mit C001/S für 72 h wurden die cbfa1-, DKK1-, Osx-, DMP1-, OPG- und RANKL-Expressionen um etwa das 0,2fache gehemmt. Keinen bzw. geringfügigen Einfluss hat der getestete Extrakt auf die Expression von ALP, OP und SOST. In den untersuchten S-Subfraktionen wurde das Expressionsniveau von cbfa1 nach Inkubation mit S1 und S2 um das 0,4fache im Vergleich zur Kontrolle induziert. Eine leichte Erhöhung der cbfa1-Expression konnte nach Zugabe von 1000 ng/ml S3 gemessen werden. Die Expression von DKK1 wurde von den Extrakten S1 und S2 nach 72h nicht beeinflusst. Lediglich Extrakt S3 zeigt eine unwesentliche Hemmung auf die Genexpression von DKK1. Die Expression von ALP ist nach Stimulation mit S1 und S2 um das 0,6fache hochreguliert (Abbildung 41). Dieser Effekt ist mit S3 kaum vorhanden. Keinen Einfluss haben S1 und S2 auf die Expression von Osx. Extrakt S3 führt zu einer geringen Inhibition der Genexpression nach 72 h. Das Genexpressionsniveau von Osteopontin ist nach Inkubation mit den drei S-Subfraktionen erhöht und erreicht mit S2 den höchsten Wert von etwa 1,6fach der Kontrolle. Das Expressionslevel von DMP1 wird mit keinem der drei untersuchten S-Subfraktionen wesentlich beeinflusst. Die stärksten Auswirkungen sind nach Inkubation der S-

Fraktionen auf die SOST-Genexpression zu beobachten. Diese wird teilweise um das Doppelte (1000 ng/ml S2) induziert. Dieser Effekt war nach 24 h Inkubation noch nicht messbar (Abbildung 40). OPG wird mit S1 gering hochreguliert. Dieser Effekt nimmt jedoch nach Inkubation mit S2 und S3 ab. Die RANKL-Expression wird durch Subextrakt S1 um das 1,4fache im Vergleich zur Kontrolle induziert, nimmt mit S2 und S3 ab und erreicht hier nur noch Werte um die 1,1fache Zunahme im Vergleich zur Kontrolle. Das Verhältnis von OPG/RANKL bleibt nach 72 h Stimulation mit 1000 ng/ml S1 und S3 unverändert im Vergleich zu den 24 h Daten (Abbildung 40). Lediglich das Verhältnis OPG/RANKL nach Inkubation mit S2 geht auf 1 zurück (Abbildung 41). Werden die Auswirkungen der R-Extrakte auf SaOs-2-Zellen nach 72 h untersucht, wird eine stetige Zunahme der Genexpressionsniveaus in allen Genen in den einzelnen Subfraktionen beobachtet. Alle untersuchten Gene werden nach Inkubation mit C001/R mehr oder weniger auf das knapp 0,6fache reduziert. Nach Zugabe von Extrakt R1 kommt es im Vergleich zum Genexpressionslevel des Hauptextraktes C001/R zu einer Zunahme aller Genexpressionsniveaus bis auf das 0,8fache der Kontrolle. Dasselbe Muster ist nach Inkubation mit den Extrakten R2 und R3 zu beobachten, wobei die Expressionsniveaus der meisten Gene (DKK1, Osx, DMP1, OPG) jeweils um das 0,2fache angehoben werden. Einige Gene werden mit den einzelnen Subfraktionen verstärkt hochreguliert. Nach Inkubation von Extrakt R1 erreichen die im Extrakt C001/R herunter regulierten Gene *cbfa1*, ALP, OP und SOST bereits ein Genexpressionsniveau vergleichbar mit den unbehandelten Zellen. Nach Stimulation mit 1000 ng/ml R2 werden diese Niveaus nochmal angehoben, wobei OP und SOST eine 1,4fache Expression im Vergleich zur Kontrolle erreichen. Nach Zugabe von 1000 ng/ml R3 erreicht das Genexpressionsniveau von SOST fast das Doppelte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 41). Nach 72 h sind die Genexpressionsniveaus der untersuchten Gene im Allgemein höher als nach 24 h Inkubationszeit.



**ABBILDUNG 41** RELATIVE GENEXPRESSION VON KNOCHENMARKERN (CBFA1: CORE-BINDING FACTOR SUBUNIT ALPHA-1; DKK1: DICKKOPF HOMOLOG 1; ALP: ALKALINE PHOSPHATASE; OSX: OSTERIX; OP: OSTEOPONTIN; DMP1: DENTINMATRIX ACIDIC PHOSPHOPROTEIN 1; SOST: SCLEROSTIN; OPG: OSTEOPROTEGERIN; RANKL: RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR KAPPA-B LIGAND) NACH INKUBATION VON DREI VERSCHIEDENEN SAOS-2-PASSAGEN MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA (1000 NG/ML) FÜR 72H. DIE AUSWERTUNG ERFOLGTE DURCH SEMI-QUANTITATIVER PCR MIT ANSCHLIEßENDER DENSITOMETRIE. EINE RELATIVE GENEXPRESSION VON 1 ENTSPRICHT KEINE ÄNDERUNG IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE.

### 5.3 Untersuchungen von Mechanosensitivität von *Cimicifuga racemosa* und deren aufgereinigter Subfraktionen auf hMSC-TERT

Viele Gene enthalten mechanoresponsive Elemente in ihren Promotoren und werden durch Krafteinwirkungen, z.B. durch Dehnung oder Fluid-Shearstress moduliert (Seefried et al., 2010). Um zu untersuchen, ob Extrakte aus *Cimicifuga racemosa* Komponenten enthalten, welche die zelluläre Mechanosensitivität positiv beeinflussen, folgten Tests zur Modulation der Mechanotransduktion und Mechanosensitivität unter Einwirkung der Extrakte. Für die Bestimmung wurden hMSC-TERT-Zellen, die stabil einen Luciferasereporter mit einem SP1 bzw. AP1 responsiven Element beinhalten in einer Konzentration von  $3 \times 10^4$  -Zellen/Well/1ml auf 24 Well-Polyurethan (PU)-Schalen ausgesät. Um die jeweils ungedehnten und gedehnten PU-Schalen normieren zu können, wurden auf beiden Platten in der ersten Spur hMSC-TERT-Zellen mit dem Leervektor pGL4basic ausgesät, welcher nicht auf Dehnung anspricht. Aufgrund der Fehleranfälligkeit des Versuches wurden nur die Versuche gewertet, dessen unbehandelten hMSC-TERT-SP1 bzw. -AP1 (Kontrolle gedehnt) nach Dehnung einen deutlichen Anstieg der Luciferase/Gesamtprotein im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle aufwiesen. Aus Platzgründen wurde auf die Untersuchung von 1000 ng/ml R2 verzichtet, dieser Extrakt war in den bisher untersuchten Methoden am unauffälligsten.

#### 5.3.1 *hMSC-TERT-SP1*

Werden die Basalaktivitäten (Abbildung 42; für jeden Messwert links im Balkendiagramm aufgetragen) der getesteten Extrakte untersucht, zeigt die Stimulation mit Extrakt C001 im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle keine Auswirkungen auf hMSC-TERT-SP1-Zellen. Nach Inkubation mit C001/S konnte ein Trend zur geringfügigen Inhibition der Basalaktivität gemessen werden. Dieser Trend ist in den Subfraktionen nicht gegeben. Hier werden Zunahmen der Basalaktivität von hMSC-TERT-SP1 von bis zu knapp 20 % (S1 und S3) beobachtet. Der Extrakt S2 induziert nur eine geringe Zunahme von etwa 7 % im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle. Die wässrigen Extrakte zeigen im Allgemeinen einen größeren Trend zur Induktion der Basalaktivität von hMSC-TERT-SP1-Zellen. Nach Inkubation mit Extrakt C001/R wird eine Zunahme von etwa 15 % erreicht, gefolgt von R3 mit 20 % Induktion. Die stärkste Zunahme der Basalaktivität wird nach Stimulation mit R3 gemessen.

Nach Dehnung der hMSC-TERT-SP1-Zellen mit je 1000 ng/ml Extrakt, zeigt die unbehandelte gedehnte Kontrolle (Abbildung 42; grüner Kontrollbalken) einen Anstieg der Luciferase/Gesamtprotein um bis zu 30 % im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle. Dieser Trend wird nach Inkubation mit Extrakt C001 noch verstärkt. Beim Gesamtextrakt ist eine höhere Aktivität messbar im Vergleich zur Basalaktivität, dieser liegt aber unter der Aktivität der Kontrolle nach Dehnung. Ähnliche, jedoch nicht so stark ausgeprägte, Effekte sind nach Inkubation mit 1000 ng/ml S1 und S2 messbar. 24 stündige Inkubation mit S3 ergibt nach Dehnung eine Inhibition der Luciferase/Gesamtprotein im Vergleich zur gedehnten Kontrolle. Bei allen drei R-Extrakten entsprechen die errechneten Messwerte der gedehnten PU-Schale denen der gedehnten Kontrolle. Werden die Messwerte mit denen der ungedehnten Platte verglichen, ist immerhin ein Anstieg der Aktivität um etwa 20 % beobachtbar (Abbildung 42; rechts aufgetragene Balken).

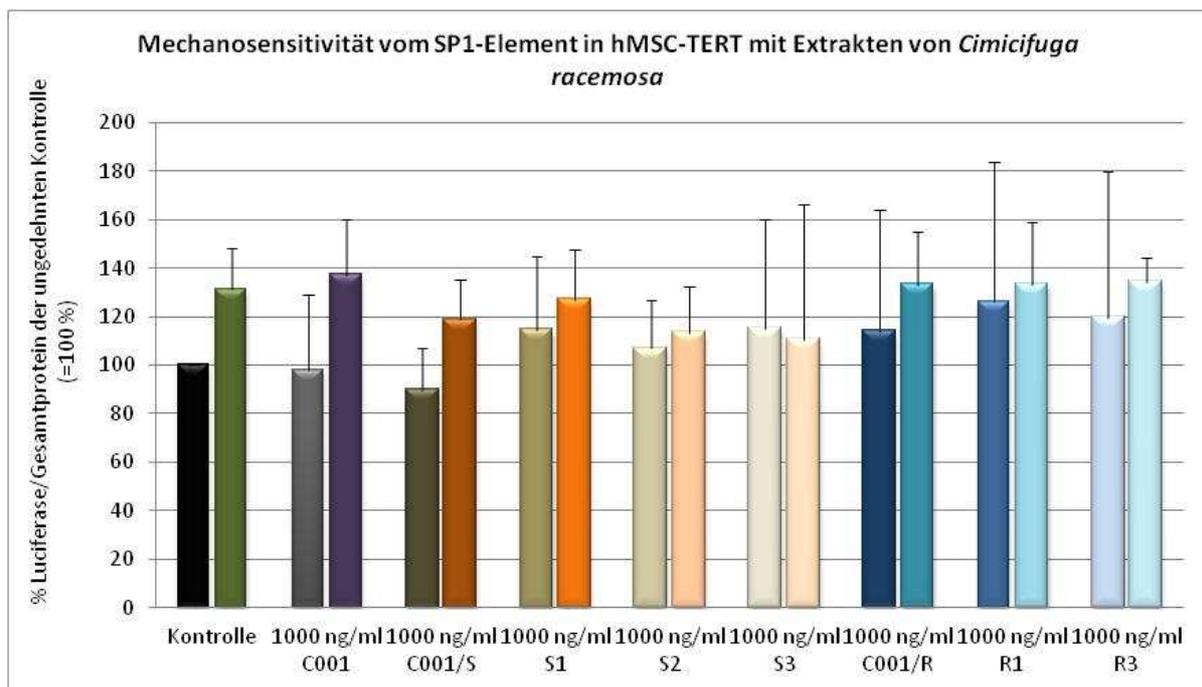


ABBILDUNG 42 MECHANOSENSITIVITÄT VOM SP1-ELEMENT IN hMSC-TERT-ZELLEN MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA. ALLE GEMESSENEN WERTE BEZIEHEN SICH AUF DIE UNGEDEHNTE, UNBEHANDELTE KONTROLLE (SCHWARZER BALKEN IM DIAGRAMM), WELCHER AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FÜR JEDEN MESSWERT LINKS AUFGETRAGENEN BALKEN ENTSPRECHEN DEM ANTEIL LUCIFERASE PRO GESAMTPROTEIN IN PROZENT DER UNGEDEHNTE PU-SCHALEN MIT JEWEILIGEN EXTRAKT IN BEZUG AUF DIE UNGEDEHNTE KONTROLLE. DIE FÜR JEDEN MESSWERT RECHTS AUFGETRAGENEN BALKEN ENTSPRECHEN DEM ANTEIL LUCIFERASE PRO GESAMTPROTEIN IN PROZENT DER GEDEHNTE PU-SCHALEN MIT JEWEILIGEM EXTRAKT IN BEZUG AUF DIE UNGEDEHNTE KONTROLLE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER 6 GETESTETEN PASSAGEN.

Um einen deutlicheren Unterschied der einzelnen Wirkungen der Extrakte nach Dehnung zu erkennen, wurden die Messwerte der gedehnten hMSC-TERT-SP1-Zellen mit Extrakt auf die

jeweiligen ungedehnten hMSC-TERT-SP1-Zellen mit Extrakt normiert. Dadurch wurde die Basalaktivität berücksichtigt und lässt sich eine klare Aussage über die Auswirkungen von *Cimicifuga*-Extrakten auf SP1-responsive Elemente nach Dehnung treffen. Der Extrakt C001 induziert die gemessene Luciferaseaktivität/Gesamtprotein um knappe 20 % im Vergleich zur gedehnten Kontrolle. Auch der Extrakt C001/S erhöht die Aktivität, jedoch nur um etwa 10 %. Die Inkubation mit den S-Subfraktionen führt zu einer Abnahme der Luciferaseaktivität je nach Fraktionierungsgrad. Der Extrakt C001/R hat keinen messbaren Einfluss auf die Aktivität nach Dehnung der Zellen. Nach Stimulation mit R1 wird die Dehnungskapazität um 10 % inhibiert. R3 erreicht immerhin noch eine Abnahme um ca. 5 % im Vergleich zur gedehnten Kontrolle (Abbildung 43; rechts aufgetragene Balken). Aufgrund der hohen Standardabweichungen ist bei allen errechneten Werten nur von einem Trend auszugehen

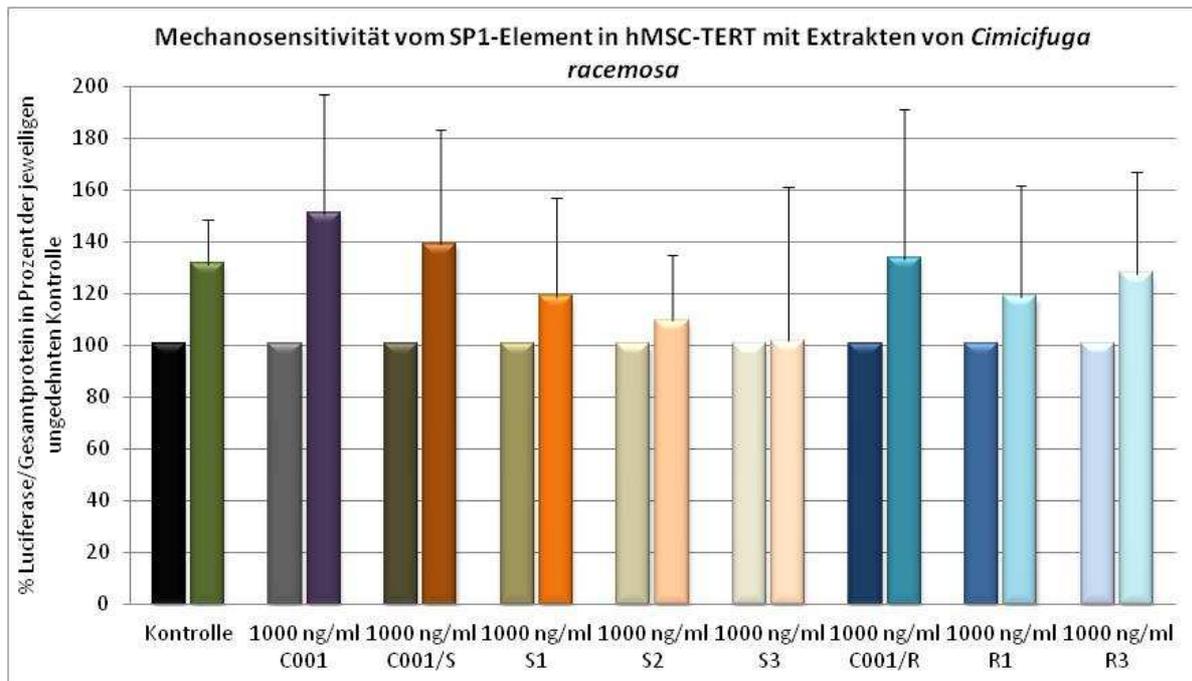


ABBILDUNG 43 MECHANOSENSITIVITÄT VOM SP1-ELEMENT IN HMSC-TERT-ZELLEN MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA. ALLE GEMESSENEN WERTE BEZIEHEN SICH AUF DIE JEWEILS UNGEDEHNTTE, STIMULIERTE KONTROLLE (JEWEILS LINKER BALKEN IM DIAGRAMM), WELCHER AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FÜR JEDEN MESSWERT RECHTS AUFGETRAGENEN BALKEN ENTSPRECHEN DEM ANTEIL LUCIFERASE PRO GESAMTPROTEIN IN PROZENT DER GEDEHNTEN PU-SCHALEN MIT JEWEILIGEM EXTRAKT IN BEZUG AUF DIE JEWEILS UNGEDEHNTTE, STIMULIERTE KONTROLLE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER 6 GETESTETEN PASSAGEN.

### 5.3.2 HMSC-TERT-AP1

Werden die Auswirkungen der Extrakte auf die Basalaktivität von hMSC-TERT-AP1-Zellen untersucht, sind nach Inkubation mit dem Hauptextrakt C001 und dem saponinhaltigen

Extrakt C001/S keine Unterschiede im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle messbar. Auch die S-Subfraktionen zeigen keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität/Gesamtprotein nach 24 stündiger Stimulation. Lediglich nach Inkubation mit den wässrigen Extrakten C001/R, R1 und R3 ist eine Zunahme von bis zu 17 % messbar (Abbildung 44; links aufgetragene Balken). Nach Dehnung der Zellen ist eine Zunahme von etwa 30 % bei den nicht behandelten Zellen (Abbildung 44; grüner Balken) im Vergleich zu den ungedehnten Zellen messbar. Der Extrakt C001 verringert die gemessene Aktivität um wenige Prozent im Vergleich zur gedehnten Kontrolle. Dieser Trend setzt sich mit zunehmender Fraktionierung mit dem Extrakt C001/S fort. Inkubation mit den Extrakten S1 und S2 inhibieren die Luciferaseaktivität/Gesamtprotein um bis zu 10 %. S3 dahingegen induziert die Dehnungskapazität um 10 % im Vergleich zur gedehnten Kontrolle. Nach Stimulation mit 1000 ng/ml C001/R ist eine tendenzielle Zunahme von knapp 10 % messbar. Diese Induktion erhöht sich nach Zugabe von 1000 ng/ml R1 um weitere 5 % und erreicht nach Inkubation mit Extrakt R3 eine Zunahme von insgesamt 20 % (Abbildung 44; rechts aufgetragenen Balken).

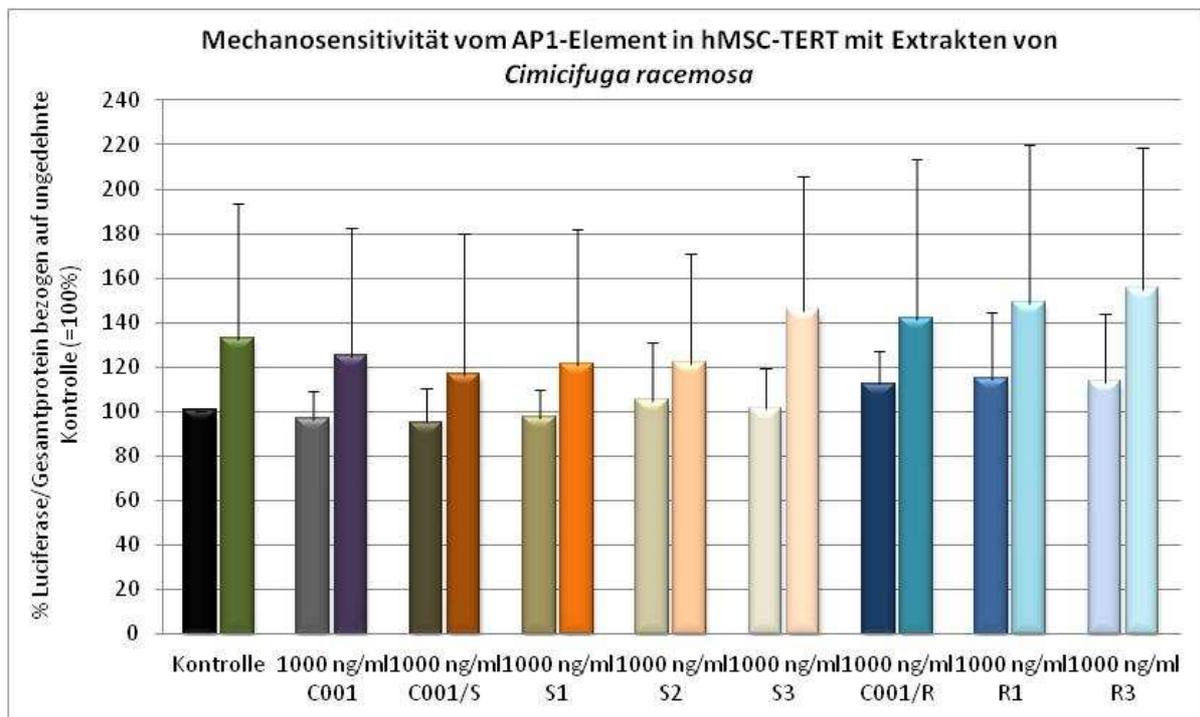
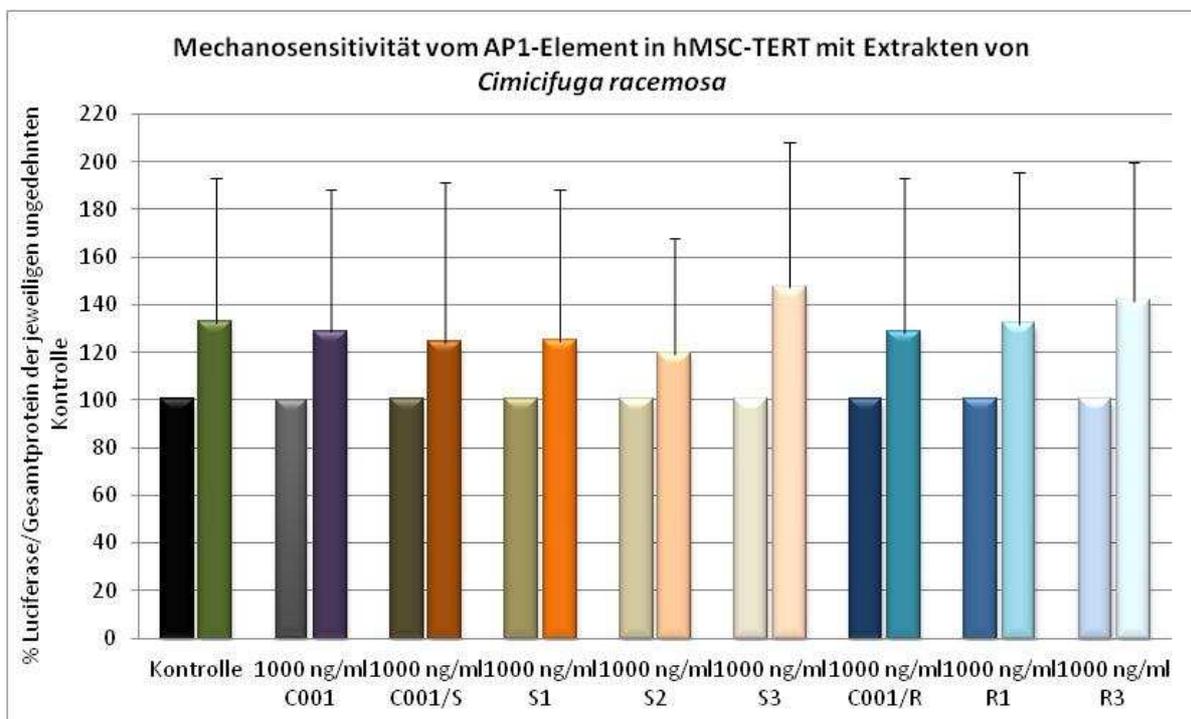


ABBILDUNG 44 MECHANOSENSITIVITÄT VOM AP1-ELEMENT IN hMSC-TERT-ZELLEN MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA. ALLE GEMESSENEN WERTE BEZIEHEN SICH AUF DIE UNGEDEHNTE, UNBEHANDELTE KONTROLLE (SCHWARZER BALKEN IM DIAGRAMM), WELCHER AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FÜR JEDEN MESSWERT LINKS AUFGETRAGENEN BALKEN ENTSPRECHEN DEM ANTEIL LUCIFERASE PRO GESAMTPROTEIN IN PROZENT DER UNGEDEHNTE PU-SCHALEN MIT JEWEILIGEM EXTRAKT IN BEZUG AUF DIE UNGEDEHNTE KONTROLLE. DIE FÜR JEDEN MESSWERT RECHTS AUFGETRAGENEN BALKEN ENTSPRECHEN DEM ANTEIL LUCIFERASE PRO GESAMTPROTEIN IN PROZENT DER GEDEHNTE PU-SCHALEN MIT JEWEILIGEM EXTRAKT IN BEZUG AUF DIE UNGEDEHNTE KONTROLLE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER 7 GETESTETEN PASSAGEN.

Werden die Messwerte der gedehnten hMSC-TERT-AP1-Zellen mit Extrakt auf die jeweiligen ungedehnten Pendanten normiert, wird deutlicher, dass der Hauptextrakt C001 und die beiden fraktionierten Extrakte C001/S und C001/R keinen bzw. einen geringen inhibierenden Einfluss auf die gemessene Aktivität nach Dehnung haben. Dieser Trend setzt sich nach Inkubation mit je 1000 ng/ml S1 und S2 fort. Die 24 stündige Inkubation mit der saponinhaltigen Subfraktion S3 und anschließender Dehnung zeigt eine Induktion der Luciferaseaktivität/Gesamtprotein von annähernd 10 % im Vergleich zur gedehnten, unbehandelten Kontrolle (Abbildung 45). Auch nach Stimulation mit 1000 ng/ml R3 ist kein Unterschied im Vergleich zur gedehnten Kontrolle messbar. Lediglich Extrakt R3 induziert nach Inkubation eine Zunahme der Dehnungskapazität von hMSC-TERT-AP1-Zellen um etwa 10 % (Abbildung 45).



**ABBILDUNG 45 MECHANOSENSITIVITÄT VOM AP1-ELEMENT IN HMSC-TERT-ZELLEN MIT EXTRAKTEN VON CIMICIFUGA RACEMOSA. ALLE GEMESSENEN WERTE BEZIEHEN SICH AUF DIE JEWEILS UNGEDEHNTTE, STIMULIERTE KONTROLLE (JEWEILS LINKER BALKEN IM DIAGRAMM), WELCHER AUF 100 % GESETZT WURDE. DIE FÜR JEDEN MESSWERT RECHTS AUFGETRAGENEN BALKEN ENTSPRECHEN DEM ANTEIL LUCIFERASE PRO GESAMTPROTEIN IN PROZENT DER GEDEHNTEN PU-SCHALEN MIT JEWEILIGEM EXTRAKT IN BEZUG AUF DIE JEWEILS UNGEDEHNTTE, STIMULIERTE KONTROLLE. DIE FEHLERBALKEN ENTSPRECHEN DEN STANDARDABWEICHUNGEN DER 7 GETESTETEN PASSAGEN.**

## 5.4 Mikroarray-Analysen von Cimifuga racemosa auf hMSC

Mit Hilfe von Mikroarray-Analysen können vermeintliche Zielgene analysiert werden, deren Genexpression nach Inkubation von hMSC mit Extrakten aus Cimicifuga racemosa moduliert sind. Diese Gene können anschließend zur Aufklärung möglicher osteoanaboler Wirkmechanismen *in vitro* beitragen. Dafür wurden hMSC mit unterschiedlichen Konzentrationen mit Extrakt für 24 h stimuliert und anschließend die zelluläre RNA isoliert. Nach Hybridisierung auf den GeneChip HG-U 133 Plus 2.0 wurden die Signale detektiert und analysiert.

### 5.4.1 Comparison-Analyse von C001 auf hMSC

Um einen ersten Eindruck über das Genexpressionsmuster des Gesamtextraktes C001 auf das Transkriptom von hMSC zu erhalten, wurde eine hMSC-Population mit 10 nM C001 für 24 h inkubiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Comparison-Analyse. Von den 54613 möglichen detektierbaren Genprodukten wurden lediglich insgesamt 6750 Probesets differentiell exprimiert. Davon sind 676 Genprodukte nach Inkubation mit C001 mindestens 1,5fach höher exprimiert als in den unbehandelten hMSC. 820 Genprodukte sind mindestens 1,5fach geringer exprimiert (Abbildung 46).

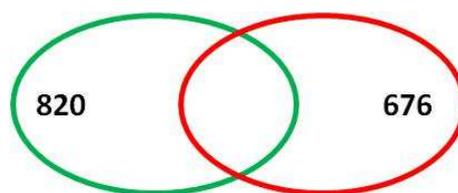


ABBILDUNG 46 VENN-DIAGRAMM DER MIKROARRAY-ANALYSE ZUR DIFFERENTIELLEN GENEXPRESSION IN HMSC MIT 10 NM C001 FÜR 24H IM VERGLEICH ZU UNBEHANDELTEN HMSC. VON INSGESAMT 6750 DETEKTIERBAREN GENPRODUKTEN SIND 676 GENPRODUKTE DIFFERENTIELL HÖHER EXPRIMIERT (ROT) UND 820 GENPRODUKTE DIFFERENTIELL GERINGER EXPRIMIERT (GRÜN). ES WURDEN HYBRIDISIERUNGEN AN EINER HMSC-POPULATION DURCHGEFÜHRT.

#### 5.4.1.1 Technische Evaluierung der Comparison-Analyse von C001 auf hMSC

Zur technischen Evaluierung wurden die Mikroarray-Ergebnisse mittels semi-quantitativer PCR detektiert und anschließend mit ImageJ densitometriert. Dazu wurden 6 Kandidatengene ausgewählt, dessen überwiegenden Probesets mindestens 1,5fach höher oder niedriger im Vergleich zu den unbehandelten hMSC exprimiert wurden. Für die technische Evaluierung

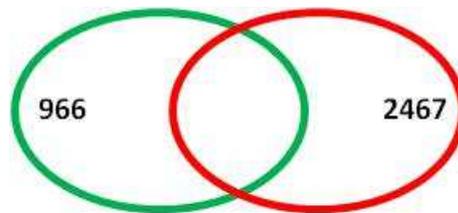
wurden dieselben hMSC-Populationen verwendet, welche auch für die Hybridisierung analysiert wurde.

Als Kandidatengene wurden vorwiegend solche Gene ausgewählt, welche auch im Knochenmetabolismus eine wichtige Rolle spielen: BMP2 (bone morphogenetic protein 2), FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2), DKK1 (dickkopf homolog 1), IGFBP5 (insulin-like growth factor binding protein 5), CD24 (CD24 molecule) und HDAC7 (histone deacetylase 7). Für die Darstellung im Balkendiagramm wurde die logarithmische Auftragung gewählt. Ist die Genexpression nach Behandlung mit Extrakt unverändert im Vergleich zur Genexpression der unbehandelten hMSC-Zellen beträgt der  $\log_2$  einen Wert von 0. Alle Genexpressionen über dem Nullwert entsprechen somit eine erhöhte Genexpression der stimulierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Ein Wert im negativen Bereich eine erniedrigte Genexpression. Die Mikroarray-Analyse zeigte eine um 3,72fache (Probeset 205290\_s\_at) und 4,21fache (Probeset 205289\_at) Erhöhung der Genexpression von BMP2. Die technische Evaluation zeigte im Vergleich dazu nur einen  $\log_2$  von 0,83 für die BMP2-Expression in den stimulierten hMSC-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Tendenziell ist die BMP2-Expression erhöht, jedoch erreicht es nicht den angegebenen Wert der Array-Analyse (Abbildung 47; BMP2). Die FGFR2-Expression ist im Array bei allen gegebenen Probesets um das 2,4fache bzw. 3,1fache erniedrigt ( $\log_2$  von -2,4 bzw. -3,1 in Abbildung 47). In der technischen Evaluation wurde der gegenläufige Effekt gemessen. Hier ist die Genexpression von FGFR2 um das 1,2fache erhöht. Die Berechnung der Genexpression von DKK1 nach Inkubation mit 10 nM C001 für 24 h ergibt im Mikroarray eine Zunahme um das 2,6fache. Ähnliche Werte wurden nach densitometrischer Auswertung der semi-quantitativer PCR derselben Probe in der technischen Evaluierung von DKK1 gemessen (2,4fache Expression; Abbildung 47, DKK1). Die Mikroarray-Analyse von IGFBP5 ergab für alle Probesets eine Inhibition der Genexpression von -1,1 bis zu -2,4. Nach der technischen Evaluation konnte keine Übereinstimmung festgestellt werden. Die Genexpression von IGFBP5 wurde nach densitometrischer Auswertung um  $\log_2$  0,8 in den behandelten Zellen induziert. Die Genexpression von CD24 wurde in allen Probesets bis um  $\log_2$  -4,2 inhibiert. Der gleiche Trend, jedoch nur um  $\log_2$  -0,9, ist nach technischer Evaluation für das CD24 Gen bestimmbar. Auch die HDAC7-Expression wurden im Array und in der technischen Evaluierung erniedrigt. Im Array wurde die Genexpression nach Stimulation mit 10 nM C001 24 h um  $\log_2$  -4,2 erniedrigt.



#### 5.4.2 SAM-Analyse von C001/S auf hMSC

Um einen aussagekräftigeren Mikroarray zu erhalten, wurde eine Mikroarray-Analyse von fünf unterschiedlichen hMSC-Populationen durchgeführt, die mit 1000 ng/ml C001/S für 24 h stimuliert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SAM-Analyse. Von den 54613 möglichen detektierbaren Genprodukten wurden lediglich insgesamt 27194 Probesets differentiell exprimiert. Davon sind 966 Genprodukte nach Inkubation mit 1000 ng/ml C001/S mindestens 2fach höher exprimiert als in den unbehandelten hMSC. 2467 Genprodukte sind mindestens 2fach geringer exprimiert (Abbildung 48). Für die Erstellung des Venn-Diagramms wurden die Probesets berücksichtigt, die einen "fold change" (FC) von  $\leq 0,5$  bzw.  $\geq 2$  und einen q-Wert von  $\leq 10\%$  in mindestens einem Probeset aufwiesen



**ABBILDUNG 48 VENN-DIAGRAMM DER MIKROARRAY-ANALYSE ZUR DIFFERENTIELLEN GENEXPRESSION IN HMSC MIT 1000 NG/ML C001/S FÜR 24 H IM VERGLEICH ZU UNBEHANDELTEN HMSC. VON INSGESAMT 27194 DETEKTIERBAREN GENPRODUKTEN SIND 2467 GENPRODUKTE DIFFERENTIELL HÖHER EXPRIMIERT (ROT) UND 966 GENPRODUKTE DIFFERENTIELL GERINGER EXPRIMIERT (GRÜN). ES WURDEN HYBRIDISIERUNGEN AN FÜNF UNTERSCHIEDLICHEN HMSC-POPULATIONEN DURCHGEFÜHRT.**

#### 5.4.2.1 Technische Evaluierung der SAM-Analyse von C001/S auf hMSC

Für die technische Evaluation wurden 6 Gene ausgewählt, deren Genexpression einen q-Wert von 0 % hatten. Davon waren SPEN (spen homolog, transcriptional regulator), WASF2 (WAS protein family, member 2) und WASL (Wiskott-Aldrich syndrome-like) um mindestens 2fach hochreguliert und ZFP26L2 (zinc finger protein 36, C3H type-like 2), LOX (lysyl oxidase-like 3) und TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) im mindestens 0,5fach herunter reguliert. Hierzu wurde eine quantitative Realtime-PCR der fünf hMSC-Populationen mit und ohne 1000 ng/ml C001/S-Extrakt dreimal durchgeführt und anschließend mittels Effizienz-korreliertem Quantifizierungsmodell ausgewertet. Nach Berechnung des "fold change" der quantifizierten Proben, zeigte sich lediglich bei der Genexpression von SPEN eine Übereinstimmung mit dem Mikroarray. Die Mittelung der fünf Datensätze der anderen untersuchten Gene ergab keine Übereinstimmung mit den im Mikroarray erhaltenen Werten für den "fold change". Bei der Genexpression von WASL, LOX und ZFP36L2 sind keine Auswirkungen von C001/S auf hMSC nach qRT-PCR detektierbar. Bei WASF2 ist eine tendenzielle Abnahme der Genexpression nach qRT-PCR messbar, obwohl im Array ein Probeset einen "fold change" von 7,2 aufweist. Die Genexpression von LOX ist im Mikroarray stark herunter reguliert (FC 0,06). Nach qRT-PCR ist ein geringfügiger Trend zur Herunterregulation gegeben, jedoch bei weitem nicht so stark wie die korrespondierende Mikroarray-Analyse vermuten lässt (Abbildung 49).

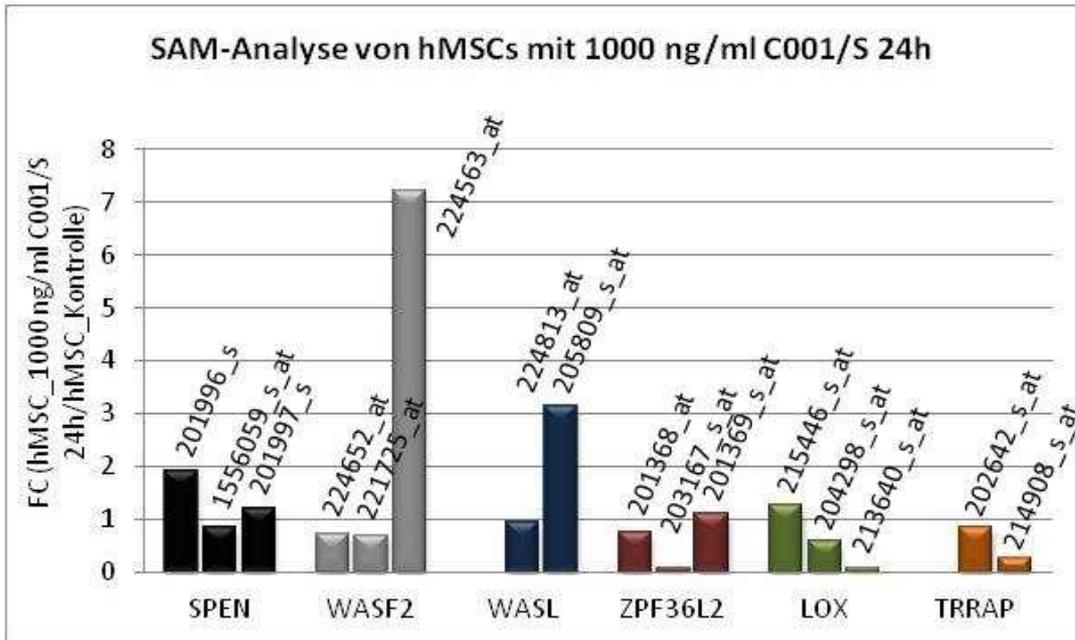
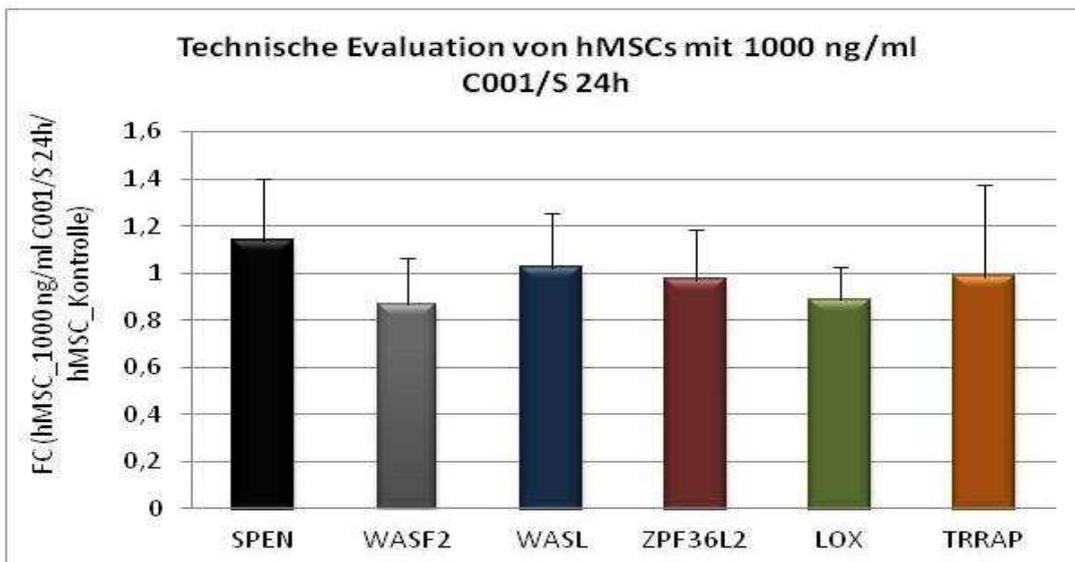
**A****B**

ABBILDUNG 49 TECHNISCHE EVALUIERUNG DER SAM-ANALYSE VON 1000 NG/ML C001/S AUF HMSC NACH 24 H INKUBATION. ABBILDUNG A ZEIGT EINE AUSWAHL VON 6 KANDIDATENGENEN WELCHE IM ARRAY IN MINDESTENS EINEM PROBESET EINE 2FACH HÖHERE ODER NIEDRIGERE GENEXPRESSION IM VERGLEICH ZU DEN UNBEHANDELTEN HMSC AUFWEISEN. NACH QUANTITATIVER REALTIME-PCR UND ANSCHLIEßENDER AUSWERTUNG MITTELS EFFIZIENZ-KORRELIERTEM QUANTIFIZIERUNGSMODELL WURDEN DIE MITTELWERTE DER GENEXPRESSIONEN (FC (hMSC-10 NM C001 24H/ HMSC\_KONTROLLE)) VON DENSELBEN FÜNF HMSC-POPULATIONEN, WELCHE IM ARRAY HYBRIDISIERT WURDEN, IN EINEM BALKENDIAGRAMM B AUFGETRAGEN.

Die hohe individuelle Variabilität der unterschiedlichen hMSC-Spender wird außer durch die hohen Standardabweichungen auch in der zugehörigen Heatmap deutlich, die für die ersten 50 am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene zusammengestellt wurde. Für die Erstellung der Heatmap wurden die Probesets berücksichtigt, die einen "fold change" (FC) von  $\leq 0,5$  bzw.  $\geq 2$  und einen q-Wert von  $\leq 10\%$  in mindestens einem Probeset aufwiesen.

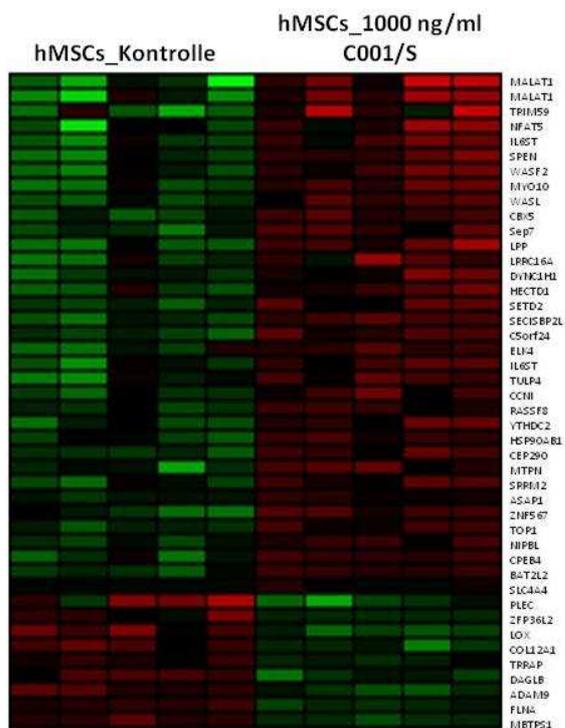


ABBILDUNG 50 HEATMAP DER SAM-ANALYSE VON 1000 NG/ML C001 AUF HMSC FÜR 24 H. DIE HYBRIDISIERUNGSSIGNALE DER 5 HMSC-SPENDER MIT UND OHNE 1000 NG/ML C001/S WURDEN FARBlich DARGESTELLT. JE PROBESET WURDE EIN MITTELWERT GEBILDET (SCHWARZ). DER HELLSTE ROTTON MARKIERT EIN 3FACH HÖHERES HYBRIDISIERUNGSSIGNAL IM VERGLEICH ZUM MITTELWERT, DER HELLSTE GRÜNTON EIN 3FACH GERINGERES SIGNAL.

## 6 DISKUSSION

*Cimicifuga racemosa* (Traubensilberkerze) als Präventivmittel zur Verhinderung von Osteoporose bzw. als Heilmittel bei osteoporotischen Erkrankungen einzusetzen, ist naheliegend, bei Beobachtung der Wirkung bei einer der hauptpostmenopausalen Probleme, wie klimakterische Symptome nach Eintreten der Menopause. Die Linderung dieses postmenopausalen Problems führt zur Hypothese, ob CR nicht auch in der Lage ist ein weiteres postmenopausales Problem, nämlich das des Knochenverlustes bis hin zur Osteoporose, verlangsamen oder verhindern kann. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Charakterisierung des Spezialextraktes C001 der Firma Bionorica, welcher bereits im zugelassenen Arzneimittel Klimadynon® zur Therapie klimakterischer Beschwerden eingesetzt wird, Methoden angewandt, mit denen osteoprotektive Wirkeigenschaften überprüft werden können. Mit der Absicht, die komplexen Zusammenhänge bezüglich des Wirkstoffprofils von Vielstoffgemischen, wie Phytopharmaka, zu ermitteln und somit ein Arzneimittel mit ausgewogenen, wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen zu erhalten ("tailor-made phytoneering", Begriff geprägt von Bionorica SE), erfolgte die Fraktionierung des Spezialextraktes in verschiedene Tochter- und Enkelefraktionen.

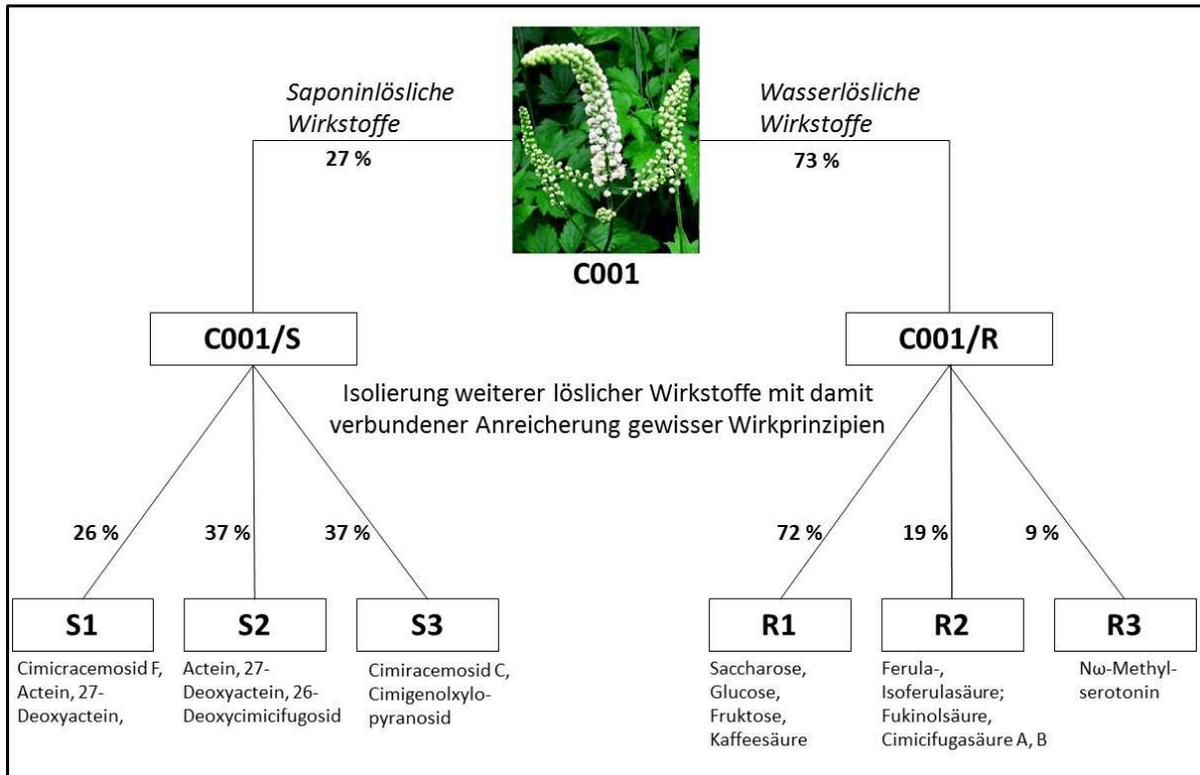


ABBILDUNG 51 FRAKTIONIERUNGSÜBERSICHT DES SPEZIALEXTRAKTES C001. NACH FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION DES HAUPTEXTRAKTES C001 ERFOLGT EINE ANREICHERUNG VON SAPONINLÖSLICHEN WIRKSTOFFEN IN C001/S UND EINE ANREICHERUNG VON WASSERLÖSLICHEN WIRKSTOFFEN IN C001/R. NACH WEITERER SUBFRAKTIONIERUNG DER ERHALTENEN TOCHTEREXTRAKTE MITTELS NORMALDRUCK-SILICA-UMKEHRPHASENCHROMATOGRAPHIE WURDEN JE DREI WEITERE ENKELFRAKTIONEN MIT UNTERSCHIEDLICH ANGEREICHERTEN WIRKSTOFFEN ERHALTEN.

## 6.1 Safety von CR

Der Einsatz von *Cimicifuga racemosa* bei der Therapie und Prophylaxe von Osteoporose erfordert auch die Gewissheit, dass es zu keinen zusätzlichen Schäden durch den behandelnden Wirkstoff kommt. Der Spezialextrakt C001 in Klimadynon® wurde bereits ausgiebig getestet, dennoch müssen Zytotoxizität, antioxidative Wirkprinzipien und Auswirkungen auf Seneszenz der erhaltenen Tochter- und Enkelfractionen ausgeschlossen bzw. ermittelt werden, um Fraktionen mit fraglichen oder toxischen Eigenschaften zu identifizieren und zugunsten des letztendlich wirksamen Extraktes zu eliminieren. Grundlegend dabei ist, dass in Vielstoffgemischen Teilextrakte Wirkmechanismen verlieren können oder vorher kaschierte Wirkungen neu hinzugewinnen können, weil im Gesamt- (Mutter-) Vielstoffgemisch ein neutralisierendes Prinzip enthalten war, das dem Teilextrakt fehlt. Des Weiteren werden die Wirkungen der Extrakte in der vorliegenden Arbeit über die direkte Stimulation der Zielzellen untersucht. Bei den erhaltenen Resultaten ist demnach zu

berücksichtigen, dass lediglich die zugrundeliegende Enzymatik der Zielzelle zum Ergebnis beitragen. Pharmakokinetische Faktoren, wie Aufnahme, Verteilung und Metabolismus der Extrakte über z.B. Darmflora, Darmzellen und Leber werden nicht einbezogen. Für die durchgeführten Untersuchungen ist somit eine hohe Reinheit der enthaltenen Extrakte maßgebend für die Bedeutung des Projektes.

### 6.1.1 Zytotoxizität von *Cimicifuga racemosa*

#### 6.1.1.1 Extrakte von CR verbessern das Überleben von hMSC

Das Überleben von verschiedenen Zellen und Zelllinien wurde über die Bestimmung des Einflusses von CR und dessen Fraktionen auf die Proliferationsrate und die Apoptose bestimmt. Apoptose ist ein genetisch gesteuerter Vorgang, der einerseits unter normalen physiologischen Bedingungen abläuft oder andererseits durch äußere Einflüsse ausgelöst wird und bei dem die Zelle in Vesikelartige Pakete verpackt von Zellen des Innate Immunsystems entsorgt wird, ohne eine Entzündungsreaktionen hervorzurufen (Favaloro et al., 2012). Vor allem in den primären Zellen, den hMSC, wirken die Extrakte sehr unterschiedlich, wodurch jedoch deutlich wird, wie sehr die Wirkung von den enthaltenen Wirkstoffen abhängig ist. Die Apoptosemessungen mit den Enkelfraktionen R1, R2 und R3 zeigen eine dosisabhängige anti-apoptotische Wirkung auf hMSC, während die saponinhaltigen Enkelfraktionen S1, S2 und S3 eine dosisabhängige Apoptose-induzierende Aktivität aufweisen. Eine Apoptose-induzierende Wirkung in primären Körperzellen ist für die Herstellung eines neuen Präparates nicht erwünscht, was zu der Überlegung führt, ob diese Fraktionen, vorrangig S1 und S2, abgereichert werden sollten. Derartig hohe Konzentrationen werden beim Menschen nach Einnahme einer Tagesdosis dagegen nicht erwartet. Für die Berechnung einer möglichen Humankonzentration wurde die Tagesdosis (6,5 mg) von Klimadynon Uno<sup>®</sup>, einem Bionorica-Präparat, welches C001 als Wirkstoff enthält, herangezogen. Hiernach würden im Menschen mit einem Gewicht von etwa 60 – 80 kg, unter Berücksichtigung eines First-Pass-Effektes, Konzentrationen zwischen 71-95 ng/ml im Serum erwartet und in diesem Dosisbereich sind keine Auswirkungen auf die Apoptose humaner mesenchymaler Stammzellen messbar. Der Gesamt-S-Extrakt (C001/S) zeigt dahingegen eindeutig eine anti-apoptotische Wirkung in den niedrigen Dosisbereichen. Dies ist vermutlich auf die unterschiedlichen Massenanteile der Enkelfraktionen im Gesamt-S-Extrakt zurückzuführen und die gegenseitige Neutralisierung

ihrer Wirkung. Hauptbestandteile sind S2 und S3 mit jeweils 37 % des Massenanteils im Vergleich zu der S1-Fraktion mit Apoptose-induzierenden Wirkstoffen, wie z.B. Actein und Desoxyactein. Der Gesamt-R-Extrakt C001/R weist ebenso wie die einzelnen Enkelfraktionen eine anti-apoptotische Wirkung auf hMSC auf. Aufgrund der prozentualen Verteilung der Enkelfraktionen im Gesamt-R-Extrakt, wird diese Wirkung wahrscheinlich von der R1-Enkelfraktion mit einem Anteil von 72 % dominiert. Diese Fraktion enthält vor allem Zimtsäurederivate wie Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäuren denen möglicherweise eine Apoptose-inhibierende Wirkung auf hMSC zugeschrieben werden kann. Die Enkelfraktion R2 enthält als Hauptbestandteil Phenylpropanoide und ist zu einem Massenanteil von 19 % enthalten. R3 weist hauptsächlich N-Methylserotonin auf und ist nur zu 9 % im Gesamt-R-Extrakt vorhanden. Durch die geringen Massenanteile der beiden Enkelfraktionen werden die wirksamen Inhaltsstoffe eher weniger an der anti-apoptotischen Wirkung beteiligt sein bzw. zeigen keinen kumulierenden Effekt auf die Gesamtwirkung von C001/R. Der Gesamtextrakt C001 zeigt dahingegen den stärksten anti-apoptotischen Effekt in allen getesteten Dosen (0-1000 ng/ml) auf hMSC und sichert somit das Überleben dieser Zellen am Besten. Vermutlich wirken die enthaltenen Extrakte C001/S, mit einem Massenanteil von 27 %, und C001/R, mit einem Massenanteil von 73 %, in diesem Fall synergistisch, d.h. die beiden Tochterfraktionen verstärken gegenseitig ihre Apoptose-inhibierende Wirkung im Gesamtextrakt C001 (Aristoteles: "*Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile*") (Abbildung 13). Um dieser These nachzugehen wurden Apoptosemessungen in hMSC mit den berechneten Massenanteilen der Tochterfraktionen durchgeführt (Tabelle 8).

Der anti-apoptotische Effekt von C001/S (0,27-270 ng/ml) ist wesentlich geringer ausgeprägt als bei den hohen Dosierungen (1-1000 ng/ml). C001/R dahingegen zeigt sogar eine noch stärkere Apoptose-inhibierende Wirkung auf hMSC in den getesteten Dosen (7,3-730 ng/ml). Die beobachtete Wirkung im Gesamtextrakt wird somit hauptsächlich von der Tochterfraktion C001/R mitbestimmt und beruht nicht auf einem zuvor angenommenen synergistischen Effekt, da dafür die Konzentration von C001/S im Gesamtextrakt zu gering ist. Für die Untersuchung des Effekts, ob hohe Dosen tatsächlich auch starke Wirkungen nach sich ziehen, wurden zwei ausgewählte Extrakte in sehr hohen Dosen (1-1000 µg/ml) angewandt. Die erhaltenen Daten zeigen eindeutig zytotoxische Effekte auf hMSC. Damit ist geklärt, dass eine hohe Dosis nicht selbstverständlich zu den gewünschten Wirkungen führt, sondern nur ein

gewisser Dosisbereich die enthaltenen Wirkprinzipien entfaltet (Paracelsus: "*Alle Ding' sind Gift und nichts ohn' Gift- allein die Dosis macht, das ein Ding' kein Gift ist*"). Des Weiteren wird das Regenerationspotenzial von hMSC, was über die Messung der Proliferationsrate erfolgte, in den physiologischen Dosen nicht beeinflusst. Die verwendeten Testmethoden weisen eine erhöhte Metabolisierungsrate der untersuchten Zellen nach und diese werden stellvertretend für eine Proliferationssteigerung angenommen.

#### 6.1.1.2 CR-Extrakte führen zu einem verbesserten Überleben von Tumorzelllinien und saponinhaltige Extrakte wirken anti-proliferativ

Ähnlich verhalten sich Tumorzelllinien (Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen) nach Stimulation mit den Extrakten. Im Gegensatz zu zahlreichen Veröffentlichungen zeigen die erhaltenen Daten dieser Arbeit eine anti-apoptotische Wirkung in den verwendeten Zellen (Hostanska et al., 2005; Jarry et al., 2005; Seidlova-Wuttke et al., 2006). Bei der Untersuchung von Androgen-sensitiven LNCaP-Zellen haben Hostanska et al. (2005) die Wirkung von einem 60 %igen isopropanolischen Extrakt von *Cimicifuga racemosa* (iCR) bezüglich Zellproliferation und Apoptose untersucht. Dieser Extrakt entsprach dem verwendeten Gesamtextrakt C001 in der vorliegenden Arbeit mit einem Anteil von 26 % an Triterpenen. Die Proliferation wurde mittels WST-1 in einem Dosisbereich von 0,02-200 µg/ml iCR ermittelt. Ab einer Dosis von 25 µg/ml konnte eine Inhibition der Proliferation gemessen werden. Bei der Bestimmung der Apoptose mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Proteins Annexin V wurde eine Apoptose-Induktion nach 24 h von 57,5 % in LNCaP-Zellen mit 40 µg/ml iCR erreicht. Um zu bestimmen, ob die Aktivierung von Caspasen eine Rolle bei der iCR-induzierten Apoptose spielt, wurde die Induktion des M30 Antikörpers gemessen. Die erhöhte Aktivierung des Antikörpers korreliert mit der Caspasen-Aktivierung während der Apoptose. Bei einer Dosis von 40 µg/ml iCR konnte eine 5,3-fache Zunahme in Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen gemessen und somit eine Caspase-Aktivierung begründet werden (Hostanska et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch anti-apoptotische Effekte mit allen getesteten Extrakten gemessen. Da hier dagegen mit weitaus geringeren Dosen (1-1000 ng/ml) gearbeitet wurde, und in der beschriebenen Literatur erst in höheren Dosen Auswirkungen messbar waren, lässt sich die Behauptung aufstellen, dass in den physiologischen Dosen eine messbare, jedoch geringe, anti-apoptotische Wirkung auf LNCaP-Zellen vorhanden ist, unabhängig der enthaltenen Wirkstoffe. Die Proliferationsmessungen mit den wesentlich geringeren Dosen an Extrakt

führen, im Vergleich zu höheren Dosen, zu einer Induktion, vor allem in den beiden Tochterfraktionen, mit Hauptaugenmerk auf C001/R.

Bei den Mammakarzinomzellen werden die Apoptoseraten sowohl in der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7, wie auch in der Östrogenrezeptor-negativen Zelllinie MDA-MB-231 nach Stimulation mit allen Extrakten (1-1000 ng/ml) gehemmt (Tabelle 6 und 8). Hostanska et al. (2004) konnten, ebenso wie bei den LNCaP-Zellen, eine, durch Caspase-Aktivierung, Erhöhung der Apoptoserate in beiden Mammakarzinomzelllinien nach Stimulation mit Extrakt in einer Höhe von 200 µg/ml feststellen. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte indirekt über die Reduktion des Tetrazoliumsalses durch zelluläre Enzyme in lebensfähigen Zellen. Hierbei zeigten sich anti-proliferative Effekte, sowohl auf MCF-7 sowie auf MDA-MB-231-Zellen (Hostanska et al., 2004). Obwohl diese Daten mit sehr hohen Konzentrationen an isopropanolischen und ethanolischen Extrakten gewonnen wurden (20-200 µg/ml), konnte eine anti-proliferative Wirkung auch auf die getesteten MCF-7-Zellen in dieser Arbeit beobachtet werden. Lediglich eine geringe, jedoch signifikante ( $P \leq 0,05$ ), Erhöhung der Proliferationsrate mit C001/R, führt zur Überlegung, ob die wirksamen Bestandteile (Hydroxymitsäurederivate, Phenylpropanoide) genauer untersucht werden müssen, da sich das gleiche Wirkprofil zusätzlich nach Stimulation mit C001/R2 zeigt. Bei den MDA-MB-231-Zellen sind kaum Auswirkungen auf die Proliferationsrate messbar. Lediglich sind auch hier geringe, proliferationsinduzierende Wirkeigenschaften in den R-Fractionen enthalten, was die Überlegung zur weiteren Aufklärung der zugrunde liegenden Wirkprinzipien erhärtet.

#### 6.1.1.3 CR-Extrakte wirken anti-apoptotisch und proliferations-induzierend auf SaOs-2-Zellen

Um die Auswirkungen der Extrakte auf Apoptose und Proliferation einer, in der osteogenen Differenzierung, weiter fortgeschrittenen Zelllinie im Vergleich zu hMSC zu untersuchen, wurden die Osteosarkomzelllinie SaOs-2 verwendet. Der Vorteil zu einer primären Zelllinie liegt in der Homogenität und der unlimitierten Anzahl der Zellen (Czekanska et al., 2012). Sie weisen den Phänotyp von maturierten Osteoblasten auf und besitzen ein ähnliches Genexpressionsprofil bezüglich Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie humane Osteoblasten (Bilbe et al., 1996; Fernandes et al., 2007; Rodan et al., 1987).

In erster Linie zeigt die Stimulation mit den Extrakten, wie bei allen anderen getesteten Zellsystemen, eine anti-apoptotische Wirkung auf die SaOs-2-Zellen mit wenigen, nicht-signifikanten Ausnahmen (Tabelle 16). Wesentlich auffälliger sind die starken, teils hochsignifikanten Proliferations-induzierenden Effekte. Diese werden hauptsächlich von den Saponin-Enkelfraktionen S2 und S3 dominiert, wobei zusätzlich alle R-Extrakte eine geringere, doch vorhandene Induktion der Proliferation bewirken. Dieser Effekt ist zwar im geringeren Ausmaß, aber dennoch auch mit dem Gesamtextrakt C001 messbar. Fraglich ist, wie stark diese Mitogenität hier zu bewerten ist, da stellvertretend für die Proliferation lediglich die erhöhten Metabolisierungsraten der Zellen gemessen wurden. Des Weiteren weisen SaOs-2-Zellen lediglich die Merkmale von maturierten Osteoblasten auf. Welche Auswirkungen die Extrakte auf verschiedene Phasen der osteogenen Differenzierung aufweisen, die eine primäre Stammzelle auf dem Weg der osteogenen Differenzierung vom Prä-Osteoblast zum maturierten Osteoblast durchläuft, kann mit diesem Zellsystem nicht untersucht werden. Eine Proliferationssteigerung in primären osteogenen Vorläuferzellen wäre mit einer Stimulation der Knochenformation kompatibel. Gerade für die Frage nach einem präventiven Wirkmechanismus von CR-Extrakten bezüglich Zellproliferation würde sich somit ein primäres Zellsystem besser eignen und wäre auch stärker zu gewichten, als die beobachteten mitogenen Eigenschaften in SaOs-2-Zellen. Außerdem enthalten *in-vitro* Daten nur die direkten Auswirkungen des Extraktes auf die Zielzelle an sich, ohne Berücksichtigung von First-Pass-Effekten in Leber und Darm und katabole Reaktionen. Ein vergleichbares *in-vivo* Testsystem auf bereits bestehende Tumore könnten zu einer Komplementierung der Ergebnisse beitragen.

#### 6.1.1.4 CR-Extrakte wirken anti-proliferativ auf osteoblastäre Mauszellen

Bei der Untersuchung der Proliferationsrate in mc3t3-e1-Zellen, einer osteoblastären Mauszelllinie, konnten eindeutig anti-proliferative Effekte nach Stimulation mit den saponinhaltigen Enkelfraktionen gemessen werden, dessen Wirkung sich auch im Gesamtextrakt widerspiegelt. Diese Ergebnisse sind konform zu einer Studie, in der die Auswirkungen eines ethanolschen Extraktes von *Cimicifuga racemosa* auf die Proliferationsrate in mc3t3-e1 untersucht wurden. Hier wurde bei einer Konzentration von 1000 ng/ml nach 48 h eine Suppression der Proliferationsrate um bis zu  $7,2 \pm 0,9$  % im Vergleich zur Kontrolle gemessen (Chan et al., 2008). Die gleichen Effekte konnten in dieser

Arbeit bestätigt werden, wobei eine hochsignifikante ( $P \leq 0,01$  (1000 ng/ml C001) bis  $P \leq 0,001$  (S-haltige Fraktionen)) Inhibierung der Proliferationsrate von bis zu 10 % nach 72 h beobachtet wurde. Die getesteten R-Extrakte haben keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von mc3t3-e1. Alle Extrakte haben eine anti-apoptotische Wirkung auf mc3t3-e1-Zellen. Hier ist auffällig, dass ausgerechnet die Enkelfraktion S2, die den stärksten anti-proliferativen Effekt ausübt, gleichzeitig auch die stärkste anti-apoptotische Wirkung aufweist. Diese Fraktion enthält als Hauptwirkstoff Actein, welches eventuell für die Wirkung auf Proliferation und Apoptose osteoblastärer Mauszellen verantwortlich gemacht werden kann.

#### 6.1.1.5 C001 wirkt anti-proliferativ auf osteoklastäre Mauszellen

Die Untersuchung der osteoklastären Mauszelllinie RAW 264.7 hinsichtlich Beeinflussung der Proliferationsrate durch den Gesamtextrakt C001, ergab eine anti-proliferative Wirkung auf RAW 264.7-Zellen. Die Inkubation mit saponinhaltigen Fraktionen führten dahingegen zu einer starken proliferationsinduzierenden Wirkung auf RAW 264.7. Die Auswirkungen von Restfraktionen wurden hier nicht untersucht, da die vorherigen Untersuchungen auf wirksame Mechanismen in den saponinhaltigen Fraktionen deuteten. Bei den unerwarteten Ergebnissen wäre es sinnvoll hier noch Untersuchungen mit den R-Fraktionen durchzuführen, um zu sehen, ob diese anti-proliferative Effekte auf RAW 264.7 aufweisen, welche sich im Gesamtextrakt widerspiegeln. Die Bestimmung der Apoptose zeigt eine anti-apoptotische Wirkung, die hauptsächlich in den Extrakten C001, C001/S und S3 vorhanden ist. Wie die Ergebnisse bei dieser Untersuchung zu interpretieren sind bleibt unklar, da die Kultivierung der Zellen durch wiederholte Kontamination und anschließender Dauerbehandlung mit Penicillin/Streptomycin einem erhöhtem Stresspotential ausgesetzt waren. Hierdurch könnten die Messungen einer erhöhten Metabolisierungsrate mit den S-Extrakten, die mit einer Proliferationssteigerung gleichgesetzt werden, verfälscht sein.

### 6.1.2 *Keine antioxidative Wirkeigenschaften von C001/S in SaOs-2-Zellen*

Aufgrund der Veröffentlichung von Dai et al. (2007), die eine Stimulation und erhöhte Proliferation von Osteoblasten nach Zugabe des antioxidativen Polyphenols Resveratrol beobachten konnten, wurden die Studien zur Bestimmung eines antioxidativen Wirkprinzips von CR in der humanen Osteosarkomzelllinie SaOs-2 durchgeführt. Hierfür wurden Tests zur Aktivitätsbestimmung von Glutathionperoxidase (GPx) und Thioredoxin Reduktase (TrxR), zweier selenabhängiger Enzyme, durchgeführt, welche Peroxide zu Wasser reduzieren und somit die Bildung freier Radikale unterbinden. Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen erwies sich der Extrakt C001/S als das Substrat mit der stärksten osteoprotektiven Wirkung. Für diesen Extrakt konnte in keinem der beiden Testsysteme Steigerung der Enzymaktivität in den getesteten Konzentrationen nachgewiesen werden. Dieses bedeutet jedoch nicht, dass in dieser Fraktion überhaupt keine antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe vorhanden sind, da es zur Abdeckung der bestehenden antioxidativen Systeme und Redox-Signalwegen einer Zelle und eines Organismus weiterer Analysenbedürfte, unter anderem die Enzyme SOD 1 und 2 (Superoxiddismutase) und die Familie der Thioredoxinreduktasen Glutathiondisulfid-Reduktase und Glutathion-S-Transferase. Des Weiteren wurden die beobachteten Effekte von Dai et al. (2007) nach Zugabe von Resveratrol, einem Polyphenol, gemessen. Polyphenole wurden durch die Fraktionierung in den wasserlöslichen Fraktionen, also den R-Extrakten, angereichert. Auch Arbeiten um Burdette et al. (2002) konnten ein antioxidatives Potential bei Menadion-induzierten DNA-Schäden in S30-Brustkrebszellen beobachten, nach Stimulation mit Phenolsäuren, wie Kaffee-, Ferula- und Fukinolsäuren. Wenn demnach das Interesse bestünde, einen genaueren Einblick für mögliche antioxidative Wirkprinzipien in *Cimicifuga racemosa* zu bekommen, sollten zusätzlich zu den bereits durchgeführten Studien, Tests mit den wasserlöslichen Fraktionen durchgeführt werden und das Spektrum der Untersuchungen auf weitere Redox-Systeme ergänzt werden.

### 6.1.3 *CR-Extrakte haben keinen Einfluss auf die Seneszenz von hMSC*

Kultivierte Zellen erreichen nach einer gewissen Anzahl an Zellteilungen einen Status der terminalen Wachstumsrate, die sogenannte zelluläre Seneszenz oder auch Hayflick-Limit (Hayflick and Moorhead, 1961). Zelluläre Seneszenz kann außerdem durch antioxidativen Stress, DNA-Schädigungen, Ungleichgewicht in der Signalwirkung und vieles mehr induziert

werden (Endoh et al., 2009). Zur Vervollständigung der Safety-Untersuchungen bezüglich *Cimicifuga racemosa* und den einzelnen Fraktionen, wurde der Einfluss ausgewählter Extrakte auf die Seneszenz von hMSC anhand des Eintritts in die Replikative Seneszenz, welche mit starken morphologischen Änderungen, wie Vergrößerung, Abflachung und Granulierung der Zellen einhergeht, analysiert.

Die Ergebnisse zeigen eine leichte, nicht signifikante, Abnahme der Zellzuwachsrate in P3-P5 nach Stimulation mit Extrakt C001/S und C001/R, die beim Gesamtextrakt C001 nicht messbar ist. Um die Seneszenz auf Genexpressionsebene zu verfolgen, wurden die Genexpressionsniveaus von den, mit Seneszenz verknüpften, Markergenen P16 (Bringold and Serrano, 2000) und PSG5 (Endoh et al., 2009) untersucht. Aufgrund der hohen Heterogenität der erhaltenen Daten für das Genexpressionsniveau von PSG5 der 3 verschiedenen Spendern nach Stimulation mit den Extrakten C001, C001/S und C001/R, kann lediglich bis zur P5 eine stetige Zunahme von PSG5 im Vergleich zur Kontrolle bestätigt werden (Abbildung 20). Ab P6-P7 sind zu hohe Variabilitäten in den erhaltenen Daten vorhanden, um eine sichere Aussage treffen zu können. Die Messung des Expressionsniveaus von P16 zeigt wie erwartet eine Zunahme des Markers im Verlauf der Passagierungen. Vor allem die Behandlung mit 1000 ng/ml C001/S führt zu einer starken Induktion des Expressionslevels im Vergleich zur Kontrolle. In den komplementierenden P16-Promotoranalysen erfolgte der Read-out über den Einfluss auf die Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine Induktion der Aktivität ist nur nach Stimulation mit der Enkelfraktion S2 vorhanden, wobei alle anderen fraktionierten Extrakte, außer C001 und C001/R, die Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle herabsetzen. Im Großen und Ganzen sind die Effekte auf die Replikative Seneszenz mit hohen Dosen Extrakt (1000 ng/ml) nur gering und aufgrund der hohen Heterogenität wegen Donorvariabilität mit Vorsicht zu interpretieren. Hier könnte eine Erhöhung der Anzahl an Spendern zu einer erheblicheren Genauigkeit der Messungen und zu einem stabileren Ergebnis führen. Eine weitere Ergänzung zur Untersuchungen der Extrakte bezüglich ihres Einflusses auf die Replikative Seneszenz, wäre Studien in einem physiologischen Wirkungsbereich mit 10 bis 100 ng/ml der Extrakte durchzuführen, um somit ein mögliches Dosis-Wirkungsprofil der Pflanze zu erfassen.

## 6.2 Differenzierungsstudien mit CR

Adulte humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind in der Lage zu verschiedenen Geweben wie Fett, Knochen, Knorpel und Muskeln zu differenzieren. *In vitro* lassen sich die Zellen durch Zugabe von verschiedenen Medienzusätze zu den gewünschten Gewebezellen differenzieren (Barry and Murphy, 2004). Diese vielfältigen Möglichkeiten und eine einfache Isolierung und hohe Effizienz in Kultur machen hMSC unentbehrlich in der Entwicklung der Regenerationsmedizin und Tissue Engineering.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *Cimicifuga racemosa* und ausgewählte Fraktionen auf das Differenzierungspotential von MSC untersucht und durch qRT-PCR-Nachweis von Markergenen komplementiert.

### 6.2.1 *Transdifferenzierungsstudien*

Im zunehmenden Alter verliert das menschliche Skelett an Knochenmasse was mit einer Häufung der Frakturrate des Knochens einhergeht. Arbeiten um Justesen et al. (2001) untersuchten die Hypothese, dass im Alter durch ein Ungleichgewicht im Sinne einer erhöhten Adipogenese im Vergleich zur Osteoblastengenese eine verminderte Knochenformation hervorgerufen wird. Dafür wurden Analysen zur quantitativen Bestimmung des Fettgewebes, des trabekulären Knochens und hämatopoietische Stammzellen in 53 gesunden (30-100 Jahre, w=31, m=22) und 26 osteoporotischen (52-92 Jahre, w) Knochenbiopsien durchgeführt. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass eine Zunahme der Knochenmarksverfettung im Alter mit einer verminderten Osteogenese einhergeht, wobei dieser Effekt bei an Osteoporose Erkrankten wesentlich stärker und altersunabhängig ausgeprägt ist. Diese Studien sind konform zu bereits früher durchgeführten Studien zum Verhältnis Altern und Knochenmarksfettgewebe (Burkhardt et al., 1987; Meunier et al., 1971). Ziel bei dieser Untersuchung war, herauszufinden, ob Extrakte von CR bzw. bestimmte Inhaltsstoffe der Extrakte dazu in der Lage sind, bereits vorhandene Adipozyten und die eingeleitete Adipogenese zugunsten einer Osteogenese und somit im Sinne der Erhöhung der Knochenmasse umzuwandeln.

### 6.2.1.1 Saponinhaltige Extrakte von CR induzieren Osteogenese vs. Adipogenese in hMSC

Für die Untersuchungen zur Transdifferenzierungskapazität der Extrakte C001, C001/S und C001/R vom adipogenen zum osteogenen Phänotyp wurden zwei unterschiedliche Stimulationen ausgewählt. Einerseits wurde untersucht, wie die Transdifferenzierung zur Osteogenese mit Extrakt beeinflusst wird, nach einer zweiwöchigen adipogenen Differenzierung ohne Extrakt und anschließender Zugabe der Extrakte mit Beginn der osteogenen Differenzierung. Des Weiteren erfolgte eine Transdifferenzierung mit Extrakt bereits in der Phase der zweiwöchigen adipogenen Differenzierung und weiterführend während der Osteogenese. C001/S war in beiden Fällen in der Lage eine Zunahme der Mineralisierungsmatrix nach der Transdifferenzierungsphase zu erreichen. Dabei spielte es keine Rolle, ob der Extrakt bereits während der Adipogenese oder erst ab Eintritt der Osteogenese zugegeben wurde. Lediglich das Ausmaß war bei der Stimulation über den kompletten Zeitraum von sechs Wochen etwas stärker ausgeprägt, als bei der Zugabe des Extraktes ab Induktion der Osteogenese. Die Inkubation mit C001 führt zu einer Abnahme der Osteogenese, wenn der Extrakt erst im Anschluss der Adipogenese zugesetzt wird. Dieser Effekt kann durch Zugabe des Extraktes zu Anfang der adipogenen Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht (100 ng/ml) bzw. ausgeglichen (1000 ng/ml) werden. Extrakt C001/R zeigt keinerlei Auswirkungen auf die Transdifferenzierungskapazität von hMSC.

In einer aktuellen Studie wurden die gleichen CR-Extrakte, wie diese auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, an ovariectomisierte (ovx) Ratten verfüttert und anschließend histologisch ausgewertet (Seidlova-Wuttke et al., 2012). Hier konnte eine Abnahme der Knochenmarksverfettung, sowie eine anti-osteoporotische Aktivität nach Fütterung mit Gesamtextrakt C001 und den saponinhaltigen Fraktionen beobachtet werden. Auch die Restfraktion C001/R führte zu einer erheblichen Abnahme des Fettgewebes im Knochenmark, jedoch waren die osteoprotektiven Effekte, welche über die Trabekeldichte bestimmt wurde, weniger ausgeprägt im Vergleich zur Trabekeldichte (Quotient Kreuzung Trabekel/freie Enden Trabekel) von ovx Ratten. Um dieses Modell *in vitro* nachzustellen, wurden Transdifferenzierungsstudien an hMSC mit Extrakt durchgeführt. Dafür wurde vorerst eine

Adipogenese eingeleitet und nach einem Inkubationszeitraum von zwei Wochen, durch Umstellung des Zellmediums, eine osteogene Differenzierung induziert.

Für weitere Untersuchungen bezüglich Einflüsse von CR auf die Transdifferenzierungskapazität von hMSC ist es sinnvoll, die Inkubation der Zellen mit den saponinhaltigen Enkelfraktionen zu testen um anschließend eine weitere Fraktionierung und somit Isolierung vorhandener Wirkstoffe zu erhalten. Falls eine Eingrenzung bezüglich anti-adipogener und pro-osteoprotektiver Effekte in den Enkel- oder Urenkelfraktionen möglich ist, sollte definitiv die Anzahl an Spender-hMSC über  $n=3$  ansteigen, um signifikant wertvolle Aussagen treffen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich drei unterschiedliche Spender zur Untersuchung herangezogen, was vermutlich für die fehlenden Signifikanzen in den Ergebnissen verantwortlich ist und weswegen lediglich ein Trend konstatiert werden konnte.

### 6.2.2 Adipogene Differenzierungsstudien mit CR

Im zunehmenden Alter und auch als Symptom bei Osteoporose kommt es zu einer zunehmenden Verfettung, also Adipogenese, des Knochenmarks. Im Gegensatz dazu führt eine Zunahme des Körpergewichts bei postmenopausalen Frauen zu einer Verlangsamung des Knochenverlusts. Dies wird zum einen damit erklärt, dass eine Körpergewichtszunahme auch mit einer erhöhten mechanischen Belastung einhergeht. Dadurch wird die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten gehemmt und ihre Proliferation über Beeinflussung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges stimuliert (Bonewald and Johnson, 2008; Cao, 2011). Andererseits können Fettzellen neben der Sekretion von endo- und parakrinen Faktoren auch Cytochrom P450 19A1 (Aromatase) exprimieren, welches Östradiol aus Testosteron synthetisieren kann. Produkte aus dieser Konstellation inhibieren wiederum die Osteoklastengnese im Knochenmark und werden so für die Abnahme des Knochenverlust bei übergewichtigen Frauen begründet (Cohen, 2001; Gimble et al., 1996; Rosen and Bouxsein, 2006). Ob jedoch eine Zunahme des Körpergewichts zugunsten einer möglichen Verlangsamung des Knochenverlust bei Osteoporose gesundheitlich ratsam ist, ist sicherlich genauestens abzuwägen, denn viszerales Fettgewebe sezerniert proinflammatorische Zytokine und Adipokine, wie z.B. TNF $\alpha$ , IL6, Adiponektin und Leptin, die wiederum zu Arteriosklerose,

Herzanfällen und Typ II Diabetes, auch unter Metabolisches Syndrom bekannt, führen können (de Ferranti and Mozaffarian, 2008; Rai and Sandell, 2011).

Für die Untersuchung der Adipogenese im Knochenmark wurden Differenzierungsstudien in hMSC durchgeführt. Durch den Zusatz von Dexamethason, Indomethacin, 3-Isobutyl-1-methylxanthin und Insulin zum regulären Zellmedium wird die Differenzierung zu Adipozyten aus hMSC induziert (Noth et al., 2002; Nuttall et al., 1998).

#### 6.2.2.1 R3 induziert Adipogenese in hMSC

Die Enkelfraktion R3 induziert als einziger Extrakt eine teils signifikante Induktion der Adipogenese von hMSC in allen getesteten Konzentrationen (1-1000 ng/ml). Der Hauptbestandteil dieser Fraktion ist N-Methylserotonin (5-Hydroxytryptamin) und deren Anteil etwa 9% des Gesamtextraktes C001/R beträgt. Aktuelle Studien um Gres et al. (2012) zeigen einen Zusammenhang zwischen Oxidationsprodukten von 5-Hydroxytryptamin (5-HT) und einer Bindung zum PPAR $\gamma$ -Rezeptor (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\gamma$ ), welcher zu einer erhöhten Akkumulierung von Fett in Präadipozyten führt. Dieser Effekt könnte auch für die Zunahme der adipogenen Differenzierung von hMSC durch R3 verantwortlich sein. Alle weiteren Extrakte zeigen im Gegensatz dazu eine teils signifikante Inhibition der Adipogenese. Im Extrakt C001/R findet sich die induzierende Wirkung der R3-Fraktion nicht wieder, was vermutlich auf die geringen enthaltenen Massenanteile von 9% zurückzuführen ist. Hier wäre es sinnvoll eine vergleichende Studie zu entwickeln, die einen Einfluss der Reinsubstanz N-Methylserotonin im Vergleich zum R3-Extrakt aufzeichnet. Zusätzliche Genexpressionsanalysen in hMSC nach 24h und nach 1 Woche adipogener Differenzierung zeigen eine unerwartete Abnahme der typischen Fettmarker FABP4, LPL und PPAR $\gamma$ 2 nach Inkubation mit R3. Da FABP4, LPL und PPAR $\gamma$ 2 vor Allem in ausgereiften Adipozyten exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass eine längere Inkubationszeit mit Extrakt und eine mindestens 3-wöchige vorangegangene adipogene Differenzierung erfolgen sollten.

#### 6.2.2.2 Saponinhaltige Fraktionen inhibieren die Adipogenese von hMSC

Nach der Inkubation von C001/S und der Enkelfraktion S2 auf die adipogene Differenzierung von hMSC ist bei beiden Fraktionen eine deutliche Inhibition der Adipogenese messbar. Diese

Ergebnisse korrelieren mit Studien in ovariectomierten Ratten, die eine Abnahme des Knochenmarksfetts durch die in CR enthaltenen Triterisaponine ergaben, wie bereits bei den Transdifferenzierungsstudien diskutiert wurden (Seidlova-Wuttke et al., 2012). Werden die erhaltenen Daten bezüglich adipogene Differenzierung mit den Ergebnisse der Transdifferenzierungsstudien von C001/S verglichen, sind die Resultate hier eventuell nicht auf eine vermehrte Umwandlung von hMSC zu Osteoblasten zurückzuführen. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass eine Inkubation von C001/S während der Adipogenese zu einer erhöhten Anzahl undifferenzierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle führt und somit mehr multipotente Stammzellen für die Induktion einer osteogenen Differenzierung zur Verfügung stehen. Es ist nicht auszuschließen, dass gewiss einige Zellen eine Transdifferenzierung durchlaufen, jedoch sind die Mineralisierungskapazitäten nach Stimulation mit Extrakt erst ab Zeitpunkt der osteogenen Differenzierung geringer ausgeprägt, was möglicherweise durch eine "ungehemmte", d.h. ohne Extrakt-Wirkung beeinflusste, Adipogenese hervorgerufen wird. Auch das Genexpressionsniveau des Fettmarker PPAR $\gamma$ 2 ist um das 0,5fache geringer exprimiert nach einwöchiger adipogener Vordifferenzierung im Vergleich zur Kontrolle. Seidlova-Wuttke et al. (2012) begründen dies mit dem Vorhandensein von Inhaltsstoffen die als PPAR $\gamma$ -Inhibitoren fungieren und eine gehemmte Fettzellendifferenzierung herbeiführen. Des Weiteren beschreiben sie eine Studie um Qiu et al. (2007), die ein Triterpen vom Actein-Typ in CR beschreiben, welches die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im Knochen inhibiert. Diese Inhaltsstoffe in C001/S könnten auch für die Hemmung der Adipogenese in hMSC-Differenzierungsstudien verantwortlich sein.

#### 6.2.2.3 C001 hemmt Adipogenese in hMSC

Im Gesamtextrakt C001 setzt sich als Netto-Effekt die Hemmung der Adipogenese durch. Im Gesamtextrakt scheinen die induzierenden Effekte von R3 keinerlei Auswirkungen im Gesamtextrakt zu haben. Der Anteil der Enkefalfraktion in C001 ist extrem gering und reicht nicht aus um die Wirkungen, die von den saponinhaltigen Fraktion und C001/R verursacht wird, zu minimieren. Diese Ergebnisse sind konform mit *in vivo* Studien, bei welchen die durch eine Ovariectomie ausgelöste Zunahme des Fettgewebes im Darm durch Gabe von Rattenfutter mit C001 vermindert werden konnte (Seidlova-Wuttke et al., 2003).

### 6.2.3 Osteogene Differenzierungsstudien mit CR

Ein typisches Symptom der Menopause sind klimakterische Beschwerden, wie Hitzewallungen. Auch ein vermehrter Abbau der Knochensubstanz, aufgrund der verminderten Produktion von Östrogen sind charakteristische Merkmale bei postmenopausalen Frauen. Der Einsatz von CR bei klimakterischen Beschwerden lässt auch den Einsatz bei der präventiven Therapie von Osteoporose zu. Um die Auswirkungen des Extrakts diesbezüglich zu untersuchen wurden osteogene Differenzierungsstudien in hMSC und SAOS-2-Zellen durchgeführt. Durch den Zusatz von  $\beta$ -Glycerolphosphat und Dexamethason im regulären Zellmedium wird die Differenzierung zu Osteoblasten aus hMSC induziert (Schilling et al., 2007).

#### 6.2.3.1 R3 induziert Osteogenese in hMSC

Am vielversprechendsten der Extrakte in der osteogenen Differenzierung von hMSC ist die Enkelfraktion R3. Die Inkubation führt in allen getesteten Konzentrationen zu einer doppelt so hohen Mineralisierungskapazität im Vergleich zur Kontrolle. Hauptbestandteil der Fraktion ist N-Methylserotonin oder auch 5-Hydroxytryptamin. Rezeptoren für 5-Hydroxytryptamin (5-HT) wurden in allen Knochenzellen, wie Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten gefunden und die Stimulation des Rezeptors führt zur Beeinflussung der Knochenzellaktivitäten (Bliziotis, 2010; Westbroek et al., 2001). Dabei dokumentieren einige Studien einen direkten stimulatorischen Effekt von 5-HT auf verschiedene Signalwege der Knochenformation (Bliziotis et al., 2006; Gustafsson et al., 2006; Westbroek et al., 2001) und andere Studien diskutieren wiederum inhibitorische Effekte auf die Knochenbildung (Westbroek et al., 2001; Yadav et al., 2008). In den vorliegenden Untersuchungen überwiegt die stimulatorische Wirkung auf die Osteoblastenaktivität in hMSC. Diese Aktivität, die vermutlich auf den Inhaltsstoff N-Methylserotonin zurückzuführen ist, verliert sich im Gesamt-R-Extrakt und kommt im Extrakt C001 nicht mehr zur Geltung. Hier überwiegen demnach die anderen Wirkstoffe in ihren kumulierenden Eigenschaften den Effekt von N-Methylserotonin, welcher nur zu 9 % in C001/R vertreten ist. Auch hier unterliegen die Versuche den starken Spendervariabilitäten wie in Abb. 21 deutlich gezeigt wird. Diese Variabilitäten sind aufgrund unbekannter Lebensumstände, unbekannter Krankenvorgeschichte und des Geschlechts bei jeder der durchgeführten Untersuchungsmethoden gegeben. Wenn die Möglichkeit besteht,

ist es sinnvoll, die verwendeten Spenderzellen nach Geschlecht und Alter zu sortieren, wie z.B. bei weiblichen Spendern diejenigen auszuwählen, die bereits in die Menopause eingetreten sind. Aufgrund der limitierten Anzahl von vorhandenen Donoren und der unterschiedlichen Wachstumsverhältnisse der Zellen in Kultur, ist dies jedoch nicht immer möglich und es muss mit dem Material gearbeitet werden, das zur Verfügung steht. Dennoch deutet der erhaltene Trend in der osteogenen Differenzierung eindeutig auf osteoprotektive Inhaltsstoffe in der Enkelfraktion R3 und in geringerer Konzentration in C001/R hin.

Im Gesamtextrakt C001 ist dahingegen eine Inhibition der Osteogenese in allen getesteten Konzentrationen gegeben (100 ng/ml  $P \leq 0,05$ ). Dieser Effekt tritt auch nach Inkubation der Zellen mit C001/S auf und wird erst durch S2 in eine geringfügige Zunahme der osteogenen Differenzierung umgewandelt. In vielen Studien zur osteoprotektiven Wirkung von CR werden jedoch gerade Saponine als wirksam dargestellt (Seidlova-Wuttke et al., 2012). In den vorliegenden Studien ist diese Wirkung bei Betrachtung der osteogenen Differenzierungskapazität nicht gegeben, jedoch wird diese Kapazität nach vorangegangener adipogener Differenzierung wiederum durch C001 und C001/S gesteigert, wie bereits bei den Transdifferenzierungsstudien diskutiert wurde. Da Osteoporose hauptsächlich in der Menopause und damit in einem fortgeschritteneren Alter auftritt, welches mit einer zunehmenden Verfettung des Knochenmarks einhergeht, ist den Studien zur Transdifferenzierungskapazität in diesem Falle mehr Gewicht zuzuschreiben.

#### 6.2.3.2 CR induziert Genexpression von SOST in hMSC

Sclerostin wird von Osteozyten und andere terminal differenzierten Zellen der Knochenmatrix sezerniert und inhibiert die Differenzierung, Aktivität und das Überleben von Osteoblasten (Poole et al., 2005). Die Sekretion von SOST ist allerdings auch im isolierten *in vitro*-System ein Kennzeichen des Übergangs der Kulturen in eine Gewebe-Maturationsphase. Unter physiologischen Bedingungen ist die Sekretion von SOST im Organismus auch ein Zeichen eines ausreichend stabilen Skeletts. Werden hMSC-Zellen 24 h mit den Extrakten stimuliert, steigt das Genexpressionsniveau von SOST bei nahezu allen Fraktionen an. Am stärksten wird die Expression von SOST nach Inkubation mit den wasserlöslichen Extrakten induziert. Diese Genexpressionsdaten stehen im Gegensatz zu den Daten, die bei der osteogenen Differenzierung beobachtet wurden. Eine Erhöhung der Genexpression würde auf

Translationsebene zu einer verminderten Knochenbildung führen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch, da ausgerechnet R3 zu einer 1,4 fachen Erhöhung der Expression führt, aber auch die osteogene Differenzierung von hMSC um das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle ansteigt. Die Betrachtung der Genexpressionslevel von SOST und weitere knochenrelevante Gene, wie OPG, RANKL, ALP, OC und OP, wurden jedoch nach 24 h Inkubation abgeschlossen. Dieser Zeitrahmen ist wahrscheinlich zu kurz um eindeutige Effekte auf die Genregulation zu erhalten, vor allem, weil SOST von Osteozyten sezerniert werden, die definitiv nach 24 h ohne Differenzierungsanstoß der Zellen nicht gebildet wurden. Des Weiteren konnte in Studien eine Expression von SOST in hMSC erst 14 Tage nach Einleitung der osteogenen Differenzierung beobachtet werden (van Bezooijen et al., 2004). Hier würde einerseits eine längere Inkubationszeit mit Extrakt von Vorteil sein und andererseits eine osteogene Vordifferenzierung von mindestens zwei Wochen zum Vergleich eine genauere Aussage über die Genexpressionsniveaus von knochenrelevanten Genen liefern.

#### 6.2.3.3 Nettoeffekte vs. Effekte der Subfraktionen werden deutlich anhand des Genexpressionsprofils knochenrelevanter Gene in SaOs-2-Zellen

Die Untersuchungen der osteogenen Differenzierungskapazitäten der Extrakte in der Osteosarkomzelllinie SaOs-2 ergaben eine tendenzielle Zunahme nach Inkubation mit den Tochter- bzw. Enkelfraktionen im Vergleich zum Gesamtextrakt C001. Der Effekt einer Zunahme der Mineralisierungskapazität konnte vor allem nach einer zweiwöchigen Stimulation beobachtet werden und war nach weiteren zwei Wochen osteogener Differenzierung zwar noch vorhanden, aber nicht verstärkt messbar. Interessanter ist dahingegen das Genexpressionsprofil von relevanten Genen in den Stadien vom Osteoblast zum voll ausgereiften Osteozyten in SaOs-2-Zellen. Nach 24 h Inkubation war das Genexpressionslevel knochenrelevanter Gene bei allen getesteten Fraktionen niedriger als das Niveau bei unstimulierten SaOs-2-Zellen. Erst nach 72 h konnten erhebliche Induktionen von gewissen Markergenen hauptsächlich nach Stimulation mit den Subfraktionen beobachtet werden. So wird z. B. Runx2 (cbfa-1), das in osteochondralen Progenitoren und in frühen Phase der Osteoblastogenese gebildet wird (Ducy et al., 1997), nach Inkubation mit den saponinhaltigen Extrakten S1 und S2, sowie R3 tendenziell höher exprimiert im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Expression von ALP wird nach Stimulation mit S1, S2 und R3 verstärkt und ist ein Marker der von aktiven Osteoblasten exprimiert wird. Bei allen drei

saponinhaltigen Enkelfraktionen und R3 wird, ebenso wie in den hMSC, SOST nach 72 stündiger Inkubation überexprimiert. Das Genexpressionsprofil zeigt jedoch nur Tendenzen und einen Hinweis darauf, dass die Extrakte Inhaltsstoffe enthalten, die die osteogene Differenzierung von SaOs-Zellen beeinflussen. Wesentlich auffälliger ist hier die Wirkung der fraktionierten Enkel-Extrakte auf SaOs-Zellen. Mit zunehmender Fraktionierung erhöhen sich die Qualität und die Quantität der enthaltenen Inhaltsstoffe, die somit eine gezieltere Wirkung bezüglich Osteoprotektivität entfalten können. Wenn die Wirkungen der Tochterfraktionen C001/S und C001/R betrachtet, sind keine der beobachteten Effekte der Enkelfraktionen projizierbar. Im Gegenteil, eine Inkubation mit C001/R führt zu einer Herabregulation aller untersuchten Gene im Vergleich zur Kontrolle, genauso wie bei der Stimulation mit dem saponinhaltigen Gesamtextrakt C001/S in abgeschwächter Form. Der Gesamtextrakt C001 zeigt als Nettoeffekt, im Gegensatz zu den beobachteten regulierenden Einflüssen der Enkelfraktionen auf die untersuchten Markergene, keine Auswirkungen bzw. eine geringe Herabregulation auf das Genexpressionsprofil von undifferenzierten SaOs-2-Zellen. Die Untersuchung von knochenrelevanten Genen in SaOs-Zellen zeigt somit ganz deutlich wie beobachtete Wirkungen der Subextrakte in Vielstoff-Gemischen im Gesamtextrakt untergehen bzw. aufgehoben werden.

#### 6.2.4 CR beeinflusst nicht die zelluläre Mechanosensitivität

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass CR östrogenähnliche Inhaltsstoffe enthält und somit als Phytoöstrogen die Symptome der Menopause lindert. Obwohl eine eindeutige Evidenz für östrogenähnliche Inhaltsstoffe in CR fehlt, eignet sich die angewandte Methode zur Untersuchung der Mechanosensitivität auch, um östrogenähnliche Wirkprinzipien aufzudecken. Im klassischen Modell binden die Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  die entsprechenden Liganden und anschließend an östrogenresponsive Elemente (EREs) in der DNA und beeinflussen so die Genexpression (Beato et al., 1995; Kuiper and Gustafsson, 1997). Jedoch besitzen viele östrogenresponsive Gene keine klassischen EREs (Schultz et al., 2005). In Studien konnte gezeigt werden, dass ER $\alpha$  auch über die Wechselwirkung mit AP-1 und Sp1 Proteinkomplexe die Genexpression regeln kann (Kushner et al., 2000; Safe, 2001). Des Weiteren reagieren Promotoren, welche AP-1- oder Sp1-responsive Elemente enthalten, auf mechanische Belastungen und können somit den Knochenmetabolismus beeinflussen (Liedert et al., 2006). Die Untersuchung des Sp1-responsiven Elements zeigte bis auf eine leichte, nicht-

signifikante Inhibition der Luciferase-Aktivität durch die saponinhaltigen Enkelfractionen keine Auswirkungen im Vergleich zur gedehnten Kontrolle. Bei der Untersuchung des AP-1-responsiven Elements war lediglich nach Inkubation mit der Enkelfraktion S3 eine tendenzielle Erhöhung der Antwort auf Dehnungsreize bis zu 15 % messbar. Die getesteten fraktionierten Extrakte enthalten demnach keine Komponenten um die zelluläre Mechanosensitivität zu stimulieren. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie überein, die die Auswirkungen von sportlichen Belastungen mit und ohne CR-Einnahme untersuchte. Es konnten zwar positive Auswirkungen auf die Knochendichte, auf die Schwere der menopausalen Symptome und auf das Körpergewicht festgestellt werden, jedoch waren diese auf das körperliche Fitnessprogramm zurückzuführen. Die zusätzliche Einnahme von CR verbesserte diese Ergebnisse nicht (Bebenek et al., 2010).

#### *6.2.5 Mikroarray-Analysen sind für Vielstoffgemische wie CR nicht geeignet*

Mikroarray-Analysen eigneten sich zumindest im Kontext der hier durchgeführten Experimente nicht, um aus einer geringen Menge Probenmaterial vermeintliche Zielgene zu identifizieren, deren Genexpression nach Stimulation mit einer Substanz moduliert werden. Für die Untersuchung des Genexpressionsprofils von CR wurden zu Beginn der Arbeit eine Kurzzeitstimulation von hMSC mit 10 nM C001 von 24 h durchgeführt und mit unbehandelten hMSC verglichen. Ziel war es, bereits zum frühen Zeitpunkt einen Einblick über differentiell exprimierte Gene zu bekommen und somit weitere Untersuchungen gezielter auszurichten. Die Comparison-Analyse ergab insgesamt 6750 differentiell exprimierte Probesets von 54613 möglichen detektierbaren Genprodukten. Für die technische Evaluierung des Arrays wurde, um im Vorfeld Spendervariabilitäten ausschließen zu können, dieselbe Probe untersucht, die auch für den Array eingeschickt wurde. Die Evaluierung der Zielgene, die aufgrund ihrer Funktion im Knochenmetabolismus ausgewählt wurden, war tendenziell nicht möglich. Die Regulationen der Probesets im Array konnten nicht mit der technischen Evaluierung bestätigt werden. Das Vorliegen eines Vielstoff-Gemisches, die geringe Konzentration und die Anzahl der untersuchten hMSC-Spender von 1 sind vermutlich Gründe für die fehlende Übereinstimmung des Arrays und der technischen Evaluierung. Daher wurde eine Mikroarray-Analyse mit 5 hMSC-Spendern nach Inkubation mit dem saponinhaltigen Hauptextrakt C001/S in einer Konzentration von 1000 ng/ml durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte hier, wegen der höheren Spenderzahl, mittels SAM-Analyse (Significance Analysis of

Microarrays). Für die technische Evaluierung wurden Kandidatengene ausgewählt, dessen q-Werte 0 % betragen (Falscherkennungsrate in %). Auch hier war es nicht möglich eine Übereinstimmung der Genexpressionniveaus im Array mit dem Genexpressionslevel der Kandidatengene in der technischen Evaluierung zu erhalten. Für Vielstoff-Gemische eignen sich Mikroarray-Analysen offenbar nicht, denn obwohl der saponinhaltige Tochterextrakt in den bereits diskutierten Untersuchungen definitiv osteoprotektive Wirkeigenschaften enthält, können keine konsistenten Veränderungen des Genexpressionsmusters mittels Mikroarray-Untersuchungen detektiert werden. Obwohl die Würzburger Arbeitsgruppe große Erfahrung im Umgang mit Mikro-Array-Analysen hat, war hier die technische Verwertung nicht möglich, die Ursachenanalyse blieb ohne Erfolg. Es ist denkbar, dass die Analysen umso besser ausfallen würden, je weiter die Vielstoffgemische aufgereinigt sind, am besten natürlich bei Anwendung von Reinsubstanzen. So könnten z.B. die saponinhaltigen Enkelfractionen noch weiter aufgeschlüsselt werden, auch die Enkelfraktion R3 scheint ein interessanter Kandidat. Sinnvoll ist hier eine Anreicherung von N-Methylserotonin in höheren Fraktionen zu erreichen und anschließend eine Mikroarray-Analyse durchzuführen, in der die Zellen mit reinem N-Methylserotonin und dem entsprechenden Extrakt behandelt werden, zu vergleichen und das Genexpressionsmuster zu bestimmen. Eine weitere Überlegung ist, Array-Analysen nach Langzeitstimulation von hMSC mit Extrakt durchzuführen. Damit würde auch eine mögliche präventive Wirkung von CR auf Osteoporose deutlich gezeigt werden können.

### 6.2.6 Zusammenfassung

Die insgesamt positiven Safety-Resultate sprechen für einen Einsatz von *Cimicifuga racemosa* und den untersuchten Extrakte in der Anwendung und Prophylaxe bei Osteoporose. Die Untersuchungen zum Apoptose- und Regenerationspotential lassen bereits die unterschiedlichen Wirkkomponenten der einzelnen subfraktionierten Extrakte im Vergleich zum Gesamtextrakt erahnen. Die Extrakte wirken anti-apoptotisch auf humane mesenchymale Stammzellen und tragen zum verbesserten Überleben dieser Zellen unter diesen Bedingungen *in vitro* bei. Die Proliferationsrate von hMSC wurde durch die Extrakte nicht beeinflusst. Anders verhält es sich bei der Osteosarkomzelllinie SaOs-2. Hier sind die Effekte der Extrakte auf die Apoptose sehr gering ausgeprägt, tendieren jedoch zu einer anti-apoptotischen Wirkung. Die Extrakte führen zu starken proliferations-induzierenden Effekten durch die saponinhaltigen Enkelfractionen S2 und S3 und allen R-Extrakten. Diese vorliegende

Mitogenität ist mit Vorsicht zu betrachten, da in transformierten Zelllinien häufig eine gestörte physiologische Regulation der Proliferation vorliegt. Andererseits wäre es auch denkbar, dass der Effekt schlicht eine proliferative Wirkung widerspiegelt, die im Stadium der skelettalen Vorläufer wirksam sind. Eine echte Evaluation dieser Phänomene wäre nur mit solchen Zellen möglich, am besten *in vivo* mit der Frage nach Proliferationssteigerung in Osteoblasten. Daher ist im Hinblick auf die humane Situation die Auswirkung auf hMSC stärker zu gewichten. In der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP finden sich bei allen untersuchten Extrakten proliferationssteigernde Aktivitäten, was unbedingt im Tiermodell auf bereits bestehende Tumore analysiert werden sollte. Im murinen Modell könnten die Apoptose- und Proliferationsmessungen der osteoblastären bzw. prä-osteoklastären Mauszelllinien herangezogen werden. Gerade im Hinblick auf osteogene Wirkeigenschaften sollten Versuche zur Bestimmung der Knochenresorptionsrate, wie z.B. die Bestimmung von CrossLaps im Serum durchgeführt werden. Die untersuchten Extrakte zeigen keine antioxidative Eigenschaften in den Testsystemen und haben keinen Einfluss auf die zelluläre Seneszenz von hMSC. Dies spricht für eine hohe Sicherheit bei der Anwendung und Prophylaxe mit den untersuchten Extrakten. Bei der Untersuchung der Adipogenese führen saponinhaltige Fraktionen zu einer Inhibierung, was auch mit aktuellen *in vivo*-Studien (Seidlova-Wuttke et al., 2012) übereinstimmt. Die Enkelefraktion R3, die wasserlösliche Wirkkomponenten enthält, dahingegen stimuliert eindeutig die adipogene Differenzierung. Im Gesamtextrakt C001 setzt sich als Nettoeffekt die Inhibition der Adipogenese durch. Bei der Transdifferenzierung zeigt die saponinhaltige Tochterfraktion C001/S eine Induktion der osteogenen Differenzierung im Vergleich zu C001/R bei dem keinerlei Effekte beobachtet werden konnten. Wird nur die osteogene Differenzierungskapazität untersucht, führt die Inkubation mit R3 zu einer Induktion der Osteogenese. Diese Teilwirkung ist im Gesamtextrakt C001 nicht mehr messbar. Werden die Studien jedoch in ihrer Gesamtheit betrachtet, können definitiv osteoprotektive und anti-adipogene Wirkeigenschaften von CR mit dem angewandten Modell identifiziert werden. Cimicifuga enthält keine mechanoresponsiven Inhaltsstoffe die mit den angewendeten Untersuchungsmethoden detektiert wurden. Genau wie bei den durchgeführten Mikroarray-Analysen zur Aufklärung des Genexpressionsprofils von CR ist es wahrscheinlich, dass eine höhere Reinheit der verwendeten Extrakte bei diesen Untersuchungsmethoden zu einem klarerem Ergebnis führen würde.

### 6.2.7 Ausblick

Mit dem Ziel der Arbeit, osteoprotektive Wirkeigenschaften in *Cimicifga racemosa* und fraktionierten Extrakten zu identifizieren und anschließend durch Anreicherung der Wirkstoffe ein Medikament zur präventiven Behandlung von Osteoporose auf pflanzlicher Basis zu erhalten, wurde deutlich, dass auch in Fraktionen der dritten Generation noch zu viele Inhaltsstoffe vorhanden sind, um die beobachteten Effekte eindeutig einzelnen Substanzen zuordnen zu können. Im Verlauf der Untersuchungen waren die saponinhaltigen Enkelfractionen und der Extrakt R3 aufgrund ihrer Auswirkungen auf Adipogenese und Osteogenese in den Fokus geraten. Die Resultate zeigen die klassischen Probleme die bei pflanzlichen Arzneimitteln häufig auftreten. Die vielen Teilwirkungen der Tochter- und Enkelfractionen können sich in Kombination gegenseitig aufheben oder verstärken und im Gesamtextrakt vorhanden oder nicht vorhanden sein oder zugunsten einer Fraktion überwiegen. Steht weiterhin die Entwicklung eines osteoprotektiven Präparates im Vordergrund, würde der erste Schritt darin bestehen, diese Fraktionen mit Hilfe fortgeschrittener High-Tech-Methoden weiter zu entschlüsseln um ein gezielteres Wirkstoffprofil zu erhalten. Das weitere Vorgehen in Bezug auf die Identifikation osteoprotektiver Effekte bedeutet *in vitro*-Untersuchungen durchzuführen, wie diese in der vorliegenden Arbeit aufgelistet sind. Eine große Herausforderung bei Vielstoffgemischen ist die Bestimmung der Pharmakokinetik in *in vitro* und *in vivo* Studien. Viele wirksame Eigenschaften einer Substanz oder wirksame Metaboliten entstehen erst nach der Metabolisierung über Leber und Darm (First-Pass-Effekt) und können erst durch pharmakokinetische Untersuchungen aufgedeckt werden. Daher ist es anzuraten, falls die Entwicklung eines osteoprotektiven Präparates weiter verfolgt wird, die angewandten Studien komplementär mit *in-vivo*-Untersuchungen zu begleiten.

FAZIT: Definitiv steckt in den hier untersuchten Tochterextrakten ein großes Potenzial, dass dem Anspruch von Phytoengineering beim Design künftiger Extrakte mit engem und definiertem Wirkungsspektrum Rechnung tragen kann. Die hier angewendeten High-Tech-Verfahren sind umso mehr zur Analyse geeignet, je schmaller und definierter das Wirkungsspektrum ist und je mehr Information über Stoffwechselwege und First-Pass-Effekte mit dem Design verknüpft werden können. Für zukünftige Entscheidungen einen oder mehrere der beschriebenen Extrakte mit höherer Reinheit oder Fraktionierungsgrad weiter zu

verfolgen, könnten die, in dieser Arbeit, angewandeten Methoden definitiv zu einer klaren Aussage bezüglich osteoprotektiver Wirkeigenschaften der Extrakte beitragen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agerbaek, M.O., Eriksen, E.F., Kragstrup, J., Mosekilde, L., and Melsen, F. (1991). A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone and mineral* 12, 101-112.
- Asagiri, M., and Takayanagi, H. (2007). The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251-264.
- Barry, F.P., and Murphy, J.M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 568-584.
- Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857.
- Bebenek, M., Kemmler, W., von Stengel, S., Engelke, K., and Kalender, W.A. (2010). Effect of exercise and *Cimicifuga racemosa* (CR BNO 1055) on bone mineral density, 10-year coronary heart disease risk, and menopausal complaints: the randomized controlled Training and *Cimicifuga racemosa* Erlangen (TRACE) study. *Menopause* 17, 791-800.
- Beighton, P., Davidson, J., Durr, L., and Hamersma, H. (1977). Sclerosteosis - an autosomal recessive disorder. *Clinical genetics* 11, 1-7.
- Bekker, P.J., Holloway, D., Nakanishi, A., Arrighi, M., Leese, P.T., and Dunstan, C.R. (2001). The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16, 348-360.
- Beuscher (1995). *Cimicifuga racemosa* L. - Die Traubensilberkerze. *Zeitschrift für Phytotherapie* 16, 301-310.
- Bilbe, G., Roberts, E., Birch, M., and Evans, D.B. (1996). PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* 19, 437-445.
- Blizotes, M. (2010). Update in serotonin and bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, 4124-4132.
- Blizotes, M., Eshleman, A., Burt-Pichat, B., Zhang, X.W., Hashimoto, J., Wiren, K., and Chenu, C. (2006). Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone* 39, 1313-1321.
- Bone, H.G., McClung, M.R., Roux, C., Recker, R.R., Eisman, J.A., Verbruggen, N., Hustad, C.M., DaSilva, C., Santora, A.C., and Ince, B.A. (2010). Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 937-947.

Bonewald, L.F., and Johnson, M.L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42, 606-615.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.

Bringold, F., and Serrano, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Experimental gerontology* 35, 317-329.

Burdette, J.E., Chen, S.N., Lu, Z.Z., Xu, H., White, B.E., Fabricant, D.S., Liu, J., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Constantinou, A.I., *et al.* (2002). Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 7022-7028.

Burdette, J.E., Liu, J., Chen, S.N., Fabricant, D.S., Piersen, C.E., Barker, E.L., Pezzuto, J.M., Mesecar, A., Van Breemen, R.B., Farnsworth, N.R., *et al.* (2003). Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 5661-5670.

Burkhardt, R., Kettner, G., Bohm, W., Schmidmeier, M., Schlag, R., Frisch, B., Mallmann, B., Eisenmenger, W., and Gilg, T. (1987). Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8, 157-164.

Cao, J.J. (2011). Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of orthopaedic surgery and research* 6, 30.

Chan, B.Y., Lau, K.S., Jiang, B., Kennelly, E.J., Kronenberg, F., and Kung, A.W. (2008). Ethanolic extract of *Actaea racemosa* (black cohosh) potentiates bone nodule formation in MC3T3-E1 preosteoblast cells. *Bone* 43, 567-573.

Chapuy, M.C., Arlot, M.E., Duboeuf, F., Brun, J., Crouzet, B., Arnaud, S., Delmas, P.D., and Meunier, P.J. (1992). Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *The New England journal of medicine* 327, 1637-1642.

Chattopadhyay, N., Quinn, S.J., Kifor, O., Ye, C., and Brown, E.M. (2007). The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochemical pharmacology* 74, 438-447.

Chesnut, C.H., 3rd, Silverman, S., Andriano, K., Genant, H., Gimona, A., Harris, S., Kiel, D., LeBoff, M., Maricic, M., Miller, P., *et al.* (2000). A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *The American journal of medicine* 109, 267-276.

Cohen, P.G. (2001). Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. *Medical hypotheses* 56, 702-708.

Coleman, R.E. (2001). Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer treatment reviews* 27, 165-176.

- Collet, C., Schiltz, C., Geoffroy, V., Maroteaux, L., Launay, J.M., and de Vernejoul, M.C. (2008). The serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 418-427.
- Cosman, F., and Lindsay, R. (1999). Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. *Endocrine reviews* 20, 418-434.
- Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Richards, R.G., and Hayes, J.S. (2012). In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European cells & materials* 24, 1-17.
- Dachverband Osteologie, e.V. (2011). DVO Guideline 2009 for Prevention, Diagnosis and Therapy of Osteoporosis in Adults. *Osteologie* 2011 20, 19.
- Dai, Z., Li, Y., Quarles, L.D., Song, T., Pan, W., Zhou, H., and Xiao, Z. (2007). Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 14, 806-814.
- de Ferranti, S., and Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical chemistry* 54, 945-955.
- Deftos, L.J., Lee, M.R., and Potts, J.T., Jr. (1968). A radioimmunoassay for thyrocalcitonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60, 293-299.
- Dempsey, J.R. (2009). Lydia Pinkham "For the female discomforts". In *Transactions of the royal martian geographical society (Heliograph Inc.)*.
- Dobnig, H., and Turner, R.T. (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136, 3632-3638.
- Drake, M.T., and Cremers, S.C. (2010). Bisphosphonate therapeutics in bone disease: the hard and soft data on osteoclast inhibition. *Molecular interventions* 10, 141-152.
- Dreher, I., Schmutzler, C., Jakob, F., and Kohrle, J. (1997). Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J Trace Elem Med Biol* 11, 83-91.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
- Endoh, M., Kobayashi, Y., Yamakami, Y., Yonekura, R., Fujii, M., and Ayusawa, D. (2009). Coordinate expression of the human pregnancy-specific glycoprotein gene family during induced and replicative senescence. *Biogerontology* 10, 213-221.
- Eriksen, E.F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 11, 219-227.
- Falgueyret, J.P., Desmarais, S., Oballa, R., Black, W.C., Cromlish, W., Khougaz, K., Lamontagne, S., Masse, F., Riendeau, D., Toulmond, S., *et al.* (2005). Lysosomotropism of basic cathepsin K inhibitors contributes to increased cellular potencies against off-target cathepsins and reduced functional selectivity. *Journal of medicinal chemistry* 48, 7535-7543.

- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* 4, 330-349.
- Fernandes, R.J., Harkey, M.A., Weis, M., Askew, J.W., and Eyre, D.R. (2007). The post-translational phenotype of collagen synthesized by SAOS-2 osteosarcoma cells. *Bone* 40, 1343-1351.
- Fischer, J. (2006). Cimicifuga racemosa Extrakt (Remifemin) bei Mamma-Ca-Patientinnen mit klimakterischen Beschwerden unter hormontherapeutischer Behandlung mit Tamoxifen- eine Anwendungsbeobachtung. In *Meduzinische Fakultät (Freiburg i. Br.: Albert-Ludwigs-Universität)*, pp. 162.
- Foster (1998). Black Cohosh: Cimicifuga racemosa. A literature Review. *HerbalGram* 45, 1-50.
- Freeman, E.W., and Sherif, K. (2007). Prevalence of hot flushes and night sweats around the world: a systematic review. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* 10, 197-214.
- Frost, H.M. (1969). Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcified tissue research* 3, 211-237.
- Gauthier, J.Y., Chauret, N., Cromlish, W., Desmarais, S., Duong le, T., Falgueyret, J.P., Kimmel, D.B., Lamontagne, S., Leger, S., LeRiche, T., *et al.* (2008). The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18, 923-928.
- Geller, S.E., Shulman, L.P., van Breemen, R.B., Banuvar, S., Zhou, Y., Epstein, G., Hedayat, S., Nikolic, D., Krause, E.C., Pierson, C.E., *et al.* (2009). Safety and efficacy of black cohosh and red clover for the management of vasomotor symptoms: a randomized controlled trial. *Menopause* 16, 1156-1166.
- Gimble, J.M., Robinson, C.E., Wu, X., and Kelly, K.A. (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 19, 421-428.
- Gres, S., Gomez-Zorita, S., Gomez-Ruiz, A., and Carpena, C. (2012). 5-hydroxytryptamine actions in adipocytes: involvement of monoamine oxidase-dependent oxidation and subsequent PPARgamma activation. *J Neural Transm.*
- Guerri-Fernandez, R.C., and Diez-Perez, A. (2012). Is there a future for selective estrogen-receptor modulators in osteoporosis? *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 4, 55-59.
- Gustafsson, B.I., Thommesen, L., Stunes, A.K., Tommeras, K., Westbroek, I., Waldum, H.L., Slordahl, K., Tamburstuen, M.V., Reseland, J.E., and Syversen, U. (2006). Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 98, 139-151.
- Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Haussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F., and Linder, R. (2013). The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Deutsches Arzteblatt international* 110, 52-57.
- Hamdy, R.C., and Daley, D.N. (2012). Oral calcitonin. *International journal of women's health* 4, 471-479.

Hamersma, H., Gardner, J., and Beighton, P. (2003). The natural history of sclerosteosis. *Clinical genetics* 63, 192-197.

Hänsel, R.S., O. (2007). *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, S.L. Friedrichsen, C., ed. (Heidelberg: Springer Medizin Verlag).

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 585-621.

He, K., Pauli, G.F., Zheng, B., Wang, H., Bai, N., Peng, T., Roller, M., and Zheng, Q. (2006). *Cimicifuga* species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. *Journal of chromatography A* 1112, 241-254.

Hedlund, P.B., and Sutcliffe, J.G. (2004). Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT<sub>7</sub> receptor research. *Trends in pharmacological sciences* 25, 481-486.

Henriksen, K., Bay-Jensen, A.C., Christiansen, C., and Karsdal, M.A. (2010). Oral salmon calcitonin--pharmacology in osteoporosis. *Expert opinion on biological therapy* 10, 1617-1629.

Holleman, A.F. (2007). *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 102., stark umgearb. und verb. Aufl. / von Nils Wiberg edn (Berlin u.a.: de Gruyter).

Hostanska, K., Nisslein, T., Freudenstein, J., Reichling, J., and Saller, R. (2004). *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. *Breast cancer research and treatment* 84, 151-160.

Hostanska, K., Nisslein, T., Freudenstein, J., Reichling, J., and Saller, R. (2005). Apoptosis of human prostate androgen-dependent and -independent carcinoma cells induced by an isopropanolic extract of black cohosh involves degradation of cytokeratin (CK) 18. *Anticancer research* 25, 139-147.

Ikegame, M., Ejiri, S., and Ozawa, H. (2004). Calcitonin-induced change in serum calcium levels and its relationship to osteoclast morphology and number of calcitonin receptors. *Bone* 35, 27-33.

Jap D., O.P.G., Fasching P., Niederacher D., Beckmann M.W. (2001). Genetik der Osteoporose. *Journal für Menopause* 8, 6.

Jarry, H., Thelen, P., Christoffel, V., Spengler, B., and Wuttke, W. (2005). *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 inhibits proliferation of the human prostate cancer cell line LNCaP. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 12, 178-182.

Jerome, C., Missbach, M., and Gamse, R. (2011). Balicatib, a cathepsin K inhibitor, stimulates periosteal bone formation in monkeys. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22, 3001-3011.

Jirecek, S., Pavo, I., and Huber, J.C. (1999). [Effect of selective estrogen receptor modulators on estrogen-sensitive tissues]. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau* 39, 184-190.

- Jordan, V.C. (2004). Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer cell* 5, 207-213.
- Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L., Steiniche, T., and Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2, 165-171.
- Kapinas, K., and Delany, A.M. (2011). MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis research & therapy* 13, 220.
- Kapur, P., Wuttke, W., and Seidlova-Wuttke, D. (2010). The *Cimicifuga racemosa* special extract BNO 1055 prevents hot flashes in ovariectomized rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17, 890-894.
- Khajuria, D.K., Razdan, R., and Mahapatra, D.R. (2011). Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Revista brasileira de reumatologia* 51, 365-371, 379-382.
- Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D.W., Ebeling, P.R., Felsenberg, D., Gagel, R.F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., *et al.* (2007). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22, 1479-1491.
- Kligler, B. (2003). Black cohosh. *American family physician* 68, 114-116.
- Kuiper, G.G., and Gustafsson, J.A. (1997). The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS letters* 410, 87-90.
- Kumar (2005). Histomorphometric and biochemical evidence for a cortical bone-forming effect of a cathepsin K inhibitor in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (Supply 1): Abstract F236.
- Kurzer, M.S., and Xu, X. (1997). Dietary phytoestrogens. *Annual review of nutrition* 17, 353-381.
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiao, A.K., Uht, R.M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74, 311-317.
- Lewis, J.E., Nickell, L.A., Thompson, L.U., Szalai, J.P., Kiss, A., and Hilditch, J.R. (2006). A randomized controlled trial of the effect of dietary soy and flaxseed muffins on quality of life and hot flashes during menopause. *Menopause* 13, 631-642.
- Lewis, J.S., and Jordan, V.C. (2005). Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutation research* 591, 247-263.
- Li, J.X., Liu, J., He, C.C., Yu, Z.Y., Du, Y., Kadota, S., and Seto, H. (2007). Triterpenoids from *Cimicifugae rhizoma*, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss. *Maturitas* 58, 59-69.

- Li, X., Warmington, K.S., Niu, Q.T., Asuncion, F.J., Barrero, M., Grisanti, M., Dwyer, D., Stouch, B., Thway, T.M., Stolina, M., *et al.* (2010). Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass, and bone strength in aged male rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 2647-2656.
- Liedert, A., Kaspar, D., Blakytyn, R., Claes, L., and Ignatius, A. (2006). Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 1-5.
- Locker, M., Bitard, J., Collet, C., Poliard, A., Mutel, V., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2006). Stepwise control of osteogenic differentiation by 5-HT(2B) receptor signaling: nitric oxide production and phospholipase A2 activation. *Cellular signalling* 18, 628-639.
- Love, R.R., Mazess, R.B., Barden, H.S., Epstein, S., Newcomb, P.A., Jordan, V.C., Carbone, P.P., and DeMets, D.L. (1992). Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *The New England journal of medicine* 326, 852-856.
- Low Dog, T., Riley, D., and Carter, T. (2001). An integrative approach to menopause. *Alternative therapies in health and medicine* 7, 45-55; quiz 56-47.
- MacLean, C., Newberry, S., Maglione, M., McMahon, M., Ranganath, V., Suttorp, M., Mojica, W., Timmer, M., Alexander, A., McNamara, M., *et al.* (2008). Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis. *Annals of internal medicine* 148, 197-213.
- Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews* 21, 115-137.
- McClung, M.R. (2003). Bisphosphonates. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 32, 253-271.
- McKenna, D.J., Jones, K., Humphrey, S., and Hughes, K. (2001). Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical applications. *Alternative therapies in health and medicine* 7, 93-100.
- Menea, C., Kurihara, N., and Roodman, G.D. (2000a). CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochemical and biophysical research communications* 267, 943-946.
- Menea, C., Reddy, S.V., Kurihara, N., Maeda, H., Anderson, D., Cundy, T., Cornish, J., Singer, F.R., Bruder, J.M., and Roodman, G.D. (2000b). Enhanced RANK ligand expression and responsivity of bone marrow cells in Paget's disease of bone. *The Journal of clinical investigation* 105, 1833-1838.
- Meunier, P., Aaron, J., Edouard, C., and Vignon, G. (1971). Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clinical orthopaedics and related research* 80, 147-154.
- Meunier, P.J., Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S., Badurski, J.E., Spector, T.D., Cannata, J., Balogh, A., Lemmel, E.M., Pors-Nielsen, S., *et al.* (2004). The effects of strontium ranelate on

the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *The New England journal of medicine* 350, 459-468.

Meunier, P.J., Slosman, D.O., Delmas, P.D., Sebert, J.L., Brandi, M.L., Albanese, C., Lorenc, R., Pors-Nielsen, S., De Vernejoul, M.C., Roces, A., *et al.* (2002). Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 2060-2066.

Miller, P.D. (2011). A review of the efficacy and safety of denosumab in postmenopausal women with osteoporosis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 3, 271-282.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 263-273.

Neer, R.M., Arnaud, C.D., Zanchetta, J.R., Prince, R., Gaich, G.A., Reginster, J.Y., Hodsmann, A.B., Eriksen, E.F., Ish-Shalom, S., Genant, H.K., *et al.* (2001). Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine* 344, 1434-1441.

Noth, U., Osyczka, A.M., Tuli, R., Hickok, N.J., Danielson, K.G., and Tuan, R.S. (2002). Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 20, 1060-1069.

Nuttall, M.E., Patton, A.J., Olivera, D.L., Nadeau, D.P., and Gowen, M. (1998). Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13, 371-382.

Oddens, B.J. (1994). The climacteric cross-culturally: the International Health Foundation South-east Asia study. *Maturitas* 19, 155-156.

Ominsky, M.S., Vlasseros, F., Jolette, J., Smith, S.Y., Stouch, B., Doellgast, G., Gong, J., Gao, Y., Cao, J., Graham, K., *et al.* (2010). Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 948-959.

Pachman, D.R., Jones, J.M., and Loprinzi, C.L. (2010). Management of menopause-associated vasomotor symptoms: Current treatment options, challenges and future directions. *International journal of women's health* 2, 123-135.

Patel, L.R., Camacho, D.F., Shiozawa, Y., Pienta, K.J., and Taichman, R.S. (2011). Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol* 7, 1285-1297.

Pfeilschifter, J. (2001). [Hormone replacement and selective estrogen receptor modulators (SERMS) in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis]. *Der Orthopade* 30, 462-472.

- Podgorski, I. (2009). Future of anticashepsin K drugs: dual therapy for skeletal disease and atherosclerosis? *Future medicinal chemistry* 1, 21-34.
- Poole, K.E., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Lowik, C.W., and Reeve, J. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1842-1844.
- Powell, S.L., Godecke, T., Nikolic, D., Chen, S.N., Ahn, S., Dietz, B., Farnsworth, N.R., van Breemen, R.B., Lankin, D.C., Pauli, G.F., *et al.* (2008). In vitro serotonergic activity of black cohosh and identification of N(omega)-methylserotonin as a potential active constituent. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 11718-11726.
- Pruthi, S., Thompson, S.L., Novotny, P.J., Barton, D.L., Kottschade, L.A., Tan, A.D., Sloan, J.A., and Loprinzi, C.L. (2007). Pilot evaluation of flaxseed for the management of hot flashes. *Journal of the Society for Integrative Oncology* 5, 106-112.
- Qiu, S.X., Dan, C., Ding, L.S., Peng, S., Chen, S.N., Farnsworth, N.R., Nolte, J., Gross, M.L., and Zhou, P. (2007). A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNFalpha signaling pathways. *Chemistry & biology* 14, 860-869.
- Quella, S.K., Loprinzi, C.L., Barton, D.L., Knost, J.A., Sloan, J.A., LaVasseur, B.I., Swan, D., Krupp, K.R., Miller, K.D., and Novotny, P.J. (2000). Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: A North Central Cancer Treatment Group Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 1068-1074.
- Rai, M.F., and Sandell, L.J. (2011). Inflammatory mediators: tracing links between obesity and osteoarthritis. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 21, 131-142.
- Riggs, B.L., and Hartmann, L.C. (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *The New England journal of medicine* 348, 618-629.
- Riggs, B.L., Hodgson, S.F., O'Fallon, W.M., Chao, E.Y., Wahner, H.W., Muhs, J.M., Cedel, S.L., and Melton, L.J., 3rd (1990). Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine* 322, 802-809.
- Ringe (2001). Wo stehen die Fluoride in der Osteoporosetherapie. *Medical Tribune* 36, 1.
- Rodan, S.B., Imai, Y., Thiede, M.A., Wesolowski, G., Thompson, D., Bar-Shavit, Z., Shull, S., Mann, K., and Rodan, G.A. (1987). Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer research* 47, 4961-4966.
- Roodman, G.D. (2004). Mechanisms of bone metastasis. *Discovery medicine* 4, 144-148.
- Rosen, C.J., and Bilezikian, J.P. (2001). Clinical review 123: Anabolic therapy for osteoporosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 957-964.
- Rosen, C.J., and Bouxsein, M.L. (2006). Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nature clinical practice Rheumatology* 2, 35-43.

Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., *et al.* (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* *288*, 321-333.

Safe, S. (2001). Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitamins and hormones* *62*, 231-252.

Schilling, T., Noth, U., Klein-Hitpass, L., Jakob, F., and Schutze, N. (2007). Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Molecular and cellular endocrinology* *271*, 1-17.

Schultz, J.R., Petz, L.N., and Nardulli, A.M. (2005). Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta. *The Journal of biological chemistry* *280*, 347-354.

Seefried, L., Mueller-Deubert, S., Schwarz, T., Lind, T., Mentrup, B., Kober, M., Docheva, D., Liedert, A., Kassem, M., Ignatius, A., *et al.* (2010). A small scale cell culture system to analyze mechanobiology using reporter gene constructs and polyurethane dishes. *European cells & materials* *20*, 344-355.

Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Becker, T., Christoffel, V., and Wuttke, W. (2003). Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* *44 Suppl 1*, S39-50.

Seidlova-Wuttke, D., Stecher, G., Kammann, M., Haunschild, J., Eder, N., Stahnke, V., Wessels, J., and Wuttke, W. (2012). Osteoprotective effects of *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* *19*, 855-860.

Seidlova-Wuttke, D., Thelen, P., and Wuttke, W. (2006). Inhibitory effects of a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract on prostate cancer. *Planta medica* *72*, 521-526.

Shane, E., Burr, D., Ebeling, P.R., Abrahamsen, B., Adler, R.A., Brown, T.D., Cheung, A.M., Cosman, F., Curtis, J.R., Dell, R., *et al.* (2010). Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *25*, 2267-2294.

Shang, Y., and Brown, M. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* *295*, 2465-2468.

Shyu, J.F., Shih, C., Tseng, C.Y., Lin, C.H., Sun, D.T., Liu, H.T., Tsung, H.C., Chen, T.H., and Lu, R.B. (2007). Calcitonin induces podosome disassembly and detachment of osteoclasts by modulating Pyk2 and Src activities. *Bone* *40*, 1329-1342.

St Germain, A., Peterson, C.T., Robinson, J.G., and Alekel, D.L. (2001). Isoflavone-rich or isoflavone-poor soy protein does not reduce menopausal symptoms during 24 weeks of treatment. *Menopause* *8*, 17-26.

Stich, H.F., and Rosin, M.P. (1984). Naturally occurring phenolics as antimutagenic and anticarcinogenic agents. *Advances in experimental medicine and biology* 177, 1-29.

Stoch, S.A., and Wagner, J.A. (2008). Cathepsin K inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy. *Clinical pharmacology and therapeutics* 83, 172-176.

Takaoka, S., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M., and Sugimoto, T. (2010). The Calcium-sensing Receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 42, 627-631.

Theriault, R.L. (2012). Biology of bone metastases. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 19, 92-101.

Tice, J.A., Ettinger, B., Ensrud, K., Wallace, R., Blackwell, T., and Cummings, S.R. (2003). Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes: the Isoflavone Clover Extract (ICE) Study: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 290, 207-214.

Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-5121.

van Bezooijen, R.L., Roelen, B.A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., and Lowik, C.W. (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine* 199, 805-814.

Vandenput, L., and Ohlsson, C. (2009). Estrogens as regulators of bone health in men. *Nat Rev Endocrinol* 5, 437-443.

Weilbaecher, K.N., Guise, T.A., and McCauley, L.K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature reviews Cancer* 11, 411-425.

Westbroek, I., van der Plas, A., de Rooij, K.E., Klein-Nulend, J., and Nijweide, P.J. (2001). Expression of serotonin receptors in bone. *The Journal of biological chemistry* 276, 28961-28968.

Wuttke, W., Seidlova-Wuttke, D., and Gorkow, C. (2003). The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44 Suppl 1, S67-77.

Yadav, V.K., Balaji, S., Suresh, P.S., Liu, X.S., Lu, X., Li, Z., Guo, X.E., Mann, J.J., Balapure, A.K., Gershon, M.D., *et al.* (2010). Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nature medicine* 16, 308-312.

Yadav, V.K., Ryu, J.H., Suda, N., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Schutz, G., Glorieux, F.H., Chiang, C.Y., Zajac, J.D., Insogna, K.L., *et al.* (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 135, 825-837.

Yalin, S., Sagir, O., Comelekoglu, U., Berkoz, M., and Eroglu, P. (2012). Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model. *Pharmacological reports : PR* 64, 396-402.

Yavropoulou, M.P., and Yovos, J.G. (2008). Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 8, 204-216.

Yee, A.J., and Raje, N.S. (2012). Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients. *Clinical interventions in aging* 7, 331-338.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht der Knochenresorption- und Formation.....	9
Abbildung 2 Chemische Strukturen von $17\beta$ -Estradiol und Raloxifen .....	12
Abbildung 3 Übersicht über die chemischen Strukturen bei Osteoporose eingesetzten Bisphosphonaten .....	14
Abbildung 4 Wirkung von RANKL- Antikörper Denosumab auf den Knochenumsatz. ....	15
Abbildung 5 Traubensilberkerze ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ).....	20
Abbildung 6 Chemische Struktur von Actein .....	25
Abbildung 7 Hydroxizimtsäure und davon abgeleitete Derivate.....	26
Abbildung 8 Übersicht über die Wirkung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und antioxidative Enzymen....	27
Abbildung 9 Chemische strukturen von 5-Hydroxytryptamin und N-methylserotonin .....	28
Abbildung 10 Vektorkarte von pGL4.14[luc 2/Hygro] .....	35
Abbildung 11 Fraktionierungsprozess von <i>Cimicifuga racemosa</i> .....	42
Abbildung 12 Bioreaktor mit eingespannter Polyurethanschale.....	58
Abbildung 13 Liniendiagramm der Apoptosemessungen aus Tabelle 7 zur Darstellung der unterschiedlichen Wirkkomponenten auf hMSC mit den Extrakten C001 und deren Subfraktionen nach 72 h Inkubation. ....	62
Abbildung 14 GPx-Aktivität von hMSC-TERT-Zellen mit und ohne Selen pro mg Protein im Vergleich zur Kontrolle ohne Selen (=100 %). ....	70
Abbildung 15 Bestimmung der GPx-Aktivität in SaOS-2-Zellen nach Behandlung mit C001/S (0, 1, 10, 100 ng/ml) für 72 h pro mg Protein mit und ohne Selen bezogen auf unbehandelte Zellen (Kontrolle = 100 %) in % .....	70
Abbildung 16 TrxR-Aktivität von hMSC-TERT-Zellen mit und ohne Selen pro mg Protein im Vergleich zur Kontrolle ohne Selen (=100 %). ....	71
Abbildung 17 Bestimmung der TrxR-Aktivität in SAOS-2-Zellen nach Behandlung mit C001/S (0, 1, 10, 100 ng/ml) für 72 h pro mg Protein mit und ohne Selen bezogen auf unbehandelte Zellen (Kontrolle = 100 %) in % .....	71
Abbildung 18 Balkendiagramm der Bestimmung der Kumulativen Populationsverdopplung von C001, C001/S und C001/R auf hMSC mit n=3. ....	72
Abbildung 19 Liniendiagramm der Bestimmung der Kumulativen Populationsverdopplung von C001, C001/S und C001/R auf hMSC mit n=3. ....	73
Abbildung 20 Genexpressionsmuster von PSG5 im Verlauf der in vitro-Alterung in hMSC mit Extrakt von drei hMSC-Populationen. ....	74
Abbildung 21 Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderung von PSG5 im Verlauf der in vitro-Alterung von drei hMSC-Populationen inkubiert mit Extrakt (1000 ng/ml).....	75
Abbildung 22 Genexpressionsmuster von P16 im Verlauf der in vitro-Alterung in hMSC mit Extrakt von drei hMSC-Populationen. ....	76
Abbildung 23 Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderung von P16 im Verlauf der in vitro-Alterung von drei hMSC-Populationen inkubiert mit Extrakt (1000 ng/ml).....	77

Abbildung 24 P16-Promotoranalysen in HEK-293-Zellen (n=4) mit Extrakten von <i>Cimicifuga racemosa</i> nach 48 h nach transienter Transfektion. ....	78
Abbildung 25 Transdifferenzierungsstudien an drei hMSC-Populationen mit zwei Konzentrationen von C001 und zwei unterschiedlichen Zugabezeitpunkten. ....	80
Abbildung 26 Transdifferenzierungsstudien an drei hMSC-Populationen mit zwei Konzentrationen von C001/S und zwei unterschiedlichen Zugabezeitpunkten. ....	81
Abbildung 27 Transdifferenzierungsstudien an drei hMSC-Populationen mit zwei Konzentrationen von C001/R und zwei unterschiedlichen Zugabezeitpunkten. ....	81
Abbildung 28 Adipogene Differenzierung von hMSC mit Gesamtextrakt C001 (A), C001/S (B), S2 (C), C001/R (D) und R3 (E) mit je 1-1000 ng/ml Extrakt. ....	84
Abbildung 29 Adipogene Differenzierungsstudien an drei hMSC-Populationen mit ausgewählten Extrakten von <i>Cimicifuga racemosa</i> . ....	85
Abbildung 30 Relative Genexpression von Fettmarkern (FABP4: fatty acid binding protein 4 und PPAR $\gamma$ 2: peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ 2) nach Inkubation von drei verschiedenen hMSC-Populationen mit Extrakten von <i>Cimicifuga racemosa</i> (1000 ng/ml) und den anteilig enthaltenen Subfraktionen S1, S2, S3, R1, R2 und R3 nach 24 h Inkubation. ....	86
Abbildung 31 Adipogene Differenzierung von hMSC mit Gesamtextrakt C001 und den anteilig enthaltenen Fraktionen C001/S (27 %) und C001/R (76 %). ....	87
Abbildung 32 Adipogene Differenzierungsstudien an drei hMSC-Populationen mit Gesamtextrakt C001 und den anteilig enthaltenen Fraktionen C001/S (27 %) und C001/R (73 %). ....	88
Abbildung 33 Osteogene Differenzierung von hMSC mit Gesamtextrakt C001 (A), C001/S (B), S2 (C), C001/R (D) und R3 (E) mit je 1-1000 ng/ml Extrakt. ....	90
Abbildung 34 Osteogene Differenzierungsstudien an drei hMSC-Populationen mit ausgewählten Extrakte von <i>Cimicifuga racemosa</i> . ....	91
Abbildung 35 Relative Genexpression von Knochenmarkern (OPG: Osteoprotegerin; RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; ALP: Alkaline Phosphatase; OC: Osteocalcin; OP: Osteopontin; SOST: Sclerostin) nach Inkubation von drei verschiedenen hMSC-Populationen mit Extrakte von <i>Cimicifuga racemosa</i> (1000 ng/ml) und den anteilig enthaltenen Subfraktionen S1, S2, S3, R1, R2 und R3 nach 24 h Inkubation. ....	92
Abbildung 36 Osteogene Differenzierung von hMSC mit Gesamtextrakt C001 und den anteilig enthaltenen Fraktionen C001/S (27 %) und C001/R (76 %). ....	93
Abbildung 37 Osteogene Differenzierungsstudien an zwei hMSC-Populationen mit Gesamtextrakt C001 und den anteilig enthaltenen Fraktionen C001/S (27 %) und C001/R (73 %). ....	93
Abbildung 38 Osteogene Differenzierungsstudien an drei SAOS-2-Passagen mit ausgewählten Extrakten von <i>Cimicifuga racemosa</i> . ....	94
Abbildung 39 Osteogene Differenzierungsstudien an drei SAOS-2-Passagen mit ausgewählten Extrakten von <i>Cimicifuga racemosa</i> . ....	95
Abbildung 40 Relative Genexpression von Knochenmarkern (cbfa1: core-binding factor subunit alpha-1; DKK1: dickkopf homolog 1; ALP: alkaline phosphatase; Osx: osterix; OP: Osteopontin; DMP1: dentinmatrix acidic	

<i>phosphoprotein 1; SOST: Sclerostin; OPG: osteoprotegerin; RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) nach Inkubation von drei verschiedenen SAOS-2-Passagen mit Extrakten von Cimicifuga racemosa (1000 ng/ml) für 24 h. ....</i>	97
<i>Abbildung 41 Relative Genexpression von Knochenmarkern (cbfa1: core-binding factor subunit alpha-1; DKK1: dickkopf homolog 1; ALP: alkaline phosphatase; Osx: osterix; OP: Osteopontin; DMP1: dentinmatrix acidic phosphoprotein 1; SOST: Sclerostin; OPG: osteoprotegerin; RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) nach Inkubation von drei verschiedenen SAOS-2-Passagen mit Extrakten von Cimicifuga racemosa (1000 ng/ml) für 72h. ....</i>	99
<i>Abbildung 42 Mechanosensitivität vom SP1-Element in hMSC-TERT-Zellen mit Extrakten von Cimicifuga racemosa. ....</i>	101
<i>Abbildung 43 Mechanosensitivität vom SP1-Element in hMSC-TERT-Zellen mit Extrakten von Cimicifuga racemosa. ....</i>	102
<i>Abbildung 44 Mechanosensitivität vom AP1-Element in hMSC-TERT-Zellen mit Extrakten von Cimicifuga racemosa. ....</i>	103
<i>Abbildung 45 Mechanosensitivität vom AP1-Element in hMSC-TERT-Zellen mit Extrakten von Cimicifuga racemosa. ....</i>	104
<i>Abbildung 46 Venn-Diagramm der Mikroarray-Analyse zur differentiellen Genexpression in hMSC mit 10 nM C001 für 24h im Vergleich zu unbehandelten hMSC. ....</i>	105
<i>Abbildung 47 Technische Evaluierung der Comparison-Analyse von 10 nM C001 auf hMSC nach 24 h Inkubation. ....</i>	107
<i>Abbildung 48 Venn-Diagramm der Mikroarray-Analyse zur differentiellen Genexpression in hMSC mit 1000 ng/ml C001/S für 24 h im Vergleich zu unbehandelten hMSC. ....</i>	108
<i>Abbildung 49 Technische Evaluierung der SAM-Analyse von 1000 ng/ml C001/S auf hMSC nach 24 h Inkubation. ....</i>	110
<i>Abbildung 50 Heatmap der SAM-Analyse von 1000 ng/ml C001 auf hMSC für 24 h. ....</i>	111
<i>Abbildung 51 Fraktionierungsübersicht des Spezialextraktes C001. ....</i>	113

## 8.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Übersicht über Grunderkrankungen bei sekundärer Osteoporose</i> .....	6
<i>Tabelle 2 Liste der verwendeten Primer für semi-quantitative PCR</i> .....	33
<i>Tabelle 3 Liste der verwendeten Primer für quantitative PCR</i> .....	34
<i>Tabelle 4 Standardbedingungen für semi-quantitative PCR im Thermocycler</i> .....	45
<i>Tabelle 5 Bedingungen für quantitative PCR</i> .....	46
<i>Tabelle 6 Zusammensetzung des Transfektionsgemischs für die Transfizierung des pGL4.14-Vektors</i> .....	56
<i>Tabelle 7 Apoptose- und Proliferationsdaten von hMSC mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml)</i> .....	60
<i>Tabelle 8 Apoptose- und Proliferationsmessungen in hMSC mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml anteilig)</i> .....	60
<i>Tabelle 9 Apoptose- und Proliferationsmessungen in hMSC mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 µg/ml)</i> .....	61
<i>Tabelle 10 Apoptose- und Proliferationsmessungen in LNCaP mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml)</i> .....	63
<i>Tabelle 11 Apoptose- und Proliferationsmessungen in LNCaP mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml anteilig)</i> .....	63
<i>Tabelle 12 Apoptose- und Proliferationsmessungen in MCF7 mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml)</i> .....	64
<i>Tabelle 13 Apoptose- und Proliferationsmessungen in MCF7 mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml anteilig)</i> .....	64
<i>Tabelle 14 Apoptose- und Proliferationsmessungen in MDA-MB-231 mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml)</i> .....	65
<i>Tabelle 15 Apoptose- und Proliferationsmessungen in MDA-MB-231 mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml anteilig)</i> .....	65
<i>Tabelle 16 Apoptose- und Proliferationsmessungen in SAOS-2 mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml)</i> .....	66
<i>Tabelle 17 Apoptose- und Proliferationsmessungen in mc3t3-e1 mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml)</i> .....	67
<i>Tabelle 18 Apoptose- und Proliferationsmessungen in RAW mit fraktionierten und gereinigten Pflanzenextrakten von Cimicifuga racemosa (1-1000 ng/ml)</i> .....	68

## 8.3 Formelverzeichnis

<i>Formel 1 Berechnung der primerspezifischen Schmelztemperatur mit der Wallace-Regel .....</i>	<i>44</i>
<i>Formel 2 Effizienz-korrigiertes relatives Quantifizierungsmodell.....</i>	<i>46</i>
<i>Formel 3 Vereinfachtes Effizienz-korrigiertes Quantifizierungsmodell .....</i>	<i>46</i>
<i>Formel 4 Berechnung der Effizienz aus der Steigung m der Standardkurve.....</i>	<i>47</i>
<i>Formel 5 Berechnung der Populationsverdopplung.....</i>	<i>52</i>

## 8.4 Publikationen und Kongressbeiträge

### Originalarbeiten:

Benisch P, Schilling T, Klein-Hitpass L, Frey SP, Seefried L, Raaijmakers N, Krug M, Regensburger M, Zeck S, Schinke T, Amling M, Ebert R, Jakob F. The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. *PLoS One*. 2012;7(9):e45142. doi: 10.1371/journal.pone.0045142. Epub 2012 Sep 24.

### Übersichten:

Schilling T, Ebert R, Raaijmakers N, Schütze N, Jakob F. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012 Dec 20. doi:prii: S0960-0760(12)00266-X. 10.1016/j.jsbmb.2012.12.006

Jakob F, Benisch P, Klotz B, Seefried L, Mentrup B, Raaijmakers N, Ebert R, Hofbauer LC. Sexualsteroid in der Homöostase des Knochens (Sex steroids in bone homeostasis). *Osteologie/Osteology* 2/2010:105-110

### Abstrakte und Posterpräsentationen:

Raaijmakers N., Schneider D., Hetzer D., Ebert R., Jakob F. (2011) Bestimmung der Apoptose und Proliferation von hMSC, MCF7, MDA und LNCaP nach Inkubation mit *Cimicifuga racemosa*. *Osteologie* 20 (Suppl. 1), P61

Raaijmakers N., Schneider D., Haunschild J., Hiller C., Ebert R., Jakob F. (2012) Differenzierungsstudien in hMSC und SAOS-2 Zellen nach Stimulierung mit Extrakten aus *Cimicifuga racemosa*. *Osteologie* 21 (1), A 27.

Raaijmakers N., Schneider D., Haunschild J., Hiller C., Ebert R., Jakob F. (2012) Differentiation studies in human mesenchymal stem cells and SAOS-2 cells after stimulation with extracts of *Cimicifuga racemosa*. *Bone* 50 (Suppl. 1), S81.

### Patent:

European Patent Application EP2545932: Intelmann, D.G.-E.-S., 6020 Innsbruck, AT), Schuh, Markus (Rilkestrasse 15, 90419 Nürnberg, DE), Stecher, Guenther (Oberer Feldweg 30, 6091 Götzens, AT), Abel, Gudrun (Veilchenweg 5, 91301 Forchheim, DE), Jakob, Franz (Adalbert-Stifter-Weg 6, 97082 Würzburg, DE), Ebert, Regina (Dürerweg 1, 97241 Bergtheim, DE), Wuttke, Wolfgang (Domäne 8, 37120 Bovenden, DE), Seidlovà-Wuttke, Dana (Domäne 8,

37120 Bovenden, DE),, Selected cimicifuga fractions for treating osteoporosis. 2013, Bionorica, SE (Kerschensteinerstrasse 11 -15, 92318 Neumarkt, DE)

In Vorbereitung:

Schuh, M., et al., The detailed chemical characterisation of the special extract BNO 1055 from *Actaea racemosa* L.. *Planta Medica* 2013

Schuh, M., Doktorarbeit „Umfassende Inhaltsstoffprofilierung von *Actaea*-Drogen/Zubereitungen, präparative Herstellung von Fraktionen sowie Isolierung, Nachweis und Bioverfügbarkeit von lead substances in Zusammenhang mit in vivo und in vitro Studien mittels hoch auflösender state-of-the-art Methoden“, 2013

## 8.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herr Prof. Dr. Jakob für die Überlassung des Themas sowie die geschätzten Ratschläge und Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit. Sehr geschätzt habe ich auch die gegebene Möglichkeit viele nationale und internationale Kongresse besuchen und meine Arbeit dort präsentieren zu dürfen. Vielen Dank für die Betreuung in den letzten Jahren und das Vertrauen darin, dass ich diese Arbeit tatsächlich zu Ende bringe.

Bei Frau Prof. Dr. Högger möchte ich mich herzlichst für die Übernahme der Zweitbegutachtung bedanken.

Ein weiterer Dank gilt der Firma Bionorica SE für die Bereitstellung des durchaus interessanten Themas und der fortwährenden Begleitung während der letzten Jahre. In diesem Sinne möchte ich mich auch bei unserem zweiten Projektpartner aus Göttingen, Herr und Frau Prof. Wuttke, sehr herzlichst bedanken, für die anregenden Diskussionen und wertvollen Ratschlägen.

Hervorheben möchte ich noch PD Dr. Regina Ebert. Vielen, vielen Dank für Deine tollen Ratschläge und Deine unermüdliche Korrektur meiner Arbeit.

Natürlich könnte ich hier jeden Einzelnen auflisten, aber ich denke, jedem ist bewußt, das eine Arbeit, wie sie hier vorgelegt wurde, nur durch die Unterstützung eines tollen Teams, von Laborkollegen über Sekretariat bis hin zum gesamtem KLH-Personal, möglich ist. Also hiermit an Alle: Vielen Dank für Eure Unterstützung und für die angenehme Zeit!!!

Und auch meinem privaten Umkreis vielen lieben Dank. Allen voran meiner Familie und meinem Freund für das stetige Vertrauen und die Ermutigung nicht aufzugeben. Danke xxx.

