



universität
wien

DIPLOMARBEIT

AKTIVATOREN DER PREGNAN-X- UND RETINOID-X-
REZEPTOREN: EINFLUSS AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT
VON PACLITAXEL IN OSTEOSARKOMZELLINIEN

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Iris Christina Kubik
Matrikel-Nummer:	0002355
Studienrichtung:	Pharmazie (A-449)
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger

Wien, im November 2008

DANKSAGUNG

Diese Diplomarbeit entstand im Zeitraum März bis Juli 2007 am Institut für Pathophysiologie des AKH Wien (Vorstand: Univ. Prof. DDr. Meinrad Peterlik) in Zusammenarbeit mit dem Department für klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien (Leiter: Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger).

Zu aller erst möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger (Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien) bedanken. Durch ihn war es mir erst möglich die Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe am AKH durchzuführen.

Ein besonders großes Dankeschön geht an Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Theresia Thalhammer (Institut für Pathophysiologie, AKH Wien) für ihre Unterstützung und freundliche Betreuung.

Bei Herrn Mag. Martin Svoboda bedanke ich mich für die Betreuung bei der praktischen Arbeit und seiner großen Hilfsbereitschaft.

Meiner Freundin und Kollegin Frau Mag. Caroline Gouhaneh möchte ich besonders danken für die unvergessliche Zeit während der Zusammenarbeit im Rahmen dieser Diplomarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Familie, die mich während des Studiums liebevoll unterstützt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

1. PROBLEMSTELLUNG	3
2. EINLEITUNG	5
2.1. Aufbau der Knochen	5
2.2. Knochtumoren	6
2.3. Tumore des Knochens	9
2.3.1. Knochenbildende Tumoren.....	10
2.3.2. Knorpelbildende Tumoren.....	11
2.3.3. Knochenmarktumoren	12
2.3.4. Bindegewebige und bindegewebsbildende Tumoren	12
2.3.5. Sonstige Tumoren	13
2.3.6. Tumorähnliche Knochenläsionen („tumor-like lesions“).....	13
2.4. Chemotherapie maligner Erkrankungen.....	17
2.5. Chemotherapie der Knochtumoren.....	17
2.6. Ausscheidung von Zytostatika über ABC-Transportproteine	19
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Zellkultur	24
3.1.1 Verwendete Zelllinien.....	24
3.1.2 Kultivierung der Zellen.....	24
3.2 RNA-Isolierung	25
3.2.1 Isolierung der RNA aus einem Zellysat.....	26
3.2.2 RNA-Präzipitation	26
3.2.3 Vermessung und Berechnung des RNA-Gehalts.....	27

3.3 Reverse Transkription (RT).....	27
3.3.1 Durchführung der reversen Transkription	28
3.4 Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR).....	29
3.4.1 Durchführung.....	30
3.4.2 Detektion der PCR-Produkte	31
3.4.3 Quantitative TaqMan PCR.....	32
3.5 Zytotoxizitätstest	34
3.5.1 Durchführung des CCK-8 Zytotoxizitätskits.....	35
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	36
4.1. Einfluss von Dexamethason auf die Zytotoxizität von Paclitaxel in Osteosarkomzellen	36
4.2. Einfluss von Rifampicin auf die Zytototizität von Paclitaxel in Osteosarkomzellen	39
4.3. Wirkung von 9-cis-Retinolsäure auf die Toxizität von Paclitaxel in Osteosarkomzellen	41
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	45
7. LEBENSLAUF.....	52

1. PROBLEMSTELLUNG

Krebs ist heute eine der häufigsten Todesursachen und die Zahl der Krebserkrankungen nimmt ständig zu. Dies liegt darin begründet, dass maligne Tumoren vor allem eine Erkrankung des höheren Lebensalters darstellen und die Anzahl der älteren Menschen in den westlichen Industrieländern immer mehr zunimmt. Allerdings gibt es auch maligne Tumoren, die vor allem im jugendlichen Alter auftreten. Dazu gehört das Osteosarkom, das der häufigste maligne Knochentumor bei Jugendlichen ist.

Obwohl viele Fortschritte und Weiterentwicklungen im diagnostischen und therapeutischen Bereich erreicht wurden, sind die Heilungschancen für das Osteosarkom gering und die Therapie ist äußerst schwierig.

Ein wichtiges Problem ist die „Multidrug Resistance“ auch Vielfachresistenz genannt (MDR) der Osteosarkomzelllinien. Dabei werden die Tumorzellen nicht nur gegen das selektionierende Zytostatikum, sondern sie werden auch gegenüber einer Vielzahl von strukturell und funktionell unterschiedlichen Verbindungen resistent. Dies erklärt, warum diese Tumorerkrankungen nur schlecht auf die Behandlung mit Zytostatika ansprechen.

Die Ursache der MDR ist ein vermehrter Export von zytostatisch wirksamen Verbindungen aus der Zelle, wodurch eine zu geringe intrazelluläre Konzentration des Zytostatikums in der Zelle vorliegt. Dadurch bleibt die zytotoxische Wirkung aus und die Zellen überleben.

Für den Export sind Membrantransportproteine (MDR-Transporter) verantwortlich, deren Expression durch den nukleären Pregnan-X-Rezeptor (PXR) reguliert werden. Eine verminderte Expression dieser Efflux-Pumpen könnte zu einer Aufhebung der MDR führen.

Der Pregnan- X- Rezeptor (PXR) spielt eine zentrale Rolle bei der Antwort des Körpers auf toxische Xenobiotika und endogenen Metaboliten. Als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor reguliert er alle Stadien des xenobiotischen Metabolismus und Transports. PXR wird von einer großen Zahl an endogenen und exogenen Chemikalien einschließlich Steroide, Antibiotika, Antimykotika, Gallensäuren und Inhaltsstoffen aus Johanniskraut aktiviert. Daher sollte in dieser Diplomarbeit überprüft werden, ob die Toxizität des Zytostatikums Paclitaxel durch Aktivierung des Pregnan-X-Rezeptors beeinflusst wird. Als PXR-

Aktivatoren dienen das Glukokortikoid Dexamethason und das Chemotherapeutikum Rifampicin.

Da PXR als Heterodimer mit 9-cis Retinoidsäurerezeptor (RXR) bindet und dieser PXR/RXR- Komplex durch RXR-Agonisten wie 9-cis-Retinolsäure aktiviert wird, sollte in dieser Diplomarbeit auch untersucht werden, welche Bedeutung 9-cis-Retinolsäure für die MDR der Osteosarkomzellen hat.

Das Wissen über die Wirkungen der PXR-Aktivatoren auf die MDR der Tumorzellen würde es erlauben, Liganden auszuwählen, die die Mechanismen, die zur MDR führen, selektiv beeinflussen können. Diese Studien sollten neue Wege aufzeigen, die zu einer Verbesserung der Wirksamkeit der Chemotherapie führen könnten.

2. EINLEITUNG

2.1. Aufbau der Knochen

Knochen bestehen aus einem komplexen Bindegewebe, das eine hohe strukturelle Stabilität besitzt. Sie sind das sind das einzige Gewebe, das einer kontinuierlichen Umgestaltung mit ständigem Abbau und gleichzeitiger Regeneration unterworfen ist. Der Knochen besitzt verschiedene Aufgaben im Organismus; einerseits hat er die Funktion eines **Stützgewebes**, das für den Schutz und die Bewegungen unseres Körpers verantwortlich ist, andererseits **speichert** er Phosphat- und Kalzium-Ionen. Darüber hinaus beherbergt der Knochen das **Knochenmark** als Stätte der Blutbildung (Löffler, Petrides, 1998).

Der Knochen besteht aus Knochen-aufbauenden Osteoblasten, die sich aus den Prä-Osteoblasten zu reifen **Osteoblasten**, Osteozyten und den sog. „lining cells“ entwickeln, und die den Knochen-abbauenden, vielkernigen **Osteoklasten**. Kollagene, Glykosaminoglykane und Chondroitinsulfat bilden die organische Matrix. Das anorganische Knochenmineral setzt sich vorwiegend aus Calcium und Phosphat zusammen, die Verbindungen, ähnlich dem **Hydroxyapatit** bilden. Für die Osteogenese ist durch zahlreiche Gewebefaktoren wie z.B. Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor (GM-CSF) reguliert. Zum Beispiel sind auch die „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) an der Regulation des Knochenbaus entscheidend beteiligt (Cheng, 2003).

Zu einem verstärkten **Abbau** des Knochens kommt es zum Beispiel bei fehlender mechanischer Beanspruchung durch Immobilisierung eines Gelenkes und auch im Alter, wo der Schwund der Knochenmasse bei der Osteoporose ein großes therapeutisches Problem darstellt (Pietschmann et al., 2008).

Beispiele für regulatorische Faktoren im Knochenbau:

Osteoklasten-aktivierenden Faktor (OAF)

Der lokalisierte Abbau des Knochens kann durch den Gewebefaktor wie den Osteoklasten-aktivierenden Faktor (OAF) stimuliert werden. Dies kann zur Entmineralisierung der Knochen führen, wenn OAF z.B. vermehrt in osteoklastischen Tumoren gebildet wird (Silbernagl, Lang, 1998).

„Bone Sialoprotein“ (BSP)

Das „Bone Sialoprotein“ ist ein mineralisiertes, gewebsspezifisches, nichtkollagenes Protein, das glykosyliert, phosphoryliert und sulfatiert ist. Bone Sialoprotein schützt die Zellen vor zellulärer Lyse und hat eine angiogenetische Kapazität. „Bone-Sialoproteine“ sind für die Differenzierung der Osteoblasten, der Knochen–Matrix-Mineralisation und Tumormetastasierung wichtig. Es wird in Brust-, Lungen-, Schilddrüsen- und Prostatakrebs exprimiert, die im Knochen Metastasen bilden. Daher kann die Expression des „Bone Sialoproteins“ die metastatischen Zellen in der Angiogenese unterstützen und die Invasion erleichtern.

„Epidermal Growth-Factor“ (EGF) führt zu einer „Down-Regulation“ der osteoblastischen Zelldifferenzierung und inhibiert die Expression des Bone Sialoproteins.

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) unterdrückt die Gen-Transkription von „Bone-Sialoprotein“ (Ogata, 2007).

2.2. Knochentumoren

Tumorigenese

Der Aufbau von Geweben und die dafür erforderlichen unterschiedlichen Zellarten entstehen aus undifferenzierten Zellen, die als Stammzellen fungieren. Stammzellen haben die Fähigkeit, sich zu unterschiedlichen Zellen zu entwickeln und sich unbegrenzt zu teilen. Es besteht ein Fließgleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung der Zellen einerseits und dem programmierten Zelltod der reifen Zellen durch **Apoptose** andererseits, d.h. die Anzahl der neu produzierten Zellen gleicht genau der der abgebauten Zellen. Bei Störungen dieses Gleichgewichtes übersteigt die Zahl der neugebildeten Zellen die der abgebauten Zellen. Die überschüssig entstandenen Zellen können sich gelegentlich oder ständig, ganz oder auch partiell der Regulation entziehen: die Konsequenz sind **benigne** (gutartige) **Tumoren** oder **maligne** (bösartige) **Tumoren**. Meist geht mit einer gesteigerten Proliferation auch ein Unvermögen zur Differenzierung einher. Daher ist nicht nur eine Hemmung der Proliferation, sondern auch eine Induktion der Differenzierung das Ziel vieler Therapieausgangspunkte. Es wird zwischen **Sarkomen** und **Karzinomen** unterschieden, abhängig davon ob die Tumoren von

Mesenchym- oder Epithelzellen entstammen. **Leukämien** sind Tumoren der Blut bildenden Zellen. Ein Tumor entsteht aus *einer* neoplastisch veränderten Zelle und stellt damit die Ausgangszellen für einen Zellklon dar (Löffler, Petrides, 1998).

An der Krebsentstehung sind Veränderungen an Genen beteiligt, die die Zellproliferation regulieren (Yarbro, 1992).

Es werden zwei Arten solcher Gene unterschieden:

Onkogene, die zu einer ständigen Proliferation von Krebszellen führen (Klein, 2000).

Anti-Onkogene bzw. Anti-Onkoproteine hemmen die Tumorentstehung und werden deshalb auch als Tumor-Suppressorgene bezeichnet: Die Anti-Onkoproteine **Rb 105** und **p53** werden in der Zellzyklusregulation beim Übergang von der G1- in die S-Phase benötigt. Als Folge auf eine DNA-Schädigung wird die p53-Konzentration erhöht. Daher werden mehrere Transkriptionsfaktoren verstärkt synthetisiert. Der Übergang in die S-Phase kann nicht verhindert werden, wenn p53 mutiert ist, was bei nahezu der Hälfte der menschlichen Tumoren der Fall ist. Das Tumor-suppressor Protein p53 ist ein stark wirksamer Induktor der Apoptose (Kitagaki et al., 2008).

An der Tumorentstehung treten folgende Änderungen der Zellphysiologie auf:

1. „Self-sufficiency in Growth Signals“ („Unabhängigkeit von der Produktion der Wachstumsfaktoren“)

Normale Zellen benötigen Wachstumssignale („Growth Signals“, GS), um vom Ruhezustand in den aktiven proliferierenden Zustand zu wechseln. Diese Signale werden von transmembranären Rezeptoren in die Zelle übertragen, welche spezifisch für Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Adhäsions- bzw Interaktionsmoleküle sind. In Abwesenheit solcher Signale sind normale Zellen nicht zur Proliferation befähigt. Tumorzellen hingegen können eigene Wachstumsfaktoren produzieren.

2. „Insensitivity to Growth-Inhibitory (antigrowth) Signals“ (Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmern)

Wachstumshemmende Signale sind in der Lage, die Proliferation auf zwei Arten zu blockieren: Zellen können gezwungen werden, vom aktiven proliferierenden Zyklus in die Ruhephase (G0) oder aber ins postmitotische Stadium überzutreten. Krebszellen umgehen diese Wachstumshemmung.

3. “Evasion of Programmed Cell Death (Apoptosis)” (Umgehung der Apoptose)

Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod und, genauso wie die Zellteilung, ein präzise gesteuerter physiologischer Mechanismus. Sie nützt der Eliminierung überschüssiger Zellen bei der Embryonalentwicklung, der Adaption des Gewebes an sich ändernde Begebenheiten, sowie der Entfernung schädlicher Zellen, wie etwa virusbefallener Zellen oder Tumorzellen. Liganden der Tumornekrose-Faktor-Familie (TNF) besitzen die Möglichkeit den Zelltod auszulösen (Wallach et al., 1996).

4. „Limitless Replicative Potential” (uneingeschränktes Replikationspotential)

Ein wichtiges Element der Zellgenerationsregulation sind die Telomere (Hanahan et al., 2000). Die Enden der Chromosomen bestehen aus spezifischen DNA-Sequenzen, den sog. **Telomeren**, mit der sich etwa 1000fach wiederholenden Basenfolge TTAGGG. Bei jeder DNA-Replikation verkürzen sich die Telomeren, bei kritischer Verkürzung wird die Zellteilung unmöglich, und die gealterte Zelle mit kurzen Telomeren stirbt beim Versuch einer erneuten Teilung (Mutschler et al., 2001).

Die Erhaltung der Telomere ist für alle malignen Zellen charakteristisch, welche durch Überexpression der Telomerase reguliert wird. Durch die Telomerase werden Hexanucleotide an die Enden der telomeren DNA angeknüpft (Hanahan et al., 2000).

5. „Sustained Angiogenesis“ (Aufrechterhalten der Angiogenese)

Sauerstoff und Nährstoffe, welche vom Blutgefäßsystem bereitgestellt werden, sind ausschlaggebend für die Funktion und das Überleben der Zellen. Ist ein Gewebe während der Organogenese gebildet, wird das Wachstum neuer Blutgefäße, also der Angiogenese, vermindert. Proliferierende Zellen im Gewebe besitzen die intrinsische Aktivität das Wachstum der Blutgefäße anzuregen.

6. „Tissue Invasion and Metastasis“ (Gewebe-invasion/einbruch und Metastasierung)

Vom primären Tumor gehen Zellen ab, die in umgebende Gewebe eintreten. Diese entfernten Ansiedelungen werden auch Metastasen genannt (Hanahan et al., 2000).

Metastasen sind für 90% der Letalität von KrebspatientInnen verantwortlich (Qiao et al., 2008).

Voraussetzung für Invasion und Metastasierung sind mehrere aufeinander abgestimmte Abläufe. Hierbei sind positive und negative regulatorische Faktoren wichtig. Die genetischen Veränderungen haben eine Beeinträchtigung der Proliferation zur Folge. Das fehlgesteuerte Wachstum alleine löst allerdings nicht Invasion und Metastasierung aus, d.h. diese Prozesse benötigen zusätzliche genetische Abweichungen.

Invasion und Metastasierung kommen durch Proteine zustande, die die Anhaftung von Tumorzellen an zelluläre oder extrazelluläre Matrixbestandteile des Wirtes fördern, die die Proteolyse von Wirtsbarrieren wie z.B. Basalmembranen durch Tumorzellen stimulieren, die die Tumorzellfortbewegung unterstützen und die die Proliferation im Zielorgan der Metastasierung ermöglichen (Löffler, Petrides 1998).

2.3. Tumore des Knochens

Primäre Knochen- und Weichteiltumore

Primäre Geschwülste und auch geschwulstähnliche Läsionen im Knochen sind im Vergleich zu degenerativen und metastatischen Läsionen am Skelett äußerst selten. Die zeitliche Verzögerung zwischen dem Beginn der klinischen

Symptomatik und der endgültigen Diagnose ist immer noch nicht ausschlaggebend kürzer geworden, sie liegt zum Beispiel beim Osteosarkom immer noch zwischen 1 und 8 Monaten. Besonders bösartige primäre Knochentumore werden daher selten und oft sehr spät diagnostiziert.

Wesentlich verbessert haben sich dagegen diagnostischen Möglichkeiten, sowohl was die histologischen als auch die radiologischen Diagnosemöglichkeiten betrifft. Verbessert haben sich auch die therapeutischen Möglichkeiten und damit verbessert sich auch die Prognose der primären malignen Knochentumoren (Freyschmidt, 2003).

2.3.1. Knochenbildende Tumoren

Benigne Läsionen

Osteom

Das Osteom ist eine langsam wachsende Läsion und besteht aus hochdifferenziertem reifem Knochengewebe mit vorwiegend lamellärer Struktur; es tritt häufig in der Stirnhöhle auf (Greenspan, 2000). Manchmal findet es sich auch an den Kieferknochen. Osteome treten üblicherweise bei Kindern und jungen Erwachsenen zwischen 10 und 30 Jahren auf, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Aschero et al., 2008).

Maligne Läsionen

Osteosarkom

Primär befinden sich Osteosarkome häufig im Kniegelenk, im Oberschenkelknochen und im Schienbein. Mutationen der Rb- und p53-Tumorsuppressoren sind an der Entstehung von Osteosarkom beteiligt (Berman et al., 2008).

Osteosarkome und Ewing-Sarkome sind die zwei häufigsten Konchensarkome bei Kindern. Sie machen 2-5 % aller Tumorerkrankungen während des Kindesalters aus. (Ilic et al., 2004)

Osteosarkome bei Jugendlichen sind meist an Bereichen mit raschem Knochenwachstum lokalisiert (Tang et al., 2008).

Behandlung des pädiatrischen Osteosarkoms der Extremitäten:

Obwohl das Osteosarkom die häufigste primäre maligne Knochenerkrankung in der Kindheit ist, wurden erst kleine Fortschritte in den letzten 10 Jahren bezüglich der Überlebensrate erzielt. Unbehandeltes Osteosarkom fordert die Leben von mehr als 80 % der PatientInnen ein. Der erste Fortschritt bestand in der Behandlung mit adjuvanter postoperativer Chemotherapie, wobei die Überlebensrate von 40 % auf 50 % anstieg.

Eine der Herausforderungen der präoperativer Chemotherapie war das Bestreben, die Tumornekrose vor dem chirurgischen Eingriff vorherzusagen (Wilkins et al., 2003).

2.3.2. Knorpelbildende Tumoren

Benigne Läsionen

Osteochondrom

Diese sind von allen benignen Knochentumoren am bekanntesten und sind Auswüchse aus dem Knochen. Der typische Sitz von Osteochondromen ist die Metaphyse der langen Röhrenknochen. Die meisten bisher beobachteten strahleninduzierten Osteochondrome sind an der Wirbelsäule und im Becken lokalisiert (Freyschmidt, 2003).

Die Häufigkeit liegt bei 1:50.000 und tritt bei Männern öfters auf als bei Frauen (Bovée, 2008).

Maligne Läsionen

Chondrosarkom

Chondrosarkome machen nahezu 10 – 20 % aller primären malignen Knochentumoren aus (Sammartino et al., 2008). Sie zeichnen sich durch Bildung einer Knorpelgrundsubstanz durch die Tumorzellen aus. Bei Männern sind sie doppelt so häufig wie bei Frauen. Das Chondrosarkom befällt vorzugsweise flache Knochen, den Schultergürtel und den Beckenring sowie die proximalen Anteile langer Röhrenknochen (Greenspan, 2000).

2.3.3. Knochenmarktumoren

Ewing-Sarkom-Gruppe

Man betrachtet das Ewing-Sarkom als eine Gruppe von Tumoren. Dazu gehören

- das konventionelle Ewing-Sarkom,
- das großzellige Ewing-Sarkom,
- und primitive neuroektodermale Tumoren (PNET),

Diese Tumoren sind eng miteinander verwandt und oft nur schwer voneinander zu unterscheiden. (Greenspan, 2000)

Sie sind durch ihre besonders hohe Aggressivität gekennzeichnet. Die Prognose hat sich durch den Erfolg der systemischen Chemotherapie verbessert. (Bacci et al., 2000)

Das Ewing-Sarkom tritt überwiegend bei jungen Menschen, meist im 2. Lebensjahrzehnt, auf (Greenspan, 2000).

Maligne Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome

Das primäre Non-Hodgkin-Lymphom des Skelettsystems ist definitionsgemäß ein Tumor, der vom Knochen ausgeht. Allerdings kommen auch Non-Hodgkin-Lymphome des Knochenmarks ohne Tumorbildung vor (Freyschmidt, 2003).

Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin-Lymphom oder der Morbus Hodgkin ist ein maligner Tumor der Lymphknoten und macht etwa. 50 % aller malignen Lymphome aus. Männer erkranken daran häufiger als Frauen (Greenspan, 2000). Jährlich erkranken von 100.000 Personen zwei bis drei am Hodgkin Lymphom (Fong et al., 2008).

2.3.4. Bindegewebige und bindegewebsbildende Tumoren

Benigne Läsionen

Benignes fibröses Histiocytom

Diese seltene Läsion zeichnet sich histologisch durch eine Proliferation von Zellen, die Kollagen bilden, aus. Diese Läsion tritt überwiegend im Erwachsenenalter auf und kommt vor allem im Kreuzbein, im Darmbein, in den Rippen und an der Wirbelsäule vor. Die Behandlung erfolgt durch Kürettage oder Exzision (Freyschmidt, 2003).

Maligne Läsionen

Malignes fibröses Histiocytom

Das maligne fibröse Histiocytom kann entweder als Primärtumor oder sekundär aus einer benignen Knochenläsion entstehen. Chronischer Fistelkanal einer Osteomyelitis, Knocheninfarkt oder Morbus Paget können zur Bildung eines Histiocytems führen. Derartige Läsionen werden auch sekundäre maligne fibröse Histiocytoome genannt. Sie treten üblicherweise im 3. bis 6. Lebensjahrzehnt auf und stellen ca. 11 % aller Fälle malignen Knochtumoren dar (Greenspan, 2000).

2.3.5. Sonstige Tumoren

Benigne Läsionen

Riesenzelltumore

Die Riesenzellen vom osteoklastären Typ (Osteoklastom) entstehen wahrscheinlich durch eine Fusion der mononukleären Tumorzellen. Fast 50 % aller Riesenzelltumoren befinden sich in der Kniegelenkregion (Freyschmidt, 2003). Sie machen 4 % aller primären Knochtumoren aus und kommen im 20. bis 40. Lebensjahr vor (Lang, 2008). Frauen erkranken öfter an Riesenzelltumoren als Männer (Ul Haque et al., 2007).

Maligne Läsionen

Adamantinom der langen Röhrenknochen

Das Adamantinom ist ein seltener maligner Tumor, der lange Knochen befällt und 0.1 bis 0.5 % aller primärer Knochtumore ausmacht (Goncalves et al., 2008).

2.3.6. Tumorähnliche Knochenläsionen („tumor-like lesions“)

Benigne Läsionen

Aneurysmatische Knochenzyste

Aneurysmatische Knochenzysten sind selten auftretende Knochtumoren. Das Durchschnittsalter der PatientInnen liegt im 2. Lebensjahrzehnt und betrifft häufiger Frauen. Am häufigsten sind das Schienbein und der Oberschenkelknochen betroffen (Pennekamp et al., 2008).

Maligne Läsionen

Synoviales Sarkom

Das Synovialsarkom macht ca 5-10 % der Weichteilsarkome aus. Es kommt bei Männern häufiger vor als bei Frauen (Friedrichs et al., 2008). Es geht manchmal von der Synovialis (Schleimbeutel) aus. Es kann aber auch von anderen Strukturen ausgehen wie der Gelenkkapsel, den Schleimbeutel und Sehnenscheiden. Der Tumor tritt in der Regel im Alter unter 50 Jahren auf. 83 % aller Synovialsarkome liegen in den Extremitäten (Greenspan, 2000).

Sekundäre Knochtumore (Knochenmetastasen)

Das Skelett ist der häufigste Zielort für Tumormetastasen.

Knochenmetastasen entstehen in der überwiegenden Mehrheit bei PatientInnen mit Brust- oder Prostatakrebs, bei >50 % der PatientInnen mit fortgeschrittenem Schilddrüsenkrebs, 30-40 % der PatientInnen mit fortgeschrittenem Lungenkrebs und 20-25 % der PatientInnen mit fortgeschrittenem Nierenkrebs (Lipton, 2007).

Für die erfolgreiche Metastasierung muss eine Zelle oder eine Gruppe von Zellen imstande sein, den Primärtumor durch Überwindung der **Basalmembran** zu verlassen und in das örtliche Stroma einzudringen (invasiver Tumor). Die Tumorzellen müssen Anschluss an die Zirkulation finden und sich in entfernte Gefäße bewegen und in das Zielorgan eindringen, um dort als Sekundärtumor zu proliferieren. Wenn der Tumor eine bestimmte Größe hat muss er sich mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen. Dabei stellt die Neubildung von Gefäßen, die **Angiogenese**, die Voraussetzung für die Größenzunahme des Primärtumors dar (Löffler, Petrides, 1998).

Nierenzellkarzinom

Nahezu 30 % der PatientInnen mit Nierenzellkarzinom entwickeln Knochenmetastasen. Diese sind charakterisiert durch extensive Osteolyse verbunden mit schweren Schmerzen, eingeschränkter Beweglichkeit und Knochenbruch. Diese Komplikationen resultieren aus der Fähigkeit des Nierenzellkarzinoms die empfindliche Balance des Knochenbaus zu zerstören. Dadurch kommt es zu einem pathologischen Knochenschwund.

Der Mechanismus der Nierenzellkarzinom-induzierten Osteolyse ist noch unbekannt. Studien über Knochenmetastasen haben gezeigt, dass tumor-induzierte Veränderungen im Knochenumbau durch Veränderungen in der Mikroumgebung des Knochens vermittelt werden. Durch die Stimulation von Leukozyten werden Chemokine freigesetzt, die wahrscheinlich auch eine Rolle bei pathologischem tumorbedingtem Knochenabbau spielen. Zum Beispiel kann Interleukin-8 am Osteoklasten-vermittelten Knochenabbau bei diesen Tumoren beteiligt sein (Kominsky et al., 2008).

Zytokine, wie z.B. „Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 δ “ spielen eine Rolle bei der Auslösung der Osteolyse verbunden mit multiplem Myelom. „Makrophage Inflammatory Protein-1 δ “, welches in humanen Nierenzellkarzinom-induzierten Knochenmetastasen gebildet wird, stimuliert Osteoklastenwachstum und -differenzierung und bewirkt dadurch den verstärkten Knochenabbau (Kominsky et al., 2008).

Prostatakrebs

Prostatakrebs führt häufig zu Knochenmetastasen. Der Mechanismus der Metastasierung ist noch nicht vollkommen geklärt. Die Interaktionen zwischen Prostatakrebszellen und Knochenzellen initiieren vermutlich die Kolonisation von metastasierenden Zellen im Knochenmark und die Tumorzellen interagieren mit spezifischen Zellen der Knochenumgebung, meist Osteoblasten und führen dadurch zur Bildung von Sekundärtumoren. Verschiedene osteoblasten-typische Gene, inklusive Cadherin-11, auch als Osteoblasten-Cadherin bezeichnet wird, sind in Prostatakrebszellen vermehrt exprimiert und erleichtern das Überleben der Krebszellen im Knochen, was für das Überleben und das Wachstum der Prostatakrebszellen im Knochen erforderlich ist (Chu et al., 2008).

Das exzessive Knochenwachstum durch das Übergewicht der Osteoblasten wird durch die von Tumorzellen sezernierten Zytokine wie „Fibroblasten Growth-Factors“ 1 und 2 (FGF 1 und 2), „Insulin-Like Growth-Factors“ 1 und 2 (IGF 1 und 2), „Bone Morphogenetic-Proteins“ (BMP) und Endothelin 1 (ET-1), bewirkt (Van Sant et al., 2007).

Brustkrebs

Brustkrebs metastasiert bevorzugt im Knochen, und die Mehrheit der Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs hat zum Zeitpunkt ihres Todes Knochenmetastasen. Knochenmetastasen führen zu typischen Komplikationen wie Frakturen und Knochenschmerzen. Chemotherapie, Östrogenentzug und Bisphosphonattherapie zur Behandlung von brustkrebsinduzierten Knochenmetastasen bieten nur beschränkte Wirksamkeit.

Verschiedene Gewebefaktoren im Knochen könnten für das Überleben und die Proliferation von Brustkrebszellen kritisch sein. Z.B. sind Knochenmatrix freigesetzte Wachstumsfaktoren. Zum Beispiel sind „Insulin-like-Growth-Factors“ (IGF) die wichtigsten Moleküle, die für die Proliferation der Brustkrebszellen im Knochen bedeutsam sind (Sangai et al., 2008).

Lungenkrebs

Knochenmetastasen sind auch bei LungenkrebspatientInnen häufig.

Bei allen malignen Erkrankungen hat derzeit Lungenkrebs die höchste Todesrate. Der Grund der hohen Mortalität ist die Schwierigkeit der frühzeitigen Diagnose und das hohe metastatische Potential von Lungenkrebs. Mehr als ein Drittel der PatientInnen mit fortgeschrittenem Lungenkrebs entwickelt osteolytische Knochenmetastasen.

Bis jetzt existiert noch keine kurative sondern nur palliative Therapie (Sone et al., 2007).

Regulation der Entwicklung osteolytischer und osteoblastischer Metastasen:

Prostata- und Brustkrebs-induzierte Knochenmetastasen können osteoblastisch oder osteolytisch sein. „Bone-Morphogenetic Proteins“ (BMP) sind osteoinduzierende Moleküle, deren Aktivität von den Antagonisten wie Noggin und Dickkopf-1 reguliert wird (Schwaninger et al., 2007).

Osteolytische Zelllinien exprimieren *in vitro* Noggin und Dickkopf-1 und osteolytische Zytokine. Im Gegensatz dazu exprimieren osteoinduktive Zelllinien weder Noggin noch Dickkopf-1 noch osteolytische Zytokine.

Bei Prostatakrebs kommt es v.a. zu Osteoblastenproliferation, die zu osteosklerotische Läsionen führen. Brustkrebs dagegen führt zu osteoklastischen

Veränderungen mit Stimulierung der Knochenresorption und folglich osteolytische Läsionen. Osteolyse und Osteosklerose neigen zu pathologischen Frakturen. Gewebefaktoren, die Osteoblastenproliferation und -differenzierung stimulieren, werden von Prostata- und Brustkrebszellen in der Knochenmikroumgebung freigesetzt und vermitteln Osteoblastenantwort in Knochenmetastasen.

„Bone-Morphogenic Proteins“ (BMP) regulieren direkt die Osteoblastengeneration. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Skelett- und Knochenmorphogenese und sind Frakturen-Reparaturmechanismen aufgrund ihrer Induktion der Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Chondrozyten und Osteoblastenvorstufen. Antagonismus der Knochenmorphogenetic-Proteine durch Noggin ist entscheidend für die embryonale Chondro-Osteogenese und Gelenkformation. Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen „Bone-Morphogenetic Proteins“ und deren Antagonisten sind für den Aufbau der optimalen Knochenmasse notwendig (Schwaninger et al., 2007).

2.4. Chemotherapie maligner Erkrankungen

Krebstherapie

Zytostatika greifen an definierten Stellen des Zellzyklus ein; sie können aber nur auf Zellen wirken, die sich in Teilung befinden. Zum Beispiel führen alkylierende Verbindungen über eine kovalente Brückenbildung zwischen den DNA-Strängen zu einer Hemmung der Replikation, zytostatisch wirksame Antibiotika interkalieren zwischen den DNA-Strängen und verwehren der DNA-Polymerase damit den Zugang. Verschiedene Zytostatika (z.B. Camptothecine) hemmen für die DNA-Synthese essentielle Reparaturenzyme wie die Topoisomerase, während andere (Taxole) zur einer Stabilisierung der Polymerisation der Mikrotubuli führen.

2.5. Chemotherapie der Knochentumoren

Die gegenwärtige Therapie des Osteosarkoms besteht in der initialen Behandlung mit Chemotherapeutika und der chirurgischen Entfernung des primären Tumors im betroffenen Knochen. Die Behandlung beginnt generell mit präoperativer

Chemotherapie („neoadjuvant“ oder „primary“ Chemotherapie) für eine definierte Periode. Anschließend wird der Tumor durch Amputation oder unter Rettung der Gliedmaßen beseitigt. Dann folgt die postoperative „adjuvante“ Chemotherapie. In den meisten Umständen werden die mit Hilfe der präoperativen Chemotherapie erreichten Ergebnisse herangezogen, um postoperativ eine adjuvante Chemotherapie mit guter Erfolgsaussicht zu wählen.

Die chemotherapeutische Behandlung führt gewöhnlich zur kompletten Beseitigung der Schmerzen und Beschwerden und zur funktionellen Wiederherstellung der betroffenen Gliedmaßen.

In Anbetracht der großen Fortschritte der Chemotherapie zur Behandlung der primären Tumore, wurde versucht, den Tumor ausschließlich durch Chemotherapie zu zerstören.

Wie aber Studien von Jaffe et al. (2002) demonstrieren, wurden nur 10 % PatientInnen ausschließlich durch Chemotherapie geheilt. Bei der Mehrheit trat erneut ein lokaler Tumor auf und nahezu 50 % dieser PatientInnen entwickelten Lungenmetastasen. Daher kann auch bei kompletter Tumornekrose nicht notwendigerweise eine vollständige Heilung erzielt werden.

Die Kombination von aggressiver systemischer Chemotherapie und Operation hat die Überlebensrate der OsteosarkompatientInnen bedeutend verbessert. Die Antwort des primären Tumors auf präoperative Chemotherapie zeichnet sich als ein wichtiger prognostischer Parameter für Metastasierung ab. Darüber hinaus wird das Risiko für ein neuerliches Auftreten des Tumors reduziert (Fuchs et al., 1998).

Bisphosphonate, wie *Zoledronat*, *Pamidronat*, *Ibandronat*, sind wichtig zur Prävention von Skelettschäden, die durch Knochenmetastasen verursacht werden. Sie bieten ebenfalls signifikante Vorteile in der palliativen Behandlung von Knochenmetastasen und werden zur unterstützenden Therapie von PatientInnen mit malignen Knochenerkrankungen empfohlen (Lipton, 2007).

Minodronat hat das Potential Knochenmetastasen zu inhibieren. Es reduziert die Anzahl der Osteoklasten in den Knochenläsionen und hemmt die Produktion von Knochenmetastasen (Sone et al., 2007).

Resistenzentwicklung von Tumorzellen:

Durch Ausbildung einer Vielfachresistenz (Multidrug-Resistenz, MDR) wurden zahlreiche gut wirksame Chemotherapeutika, die in der Krebstherapie angewendet werden, ineffektiv (Limtrakul et al., 2006).

Werden Tumorzellen mit Zytostatika behandelt, so entstehen häufig resistente Varianten der Zellen. Im Allgemeinen sind diese Zellvarianten nicht nur gegen das selektionierende Medikament resistent, sondern auch resistent gegenüber anderen aus Verbindungen. Deshalb wird dieser Zustand als **Multidrug-Resistenz (MDR)** bezeichnet. Diese Resistenz erklärt, warum viele Tumorerkrankungen des Menschen nach anfänglichen Erfolgen nur schlecht auf die weitere Behandlung mit Zytostatika ansprechen. Vermittelt wird diese Resistenz u.a. durch eine Familie membranständiger Transportproteine (ABC-Efflux-Pumpen), die die Zytostatika aus dem Zytosol wieder in den Extrazellulärraum zurücktransportieren (Löffler, Petrides, 1998).

2.6. Ausscheidung von Zytostatika über ABC-Transportproteine

Eine effiziente Ausscheidung und Entgiftung (Detoxifikation) gesundheitsschädlicher Xenobiotika ist essentiell für das Überleben von Organismen. Vertreter der Zytochrom (CYP) P450-Superfamilie von Monooxygenasen spielt eine wichtige Rolle in der Umwandlung von wasserunlöslichen toxischen Verbindungen in gut ausscheidbare, wasser-lösliche Abbauprodukte. Die Familie CYP3A- (CYP3A4 und CYP3A7) ist von besonderer Wichtigkeit, weil sie an der Biotransformation von fast 2/3 der klinisch eingesetzten Arzneimittel beteiligt ist. Eine große Anzahl dieser Arzneimittel, einschließlich der Chemotherapeutika (Rifampicin), Antimykotika (Clotrimazol) und der Glukokortikoide (Dexamethason), aktivieren die Transkription von CYP3A-Genen (Pascussi et al., 2000).

CYP3A-Induktoren binden direkt an einen Transkriptionsfaktor, den nukleären Rezeptor Pregnan-X-Rezeptor, der mit dem nukleären Retinoid-X-Rezeptor (RXR) dimerisiert. Dieses Heterodimer wandert in den Kern und bindet dort an Xenobiotika-responsible Elements in der DNA der Zielgene (He et al., 2006).

Die metabolischen Biotransformationsreaktionen, die über die Cytochrom P-450 Monooxygenasen vermittelt werden, sind häufig entscheidende Bestimmungsgrößen in der Disposition vieler Arzneistoffe. Allerdings wurde erkannt, dass zusätzliche Prozesse wie Membrantransportsysteme z.B. ABC-Transporter, genauso wichtig sind (Cvetkovic et al., 1999).

Aufnahme und Efflux von Arzneistoffen in Krebszellen:

Arzneistoffe, die über **Organische Anionen-Transportierende Polypeptide (OATPs)** in die Zelle aufgenommen werden, können entweder direkt an das Zellziel gelangen oder aber über den Weg der Biotransformation in aktive oder inaktive Metaboliten umgewandelt werden. Diese Metaboliten können ebenfalls zum Zellziel transportiert oder über Effluxpumpen wie P-Glykoprotein (P-gp) oder „Multidrug Resistance-Related Proteins“ (MRPs) aus der Zelle transportiert werden, wodurch die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration sinkt.

MRPs (Multidrug Resistance-Related Proteins) und **P-gp** (P-Glykoprotein) gehören zu den ABC-Transportern, die am Export von Arzneistoffen und Metaboliten aus den Zellen beteiligt sind (Mutschler et al., 2001).

Sowohl eine Überexpression von P-Glykoprotein also auch von „Multidrug Resistance-Related Proteins“ führt zur Entwicklung einer Vielfachresistenz. (Mistry et al., 2001)

OATPs (Organische Anion-Transportierende Polypeptide) sind verantwortlich für die Aufnahme verschiedener anionischer, neutraler und kationischer Arzneistoffe (Schiffer et al., 2002).

Aufnahme und Efflux-Transporter könnten wesentlich in der Arzneistoffbestimmung involviert sein.

Die funktionelle Modulation solcher Membrantransporter kann ebenfalls zu Arzneimittelinteraktionen führen. Arzneistoffe, welche die P-Glykoproteintransporter-Aktivität verändern, haben ebenfalls Einfluss auf die Funktion der OATPs. Hemmer des P-Glykoprotein-Efflux können auch die Aufnahme durch die OATPs inhibieren; demzufolge kann eine Hemmung beider Systeme die Basis einiger ungünstiger Arzneimittelinteraktionen darstellen (Cvetkovic et al., 1999).

ABC-Transporter (ATP-binding cassette transporter) sind integrale Membranproteine, die Substrate durch zelluläre Membranen transportieren. ABC-

Importer katalysieren die Aufnahme essentieller Nährstoffe aus der Umgebung. ABC-Exporter befördern verschiedene Verbindungen wie z.B. Arzneistoffe aus dem Zytoplasma (Dawson et al., 2007).

P-Glykoprotein

P-Glykoprotein (P-gp), das zur Familie der ABC-Transporter (ABC = ATP-binding cassette) gehört, wurde im Rahmen der Resistenzentwicklung von Tumoren gegen Zytostatika entdeckt und ist dazu fähig, Zytostatika aus dem Inneren der Tumorzelle herauszupumpen und so die Konzentration in der Zelle auf einen nicht toxischen Wert zu verringern. P-Glykoprotein ist ein membranständiges Protein das durch das „Multi-Drug-Resistance-Gen“ (MDR 1) kodiert wird und aus sich zwei Hälften mit je sechs transmembranären Domänen zusammensetzt. Im zytoplasmatischen Teil befindet sich in jeder Hälfte eine ATP-Bindungsstelle, die die für den Transport benötigte Energie durch ATP-Hydrolyse aufbringt. Auf diese Weise kann ein Transport eines intrazellulären Substrats nach extrazellulär stattfinden.

P-Glykoprotein transportiert eine Vielzahl strukturell sehr heterogenen Substanzen.

Da Proteine wie ABC-Transporter z.B. P-Glykoprotein nicht nur in Tumorzellen vorkommen, sondern in vielen Geweben physiologisch exprimiert werden, sind sie für die Pharmakokinetik einiger Substanzen besonders bedeutend

P-Glykoprotein ist für die Elimination von einer Vielzahl an Xenobiotika verantwortlich (Clearancefunktion z.B. in Darm, Leber, Niere) oder bietet einem Organ bzw dem Organismus vor dem Eintreten von Fremdstoffen (Barrierefunktion z.B. in Darm oder Blut-Hirn-Schranke) Schutz.

Da P-Glykoprotein häufig in denselben Zellen wie CYP3A4 vorkommt und darüber hinaus die meiste P-Glykoprotein-Substrate auch von CYP3A4 verstoffwechselt werden, wird angenommen, dass beide Proteine Teil eines kombinierten Entgiftungsmechanismus sind (Mutschler et al., 2001).

Ein wichtiges Substrat für P-Glykoprotein ist Paclitaxel. Dieses Taxolderivat wurde erfolgreich bei der Behandlung verschiedener Tumoren wie Brust, Ovar und Lunge verwendet. P-Glykoprotein (P-gp) und Mutationen im Zellziel von Paclitaxel bestimmen die Resistenz gegen das Tumorthapeutikum Paclitaxel.

Überexpression von P-Glykoprotein erleichtert den Export von Paclitaxel aus den Zellen. Dadurch wird die intrazelluläre Arzneimittel-Konzentration sehr niedrig und diese ermöglicht das Überleben von Tumorzellen, die normalerweise toxisch sind. Um diese Arzneimittel-Resistenz umzukehren, wurden Strategien entwickelt, um potente P-Glykoprotein- Inhibitoren wie Verapamil und Cyclosporin A zur Blockierung verwenden zu können (Tanino et al., 2007).

Pregnan-X-Rezeptor

Der Pregnan X Rezeptor (PXR) spielt eine zentrale Rolle bei der Antwort des Körpers auf toxische Xenobiotica und endogene Metabolite. Als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor reguliert er alle Stadien des xenobiotischen Metabolismus und Transports und ist für wichtige induktive Arzneimittelinteraktionen verantwortlich. Vermutlich hat der Pregnan-X-Rezeptor zusätzlich protektive Funktion im Körper, und spielt eine wichtige Rolle bei Krebs (Matic et al., 2006).

PXR wird von einer großen Zahl an endogenen und exogenen Chemikalien einschließlich Steroide, Antibiotika, Antimykotika, Gallensäuren und Johanniskraut aktiviert (Kliwer et al., 2002). Die Inhaltsstoffe des Johanniskraut lassen sich in die folgenden zwei Gruppen der *Phloroglucine*, wie Hyperforin und Adhyperforin, und der *Naphthodianthrone* zu denen Hypericin, Pseudohypericin, Protohypericin und Protopseudohypericin gehören, einteilen (Liu et al., 2004). Die große, sphärische Ligandenbindungsstelle ermöglicht dem Pregnan-X-Rezeptor die Interaktion mit einer großen Breite an hydrophoben Chemikalien. Dadurch, im Gegensatz zu anderen nuklearen Rezeptoren, die selektiv an physiologische Liganden binden, arbeitet der Pregnan-X-Rezeptor als nicht-selektiver Rezeptor für hydrophobe Toxine. Der Pregnan-X-Rezeptor bindet als Heterodimer mit dem 9-cis-Retinolsäurerezeptor an Regulatorregion der CYP3A4 Monooxygenase Genen und anderer Gene, die im Metabolismus und der Elimination der Xenobiotika involviert sind.

Dexamethason steigert die Pregnan-X-Rezeptor mRNA-Levels in primären menschlichen Leberzelltumoren. Dies scheint durch Vermittlung des Glucocorticoid-Rezeptors zu resultieren weil es nur eine nanomolare Konzentration von Dexamethason benötigt und durch den GR-Antagonisten Mifepriston blockiert wird. Möglicherweise trägt die Induktion der Pregnan-X-

Rezeptor mRNA-Spiegel zur hohen Stimulation von CYP3A Genexpression durch Dexamethason bei.

Dexamethason erhöht Pregnan-X-Rezeptor-activator-vermittelte CYP3A4 Genexpression nur nach der Behandlung von 24 h und wird inhibiert durch Cycloheximid (Pascussi et al., 2000).

Die Induktion von CYP3A4-Expression kann erklären, warum es zur Interaktion von Arzneistoffen kommt. Ein Arzneimittel beeinflusst den Metabolismus eines zweiten. Die meisten der verschriebenen Arzneimittel induzieren CYP3A4 durch Aktivierung des Pregnan-X-Rezeptors. Dieser spielt auch eine Rolle bei der Interaktion zwischen dem pflanzlichen Mittel Johanniskraut, das als Antidepressivum eingesetzt wird, und verschriebenen Arzneimittel. Johanniskraut induziert CYP3A4-Expression im Darm und erhöht den Metabolismus oraler Kontrazeptiva, dem Immunsuppressivum Cyclosporin, Warfarin und Digoxin. Jedes dieser Arzneimittel wird durch CYP3A4 metabolisiert, auf die Beteiligung des Pregnan-X-Rezeptors hinweist.

Gallensäure, die von der Leber produziert wird, ist essentiell für die Elimination von überschüssigem Cholesterin, die Solubilisation, Absorption und den Transport von Lipiden in den Darm. Die Gallensäure-Homöostase muss genau reguliert werden, weil Gallensäuren als Detergentien in höheren Konzentrationen toxisch wirken können. Der Pregnan-X-Rezeptor reguliert einige Gene, die am Gallensäuremetabolismus beteiligt sind. Die sekundäre Gallensäure Lithocholsäure aktiviert den humanen Pregnan-X-Rezeptor. Lithocholsäure-Behandlung resultiert durch Induktion von Pregnan-X-Rezeptor-Zielgenen in der Leber. Pathophysiologische Werte von Lithocholsäure aktivieren Pregnan-X-Rezeptoren und stimulieren die Expression von Genen, die an der Detoxifikation und Entfernung dieser Gallensäuren beteiligt sind. Dadurch kann der Pregnan-X-Rezeptor den Körper vor pathophysiologischen Konzentrationen toxischer Gallensäure schützen (Kliwer et al., 2002).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Zellkultur

3.1.1. Verwendete Zelllinien

Es wurden die zwei Osteosarkomzelllinien MG-63 und HOS für die Experimente verwendet. Die Zelllinien wurden ursprünglich von der American Tissue Culture Collection (ATCC) bezogen und wurden zunächst auf der Klinik für Orthopädie, AKH-Wien kultiviert. Bei diesen Tumorzellen besteht eine genetische Abnormität vom gesunden Chromosomensatz.

MG-63: Diese Zelllinie stammt aus einem Tumor eines 14-jährigen, männlichen Patienten. Dabei handelt es sich um eine stabile, schnell wachsende Osteosarkomzelllinie.

HOS: Diese Zellen wurden aus einem Tumor eines primären Osteosarkoms eines 13-jährigen, europäischen Mädchens entnommen und daraus wurde die HOS-Zelllinie gezüchtet.

Diese beiden Zelllinien bilden in Zellkultur sehr rasch Kolonien und eignen sich zur Untersuchung von Wachstumsmechanismen in Knochentumoren.

3.1.2. Kultivierung der Zellen

Verwendete Geräte und Materialien

- Laminar Air Flow (Heraeus)
- Gewebekulturschrank (Cytoperm, Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich Rotixa RP)
- Zellkulturflaschen 25 m² (Iwaki, Asahi Technoglass Co., Ltd., Tokio, Japan)
- Sterile Pipetten 10 ml, 1 ml (Sterilin® Biby- Sterilin, Staffordshire, UK)
- Sterile Zentrifugenröhrchen (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

Verwendetes Nährmedium

- RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Life Technologies, Paisely, Scotland):
Fötale Rinderserum (Gibco BRL)
Penicillin (10.000 U/ ml)-Streptomycin (10.000 µg/ ml)- Lösung (Gibco BRL)
Doxorubicin- Lösung (Sigma) 100 µM in DMSO

Verwendetes Waschmedium

- PBS („Phosphate buffered saline“, 10- fach konzentriert):
Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) 2 g
Natriumchlorid (Merck) 80 g
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck) 2 g
Dinatriumhydrogenphosphat 2 g
H₂O (bidest) ad 1 l

Trypsinlösung zum Ablösen der Zellen („Zellensplitten“):

- 5- fach Trypsin- EDTA- Lösung (Gibco BRL) 10 ml
PBS ad 50 ml

3.2. RNA-Isolierung

Verwendete Geräte:

- Heizblock Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, DE)
- Spektrophotometer U-2000, Hitachi
- Tischzentrifuge Hettich
- Vortex Mixer
- Zellkulturschaber (TTP)
- 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf AG)
- Safe- Seal Tips (Biozym Biotech Trading GmbH)
- Zentrifuge Eppendorf 5415D (Eppendorf AG)

Verwendete Reagenzien:

- Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 70 % Ethanol (Merck)
- Isopropanol (Merck)

- Steriles Wasser
- Trizol Reagent Ultra Pure (Gibco BRL, Paisley, Scotland)

3.2.1. Isolierung der RNA aus einem Zelllysate

Das Medium wird aus der Kulturflasche abgesaugt und 1ml PBS zugefügt. Anschließend werden die Zellen, die auf dem Flaschenboden anhaften, mit Hilfe eines Zellenschabers abgekratzt. Die Zellsuspension überführt man in ein Eppendorfgefäß und zentrifugiert für 5 Minuten mit 400 g und bei 4 °C im Kühlraum. Der dabei entstehende Überstand wird verworfen und das übrig bleibende Zellpellet mit 1ml PBS gewaschen/resuspendiert, abermals für 5min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert und Überstand abheben.

Nachdem dem Zellpellet 1 ml Trizol, eine einphasige Lösung von Guanidin-Isothiocyanat und Phenol, zugefügt wurde, lässt man das Lysat 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen.

Zur Trennung der RNA- von der DNA- und Proteinfraction, setzt man zu den Proben 200 µl Chloroform hinzu, schüttelt 15 s mit der Hand und lässt die Suspensionen für 3 min bei Raumtemperatur stehen. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 15 min mit 12000 g bei 4°C im Kühlraum. Dabei bildet sich ein 3-Phasengemisch, wobei sich die untere Phase aus Chloroform, Phenol und den Proteinen zusammensetzt und rot gefärbt ist, die mittlere enthält die DNA und die oberste wässrige, farblose Phase die RNA.

3.2.2. RNA-Präzipitation

Für die RNA- Präzipitation wird die farblose RNA-Phase vorsichtig abgehoben, um eine Kontamination mit genomischer DNA und Proteinen zu vermeiden, in ein neues steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und dazu 500 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Suspension wird für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 15 min / 12000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Isopropanol-Überstand wird entfernt und das übrig bleibende RNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Es wird nochmals für 5 min / 12000 g bei 4 °C zentrifugiert, worauf man den Ethanol-Überstand verwirft. Das Pellet wird im Heizblock bei 55

°C für max 3 min getrocknet, mit 20 µl sterilem Wasser resuspendiert und nochmals in den Heizblock gestellt bei 55 °C für ungefähr 10min.

3.2.3. Vermessung und Berechnung des RNA-Gehalts

Um den RNA-Gehalt **quantifizieren** zu können, wird eine sterile Eppendorf-Eprouvette mit 398 µl sterilem (RNase freies) Wasser und 2 µl der soeben hergestellten RNA-Suspension vorbereitet. Nach dem Mischen mit dem Vortex-Mixer wird die Konzentration und die Reinheit der erhaltenen RNA im Spektrophotometer mittels Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Absorption von A260 nm und 280 nm ermittelt.

Der Gehalt an RNA wird durch das Verhältnis zwischen der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm angegeben und soll zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine Kontamination, zum Beispiel mit Proteinen, würde einen Quotienten aus der Absorption weniger als 1,6 ergeben.

Berechnung der Konzentration der einzelsträngigen RNA nach nachstehender Formel:

$$c (\mu\text{g/ml}) = \text{OD } 260 / 0,025$$

Somit lässt sich die RNA-Konzentration (in µg/µl) berechnen:

$$\text{OD } 260 \times 40 \times 200 / 1000 = \text{RNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Ein Verdünnungsfaktor von 200 ist zu berücksichtigen, da diese Verdünnung für die Messung wichtig war.

3.3. Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription (RT) ist das Umschreiben der „messenger“ RNA (mRNA) in den dazugehörigen komplementären DNA-Strang (cDNA) durch das Enzym „Reverse Transkriptase“.

Beginnend vom 3`-Ende der mRNA wird ein komplementärer Primer an den Einzelstrang angelagert. Unter Beteiligung aller vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) wird nun mit Hilfe der Reversen Transkriptase der komplementäre cDNA-Strang synthetisiert.

3.3.1. Durchführung der reversen Transkription

Verwendete Geräte:

- Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Verwendete Reagenzien:

- Random Hexamer Primers 100 μ M (Fermentas, Vilnius, Litauen)
- 5x Reaction Buffer (Fermentas)
- dNTP (Desoxynucleosidtriphosphate) Mix (jeweils 10 μ M), (Finnzymes, Espoo, Finnland)
- RNase Inhibitor
- Revert Aid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l), (Fermentas)
- steriles Wasser

Um die reverse Transkription durchzuführen, werden 10 μ l Wasser in einer Eppendorf-Röhrchen vorgelegt, 3 μ g isolierte reine Gesamt-RNA und 1 μ l „Random Hexamer Primer“ hinzugefügt und bei 70 °C für 10 Minuten am PCR-Gerät inkubiert. Diese Temperatur ermöglicht die Trennung der RNA-Doppelstränge. Nachdem die Lösung abzentrifugiert wurde, wird auf Eis gekühlt. Anschließend werden 9 μ l „Master-Mix“, der aus 4 μ l 5x Reaktions-Puffer, 2 μ l dNTPs, 1 μ l RNase Inhibitor, 1 μ l Reverse Transkriptase und 1 μ l sterilem Wasser besteht, zum Gemisch pipettiert. Danach wird im Eppendorf Thermomixer Comfort bei 25 °C für 10 Minuten und nachfolgend bei 42 °C für 60 Minuten inkubiert. Diese Vorgehensweise ist die eigentliche Reverse Transkription.

Das Enzym muss anschließend durch Hitze bei 70 °C und 10 Minuten inaktiviert werden.

Die hiermit synthetisierte cDNA kann bei -20 °C gelagert oder gleich für die PCR verwendet werden.

3.4. Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR)

Dieses Verfahren dient zur exponentiellen Vermehrung von beliebigen DNA-Sequenzen.

Der Reaktionsansatz enthält das Enzym, dazu doppelsträngige DNA mit der zu amplifizierenden Zielsequenz, Primer im Überschuss und Magnesiumionen (Richter, 2003). Die Taq-Polymerase ist eine thermostabile DNA-Polymerase, die die für die DNA-Denaturierung und ein annealing notwendige hohe Temperaturen verträgt (Pingoud et al. 1997).

Durch thermische **Denaturierung** (92-98 °C) erfolgt zunächst die Aufspaltung der DNA in ihre Einzelstränge. Bei niedrigerer Temperatur (40-60 °C) bindet an jeden dieser Stränge ein Oligodeoxyribonukleotid als Primer über einen komplementären Sequenzabschnitt in der 3`-Flanke (= **Annealing**); dies erfordert, dass die Nukleotidsequenz dieses Abschnitts bekannt ist und infolgedessen kann der „richtige“ Primer angeboten werden. Die nun durch Taq-Polymerase bei 72 °C folgende **Zweitstrang-Synthese** beginnt beim 3`-Ende des Primers und verwendet den Einzelstrang als Matrize: **Primer-Verlängerung** („**primer extension**“). Sie bewegt sich in Richtung der Anlagerungsstelle des entsprechend anderen Primers. Auf diesem Weg werden zwei Doppelstrang-Strukturen gebildet, welche im Anschluss durch **Hitzedenaturierung** in Einzelstränge zerlegt werden. Die Taq-Polymerase bleibt bei diesem Vorgang größtenteils unbeschädigt im Unterschied zu den meisten anderen Polymerasen. Die entstandenen vier Einzelstränge fungieren wieder als Matrize und binden nach Verminderung der Temperatur auf den adäquat niedrigeren Wert jeweils ein Molekül des spezifischen Primers. Nach Temperaturerhöhung auf 72 °C findet die Zweitstrang-Synthese statt. Hiermit ist der 2. Reaktionszyklus abgeschlossen. Durch die kontinuierliche Wiederholung dieser Schritte – Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung – entsteht eine entsprechende Anzahl an DNA-Fragmente (Richter, 2003).

3.4.1. Durchführung

β- Aktin PCR

Zuerst wird ein „housekeeping gene“, ein bestimmtes Gen, das in jeder Zelle vorkommt, ermittelt. Dies dient zur Überprüfung der Wirksamkeit der Reversen Transkriptase, durch β-Actin PCR.

Anfangs verdünnt man 1 µl der cDNA mit 11,5 µl sterilem Wasser und fügt 12,5 µl Mastermix hinzu und stellt das Gemisch zur PCR in den Thermocycler.

Verwendete Geräte:

- Thermocycler Biometra

Verwendete Reagenzien und Materialien:

- sterile Eppendorf-Eprouvetten
- primer f (MWG Biotech, Ebersberg, DE)
- primer r (MWG)
- steriles Wasser
- 10 x PCR Buffer (Finnzyme)
- dNTP Mix (Finnzyme)
- Taq-DNA Polymerase (Finnzyme)

Mastermix für 2 Proben:

- 5 µl Buffer (10 x Buffer Finnzyme)
- 1 µl dNTPs
- 0.5 µl Primer f (forward)
- 0.5 µl Primer r (revers)
- 1 µl Taq Polymerase
- 17 µl PCR-Wasser

3.4.2. Detektion der PCR-Produkte

Gelelektrophorese

Beschreibung der Methode:

Nukleinsäuren sind aufgrund der in ihrem Gerüst enthaltenen Phosphatgruppen negativ geladen. In Anwesenheit von Gegenionen (Na^+ , K^+ , Mg^{++}) werden diese Ladungen mehr oder weniger stark kompensiert. Geladene Partikel oder Moleküle bewegen sich im elektrischen Feld, und zwar in Richtung der Gegenelektrode, d.h. Nukleinsäuren bewegen sich zur Anode. Auch die Gegenionen werden in Bewegung gesetzt und bilden einen Gegenstrom aus, der zusätzlich zur physikalischen Reibung die Bewegung hemmt. Die Überlagerung dieser Effekte führt zu einer Nettobewegung der Nukleinsäuren in der Elektrophorese.

In der Gelelektrophorese wird ein poröses Material (Gelmatrix) eingesetzt, das die aufzutrennenden Moleküle aufnimmt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt jetzt noch zusätzlich vom hydrodynamischen Widerstand ab, den die Matrix den geladenen Molekülen entgegensetzt. Dieser wird von der Porengröße der Gelmatrix bestimmt; bei einer gegebenen Matrix ist die Größe und Form der Moleküle oder Partikel für ihre Wanderungsgeschwindigkeit maßgebend. Bei gleichartigen Molekülen, die z.B. aus Nukleinsäuren aufgebaut sind, korreliert die Wanderungsgeschwindigkeit mit der Größe und daher mit der Masse des Moleküls. Lässt man einen bekannten Größenstandard in einer parallelen Spur unter den gleichen Bedingungen wie die Probe mitlaufen, so kann man eine sehr genaue Aussage über die Größe des Moleküls treffen.

Verwendete Geräte:

- Gelwanne (Hofer, Subarine Agarosegel Unit; HE 33)
- Mikrowelle (Elin, MIK 4600)
- Power Supply (Biorad)
- UV-Detektor (Herolab, Molecular Trenntechnik)

Verwendete Reagenzien und Materialien:

- Agarose D-1 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethidiumbromid (1 mg/ ml) (Merck)
- PCR-Marker Gene Ruler 100 bp DNA-Ladder (MBI Fermentas)

- 10x TAE-Puffer bestehend aus 48,4 g TRIS, 27,2 g Natriumacetat; 3,8 g EDTA auf 1000 ml pH 7,2 (zum Gebrauch als mobile Phase wird 10 x TAE-Puffer 1:10 verdünnt)
- Loading Dye Solution (MBI Fermentas)

Durchführung:

Zuerst wird ein Agarosegel folgendermaßen hergestellt:

0,45 g Agarose werden in einen kleinen Erlenmeyerkolben eingewogen und 30 ml TAE-Puffer zugegeben. Die Agarose wird so oft in der Mikrowelle erhitzt bis sie vollständig gelöst ist und dann wird die Lösung ca. 40-50 °C abkühlen gelassen. 1,5 µl Ethidiumbromid hineinpipettiert. Anschließend wird das Gel in die Gelgießform gegossen und die Gelkämme werden in die Form eingehängt. Nach Aushärten des Gels werden die Kämme entfernt. Nachdem das Gel in eine Wanne mit 1x TAE-Puffer („Running buffer“) gegeben wird, folgt das Auftragen der Proben in die Geltaschen („slots“). Jeweils 10 µl meiner PCR-Produkte werden mit 2 µl Loading Dye gemischt und davon werden 10 µl in die Taschen pipettiert. Die erste Vertiefung enthält 3 µl des PCR Markers „Gene Ruler 100 bp DNA-Ladder“, der die Funktion eines Größenstandards besitzt. Wichtig ist die vollständige Bedeckung des Gels mit dem TAE-Puffer während des Trennvorgangs.

Nun kann die Elektrophorese bei 75 Volt und für 15 Minuten gestartet werden.

3.4.3. Quantitative TaqMan PCR

Prinzip:

Die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die *real-time quantitative PCR* bzw die quantitative „Echtzeit-PCR“.

Zurzeit nutzt man den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer („*fluorescence resonance energy transfer*“, *FRET*) aus: Ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) angeregt und strahlt die aufgenommene Energie dann in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) ab. Für diesen Fluoreszenzfarbstoff sind Anregungs- und Emissionsspektrum typisch. Nähert man ein Fluorochrom (F1) ausreichend zu einem zweiten (F2) an, dessen Anregungsspektrum (A2) mit dem Emissionsspektrum des ersten

Fluorochroms (E1) übereinstimmt, wird die Energie direkt an Fluorochrom 2 weitergeleitet, das daraus Licht der Wellenlänge E2 herstellt, statt als Licht Wellenlänge E1 abgestrahlt zu werden. Die Lichtstärke kann jetzt während der PCR bei Wellenlänge E1 oder E2 beobachtet werden und man erkennt hierbei, ob die beiden Fluorochrome räumlich weit getrennt (Messung von E1) oder nahe beieinander (Messung von E2) sind. Misst man E1, heißt Fluorochrom 1 „**reporter**“ (to report = berichten) und Fluorochrom 2 „**quencher**“ (to quench = löschen), wird E2 gemessen, bezeichnet man die beiden als **Donor** und **Akzeptor**. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist das **TaqMan-Prinzip**. Dabei befinden sich Reporter und Quencher auf demselben Oligonucleotid, vorallem am 5`- und 3`- Ende. Ist das Oligonucleotid unbeschädigt, ist die Lichtstärke bei E1 niedrig. Wenn der Reporter aber durch die sich nähernde Polymerase freigegeben wird, nimmt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge zu. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke (Mülhardt, 2006).

Für die Quantifizierung wird die Kinetik der PCR-Reaktionen ausgenutzt: In den frühen PCR-Zyklen findet eine exponentielle Amplifizierung der DNA-Fragmente statt. Akkumuliert das Produkt, so erfolgt die Amplifizierung langsamer. Die Ursachen sind vielfältig. Es wird die Konzentration der Primer und Nukleotide geringer, Polymerase und Nukleotide verlieren aufgrund der anhaltend hohen Temperaturen ihre Aktivität, die Reaktion wird durch die Anhäufung von Produkten (Pyrophosphat) gehemmt. Dadurch verlangsamt sich der Prozess zu einem linearen Wachstum und kommt dann zum Stillstand. Man nimmt daher als Richtwert die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade erkennbar vom Hintergrund unterscheidet (Ct-Wert), weil zu diesem Zeitpunkt die Amplifizierung noch exponentiell ist. Die Amplifikation eines bestimmten Fragments ist aber von so vielen Umständen beeinflussbar, dass es einfacher ist, wenn man die parallel bekannte Templatemengen amplifiziert und vergleicht, welchen Ct-Wert man für welche Templatemenge erhält. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, aus der sich von einem Ct-Wert auf die Templatemenge schließen lässt (Mülhardt, 2006).

Durch Verwendung spezifischer Oligonucleotid-Sonden ist es möglich, mehrere Fragmente im gleichen Röhrchen zu amplifizieren („*Multiplex-PCR*“) und separat

nachzuweisen. Da die Emissionsspektren der gemessenen Fluorophore für einen einwandfreien Nachweis möglichst gering überlappen sollten, können in der Praxis nur zwei Fragmente amplifiziert werden. Trotzdem erleichtert dies die Arbeit erheblich, weil man so leicht die Expression zweier Gene direkt vergleichen oder parallel Mutationen nachweisen kann (Mülhardt, 2006).

3.5. Zytotoxizitätstest

Der Zytotoxizitätstest dient der Quantifizierung der lebenden Zellen im Versuchsansatz. Als sensible Färbemethode setzt man “Cell Counting Kit-8 (CCK-8)” ein. Dieser Kit enthält hydrophiles Tetrazoliumsalz, das von Dehydrogenasen in lebenden Zellen aktiv reduziert wird. Dabei entsteht eine orange, im Kulturmedium lösliche Verbindung. Da tote Zellen keine aktiven Enzyme (Dehydrogenasen) besitzen werden im Zytotoxizitätstest ausschließlich lebende Zellen nachgewiesen.

Ein Vorteil des CCK-8 Tests ist die geringe Toxizität, wodurch die behandelten Zellen für anschließende Tests wie DNA-Fluorometrie eingesetzt werden können.

Verwendete Materialien und Reagentien:

- 50 ml Zentrifugenröhrchen (TTP)
- Zellsieb 70 µm (Falcon)
- Isoton II (Beckmann Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)
- Coulter Counter Z2 (Coulter Electronics Ltd., Luton, UK)
- Plattenlesegerät Victor™ 1420 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
- „96-well“ Platte (Iwaki)
- Cell Counting Kit 8 (CCK-8), (Dojindo Laboratories, Kuamoto, Japan)
- Dimethyl Sulfoxid (DMSO), (Sigma)
- Paclitaxel, (Sigma)

Waschmedium

- PBS

3.5.1. Durchführung des CCK-8 Zytotoxizitätskits

Im ersten Schritt wird das Medium unter sterilen Bedingungen aus der Kulturflasche abgesaugt und 4 ml PBS werden in die Flasche pipettiert. Nach vorsichtigem Schwenken wird wieder abgesaugt und 1 ml Trypsin in die Flasche pipettiert, welche anschließend für 10 Minuten in den Inkubator gestellt werden (37 °C und 5 % CO₂).

Ob sich die Zellen gelöst haben, kann im Mikroskop überprüft werden.

Anschließend kommen 8 ml Medium zu den Zellen und diese Zellsuspension wird durch Auf- und Abziehen mit der Pipette durchmischt. Eine erneute Kontrolle der Zellsuspension im Mikroskop sollte erfolgen. Dann werden die Zellen aus der Zellkulturflasche durch ein Sieb mit 70 µm Maschenweite in ein 50 ml Falcon Röhrchen filtriert. Dieses Röhrchen stellt man für 3 Minuten bei 1000 rpm /200 g in die Zentrifuge. Nach dem Zentrifugieren setzt sich am Gefäßboden das Zellpellet ab. Der Überstand kann abgesaugt und verworfen werden. Man resuspendiert das Pellet mit 1 ml Medium. Zur Ermittlung der Anzahl der Zellen im Coulter Counter werden 100 µl dieser Suspension mit isotoner Lösung aufgefüllt und vermessen.

In eine „96-well“-Platte überträgt man 100 µl Zellsuspension pro well und inkubiert die Platte über Nacht. Am folgenden Tag ersetzt man das Medium durch eine äquivalente Menge an Medium + DMSO als Blindprobe bzw der entsprechenden Konzentration an Paclitaxel. Bei all überprüften Paclitaxel-Konzentrationen wurde 0,1 %iges DMSO verwendet.

Die so behandelten Platten werden für eine bestimmte Zeit inkubiert (6, 12, 24 oder 48 Stunden).

Dann werden in jedes „Well“ mit Hilfe einer Pipette 10 µl der im „Cell-Counting-Kit“ inkludierten Reaktionslösung hinzugefügt. Dabei ist auf Vermeidung von Luftbläschen zu achten, da sonst falsche Messergebnisse resultieren. Die Platten kommen wieder für 1 bis 4 Stunden in den Inkubator. Die Messung der Proben bei einer Absorption von 450 nm stellt den letzten Schritt dar.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ziel dieser Diplomarbeit war es, zu studieren, ob die Aktivierung des Pregnan-X-Rezeptors (PXR) die zytotoxische Wirksamkeit der Zytostatika verstärken kann. Als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor reguliert der Pregnan-X-Rezeptor die Expression von Transportprotein und Metabolisierungsenzymen und ist daher für alle Phasen des Metabolismus von Xenobiotika von Bedeutung. Seine Aktivierung ist auch maßgeblich für wichtige induktive Arzneimittelinteraktionen. Nach Aktivierung durch verschiedene Pharmaka und Xenobiotika bindet der Pregnan-X-Rezeptor als Heterodimer mit dem 9-cis Retinolsäurerezeptor an Regulatorregion von Genen, die für Proteine kodieren, die im Metabolismus und in der Elimination der Xenobiotika wichtig sind. Zu diesen Zielgenen gehören Cytochrom-P450 Isoenzyme wie CYP3A4 und Transportproteine wie die Membraneffluxpumpe P-Glykoprotein (P-gp). Da P-Glykoprotein häufig gemeinsam mit CYP3A4 in verschiedenen Zellen exprimiert wird und die meisten P-Glykoprotein-Substrate auch von CYP3A4 metabolisiert werden, wird vermutet, dass beide Proteine Teil eines kombinierten Entgiftungsmechanismus sind. Der Einfluss der Pregnan-X-Rezeptor-Aktivatoren Dexamethason und Rifampicin auf die Toxizität des Zytostatikums Paclitaxel in Tumorzelllinien wird daher in dieser Diplomarbeit untersucht.

Studien werden in den beiden Osteosarkom-Zelllinien MG-63 und HOS durchgeführt. Es wird überprüft, ob sich die Zytotoxizität von Paclitaxel durch die Aktivierung des Pregnan-X-Rezeptors verändert. Durch vermehrten Efflux, der über P-Glykoprotein aus den Zellen bewerkstelligt wird, könnte die Zytotoxizität reduziert werden.

4.1. Einfluss von Dexamethason auf die Zytotoxizität von Paclitaxel in Osteosarkomzellen

Bei dieser Versuchsreihe wurde mittels Zytotoxizitätstest geprüft, ob Dexamethason als Aktivator des Pregnan-X-Rezeptors (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2), die Toxizität von Paclitaxel beeinflusst. Hierfür wurden Toxizitätsstudien in den beiden Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 durchgeführt.

Wie die Abbildungen 1 und 2 zeigen, wird die Überlebensrate von HOS und MG-63 Zellen durch die Behandlung mit Dexamethason (DEX) im Vergleich zu den Kontrollexperimenten um bis zu 30% und 20% gesteigert. Die Überlebensraten in Gegenwart von Paclitaxel wurden auf 100% normalisiert.

Während Dexamethason in den MG-63 Zellen die Paclitaxeltoxizität nur wenig verändert, kommt es in der HOS Zelllinie nicht zu der erwarteten Verstärkung, sondern zu einer Minderung der Toxizität von Paclitaxel. In der der HOS Zelllinie (Abbildung 1) steigt die Überlebensrate nach Dexamethasonbehandlung (20 μM) in Gegenwart von 5 nM Paclitaxel um bis zu 20% an. 50 μM Dexamethason hat nur einen geringen Effekt.

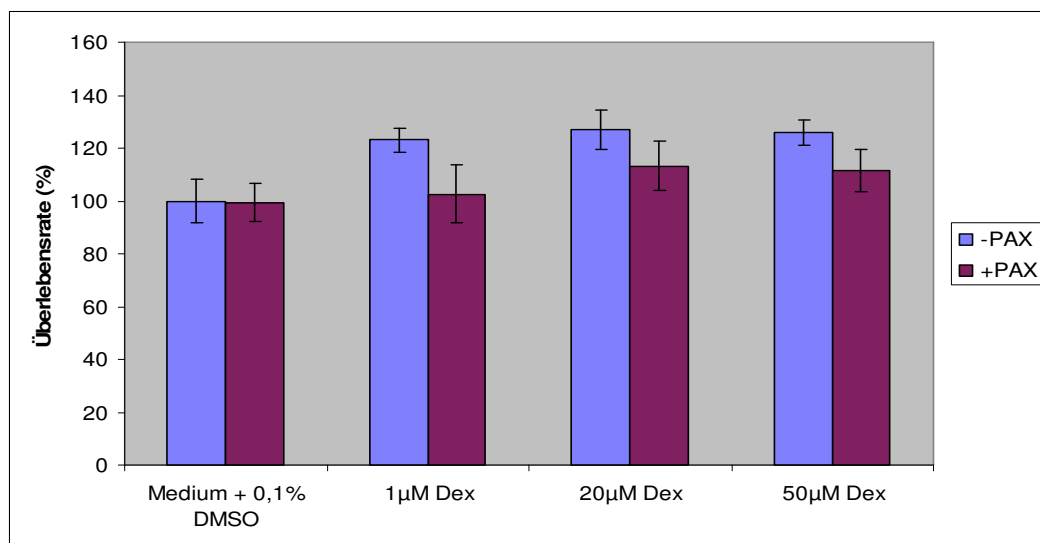


Abbildung 1: Bestimmung der Überlebensrate von HOS Zellen nach Behandlung (48 h) mit unterschiedlichen Dosen (1 – 50 μM) an Dexamethason (DEX) und 5 nM Paclitaxel (PAX). Die Werte sind in % der Überlebensrate unter Kontrollbedingungen (Zellen ohne Dexamethasonbehandlung = 100 %) ausgedrückt. Die Werte unter Kontrollbedingungen wurden in Gegenwart von Paclitaxel (PAX) auf 100% normalisiert. In Kontrollversuchen wurde das Lösungsmittel 0.1% Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

In der MG-63 Zelllinie (Abbildung 2) führt die Behandlung mit 1 μM Paclitaxel in Kombination mit 1 μM Dexamethason zu einem 20 %igen Anstieg der Überlebensrate. In dieser Zelllinie sinkt nach Dosiserhöhung von Dexamethason (20 μM) die Überlebensrate der Zellen in Gegenwart von Paclitaxel (PAX) auf die der Kontrollbedingungen. Im Falle einer Aktivierung die Expression von Effluxpumpen wie P-Glykoprotein müsste ein vermehrter Transport von Paclitaxel aus der Zelle stattfinden und die Toxizität des Zytostatikums abgeschwächt werden. Da Dexamethason keine signifikante Wirkung auf die

Zytotoxizität von Paclitaxel hat und im Gegenteil noch das Überleben der Zellen fördert, müssen andere Mechanismen, die von der Aktivierung der Effluxpumpen unabhängig sind, zum Tragen kommen.

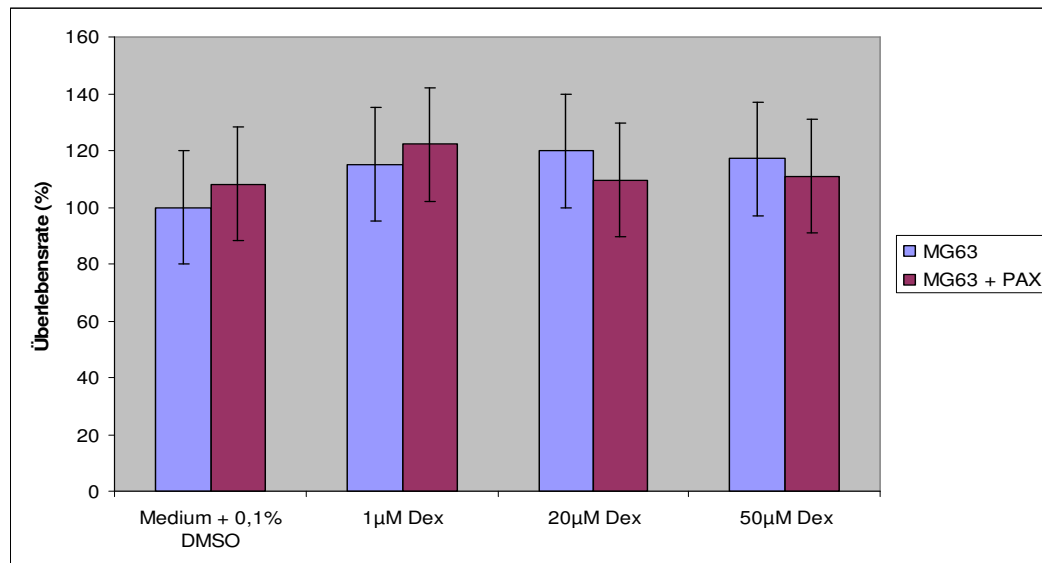


Abbildung 2: Bestimmung der Überlebensrate von MG-63 Zellen nach Behandlung (48 h) mit unterschiedlichen Dosen (1 – 50 µM) an Dexamethason (DEX) und 1 µM Paclitxel (PAX). Die Werte sind in % der Überlebensrate unter Kontrollbedingungen (Zellen ohne Dexamethasonbehandlung = 100 %) ausgedrückt. Die Werte unter Kontrollbedingungen wurden in Gegenwart von Paclitaxel (PAX) auf 100% normalisiert. In Kontrollversuchen wurde das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

Frühere Studien von Pascussi et al. (2000) zeigten, dass das Dexamethason auch zu einer vermehrten Expression des Retinoid-X-Rezeptors- α (RXR- α) und der Pregnan-X-Rezeptor mRNA zumindest in kultivierten humanen Hepatocyten führen kann. In weiterer Folge führt Dexamethason dazu, dass sich die nukleäre Konzentration des Retinoid-X-Rezeptor- α -Pregnan-X-Rezeptor-Heterodimers erhöht. Diese Akkumulation von Pregnan-X-Rezeptor und Retinoid-X-Rezeptor- α im Kern erklärt den synergistischen Effekt, welcher mit Dexamethason und Pregnan-X-Rezeptor-Aktivatoren auf die Induktion der Metabolisierungsenzyme und Transporter beobachtet wird. Es besteht ein funktionaler „Cross talk“ zwischen dem Glukokortikoid-Rezeptor und Pregnan-X-Rezeptor. Die Wirkung von Dexamethason auf das Überleben der Zellen scheint durch die Aktivierung des Glukokortikoid-Rezeptor (GR) bedingt zu sein. Der Glukokortikoid-Rezeptor wirkt wie alle Nukleären Rezeptoren als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der die Genexpression der Zielgene reguliert (Doni et al.,

2008). Zu den Zielgenen zählen Wachstumsfaktoren, die für das Überleben der Zellen wichtig sind und deren Expression dadurch aktiviert wird.

Dies erklärt auch, warum andere Pregnan-X-Rezeptor-Aktivatoren wie z.B. Rifampicin die den Glukokortikoid-Rezeptor nicht aktivieren können, keinen Einfluss auf die Expression dieser Transkriptionsfaktoren haben,

4.2. Einfluss von Rifampicin auf die Zytotoxizität von Paclitaxel in Osteosarkomzellen

Bei den nun folgenden Experimenten wurde der Einfluss von Rifampicin (RIF) auf die Empfindlichkeit der Osteosarkomzellen HOS und MG-63 gegenüber Paclitaxel (PAX) erforscht.

Wie in Abbildung 3 und Abbildung 4 ersichtlich, beeinflusst Rifampicin die Überlebensrate der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,1 % DMSO) nur wenig. Paclitaxel reduziert die Überlebensrate der Tumorzellen auf ca. 50%. Allerdings steigt die Überlebensrate in Abwesenheit von Paclitaxel nach Behandlung mit Rifampicin (5 μ M - 25 μ M) nicht an, während sie unter Kontrollbedingungen nach Gabe von Rifampicinkonzentration um circa 10 % ansteigt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Dexamethason Versuchen, führt Rifampicin zu keiner Veränderung der verminderten Überlebensrate in Gegenwart von Paclitaxel. Bei der niedrigsten Rifampicin-Konzentration (5 μ M) wird die Toxizität von Paclitaxel nur unwesentlich verändert. Die Überlebensrate in den HOS Zellen als auch in den MG-63 Zellen bleibt wie in der Kontrollgruppe auf ungefähr 40 %. Bei einer Gabe von 25 μ M Rifampicin und 5 nM Paclitaxel steigt die Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe an und es überleben bis zu 55 % der Zellen.

Rifampicin besitzt analog zu Dexamethason die Fähigkeit den Pregnan-X-Rezeptor zu aktivieren, was eine vermehrte Expression von Effluxpumpen wie zum Beispiel P-Glykoprotein zur Folge hat und ein erhöhter Transport von Paclitaxel aus der Zelle stattfinden sollte. Die Toxizität des Zytostatikums wäre somit vermindert. Da aber gezeigt wurde, dass Rifampicin auch ein Substrat für P-Glykoprotein ist, könnte Rifampicin mit Paclitaxel um die Ausscheidung

konkurrieren (Nobili et al., 2006). Dies würde die vermindert Zytotoxizität von Paclitaxel in Gegenwart höherer Konzentrationen an Rifampicin erklären.

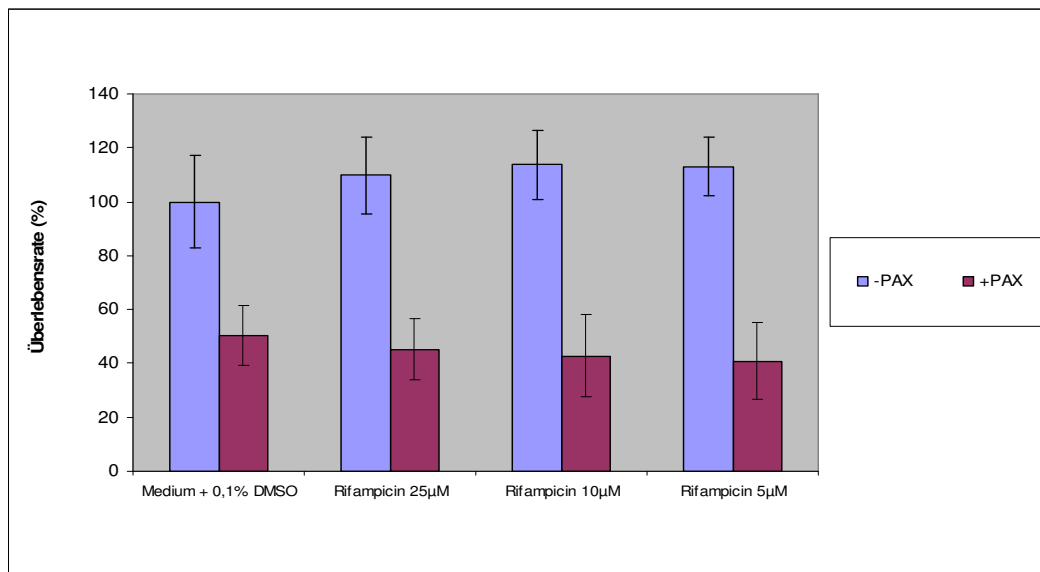


Abbildung 3: Bestimmung der Überlebensrate von HOS Zellen nach Behandlung (48 h) mit unterschiedlichen Dosen (5-25 µM) an Rifampicin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit 5 nM Paclitaxel (PAX). Die Werte sind in % der Überlebensrate unter Kontrollbedingungen (HOS Zellen ohne Paclitaxel- und Rifampicin-Behandlung = 100 %) ausgedrückt. In Kontrollproben wurde das Lösungsmittel 0.1 % Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

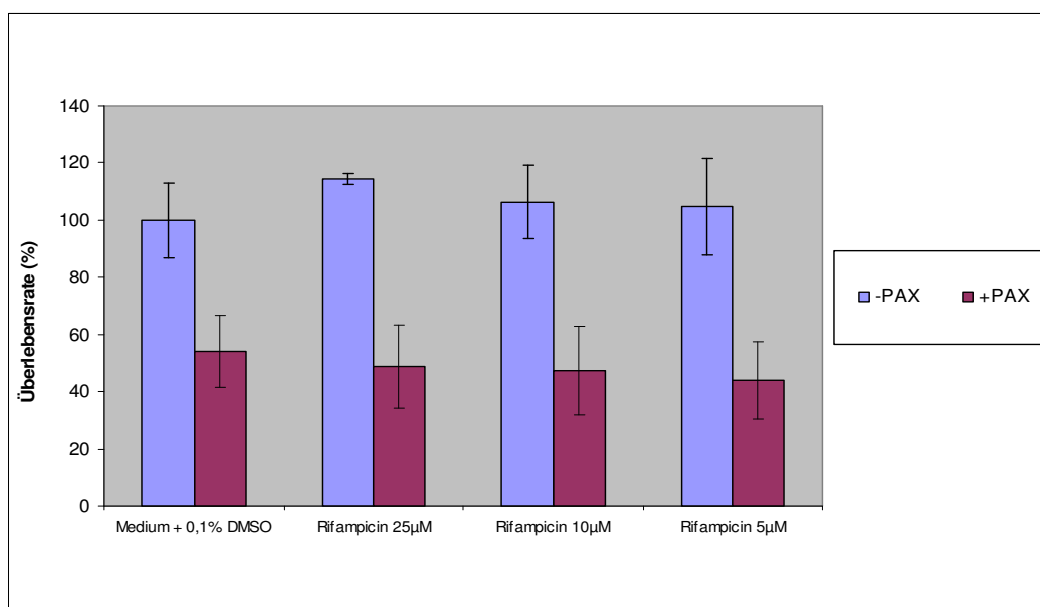


Abbildung 4: Bestimmung der Überlebensrate von MG-63 Zellen nach Behandlung (48 h) mit unterschiedlichen Dosen (5-25 µM) an Rifampicin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit 5 nM Paclitaxel (PAX). Die Werte sind in % in Relation zur Überlebensrate unter Kontrollbedingungen (HOS Zellen ohne Paclitaxel- und Rifampicin-Behandlung = 100 %) ausgedrückt. In Kontrollproben wurde das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

4.3. Wirkung von 9-cis-Retinolsäure auf die Toxizität von Paclitaxel in Osteosarkomzellen

Um den Einfluss der Aktivierung des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) auf die Zytotoxizität von Paclitaxel zu untersuchen, wurden folgende Versuche, die in Abbildung 5 und 6 dargestellt sind, mit den Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 durchgeführt.

9-cis-Retinolsäure-Rezeptoren (RXRs) gehören zu der Steroid/Thyroid Hormonrezeptor- Superfamilie. Es existieren 3 Isoformen, wobei Retinoid-X-Rezeptor- α die vorherrschende Isoform in der Leber ist. Der Rezeptor hat die Funktion eines Hilfsproteins, der ein Heterodimer mit anderen nuklearen Rezeptoren, z.B. den Retinoid-X-Rezeptor, Vitamin D Rezeptor und Thyroidhormonrezeptor, bildet (Pascussi et al., 2000).

Als Aktivator des Retinoid-X-Rezeptors wurde bei diesen Experimenten die 9-cis-Retinolsäure eingesetzt. Diese bindet im Zytoplasma an den Rezeptor und bildet Heterodimere mit dem Pregnan-X-Rezeptor, wodurch eine Konformationsänderung ausgelöst wird. Nun erfolgt der Transport des Pregnan-X-Rezeptor-Retinoid-X-Rezeptor-Heterodimers in den Zellkern und die mRNA-Expression unterschiedlicher Pregnan-X-Rezeptor-Zielgene wird durch Bindung an die DNA möglich.

Wie aus den Abbildungen 5 und 6 ersichtlich, hat 9-cis-Retinolsäure nur geringe Auswirkung auf die Überlebensrate der beiden Osteosarkomzelllinien. Nach Behandlung mit einer steigenden Konzentration an 9-cis-Retinolsäure wird sowohl bei den HOS Zellen als auch bei den MG-63 Zellen die Überlebensrate um ca. 10 % vermindert. Nach Behandlung mit 1 μ M Paclitaxel hat die Zugabe von 9-cis-Retinolsäure keine signifikante Beeinflussung auf das Überleben der Zellen. In der HOS Zelllinie hat die Behandlung mit 0,1 μ M 9-cis-Retinolsäure ein Zellwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe (mit DMSO) zur Folge. Bei höherer Dosierung (5 μ M 9cis RA) entspricht das Zellwachstum dem der Kontrolle. In den MG-63 Zellen hat die Zugabe von 1 μ M keine signifikante Veränderung der Zellzahl zur Folge.

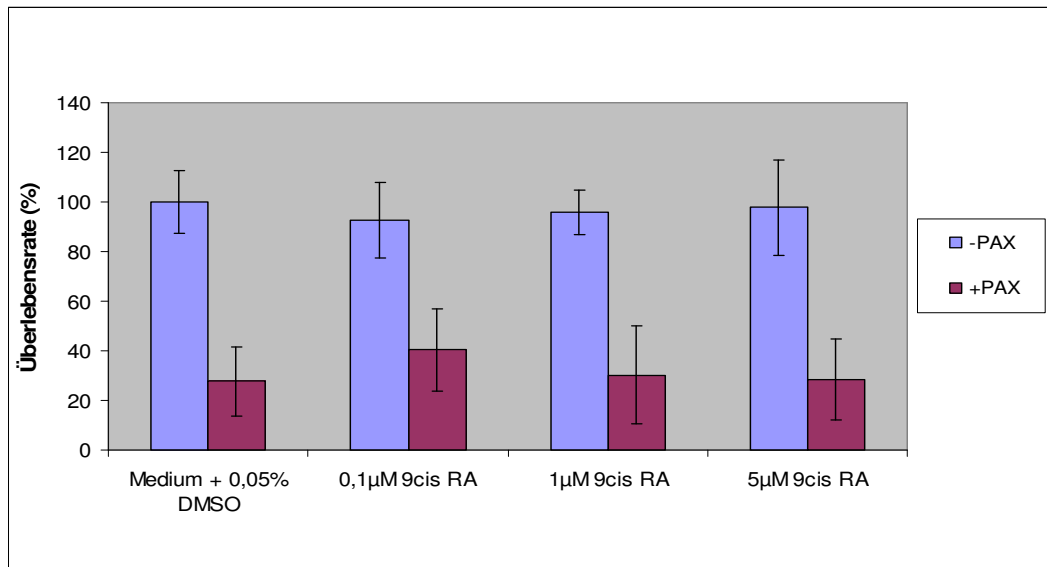


Abbildung 5: Ermittlung der Überlebensrate von HOS Zellen nach Behandlung (48h) mit unterschiedlichen Dosen (0,1-5 µM) an 9-cis-Retinolsäure (9cis RA). Es wurden HOS Zellen unter Kontrollbedingungen (ohne Paclitaxel) und nach Zusatz von 1 µM Paclitaxel untersucht. Die Werte sind in % der Überlebensrate unter Kontrollbedingungen (Zellen ohne Paclitaxel- und 9-cis-Retinolsäure = 100 %) ausgedrückt. In Kontrollversuchen wurde das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

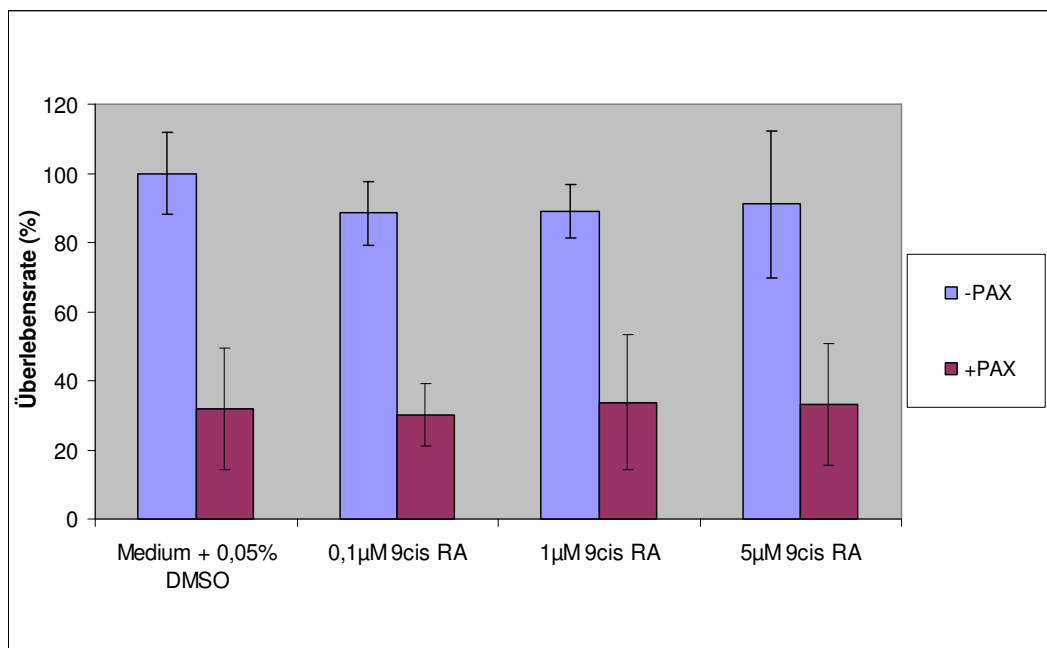


Abbildung 6: Ermittlung der Überlebensrate von MG-63 Zellen nach Behandlung (48h) mit unterschiedlichen Dosen (0,1-5 µM) an 9-cis-Retinolsäure (9cis RA). Es wurden MG-63 Zellen unter Kontrollbedingungen (ohne Paclitaxel) und nach Zusatz von 1 µM Paclitaxel untersucht. Die Werte sind in % in Relation zur Überlebensrate unter Kontrollbedingungen (Zellen ohne Paclitaxel- und 9-cis-Retinolsäure = 100 %) ausgedrückt. In Kontrollexperimenten wurde das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung des Osteosarkoms, ein Knochentumor der vor allem bei jungen Patienten auftritt, ist noch immer problematisch und eine kurative Behandlung ist in den meisten Fällen (Erfolgsrate unter 50%) immer noch nicht gegeben. In der Standardtherapie erfolgt nach initialer Behandlung mit Chemotherapeutika der chirurgischen Entfernung des primären Tumors im betroffenen Knochen. Die präoperative Chemotherapie ist besonders wichtig, um die primären Knochentumoren zu verkleinern um so möglichst viel Knochenmaterial zu erhalten. Auch bereits gebildete Metastasen sollten durch die Chemotherapie erreicht werden.

Eine große Problematik in der Behandlung dieser Tumoren ist die Vielfachresistenz („Multidrug Resistance“, MDR) der Osteosarkomzellen. Hierbei entwickeln die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber der Wirkung verschiedener, funktionell und strukturell unterschiedlicher Zytostatika. Ursache ist oft, dass aufgrund einer Überexpression von membranständigen Transportproteinen, wie z.B. von P-Glykoprotein, die Zytostatika effektiv aus der Zelle gepumpt werden. Dadurch kann die für den therapeutischen Effekt notwendige Konzentration an Zytostatika in den Zellen nicht erreicht werden.

Da die Vielfachresistenz ein bedeutendes Problem in der Chemotherapie der Knochentumoren und besonders des Osteosarkoms ist, wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht, welchen Einfluss Pregnan-X-Rezeptor-(PXR)-Aktivatoren auf die Expression von P-Glykoprotein in den beiden Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 besitzen. Durch Anwendung dieser Verbindungen sollte die Empfindlichkeit der Osteosarkomzellen gegenüber dem Zytostatikum Paclitaxel erhöht werden.

Paclitaxel (5nM) verringerte innerhalb von 48 h die Überlebensrate beider Zelllinien um ca. 50%. Allerdings wurde die Zytotoxizität von Paclitaxel in den beiden Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 durch Dexamethason und Rifampicin nicht signifikant verändert. Unter Kontrollbedingungen kommt es nach Behandlung beider Zelllinien mit Dexamethason sogar zu einem geringen Anstieg der Überlebensrate. Auch Versuche mit 9-cis-Retinolsäure, die an den Heterodimerisierungspartner von PXR, den Retinoidsäurerezeptor bindet, führten

zu keiner signifikanten Veränderung der Zytotoxizität von Paclitaxel in den beiden Knochenkarzinomzelllinien.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen der Diplomarbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass die Anwendung der beiden PXR-Aktivatoren und auch des Retinoidsäurerezeptor-Aktivators zu keiner erhöhten Wirksamkeit von Paclitaxel in den Osteosarkomzelllinien führt. Um ein verbessertes Ansprechen auf die Therapie und größere Heilungschancen von Knochtumoren zu erreichen, müssen daher neue Konzepte gefunden werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ASCHERO A, GORINCOUR G, GLARD Y, DESVIGNES C, PARIS M, BOURLIÈRE-NAJEAN B, BOLLINI G, PETIT P: Percutaneous treatment of osteoid osteoma by laser thermocoagulation under computed tomography guidance in pediatric patients. *Eur Radiol.* 2008; [Epub ahead of print].

BACCI G, FERRARI S, BERTONI F, RIMONDINI S, LONGHI A, BACCHINI P, FORNI C, MANFRINI M, DONATI D, PICCI P: Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 4-11.

BERMAN SD, CALO E, LANDMAN AS, DANIELIAN PS, MILLER ES, WEST JC, FONHOUE BD, CARON A, BRONSON R, BOUXSEIN ML, MUKHERJEE S, LEES JA.:

Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105 :11851-6.

BOVÉE JV.: Multiple osteochondromas. *Orphanet J Rare Dis.* 2008; 3:3.

CHENG H, JIANG W, PHILILPS FM, HAYDON RC, PENG Y, ZHOU L, LUU HH, AN N, BREYER B, VANICHAKARN P, SZATKOWSKI JP, PARK JY, HE TC: Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A(8):1544-52.

CHU K, CHENG CJ, YE X, LEE YC, ZURITA AJ, CHEN DT, YU-LEE LY, ZHANG S, YEH ET, HU MC, LOGOTHETIS CJ, LIN SH: Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res.* 2008; 6: 1259-67.

CVETKOVIC M, LEAKE B, FROMM MF, WILKINSON GR, KIM RB.: OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27: 866-71.

DAWSON RJ, HOLLENSTEIN K, LOCHER KP: Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol Microbiol.* 2007; 65: 250-7.

DONI A, MANTOVANI G, PORTA C, TUCKERMANN J, REICHARDT HM, KLEIMAN A, SIRONI M, RUBINO L, PASQUALINI F, NEBULONI M, SIGNORINI S, PERI G, SICA A, BECK-PECCOZ P, BOTTAZZI B, MANTOVANI A: Cell-specific Regulation of PTX3 by Glucocorticoid Hormones in Hematopoietic and Nonhematopoietic Cells. *J Biol Chem.* 2008; 283: 29983-92.

FONG D, STEURER M, GREIL R, GUNSILIUS E, SPIZZO G, GASTL G, TZANKOV A: Hodgkin lymphoma in Tyrol-a population-based study. *Ann Hematol.* 2008; [Epub ahead of print].

FREYSCHMIDT J, OSTERTAG H, JUNDT G: Knochentumoren, Klinik, Radiologie, Pathologie, 2. Auflage, Springer Verlag, 2003, p 1, 292, 454, 517, 571, 611

FRIEDRICHS N, KÜCHLER J, ENDL E, KOCH A, CZERWITZKI J, WURST P, METZGER D, SCHULTE J, HOLST M, HEUKAMP L, LARSSON O, TANAKAS, KAWAI A, WARDELMANN E, BUETTNER R, PIETSCH T, HARTMANN W: Insulin-like growth factor-1 receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma. *J Pathol.* 2008; [Epub ahead of print].

FUCHS N, BIELACK SS, EPLER D, BIELING P, DELLING G, KÖRHOLZ D, GRAF N, HEISE U, JÜRGENS H, KOTZ R, SALZER-KUNTSCHIK M, WEINEL P, WERNER M, WINKLER K: Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann Oncol.* 1998; 9: 893-9.

GONCALES R, SAAD JUNIOR R, DORGANNETO V, BOTTER M: [A rare case of pneumothorax: metastatic adamantinoma]. J Bras Pneumol. 2008; 34: 425-9.

GREENSPAN A, REMAGEN W: Knochentumoren, Differentialdiagnose in Radiologie und Pathologie; Thieme Verlag 2000; p 26, 58, 159, 218-219, 240-241, 254, 287, 328, 388

HE P, COURT MH, GREENBLATT DJ, VON MOLTKE LL: Human pregnane X receptor: genetic polymorphisms, alternative mRNA splice variants, and cytochrome P450 3A metabolic activity. J Clin Pharmacol. 2006; 46: 1356-69.

HANAHAND, WEINBERG RA: The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100: 57-70.

HQUE AU, MOATASIM A: Giant cell tumor of bone: a neoplasm or a reactive condition? Int J Clin Exp Pathol. 2008; 1: 489-501.

ILIC I, MANOJLOVIC S, CEPULIC M, ORLIC D, SEIWERTH S: Osteosarcoma and Ewing's sarcoma in children and adolescents: retrospective clinicopathological study. Croat Med J. 2004; 45: 740-5.

JAFFE N, CARRASCO H, RAYMOND K, AYALA A, EFTEKHARI F: Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? Cancer. 2002; 95: 2202-10.

KITAGAKI J, AGAMA KK, POMMIER Y, YANG Y, WEISSMAN AM: Targeting tumor cells expressing p53 with a water-soluble inhibitor of Hdm2. Mol Cancer Ther. 2008; 7: 2445-54.

KLEIN G: Better understanding of the biology of cancer cells. Ugeskr Laeger. 2000;162:5199-204.

KLIEWER SA, GOODWIN B, WILLSON TM: The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. Endocr Rev. 2002; 23: 687-702.

KOMINSKY SL, ABDELMAGID SM, DOUCET M, BRADY K, WEBER KL: Macrophage inflammatory protein-1 delta: a novel osteoclast stimulating factor secreted by renal cell carcinoma bone metastasis. *Cancer Res.* 2008; 68: 1261-6.

LANG S: Differenzialdiagnose riesenzellreicher Knochenläsionen. *Pathologe* 2008. [Suppl2]29: [Epub ahead of print].

LIMTRAKUL P, CHEARWAE W, SHUKLA S, PHISALPHONG C, AMBUDKAR SV:

Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol Cell Biochem.* 2007; 296: 85-95.

LIPTON A: Treatment of bone metastases and bone pain with bisphosphonates. *Support Cancer Ther.* 2007; 4: 92-100.

LIUF, PAN C, DRUMM P, ANG CY: Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: active constituents and their transformation. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 37: 303-12.

LÖFFLER G, PETRIDES P: *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998, p 749, 1091, 1098, 1105, 1110-1111

MATIC M, MAHNS A, TSOLI M, CORRADIN A, POLLY P, ROBERTSON GR: Pregnane X receptor: promiscuous regulator of detoxification pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 478-83.

MISTRY P, STEWART AJ, DANGERFIELD W, OKIJI S, LIDDLE C, BOOTLE D, PLUMB JA, TEMPLETON D, CHARLTON P: In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* 2001; 61: 749-58.

MÜLHARDT C: Der Experimentator- Molekularbiologie/Genomics“, 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2006; p 105-108

MUTSCHLER E, GEISLINGER G, KROEMER H, SCHÄFER-KORTING M: Arzneimittelwirkungen- Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2001, p 39, 41, 878

NOBILI S, LANDINI I, GIGLIONI B, MINI E: Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets*. 2006; 7: 861-79.

OGATA Y: Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontal Res*. 2008; 43: 127-35.

PASCUSSI JM, DROCOURT L, FABRE JM, MAURELP, VILAREM MJ: Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol*. 2000; 58: 361-72.

PENNEKAMP W, PETERS S, SCHINKEL C, KUHNEN C, NICOLAS V, MUHR G, FRANGEN TM., Aneurysmal bone cyst of the cervical spine (2008:7b). *Eur Radiol*. 2008; 18: 2356-60.

PIETSCHMANN P, RAUNER M, SIPOS W, KERSCHAN-SCHINDL K: Osteoporosis: An Age-Related and Gender-Specific Disease - A Mini-Review. *Gerontology*. 2008; [Epub ahead of print].

PINGOUD A, URBANKE C: Arbeitsmethoden der Biochemie, de Gruyter. 1997, p 185

QIAO M, SHENG S, PARDEE AB: Metastasis and AKT activation. *Cell Cycle*. 2008; 7: 2991-6

RICHTER G: Praktische Biochemie, Thieme, 2003, p 150, 151

SAMMARTINO G, MARENZI G, HOWARD CM, MINIMO C, TROSINO O, CALIFANO L, CLAUDIO PP: Chondrosarcoma of the jaw: a closer look at its management. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 2349-55.

SANGAI T, FUJIMOTO H, MIYAMOTO S, MAEDA H, NAKAMURA M, ISHII G, NAGAI K, NAGASHIMA T, MIYAZAKI M, OCHIAI A: Roles of osteoclasts and bone-derived IGFs in the survival and growth of human breast cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Metastasis.* 2008; 25 :401-10.

SCHIFFER R, NEIS M, HÖLLER D, RODRIGUEZ F, GEIER A, GARTUNG C, LAMMERT F, DREUW A, ZWADLO-KLARWASSER G, MERK H, JUGERT F, BARON JM: Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2003; 120: 285-91.

SCHWANINGER R, RENTSCH CA, WETTERWALD A, VAN DER HORST G, VAN BEZOOIJEN RL, VAN DER PLUIJM G, LÖWIK CW, ACKERMANN K, PYERIN W, HAMDY FC, THALMANN GN, CECCHINI MG: Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *Am J Pathol.* 2007; 170: 160-75.

SILBERNAGL S, LANG F: *dtv-Atlas-Pathophysiologie*, Thieme Verlag, 1998, p 12, 132

SONE S, YANO S: Molecular pathogenesis and its therapeutic modalities of lung cancer metastasis to bone. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 685-9.

TANG N, SONG WX, LUO J, HAYDON RC, HE TC: Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res.* 2008; 466: 2114-30.

TANINO T, NAWA A, KONDO E, KIKKAWA F, DAIKOKU T, TSURUMI T, LUO C, NISHIYAMAY, TAKAYANAGI Y, NISHIMORI K, ICHIDA S, WADA T, MIKI Y, IWAKI M: Paclitaxel-2'-Ethylcarbonate prodrug can circumvent P-glycoprotein-mediated cellular efflux to increase drug cytotoxicity. *Pharm Res.* 2007; 24: 555-65.

VAN SANT C, WANG G, ANDERSON MG, TRASK OJ, LESNIEWSKI R, SEMIZAROV D: Endothelin signaling in osteoblasts: global genome view and implication of the calcineurin/NFAT pathway. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 253-61.

WALLACH D, BOLDIN M, GONCHAROV T, GOLTSEV Y, METT I, MALININ N, ADAR R, KOVALENKO A, VARFOLOMEEV E: Exploring cell death mechanisms by analyzing signaling cascades of the TNF/NGF receptor family. *Behring Inst Mitt.* 1996; 97: 144-55.

WILKINS RM, CULLEN JW, ODOM L, JAMROZ BA, CULLEN PM, FINK K, PECK SD, STEVENS SL, KELLY CM, CAMOZZI AB: Superior survival in treatment of primary nonmetastatic pediatric osteosarcoma of the extremity. *Ann Surg Oncol.* 2003; 10: 498-507.

YARBRO JW: Oncogenes and cancer suppressor genes. *Semin Oncol Nurs.* 1992; 8: 30-9.

7. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name Iris Christina Kubik

Geburtsdatum 17.8.1982

Schulbildung

1988-1992 Volksschule: 1210 Wien, Dunantgasse 2

1992-2000 1210 Wien,
Bundesgymnasium/Bundesrealgymnasium und
Wirtschaftskundliches Realgymnasium 26

2000 Matura

Seit 2000 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Seit 2004 Studium der Erziehungs- und
Bildungswissenschaften