

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. H. Jürgens -

In vitro-Effekte von PPAR-Agonisten an einem Panel von 18 pädiatrischen Tumor-Zelllinien

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Stefan Zicholl

aus Hamm

2010

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Boos

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. S. Koschmieder

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Boos
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. S. Koschmieder

ZUSAMMENFASSUNG

In vitro-Effekte von PPAR-Agonisten auf ein Panel von 18 pädiatrischen Tumorzelllinien

Stefan Zicholl

Fragestellung: Bei mittlerweile guten Heilungschancen für Kinder mit malignen Erkrankungen, jedoch nach wie vor erheblicher Therapie-bedingter Toxizität, rückt die Reduktion unerwünschter Effekte unter Beibehaltung der Therapieeffizienz hinsichtlich neuer Therapiekonzepte in den Vordergrund. PPAR-Agonisten sind gut verträgliche Medikamente, die bei Lipidstoffwechselstörungen oder Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden. In Arbeiten an unterschiedlichen Tumoren wurde eine antiproliferative Wirksamkeit dieser Substanzen beobachtet. Da im Bereich der pädiatrischen Hämatologie/Onkologie nur wenige Daten diesbezüglich vorliegen, sollen hier die antiproliferativen Effekte des PPAR α -Agonisten Fenofibrat und des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon an 18 verschiedenen pädiatrischen Tumor-Zelllinien gescreent werden. Es werden Fragen zu Wirkmechanismen und eventueller Einsetzbarkeit der Substanzen *in vivo* bearbeitet.

Methodik: Die Effekte von Rosiglitazon und Fenofibrat wurden an den entsprechenden Zelllinien allein und in Kombination mit dem Zytostatikum Doxorubicin in unterschiedlichen Substanzkonzentrationen mit Hilfe des MTT-Assays nach 72 Stunden Inkubation untersucht. Durch real-time TaqMan® PCR wurde die Expression der entsprechenden Rezeptoren analysiert und Rezeptor-abhängige von Rezeptor-unabhängigen Effekten differenziert.

Ergebnisse: Die PPAR-Agonisten hatten auf die getesteten Zelllinien am ehesten Rezeptor-unabhängige Wachstums-inhibierende Effekte. Es bestand keine signifikante Korrelation der Rezeptorexpression mit der Wirksamkeit der Substanzen. Die das Zellwachstum um 50 % reduzierende Konzentration lag für Rosiglitazon zwischen 0.037 und 353 $\mu\text{mol/l}$, bei Fenofibrat zwischen 45.8 und 381 $\mu\text{mol/l}$. Im Mittel war Rosiglitazon die toxischere Substanz. Leukämie- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien zeigten die höchste Sensitivität gegen die Substanzen. Ewing- und Osteosarkom-Zelllinien waren relativ sensitiv gegen Rosiglitazon und resistent gegen Fenofibrat. Fenofibrat wirkte eher antagonistisch zum Doxorubicin, während die Effekte von Rosiglitazon zusammen mit Doxorubicin synergistisch oder zumindest additiv waren.

Schlussfolgerungen: Die Untersuchungen typischer Vertreter der jeweiligen Substanzgruppen zeigen, dass PPAR γ -Agonisten *in vitro* eine höhere Zytotoxizität als der PPAR α -Agonisten aufweisen. Anhand der Kombinationsversuche mit Doxorubicin liegt nahe, dass PPAR γ -Agonisten die Dosis von Doxorubicin bei gleicher Gesamtwirksamkeit reduzieren können. Es ergeben sich somit interessante Hinweise auf eine mögliche Einsetzbarkeit von PPAR γ -Agonisten in der pädiatrischen Tumorthherapie.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Tumorerkrankungen im Kindesalter	1
1.2	Medikamentöse Krebstherapie bei Kindern	4
1.2.1	Konventionelle Chemotherapie	4
1.2.2	Ergänzende medikamentöse Therapiemöglichkeiten	8
1.2.2.1	Allgemeines	8
1.2.2.2	PPAR-Agonisten	8
1.2.2.2.1	Klassifizierung und Lokalisation des Rezeptors	8
1.2.2.2.2	Wirkungsweise der PPAR-Agonisten	9
1.2.2.2.3	Pharmakologische Bedeutung der PPAR-Agonisten	10
1.2.2.2.4	Antineoplastische Effekte der PPAR-Agonisten	16
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Zelllinien	20
2.1.2	verwendete Substanzen	26
2.1.3	Einmal-Laborbedarf	26
2.1.4	Lösungen und Reagenzien	27
2.1.5	technische Geräte	28
2.1.6	verwendete Software	29
2.1.7	sonstige Hilfsmittel	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.1.1	Auftauen und Einfrieren der Zellen und die Vorbereitung zum experimentellen Gebrauch	31
2.2.1.2	Coating von Zellkulturflaschen	32
2.2.1.3	Passagieren/Teilen der Zellen	33
2.2.2	In vitro-Testverfahren zur Zytotoxizitätsmessung	35
2.2.2.1	Aussiedeln der Zellen	35
2.2.2.2	Erste Wachstumskontrolle nach 72 Stunden mit dem MTT- Assay	37
2.2.2.3	Anfertigen der Verdünnungsreihen und Beimpfen der Zellkulturplatten mit den Testsubstanzen	38
2.2.2.4	Erneute MTT-basierte Wachstumskontrolle nach Inkubation mit den Testsubstanzen	41
2.2.2.5	Auswertung der MTT-Assays	41
2.2.2.6	Bestimmung der GI ₅₀ -Konzentrationen	42

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.7	Statistische Analyse	43
2.2.3	Expressionsanalysen.....	44
2.2.3.1	Herstellen von Zellpellets.....	44
2.2.3.2	Isolation der RNA für die quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction (rtPCR)	44
2.2.3.3	Quantitative reverse transcription-Polymerase Chain Reaction.....	45
2.2.3.4	Real-time TaqMan® Polymerase Chain Reaction.....	47
2.2.3.5	Auswertung der PCR-Daten	49
3.	Ergebnisse	51
3.1	Ergebnisse der in vitro-Toxizitätstests	51
3.1.1	Dosis-Wirkungs-Kurven.....	51
3.1.2	In vitro-Toxizität der PPAR-Agonisten	53
3.1.3	In vitro-Toxizität von Doxorubicin	56
3.1.4	In vitro-Toxizität der PPAR-Agonisten in Kombination mit Doxorubicin.....	60
3.1.4.1	Doxorubicin + Rosiglitazon	60
3.1.4.2	Doxorubicin + Fenofibrat.....	67
3.2	Ergebnisse der Expressionsanalysen.....	70
3.2.1	Expression von PPAR α -mRNA	70
3.2.2	Expression von PPAR γ -mRNA	71
3.2.3	Rezeptor-Expression vs. chemisches Ansprechen der Zellen auf PPAR-Agonisten	72
4.	Diskussion.....	74
4.1	Diskussion der MTT-Daten.....	74
4.1.1	Allgemeine Bemerkungen zur aktuellen Datenlage	74
4.1.2	Die Wirkung der PPAR-Agonisten im Vergleich Fenofibrat vs. Rosiglitazon	75
4.1.3	Die Effekte von PPAR-Agonisten auf die einzelnen Tumorentitäten.....	78
4.1.3.1	Die Wirkung auf Neuroblastom-Zelllinien.....	78
4.1.3.2	Die Wirkung auf Leukämie-Zelllinien	82
4.1.3.3	Die Wirkung auf Rhabdomyosarkom-Zelllinien	87
4.1.3.4	Die Wirkung auf Medulloblastom-Zelllinien	89
4.1.3.5	Die Wirkung auf Ewing-Sarkom-Zelllinien	91
4.1.3.6	Die Wirkung auf Osteosarkom-Zelllinien	93
4.2	Diskussion der Expressionsanalysen	96
4.2.1	Rezeptor-unabhängige Mechanismen.....	98
4.2.2	weitere mögliche Mechanismen.....	100
4.3	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das lebende Individuum.....	101
4.3.1	Maximale Plasmaspiegel vs. GI ₅₀ bei Monotherapie	101

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	In vivo-Befunde bei der PPAR-Agonisten-Monotherapie anderer Tumorentitäten	103
4.3.3	Einsatz der PPAR-Agonisten in Kombination mit konventioneller Chemotherapie	106
4.3.4	Mögliche unerwünschte Effekte im klinischen Einsatz	111
4.3.4.1	Mögliche Gefahren der Kombintion von PPAR γ - Agonisten mit Anthrazyklinen.....	111
4.3.4.3	Erhöhtes Frakturrisiko bei Knochtumoren durch Glitazone?	112
4.3.4.3	PPAR-Agonisten und mögliche kanzerogene Effekte	113
4.4	Anregungen für die weitere Erforschung der ermittelten Effekte	114
4.4.1	Verifizierung der gewonnenen Daten	114
4.4.2	Thiazolidinedion-induzierte Effekte	115
4.4.3	Abklärung der Rezeptor-Abhängigkeit	117
4.4.4	Möglichkeiten, die Wirksamkeit der PPAR γ -Agonisten zu erhöhen.....	118
4.4.5	Welcher PPAR γ -Agonist ist am besten für die weitere Überprüfung geeignet?.....	120
4.4.6	Untersuchung anderer Anthrazykline und weiterer Zytostatika auf Kombinationseffekte mit Rosiglitazon.....	120
4.4.7	Untersuchung der Toxizitätssteigerung von Doxorubicin durch die Kombination mit Rosiglitazon.....	121
4.5	Schlussfolgerungen	123
5.	Literaturverzeichnis.....	129
6.	Abkürzungen.....	139
7.	Lebenslauf.....	141
8.	Danksagung.....	142

1. Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen im Kindesalter

Auch wenn Krebserkrankungen im Kindesalter unter 1 % der bösartigen Tumor- und Leukämieerkrankungen insgesamt ausmachen, ist Krebs in den westlichen Industrieländern die zweithäufigste Todesursache der Altersgruppe der zwischen 1 und 15jährigen. Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes treten in Deutschland jährlich ca. 1.800 neue Erkrankungsfälle auf, was innerhalb der Altersgruppe einer Inzidenz von 14/100.000 Kindern entspricht [1].

Das Spektrum der einzelnen Krankheitsentitäten unterscheidet sich bei Kindern deutlich von dem bei Erwachsenen. So stellen hier die Leukämien mit einem Gesamtanteil von 34,1 % die größte Erkrankungsgruppe dar, an zweiter Stelle folgen ZNS-Tumore mit 22,1 %. Weitere für das Kindesalter typische Krebserkrankungen sind Lymphome, Weichteil- und Knochentumore, Tumoren des sympathischen Nervensystems, sowie Nieren- und Keimzelltumoren. Die im Erwachsenenalter dominierenden Karzinome sind bei Kindern äußerst selten. *Tabelle 1.1* enthält die aktuellen Angaben des Robert-Koch-Institutes zu Inzidenz und Überlebensraten.

Tabelle 1.1: *Krebserkrankungen bei Kindern**(Inzidenz und Überlebensraten in Prozent, ermittelt aus den Jahren 1997-2006)*

Krebserkrankungen	Inzidenz*	Überlebensraten in Prozent		
		nach 3 Jahren	nach 5 Jahren	nach 10 Jahren
Hodgkin Lymphome	0,7	97	97	95
Keimzelltumoren	0,5	95	94	92
Lymphatische Leukämien	4,1	91	88	85
Nephroblastome	0,9	91	90	89
Non-Hodgkin-Lymphome	0,8	88	87	86
Neuroblastome u. Ganglioneuroblastome	1,3	83	78	75
Osteosarkome	0,3	82	73	68
Astrozytome	1,5	79	77	73
Rhabdomyosarkome	0,5	78	74	71
Ewingtumoren u. verwandte Knochensarkome	0,3	74	69	65
intrakranielle/intraspinale embryonale Tumoren	0,8	68	61	52
Akute myeloische Leukämien	0,7	65	62	60
Alle Malignome	15,0	84	81	77

* bezogen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren, altersstandardisiert auf die westdeutsche Bevölkerung 1987

Da Tumorerkrankungen in ihrer Gesamtheit bei Erwachsenen wesentlich häufiger auftreten als bei Kindern und somit für die pharmazeutische und medizintechnische Industrie eine deutlich lukrativere Einnahmequelle darstellen, steht dem Bereich der pädiatrisch hämato-onkologischen Forschung von dieser Seite leider ein relativ geringes finanzielles Budget zur Verfügung. Dies macht es umso wichtiger, in der universitären Forschung neue Therapiekonzepte für Kinder mit Krebserkrankungen zu erarbeiten und von der Grundlage an zu erforschen. Dank konsequenter Unterstützung verschiedener Organisationen mit Spendengeldern, konnten so die Überlebensraten erfreulicherweise in den letzten Jahren auf kumulativ ca. 81% nach 5 und 77% nach 10 Jahren erheblich verbessert werden.

Dennoch sind auch solch positive Entwicklungen durchaus noch verbesserungswürdig. So ist die Möglichkeit, nahezu alle Patienten heilen zu können, nach wie vor nicht absehbar. Außerdem sind die gängigen Therapiemöglichkeiten in der letzten Zeit zwar deutlich verbessert worden, jedoch ist durch deren Aggressivität nach wie vor mit erheblichen unerwünschten Wirkungen zu rechnen.

1.2 Medikamentöse Krebstherapie bei Kindern

1.2.1 Konventionelle Chemotherapie

So wird ein Großteil der Krebserkrankungen im Kindesalter nach wie vor mit systemischer Chemotherapie behandelt. Diese zielt im weitesten Sinne darauf ab, schnell proliferierende entartete Zellen in ihrem Wachstum zu hemmen und diese abzutöten. Dabei kommt es in der Regel auch zu einer Zerstörung gesunder Zellen, welche sich beispielsweise in Nebenwirkungen wie Schleimhautschäden, Infertilität, Alopezie oder Knochenmarkdepression mit den symptomatischen Folgen der körperlichen Schwäche durch Anämie, Blutungsneigung durch Thrombopenie und Infektanfälligkeit durch Leukopenie äußern kann. Hinzu kommen häufig (teilweise medikamentenspezifische) Organtoxizitäten. Demnach ist es bisher nicht gelungen, die Wirkung der entsprechenden Medikamente vollständig auf die Tumorzellen einzugrenzen. Es gibt zwar innovative Konzepte, beispielsweise mit Antikörpern oder Zytokinen bestimmte Tumorzellen selektiv anzugreifen, jedoch reicht dies für eine kurative Behandlung in den meisten Fällen nicht aus und ersetzt die konventionelle Chemotherapie nicht vollständig. Im Folgenden soll kurz auf das in dieser Arbeit verwendete Zytostatikum Doxorubicin eingegangen werden.

Doxorubicin, auch bekannt als Adriamycin, gehört zur Medikamentengruppe der Anthrazykline. Andere häufig verwendete Vertreter dieser zu den zytostatisch wirksamen Antibiotika zählenden Gruppe sind zum Beispiel Daunorubicin, Epirubicin und Idarubicin.

Anthrazycline lagern sich mit ihrem 3-4-gliedrigem, planaren Ringsystem in die DNS-Stränge der Zielzellen ein und induzieren dadurch Brüche derselben. Weiterhin spielt möglicherweise eine Beeinflussung der Topoisomerase II eine Rolle [51,70].

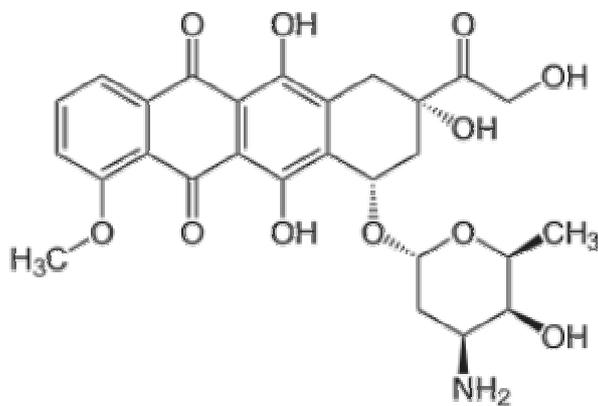


Abbildung 1.1: *Strukturformel von Doxorubicin*

Die wichtigsten Neoplasien, bei denen Doxorubicin zum Einsatz kommt sind eine Reihe von Karzinomen, Sarkomen, malignen Lymphomen und akuten Leukämien. Vor allem in der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie ist Doxorubicin von herausragender Bedeutung in der Therapie von akuten lymphatischen Leukämien, Osteosarkomen (adjuvant und neoadjuvant), Ewing-Sarkomen, Morbus Hodgkin, hochmalignen Non-Hodkin-Lymphomen sowie beim Neuroblastom und beim Nephroblastom (Wilms-Tumor) [90].

Doxorubicin hat ein Verteilungsvolumen mit hoher interindividueller Variabilität, welche das Volumen des Gesamtkörperwassers in der Regel übersteigt. Konzentrationen im Aszites übersteigen dabei häufig den Plasmaspiegel. Die Liquorgängigkeit ist bei intakter Blut-Hirn-Schranke sehr gering, bei Hirnmetastasen und zerebralem Befall durch Leukämien jedoch deutlich erhöht. Nach intravenöser Infusion werden die höchsten Konzentrationen des Medikamentes in Leber, Milz, Lunge und Herz erreicht. Die Elimination erfolgt biphasisch nach Metabolisierung in der Leber zu 40-50% über die Fäzes und zu 15% über die Niere.

Unerwünschte Wirkungen des Medikaments sind wie auch bei vielen anderen Zytostatika vor allem eine massive Myelosuppression, Teratogenität, mögliche Infertilität, verschiedenste Formen schwerer gastrointestinale Störungen (v. a. Übelkeit und Erbrechen) sowie diverse allergisch bedingte Reaktionen. Es besteht ferner eine meist reversible Hepatotoxizität. Spezifisch für Anthrazykline ist weiterhin die vor allem bei kardialer Vorschädigung ausgeprägte kardiotoxische Wirkung, welche die kumulative Dosis limitiert. Die maximale Lebenszeitdosis beträgt somit im Falle eines ansonsten herzgesunden Erwachsenen 450-550 mg Doxorubicin pro Quadratmeter, bei Kindern, Personen > 70 Jahren und Personen mit kardiovaskulärer Vorschädigung 400 mg/m² Körperoberfläche. Weitere Dosismodifikationen sind bei Leber- und Nierenfunktionsstörungen notwendig.

Im Rahmen der Kardiotoxizität steht auf der einen Seite die kardiotoxische Wirkung vom Soforttyp, die innerhalb von 24-48 Stunden nach der Therapie auftritt und von vorübergehenden Arrhythmien und unspezifischen EKG-Veränderungen gekennzeichnet ist. Diese Störungen sind in der Regel reversibel, in Einzelfällen sind allerdings auch lebensgefährliche Arrhythmien, akutes Linksherzversagen sowie ein Perikarditis(-Myokarditis)-Syndrom beschrieben worden. Der Spättyp der kardiotoxischen Wirkung ist auf der anderen Seite meist lebensbedrohlich. Im Gegensatz zu den meisten Sofortreaktionen ist dieser dosisabhängig und irreversibel. Er äußert sich zumeist in einer kongestiven, dilatativen Kardiomyopathie und führt in der Regel zu schwerer Herzinsuffizienz. Daher ist im Rahmen der Therapie sowie in der Zeit danach eine engmaschige Kontrolle der kardialen Funktion notwendig. Doxorubicin sollte nicht verabreicht werden bei bekannter Überempfindlichkeit, vorbestehender ausgeprägter Knochenmarkdepression, schweren Leberfunktionsstörungen, Herzinsuffizienz NYHA-Stadium IV und anderen gravierenden Herzerkrankungen wie Infarkten in der Anamnese [90].

1.2.2 Ergänzende medikamentöse Therapiemöglichkeiten

1.2.2.1 Allgemeines

Ein Weg zur Verbesserung der Therapiemodalitäten ist die Arbeit mit Substanzen, die Tumorwachstum hemmen und nicht die zytotoxischen Effekte konventioneller Chemotherapeutika mit dem zuvor beschriebenen massiven Nebenwirkungsspektrum aufweisen. Auch wenn diese Substanzen in der Regel nicht die gleiche Effektivität wie konventionelle Zytostatika aufweisen, besteht potentiell die Möglichkeit, bei einer zusätzlichen Therapie mit solchen Medikamenten die notwendige Dosis der Chemotherapeutika bei gleich bleibender oder sogar erhöhter Effektivität zugunsten eines geringeren Nebenwirkungsspektrum zu reduzieren.

1.2.2.2 PPAR-Agonisten

Eine Reihe von zumeist präklinischen Studien hat gezeigt, dass mit Agonisten des sogenannten peroxisome proliferator-activated receptor (kurz: PPAR-Agonisten) derartige Effekte erzielt werden können.

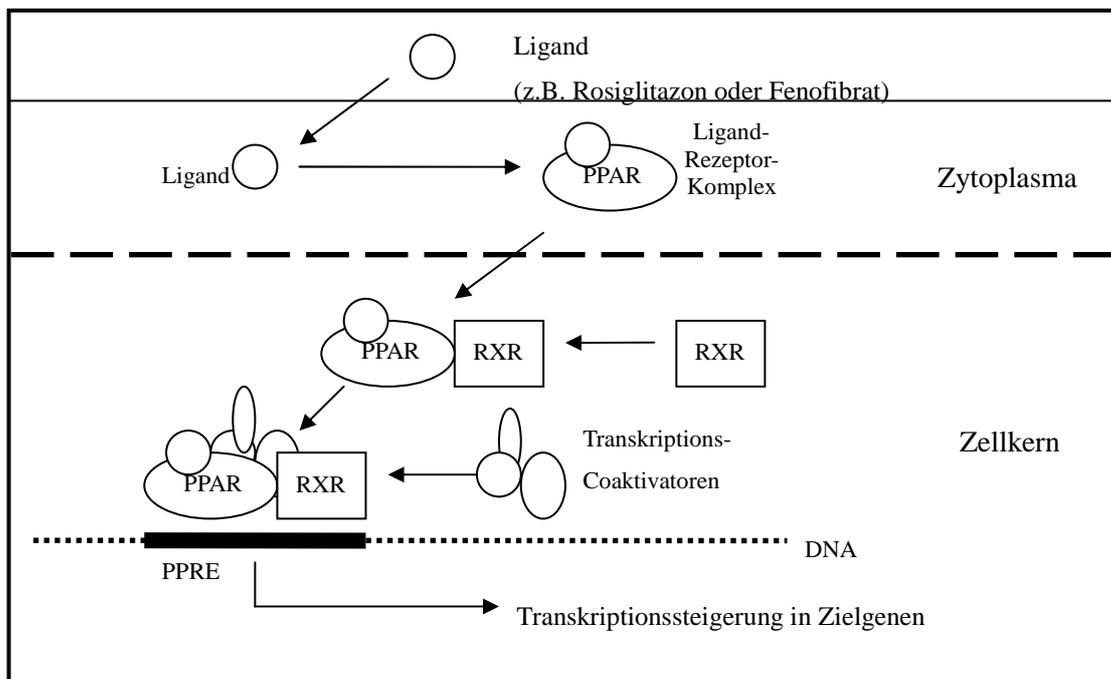
1.2.2.2.1 Klassifizierung und Lokalisation des Rezeptors

Die Familie der sogenannten „Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors“ (PPAR) gehört zusammen mit den Steroid-, den Thyroid- und Retinoidrezeptoren zur Oberfamilie der Steroidrezeptoren. Innerhalb der Familie gibt es 3 Isoformen des Rezeptors: PPAR α , PPAR β (auch beschrieben als PPAR δ) and PPAR γ [11,12]. In unterschiedlichen Gewebetypen findet man unterschiedliche Expressionsmuster dieser Isoformen. Ist PPAR β in den meisten Geweben gleichmäßig vorhanden, wird PPAR α vermehrt in Myokard, Leber und Niere gefunden. PPAR γ wird vor allem in Adipozyten, in Myozyten und in Zellen des Immunsystems exprimiert [35].

1.2.2.2.2 Wirkungsweise der PPAR-Agonisten

Das Wirkprinzip ist bei allen drei Isoformen des Rezeptors nahezu identisch. Zunächst diffundiert ein endogener oder synthetischer Ligand durch die Zellmembran ins Zytoplasma und bindet an den dort vorliegenden Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR). Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex kann nun in den Zellkern transloziert werden. Hier vollzieht sich nun eine obligate Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), bevor es nach Ligandenaktivierung des PPAR zu einer Interaktion mit sogenannten PPAR-response-elements (PPREs) kommen kann. Diese PPREs sind in Promotorregionen der PPAR-Zielgene lokalisiert. So führt eine Ligandenaktivierung letztendlich über die Bindung von PPAR-RXR-Heterodimeren an die PPREs zu einer Amplifikation bzw. Modulation der Transkription dieser Zielgene [12,82,124], welche in der Hauptsache an der Regulation des Fettsäuremetabolismus, der Zelldifferenzierung sowie insbesondere bei der γ -Isoform an der Glucose-Insulin-Homöostase beteiligt sind [35,100].

Abbildung 1.3: Wirkungsweise der PPAR-Agonisten



1.2.2.2.3 Pharmakologische Bedeutung der PPAR-Agonisten

Es gibt verschiedene endogene und synthetische Liganden von PPAR. Endogene Liganden entstammen meist langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie zum Beispiel Arachidonsäurederivate, wie sie im Cyclooxygenase- oder Lipooxygenase-Weg entstehen [82].

Seit den 1970er Jahren wurde zusätzlich eine große Zahl synthetischer PPAR α und - γ Liganden entwickelt, welche eine große Bedeutung für die Pharmakotherapie erlangten. In diesem Rahmen entstanden die **Thiazolidinedione**, auch bekannt als **Glitazone**, wie zum Beispiel Rosiglitazon, Troglitazon, Ciglitazon und Pioglitazon. Dabei handelt es sich um PPAR γ -Agonisten, welche zum Teil noch heute als sogenannter Insulin-Sensitizer in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden [35,82]. Ihr Effekt beruht auf einer Steigerung der Empfindlichkeit von Adipozyten, Leber-, Muskel- und Intestinalzellen gegenüber dem Peptidhormon Insulin, was in letzter Konsequenz zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels führt [124].

Auf genetischer Ebene spielen sich verschiedene Mechanismen ab: Als Folge der Aktivierung von PPAR γ kommt es beispielsweise zu einer vermehrte Expression des Insulin-abhängigen GLUT4-Transporters sowie dessen verstärkte Translokation in die Zellmembran [102]. Auf der anderen Seite wird die Expression bestimmter Inhibitoren der intrazellulären Insulinrezeptorkaskade wie Leptin oder TNF- α durch PPAR-Aktivierung vermindert und so die Insulinwirksamkeit wieder verbessert [124]. Auch eine verstärkte Phosphorylierung von Insulinrezeptor und von Schlüsselenzymen intrazellulärer Signalkaskaden nach Expressionssteigerung der PPAR-Zielgene wurde beschrieben [71].

Trotz der prinzipiell sehr ähnlichen Wirkung der verschiedenen PPAR-Agonisten sollte jedoch beachtet werden, dass das Spektrum an Zielgenen einzelner Substanzen recht unterschiedlich gefächert ist. Die *Tabelle 1.2* soll dies verdeutlichen.

Tabelle 1.2: *Heterogene Wirkung der PPAR-Agonisten am Beispiel von Troglitazon und Rosiglitazon [124]*

Modifikation der Expression von Zielgenen im Fettgewebe			
	Troglitazon	Rosiglitazon	durch beide Substanzen beeinflussbar
Anzahl der stimulierten Gene	80	120	10
Anzahl der gehemmten Gene	17	42	6
Unterschiede in der Endwirkung			
	Troglitazon	Rosiglitazon	
freie Fettsäuren	Senkung	Senkung	
Triglyceride	Senkung	-	
LDL-Cholesterol	-	Erhöhung	
HDL-Cholesterol	Erhöhung	Erhöhung	

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete **Rosiglitazon** wird beim Typ 2 Diabetes als Monotherapie bei nicht ausreichender Blutzuckereinstellung durch Diät und körperliche Aktivität sowie bei Kontraindikation gegen Metformin eingesetzt [33]. Ebenso kommt es in 2- oder Dreifachkombinationen mit anderen oralen Antidiabetika zum Einsatz.

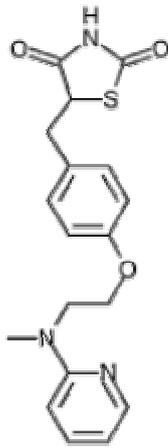


Abb. 1.4: *Strukturformel von Rosiglitazon*

Die tägliche Dosis beträgt dabei 4 bis 8 mg verteilt auf 1-2 Gaben pro Tag, die unabhängig von der Nahrungsaufnahme sein können. Die Metabolisierung erfolgt zum Großteil über die Leber, die Ausscheidung vor allem über die Niere und teilweise über die Fäzes. Die eigentliche Blutzucker senkende Wirkung setzt allmählich ein und ist nach ca. 8 Wochen Therapie vollständig ausgeprägt.

Dabei ist Rosiglitazon kontraindiziert bei bekannter Überempfindlichkeit, Herzinsuffizienz und Leberfunktionsstörungen sowie in Kombination mit Insulin. Da Rosiglitazon eine vermehrte Flüssigkeitsretention bewirkt und damit eine Belastung für das kardiozirkulatorische System darstellt, besteht ebenfalls eine Kontraindikation bei Herzinsuffizienz. Weitere häufig beschriebene Nebenwirkungen (Auftreten bei 1:100-1:10 Anwendungen) sind das Auslösen von Leberfunktionsstörungen und wahrscheinlich durch Verschlechterung eines diabetischen Makulaödems bedingte Sehstörungen sowie Gewichtszunahme, Obstipation, Anämie und (vor allem in Kombination mit Sulfonylharnstoffen) dosisabhängige Hypoglykämien und Myalgien. Ebenso wurden vermehrtes Auftreten von Hyperlipidämien und andere Stoffwechsel- und Ernährungsstörungen beschrieben. Vorsicht geboten ist außerdem in der Schwangerschaft, da im Tiermodell Reproduktionstoxizität gezeigt werden konnte [33]. Bei Frauen zeigte sich außerdem in einer groß angelegten Studie ein erhöhtes Frakturrisiko unter der Langzeitbehandlung mit Rosiglitazon im Vergleich zu anderen oralen Antidiabetika. Dieser Effekt wurde durch die Wirkung auf PPAR γ in pluripotenten mesenchymalen Stammzellen, welche sich demzufolge vermehrt zu Fettzellen anstatt zu Osteoblasten differenzieren, erklärt [34,112]. Für Kinder mit Typ 2 Diabetes wurden bisher keine Sicherheitsbedenken geäußert, allerdings liegen hier nur wenige Langzeitstudien vor [33].

PPAR α wird von **Fibraten** aktiviert. Diese Medikamente waren bereits als Lipidsenker bei Hypertriglycerinämie eingesetzt worden bevor der Wirkmechanismus über die PPARs selbst bekannt wurde. Beispielmedikamente sind hier die amphipathischen Carboxylsäuren Clofibrat und Fenofibrat [8].

Letzteres findet auch in dieser Arbeit Verwendung. Die zur Zeit zugelassenen Anwendungsgebiete dieser Substanz sind primäre Hyperlipoproteinämien wie die familiäre Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und kombinierte Hyperlipidämie sowie die Typ III-Hyperlipidämie [103]. Ferner kann Fenofibrat indiziert sein bei schwerer sekundärer Hypertriglyceridämie, die trotz Behandlung der Grundkrankheit weiter besteht.

Der Wirkmechanismus beruht auf einer rezeptorvermittelten Aktivierung lipolytischer Enzyme, vor allem der Lipoproteinlipase, welche den Katabolismus von triglyceridreichen very-low-density-Lipoproteine zugunsten eines Anstiegs „gesunder“ high-density-Lipoproteine fördern.

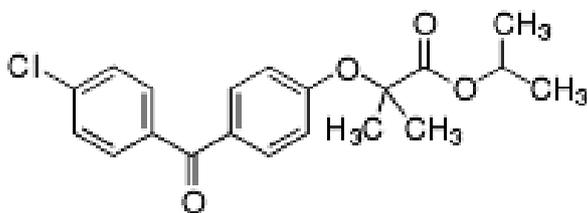


Abb. 1.5: Strukturformel von Fenofibrat

Die Anwendung besteht in einer einmal täglichen Gabe von 200 mg Fenofibrat per os oder einer entsprechend reduzierten Dosis bei Niereninsuffizienz. Nach Applikation wird die Substanz zur wirksamen Fenofibrinsäure hydrolysiert. Diese wird ohne weitere Metabolisierung über Urin (60%) und Fäzes (25%) ausgeschieden. Daraus resultiert eine biphasische Elimination, so dass die Plasmahalbwertszeit für die erste, sogenannte alpha-Phase 5 Stunden und für die beta-Phase 22 Stunden beträgt. Nach Applikation von 300 mg Fenofibrat gemessene maximale Plasmaspiegel betragen bis zu 15 mg/l (bzw. 41,6 μ mol/L) [103].

Wichtige unerwünschte Wirkungen von Fenofibrat sind gastrointestinale Störungen, leichte Abnahmen von Hämoglobin und Leukozytenwerten, unterschiedlich schwere Leberfunktionsstörungen, allergische Reaktionen sowie selten Haarausfall oder Potenzstörungen. Durch vermehrte Cholesterinausscheidung ist ferner der lithogene Index der Gallenflüssigkeit und damit das Gallensteinrisiko erhöht. Selten kommt es zu unterschiedlich ausgeprägten Myotoxizitäten. Diese können bis hin zur Rhabdomyolyse mit der Folge einer sogenannten Crush-Niere führen, was eine gefährliche Komplikation darstellt. Aus diesem Grund sollte keine Kombination mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (Statinen) erfolgen. Kontraindikationen sind Leber- und Gallenblasenerkrankungen, bekannte Überempfindlichkeit oder fotoallergische/-toxische Reaktion unter Fibrat- oder Ketoprofenbehandlung sowie eine schwere Nierenfunktionsstörung. Über die Langzeitverträglichkeit bei Kindern existieren nur wenige Daten, daher ist die Indikation hier streng zu stellen. Fenofibrat verstärkt die Wirkung von Antikoagulanzen vom Cumarin-Typ sowie von oralen Antidiabetika und Insulin [103].

1.2.2.2.4 Antineoplastische Effekte der PPAR-Agonisten

Antineoplastische Effekte von PPAR γ -Agonisten wurden bereits in einer Reihe von Versuchen und Studien sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen. Sie beruhen auf einer Interferenz mit verschiedensten biochemischen Signalwegen und resultieren zumeist in Apoptoseinduktion, Hemmung des Zellwachstums oder Arrest des Zellzyklus in der G₁-Phase [8,35].

Ferner wurde für bestimmte Zelltypen eine erhöhte Ausdifferenzierungsrate nachgewiesen. So ist bekannt, dass PPAR γ -Agonisten eine erhöhte Differenzierung von Preadipozyten und Fibroblasten in reife Fettzellen bewirken können. Auch für andere Zell- und Gewebetypen sind derartige Effekte beschrieben [8,35,62].

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Hemmung der Angiogenese durch PPAR γ -Agonisten, was vor allem bei soliden Tumoren ein interessanter therapeutischer Ansatz sein könnte. Bei Applikation der Substanz wird die Ausschüttung des sogenannten „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) aus glatten Muskelzellen blockiert. Außerdem wird die Leptin-induzierte Migration von Endothelzellen inhibiert, was der Angiogenese eine weitere Basis entzieht [35].

All diese Effekte sind bereits für die häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen des Erwachsenenalters in Lungen-, Brust-, Kolon-, Prostatakrebszellen ausführlich untersucht worden [3,10,11,32,38,47]. Des weiteren gibt es eine Reihe von Studien und Versuchsreihen zu hepatozellulären, Blasen-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinomen [26,37,85,117], sowie zu Tumoren des ZNS [36] und Sarkomen [44]. Im Gegensatz dazu ist die Datenlage zu Effekten von PPAR-Agonisten auf für das Kindesalter typische Tumorerkrankungen noch sehr überschaubar. Man findet in der Literatur lediglich vereinzelt Artikel zu Neuroblastomen [41,42], Leukämien [64] und Osteosarkomen [44].

Während die antineoplastische Aktivität der PPAR γ -Agonisten im Allgemeinen kaum noch angezweifelt wird, gibt es für die PPAR α -Agonisten diesbezüglich keinen einheitlichen Konsens. Beispielsweise wird in verschiedenen Arbeiten über eine Induktion von Kanzerogenese in der Leber durch Fibrate berichtet [45,89]. Auf der anderen Seite wurde eine effektive antineoplastische Aktivität derselben Medikamentengruppe gegen Zellen des Endometriumkarzinoms gesehen, welche durch die Beteiligung des Lipidmetabolismus an der endometrialen Kanzerogenese und deren Modulation durch die PPAR α -Agonisten erklärt wurde [100].

Die *Tabelle 1.3* gibt einen kurzen Überblick über die aktuelle Datenlage bezüglich der antineoplastischen Wirkung von PPAR-Agonisten und soll damit der besseren (qualitativen) Einordnung der Bedeutung der vorliegen neuen Daten dienen. Dabei ist für jede Tumorentität lediglich eine Beispielpublikation aufgeführt, so dass die Tabelle keine Einordnung hinsichtlich Quantität bzw. Häufigkeit der Untersuchung an einer Tumorentität zulässt.

Tabelle 1.3: *Präklinische Untersuchungen zu den antineoplastischen Effekten von PPAR-Agonisten (behandelte Tumorentitäten, Substanzen inkl. Dosierungen)*

In vitro-Studien			
Tumorentität/Zelllinien	Verwendete Substanz und Konzentration	Erzielte Effekte	Literatur
Prostata-Ca (LNCaP, DU145, PC3)	Troglitazon, Pioglitazon, Prostaglandin J2 in 10 µM Lsg.	Wachstumshemmung	[47]
Papilläres Schilddrüsen-Ca (BHP 2-7, BHP 7-13, BHP 10-3, BHP 18-21)	Troglitazon, Wy14643 (PPAR α Agonist) u.a. in 10 µM Lsg.	Reduzierte Zellzahl durch Apoptoseinduktion	[85]
Magen-Ca (MKN-7, MKN-28, MKN-45, AGS)	Troglitazon, 10 µM Lsg. über 48 Std.	Wachstumsarrest und Apoptose	[105]
Colon-Ca (HT-29)	Troglitazon, Wy-14643 u.a. 1-100µM Lsg. über 26 Std.	Wachstumsarrest und Apoptose	[111]
Pankreas-Ca (PK-1, PK-8, PK-9, MIA Paca-2)	Troglitazon in 0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM Lsg.	Wachstumshemmung, Zellzyklusarrest in der G1-Phase	[80]
HCC (Hep G2, HuH-7, KYN-1, KYN-2)	Troglitazon, Pioglitazon u.a. in 5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM über 48 h	Wachstumshemmung, Zellzyklusarrest	[98]
Mamma-Ca (MCF-7)	Troglitazon in 10-40µM	Zellzyklusarrest in der G1-Phase	[129]
NSCLC (A549, H23, H596, Calu1)	Kombinationsversuche mit Carboplatin und Rosiglitazon u.a. (2,5 µM, 10 µM, 25 µM Carboplatin; 50 nM, 1 µM, RGZ)	Arrest in G2-Phase, Apoptose	[32]
Neuroblastom (LA-N-5 u.a.)	GW1929, PGJ2 in 10-20 µM Lsg.	Wachstumshemmung und Ausdifferenzierung der Zellen	[42]
präklinische in vivo-Studien			
Tumorentität/Zelllinien	Verwendete Substanz und Konzentration	Erzielte Effekte	Literatur
NSCLC A594 in Nacktmäusen	Kombinationsversuche mit Carboplatin und Rosiglitazon u.a. (10 bzw. 50 mg/kg KG/Tag Carboplatin; 5 bzw. 20 mg/kg/d RGZ)	vollständiger Wachstumsstop bzw. Tumorreduktion vor allem bei Kombination	[32]
Prostata-Ca PC-3 in männlichen BNX-dreifach immundefizienten Nacktmäusen	Orale Troglitazongabe 500 mg/kg KG/Tag	Inhibition des Tumorwachstums und Tumorgewichtsreduktion	[108]
Colon-Ca-Zellen, subcutane Injektion bei Nacktmäusen	Troglitazon 200 mg/kg KG/Tag	Reduktion des Tumorwachstums	[104]

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Betrachtet man die Datenlage in ihrer Gesamtheit, so sind die antineoplastischen Effekte von PPAR-Agonisten vor allem in der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie noch unzureichend erforscht. In dieser Arbeit soll daher eine mögliche Basis für weitere Projekte in dieser Richtung geschaffen werden mit dem Ziel, bei vielversprechenden Ergebnissen auf lange Sicht gegebenenfalls den Weg für den klinischen Einsatz von PPAR-Agonisten in der pädiatrischen Tumorthherapie zu bereiten.

Dabei ist es zunächst wichtig, für ein breiteres Spektrum an für das Kindesalter typischen Krebserkrankungen mögliche Effekte der PPAR-Agonisten zu screenen. Dazu werden die Effekte der PPAR Agonisten allein und in Kombination mit der häufig konventionell-chemotherapeutisch eingesetzten Substanz Doxorubicin an einem Panel von 18 unterschiedlichen typisch pädiatrischen Tumorzelllinien untersucht. Dabei sollen unter anderem die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Gibt es die vorbeschriebenen Tumor-proliferationshemmenden Effekte wie Ausdifferenzierung der Zellen, Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion usw. auch an typisch pädiatrischen Tumoren? Wenn ja, an welchen? Können dabei die Substanzkonzentrationen, die *in vitro* zu einem Effekt führen, auch *in vivo* erreicht werden?
2. Sollten signifikante Effekte gesehen werden, welche Mechanismen liegen diesen zu Grunde?
3. Gibt es Unterschiede in der antiproliferativen Wirksamkeit von Rosiglitazon und Fenofibrat allein oder in Kombination mit konventionellen Zytostatika? Womit würde sich eine weitere Überprüfung am ehesten lohnen?
4. Sind die *in vitro* ermittelten Effekte ggf. ausreichend, um den Einsatz *in vivo* zu rechtfertigen?
5. Inwieweit lohnt es sich für bestimmte Tumorentitäten den Nutzen der PPAR-Agonisten im Detail zu erforschen und ggf. sogar den Weg für den klinischen Einsatz zu bereiten?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die zytotoxischen Effekte der PPAR-Agonisten wurden an einem Panel von 18 permanenten humanen Tumorzelllinien überprüft, wobei 6 verschiedene Tumorentitäten eine Rolle spielten. Die Zelllinien werden im Folgenden dargestellt. Es handelt sich dabei um Zellen aus 4 verschiedenen Leukämien, 4 Neuroblastomen, je 2 Osteosarkomen, Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen, sowie 4 Ewing-Sarkomen. Außer der AML-Zelllinie HL-60 wurden alle Zelllinien aus pädiatrischen Patienten gewonnen. Die folgenden Angaben basieren auf den Angaben der unterschiedlichen Vertreter der Zelllinien sowie der jeweils angegebenen Quellen.

MOLT-4

Diese humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie wurde 1971 aus dem peripheren Blut eines 19-jährigen jungen Mannes mit dem Rezidiv einer ALL etabliert. Es handelt sich um runde Zellen, welche in Suspension einzeln oder in Clustern wachsen. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 40 Stunden [77].

CCRF-CEM

Die humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie CCRF-CEM entstammt dem peripheren Blut eines am Rezidiv einer ALL erkrankten 3-jährigen Mädchens kaukasischer Abstammung. Es handelt sich um die erste kontinuierliche T-ALL-Zelllinie. Sie wurde 1964 etabliert. Die runden Zellen wachsen sowohl in Suspension, als auch als einschichtig-adhärenente epitheloide Zellen. Die Verdopplungszeit beträgt dabei 24-30 Stunden [28].

REH

Bei REH handelt es sich um eine B-Vorläufer-ALL-Zelllinie, die 1973 aus dem peripheren Blut eines 15-jährigen nordafrikanischen Mädchens mit dem Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie gewonnen wurde. Es handelt sich morphologisch um kleine runde, einzeln angeordnete Zellen in Suspension. Die Generationszeit beträgt 50-70 Stunden [96].

HL-60

HL-60 wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau mit akuter myeloischer Leukämie (AML-FAB-M2) etabliert. Bei einer Generationszeit von 25 Stunden handelt es sich um runde Einzelzellen in Suspension [19,21,29].

SH-SY5Y

Bei SH-SY5Y handelt es sich um eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die ursprünglich als klonale Sublinie aus der Neuroepitheliomzelllinie SK-N-SH gewonnen wurde. Diese wiederum entstammt ursprünglich einer Knochenmarkbiopsie, die 1970 bei einem 4-jährigen Mädchen mit metastasiertem Neuroblastom durchgeführt wurde. Es finden sich Epithel-/ Neuronen-ähnlich elongierte Zellen mit einschichtigem Wachstum, zumeist in Clustern gruppiert, die in der Regel nicht vollständig konfluieren. Die Zellverdopplungszeit in Kultur beträgt etwas über 55 Stunden [9,97]. Es liegen keine 1 p Deletion und keine N-myc Amplifikation, jedoch eine hohe Telomerase-Aktivität vor.

IMR-5

IMR-5 wurde aus der Zelllinie IMR-32 gewonnen. Diese humane Neuroblastom-Zelllinie entstammt dem Tumor eines einjährigen kaukasischen Jungen. Morphologisch zeigen sich neuroblastenähnliche adhärente Zellen mit einschichtigem Wachstum in der Kultur. Die Zellen weisen eine N-Myc-Amplifikation und eine Deletion auf Chromosom 1 (del 1p36) auf [58,126].

KCN

Hier handelt es sich ebenfalls um eine humane vor Therapiebeginn gewonnene Neuroblastom-Zelllinie mit der charakteristischen N-Myc-Amplifikation (100fach) und der Deletion auf Chromosom 1 (del 1p) vor [92]. Die Zelllinie wurde aus dem Tumor eines männlichen Patienten gewonnen. Es konnten hier die Gene für TrkA und für TrkB wie auch eine hohe Telomerase- Aktivität gefunden werden.

SHEP-SF

Bei SHEP-SF handelt es sich, wie auch bei SH-SY5Y, ebenfalls um einen Subklon der Zelllinie SK-N-SH. Die Zelllinie zeigt keine N-Myc-Amplifikation [7]. Es liegt eine 1 p Deletion und eine hohe Telomerase- Aktivität vor.

MNNG-HOS

Die Osteosarkom-Zelllinie HOS wurde zunächst aus dem Knochen eines 13 Jahre alten kaukasischen Mädchens gewonnen und wurde nachträglich mit dem kanzerogenen Nitrosamin MNNG behandelt, wodurch die sich für Zellkultur und zur Implantation in Nacktmäuse sehr gut eignende Zelllinie MNNG-HOS entstand [93,94].

OST

Wie auch bei MNNG-HOS, handelt es sich bei OST um eine humane Osteosarkom-Zelllinie [5,83]. Die Zellen sind Telomerase-positiv [116].

DAOY

Bei DAOY handelt es sich um eine Medulloblastom-Zelllinie. Sie wurde 1985 aus dem Cerebellum eines 4 Jahre alten kaukasischen Jungen mit desmoplastischem Medulloblastom etabliert. Obgleich der Primärtumor neuronale und gliale Differenzierung aufwies, kann dies in der Zelllinie nicht mehr nachvollzogen werden. So induziert eine Behandlung mit cAMP keine für diese Art von Differenzierung typische Expression von S100 (S-100) Protein und sogenannten „glial fibrillary acidic proteins“ (GFAP). Die Zelllinie besteht aus adhärent wachsenden polygonalen Zellen mit einer Verdopplungszeit von 34 Stunden [46,49].

UW228.2

UW228-2 ist eine von 3 Untergruppen der Zelllinie UW228 (UW228-1, -2 und -3). Es handelt sich um Zellen eines Medulloblastoms mit diploidem Chromosomensatz aus dem Tumor der hinteren Schädelgrube eines Menschen. Die Zellen sind teilweise für Synaptophysin und sogenanntes „glial fibrillary acidic protein“ positiv. Sie bilden Kolonien auf soft-agar und wachsen einschichtig in der Zellkultur [52].

RD

Diese Zelllinie entstammt einem Rhabdomyosarkom eines sieben Jahre alten kaukasischen Mädchens [73].

RH-30

Diese humane Rhabdomyosarkomzelllinie wurde ursprünglich aus einer Knochenmarkmetastase eines 17-jährigen jungen Mannes mit undifferenziertem alveolärem Rhabdomyosarkom generiert. Es handelt sich um adhärente, epithelähnliche Zellen mit einschichtigem Wachstum und einer Zellverdopplungszeit von ca. 35 Stunden [24,30].

CADO-ES-1

CADO-ES-1 wurde ursprünglich aus der Pleurametastase einer 19jährigen japanischen jungen Frau mit Ewing-Sarkom des rechten Sitzbeines mit multipler pulmonaler Metastasierung gewonnen. Es handelt sich – typisch für Ewing-Sarkome – um kleine runde und spindelförmige Zellen ohne neuronale Differenzierung, die mit einer Verdopplungszeit von ca. 35 Stunden (semi-)adhärentes klumpiges Wachstum in Form von Sphäroiden zeigen. Dabei ist die Anheftung nicht obligat [55].

VH-64

VH-64 entstammt einer Lungenmetastase eines metatarsal lokalisierten typischen Ewing-Sarkomes eines 24jährigen Mannes. Die runden bis ovalen Zellen sind locker angeordnet. Die Generationszeit beträgt üblicherweise 25,2 Stunden [121-123].

STA-ET-1

STA-ET-1 wurde ursprünglich aus einem peripheren Neuroektodermalen Tumor des Humerus' eines 13jährigen Mädchens etabliert. Die Generationszeit beträgt 40,7 h [4].

STA-ET-2.1

STA-ET-2.1 ist eine Zelllinie aus einem primären peripheren Neuroektodermalen Tumor der Fibula eines 15jährigen Jungen. Die Generationszeit beträgt ca. 60 h und eine P-gp-Expression zeigt sich bei 20 % der Zellen [4].

CCRF-CEM, MOLT-4, REH, HL-60, CADO-ES-1, SH-SY5Y und RH-30 entstammen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). DAOY, RD and IMR-5 wurden von der ATCC-LGC (Promochem GmbH, Wesel) erworben. Die Zelllinien KCN, SHEP-SF, OST und MNNG-HOS wurden uns freundlicherweise von Professor Dr. C. Poremba (Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt, während UW228.2 von Herrn Professor Dr. Dr. M. Frühwald aus der eigenen Klinik mit freundlicher Genehmigung von Prof. John Silber (Department of Neurological Surgery, University of Washington, Seattle, USA) bereitgestellt wurde. Ferner wurden die Zelllinien STA-ET-1, STA-ET-2.1 und VH-64 mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. F. van Valen aus der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Münster zur Verfügung gestellt.

2.1.2 verwendete Substanzen

Aus den Stammlösungen der folgenden Substanzen wurden Verdünnungsreihen mit Hilfe von Zellkultur-Medium und DMSO hergestellt:

PPAR-Agonisten

Rosiglitazon

TOCRIS Bioscience, Cookson Ltd. Avonmouth, UK

Fenofibrat

Lösung in DMSO (s.u.)

Zytostatikum

Doxorubicin

Adriblastin ® Lösung

Pharmacia GmbH (Unternehmen der Pfizer-Gruppe)

Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Einmal-Laborbedarf

Zellkulturflaschen, steril, 25 cm ²	TPP
Zentrifugenröhrchen, steril, 14 ml	TPP
sterile Pipetten, 1 ml	Castor, Steripette
sterile Pipetten, 5 ml	Falcon
sterile Pipetten, 10 ml	Falcon
sterile Pipetten, 20 ml	Falcon
sterile Pipetten, 50 ml	Falcon
Standartips, 100 µl	Eppendorf
Standartips, 1000 µl	Eppendorf
Kombitips, 0,5 ml	Eppendorf
Kombitips, 1 ml	Eppendorf
Kombitips, 5 ml	Eppendorf
Kulturplatten, 96 Well	Microtest TM 96, Tissue Culture Plate Falcon, Becton Dickinson Labware, Order No.: 353072
Zytostatika-Handschuhe	Nitrile 242 mm, Ref No.: 52002M
Handschuhe	Derma Clean Powder free Latex, non sterile Ansell GmbH München, Deutschland

2.1.4 Lösungen und Reagenzien

DMSO	Dimethylsulfoxid, Hybri Max, sterile Lot No.: 90K2340 Sigma Deisenhofen, Deutschland
Ethanol 96%	Apotheke des Universitätsklinikums Münster Münster, Deutschland
Nährmedium	<u>RPMI 1640 Medium</u> GibcoBRL, Cat No.: 21875-034 <u>+ Antibiotic-Antimycotic</u> (Penicillin G sodium 10.000 Units/ml, Streptomycin sulphate 10.000 µg/ml Amphotericin B als Fungizone® 25 µg/ml in 0,85 % NaCl (5,5 ml auf 500 ml)) GibcoBRL, Cat No.: 15240-062 <u>+ L-Glutamine (100x) 200 mM</u> GibcoBRL, Cat No.: 25030-024 <u>+ FCS (Foetal Bovine Serum) 50 ml (10 % FSC Medium)</u> GibcoBRL, Cat No.: 10108-165
Trypsin	Trypsin-EDTA-Solution 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA pro Liter in PBS (1x) Cat No.: L11-004; Lot No.: H04121-254 PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
Demineralisiertes Wasser	eigene Herstellung mit Milli-Q-UF Millipore Eschborn, Deutschland
Essigsäure 0,1 N	497,05 ml demineralisiertes Wasser + 2,95 ml Eisessig Baker Chemicals Deventer, Niederlande
Collagen-Essigsäure	Collagen Typ 1 R, aus Rattenschwanz 6 mg/ml in 0,2 % Essigsäure-Lösung, pH 3,2-4,0 verdünnt auf 0,2 mg/ml mit 0,1 N Essigsäure Cell Concepts GmbH Umkirch, Deutschland Order No.: Z-17C03-A
MTT	3[4,5- Dimethylthiazol-2 yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide M2128, Lot.: 66H5033 Sigma Deisenhofen, Deutschland
Lyse-Reagenz	20 g <u>SDS</u> (SDS-Sodiumdodecylsulphate) Sigma Deisenhofen, Deutschland gelöst in 50 ml H ₂ O und 50 ml <u>DMF</u> (N,N-Dimethylformamid) Merck Darmstadt, Deutschland
PBS-Puffer	250 mg MTT gelöst in 50 ml Phosphatgepufferter Saline pH 7,4 Life Technologies GmbH Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 technische Geräte

sterile Werkbank	W.H. Mahl Kaarst, Deutschland
Mikroskop	ICM 405 Carl Zeiss MicroImaging GmbH Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Begasungsbrutschrank, Temp. 37 °C, 7 % CO ₂	Heraeus Düsseldorf, Deutschland
Zentrifugen	1. Universal 2S Hettich Centrifuges, Beverly, MA, USA 2. Centrifuge 5417 R, Eppendorf Hamburg, Deutschland
Zellzähler	Casy ® 1 Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
Assay Reader	Multiscan Ascent Microplate Reader + Ascent Software Pathtech Preston, Australia
Schüttler	Vibrax VXR basic Typ VX2 (Reagenzglasauflage) IKA® Staufen, Deutschland
Varipette, 10-100 µl	Eppendorf
Varipette, 100-1000 µl	Eppendorf
Multipette Plus	Eppendorf
Akkupipette	pipetus-akku Hirschmann Laborgeräte Eberstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacobox (1000 mbar) KNF-Neuberger GmbH Freiburg, Deutschland
Analysator für RNA-Qualität und Quantität	2100-Bioanalyzer Agilent Technologies Waldbronn, Germany
Real-time PCR-Gerät	ABI Prism 7700 sequence detection system Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Roboter zur Vorbereitung der real-time PCR	Tecan Genesis 150 robotic Tecan Deutschland GmbH Crailsheim, Germany

2.1.6 verwendete Software

statistische Analysen	CalcuSyn 2.0 Biosoft Cambridge, UK
Analyse der PCR-Ergebnisse	Sequence detector software SDS 2.2 Applied Biosystems
Kalkulation der Wachstumshemmungsparameter	Microsoft Excel Microsoft Office XP
Graphische Ergebnisdarstellung	SigmaPlot 9.0 SYSTAT Software Inc.

2.1.7 sonstige Hilfsmittel

RNA-Isolations-Kit	QIAamp RNA isolation kit + RNase-Free DNase Set QIAGEN Hilden Germany
System zur Synthese komplementärer DNA-Stränge	Superscript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Invitrogen GmbH Karlsruhe, Germany

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Pflege und Behandlung der Zellkulturen erfolgte nach den Standardanweisungen (SOP-Zellkultur1) des Funktionsbereiches „Klinische Pharmakologie“ unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Claudia Lanvers-Kaminsky.

Grundlage für den Erfolg der Arbeit mit Zellkulturen ist das sterile Arbeiten. Aus diesem Grund wurde mit entsprechend desinfizierten Handschuhen an einer sauberen Werkbank gearbeitet, welche sich zuvor für mindestens 10 Minuten in Betrieb befand. Sämtliche Materialien mit Kontakt zu den Zellkulturen und dem Kulturmedium wurden absolut steril gehalten.

Auch der Inkubator wurde in regelmäßigen Abständen gewartet und gereinigt. In diesem wurden die Zellen bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Anteil von 5 % inkubiert.

2.2.1.1 Auftauen und Einfrieren der Zellen und die Vorbereitung zum experimentellen Gebrauch

Um Kontaminationen vorzubeugen und eine hohe Konstanz der Zelllinieneigenschaften zu gewährleisten, wird im Labor die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -197° C zur Langzeitlagerung von Zellen eingesetzt.

Beim **Auftauen** der Zellen aus flüssigem Stickstoff wurden die Kryotubes mit den Zellen zunächst vorsichtig, jedoch zügig in lauwarmem Wasser erwärmt. Die Öffnung der Kryotubes erfolgte nach vorheriger Desinfektion mit 70%igem Ethanol unter der Sterilwerkbank. Die Zellen wurden dann in ein Falcon-Tube mit auf 37° C vorgewärmtem Medium überführt und dort für 7 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in 4-5 ml Zellkultur-Medium und eine Überführung in die entsprechende Kulturflasche (25 cm³).

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden nach Übergang in die proliferative Phase regelmäßige Passagen der Zellen durchgeführt. Sobald sich normales Wachstumsverhalten zeigte, wurde für die nächste Zellgeneration eine größere Menge an Zellen wieder **kryokonserviert**. Dazu wurden die Zellen - resuspendiert in 500 µl Standardkulturmedium - mit 500 µl Einfriermedium (bestehend aus 10 % DMSO, 10 % FCS, 80 % RPMI) in den speziellen Kryo-Tubes vorsichtig gemischt und mit einer Geschwindigkeit von ca. 1° C pro Minute langsam bis auf -80 °C abgekühlt. Nach 24 Stunden erfolgte die Überführung in die Flüssigphase des Stickstoffbehälters.

Die übrigen Zellen wurden für die Versuche weiter kultiviert. Vor dem experimentellen Gebrauch wurde bei jeder Zelllinie ein Mykoplasmentest nach der Arbeitsanleitung des „VenorGeM Mykoplasmen-Nachweis für die konventionelle PCR“ von Minerva Biolabs durchgeführt, um eine Kontamination auszuschließen und somit falschen Versuchsergebnissen frühzeitig vorzubeugen.

2.2.1.2 Coating von Zellkulturflaschen

Speziell für semiadhärente Zelllinien, wie in dieser Arbeit die Ewing-Sarkome, ist eine spezielle Vorbereitung – sogenanntes Coating – der Zellkulturflaschen und der Kulturplatten notwendig, um eine gute Adhäsion der Zellen zu gewährleisten, was das exakte Arbeiten erleichtert.

Dazu wurden unter der Sterilbank die entsprechenden Flaschen mit Collagen-Essigsäure (1,5 ml/Flasche) befüllt und über 2 Tage verschlossen stehen gelassen, um ein Absetzen des Kollagens an den Boden zu gewährleisten. Danach wurden die Flüssigkeitsüberstände abgesaugt und die Flaschen und Platten für 24 Stunden offen unter der angeschalteten Sterilbank getrocknet.

Analog wurden die Kulturplatten mit 50 µl/Well Collagen-Essigsäure versehen. Allerdings wurden diese direkt offen bis zum Folgetag unter der Sterilbank getrocknet.

Mit der zuletzt abgesaugten Flasche wurde ein Sterilitätstest durchgeführt, indem diese für 3-4 Tage mit reinem Medium inkubiert und dann mikroskopisch beurteilt wurde. Wenn Keimwachstum ausblieb, wurden die nun gecoateten Flaschen und Platten für Kultur und Versuchsreihen verwendet.

2.2.1.3 Passagieren/Teilen der Zellen

Das Passagieren der Zellen verfolgt das Ziel, gleich bleibende Versuchsbedingungen mit exponentiellem Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Dabei ist eine regelmäßige Versorgung der Zellen mit frischem Zellkulturmedium und eine weitgehend kontinuierliche Inkubation in 25 cm³-Kulturflaschen in einem speziellen Brutschrank unter 7 %iger CO₂-Begasung bei 37° C entscheidend.

Da im Rahmen dieser Arbeit die Zelllinien nicht mehr als 20-30 mal passagiert wurden, war keine vollständige Erneuerung (sprich: erneutes Auftauen) der Zelllinien im Verlauf notwendig.

Eine Zellpassage erfolgte immer dann, wenn die Zellkulturflaschen am Boden mit einem dichten Zellrasen bewachsen waren. Die diesbezügliche Beurteilung erfolgte engmaschig mit dem Mikroskop.

Bei den (semi-)adhärenten Zelllinien mussten dabei zunächst die auf dem Flaschenboden anhaftenden Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst werden. Nach Absaugen und Verwerfen des alten Mediums aus den Kulturflaschen wurde ca. 1 ml Trypsin zugefügt und auf dem Boden verteilt. Dann wurde das Trypsin bis auf ca. 0,1 ml wieder abgesaugt und die Kulturflasche für 5 Minuten mit diesem Rest im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen bei leichtem Schlagen der Flasche gegen die Hand sichtbar vom Flaschenboden ablösten. Je nach gewünschter Teilungsrate (siehe *Tabelle 2.1*) wurden nun die Zellen mit 2-5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Ein entsprechender Anteil dieser Suspension wurde in neue Kulturflaschen überführt, nachdem diese mit genau so viel frischem Medium befüllt worden waren, so dass sich zusammen mit der Zellsuspension ein Gesamtvolumen von 4 ml in jeder Flasche befanden. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die alten Kulturflaschen verworfen und die neuen entweder weiter inkubiert oder den Versuchen zugeführt.

Tabelle 2.1: *Teilungsraten und Flüssigkeitsmengen beim Passagieren adhärenter und semiadhärenter Zellen*

<u>Teilungsrate</u>	<u>Vorgelegtes Medium in neuer Flasche (ml)</u>	<u>Medium zum Resuspendieren der Zellen (ml)</u>	<u>Resuspendiertes Medium in neuer Flasche (ml)</u>
1:3	3	3	1
1:4	3,5	2	0,5
1:5	3,5	2,5	0,5
1:6	3,5	3	0,5
1:7	3,5	3,5	0,5
1:8	3,5	4	0,5
1:9	3,5	4,5	0,5
1:10	3,5	5	0,5
1:15	3,7	5	0,3
1:20	3,75	5	0,25
1:25	3,8	5	0,2

Beim Passagieren der Suspensionszellen (Leukämie-Zelllinien) musste keine Ablösung mit Hilfe von Trypsin erfolgen. Nach Vorlegen von frischem Kulturmedium in neue Kulturflaschen erfolgte die Resuspension der Zellen in der alten Kulturflasche und die Überführung einer entsprechenden Menge an Zellsuspension in die neue Flasche. Der *Tabelle 2.2* sind die jeweiligen Teilungsraten zu entnehmen. Das Kulturmedium in den neuen Flaschen wurde stets so bemessen, dass sich nach dem Passagieren der Zellen in jeder Flasche ein Gesamtvolumen von 5 ml Zellsuspension befand.

Tabelle 2.2: *Teilungsraten und Flüssigkeitsmengen beim Passagieren von Suspensionszellen*

<u>Teilungsrate</u>	<u>Medium in neue Flasche (ml)</u>	<u>Zellsuspension aus der alten in die neue Flasche (ml)</u>
1:3	3	1,5
1:4	3,75	1,25
1:5	4	1
1:6	4,2	0,8
1:7	4,3	0,7
1:8	4,4	0,6
1:9	4,45	0,55
1:10	4,5	0,5
1:15	4,7	0,3
1:20	4,75	0,25
1:25	4,8	0,2

2.2.2 In vitro-Testverfahren zur Zytotoxizitätsmessung

Alle 18 Zelllinien wurden zunächst einzeln auf die Wirkung von Doxorubicin, Rosiglitazon und Fenofibrat untersucht. Weiterhin wurden Kombinationsversuche aller Zelllinien mit Doxorubicin und Rosiglitazon sowie Doxorubicin und Fenofibrat durchgeführt.

Insgesamt wurde jeder Versuch dreimal vollständig an unterschiedlichen Tagen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

2.2.2.1 Aussiedeln der Zellen

Ziel beim Aussiedeln der Zellen war es, die Zellen einer Zelllinie gleichmäßig auf die für die späteren Versuche erforderlichen Zellkulturplatten zu verteilen. Für jeden Versuch mit einer Zelllinie waren 2 Kulturplatten erforderlich wovon eine vollständig mit 100 µl Zellsuspension pro Well beimpft wurde. Von der zweiten Platte wurde lediglich eine Reihe von 12 Wells für die Wachstumskontrolle nach 72 Stunden mit Zellsuspension versehen.

Wie auch beim Passagieren der Zellen wurden adhärente Zellen zunächst mit Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, resuspendiert und die so entstandene Suspension in ein steriles 15 ml-Falcontube überführt. Suspensionszellen wurden unmittelbar resuspendiert und in die Tubes überführt. Auf diese Weise konnte der Inhalt mehrerer Kulturflaschen derselben Zelllinie zusammengeführt werden. Die Falcontubes mit den Zellsuspensionen wurden nun bei 1300 U/min für ca. 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgossen und entstandene Zellpellets mit einer definierten Menge (in der Regel 3 ml) neuem Medium aufgefüllt und resuspendiert.

Mit Hilfe des Zellzählers (Casy® 1) erfolgte nun die Konzentrationsbestimmung der Zellen in der entstandenen Suspension pro ml. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Messergebnisses wurden pro Zellsuspension jeweils 3 solcher Messungen durchgeführt und daraus der jeweilige Durchschnittswert errechnet. Bei signifikanter Abweichung der Einzelmessungen wurde eine neue Zellsuspension hergestellt und die Messung erneut durchgeführt.

Ausgehend von den ermittelten Zellkonzentrationen wurde das Volumen dieser Zellsuspension errechnet, welches eine adäquate Zellzahl für die durchzuführenden Versuche enthielt. Ziel dabei war es, pro Well einer Kulturplatte eine Zahl von möglichst genau 5.000 Zellen/100 µl zu erreichen. Die pro Versuch benötigte Menge an Nährmedium mit Zellen betrug somit – einen gewissen Pipettierverlust mit eingerechnet – annähernd 12 ml mit insgesamt ca. 600.000 Zellen. Daher wurde die zuvor errechnete Gesamtmenge der Zellsuspension mit Kulturmedium auf 12 ml aufgefüllt.

Nach ausgiebiger Resuspension wurden die entsprechenden Platten wie zuvor beschrieben mit 100 µl/Well dieser neu hergestellten Zellsuspension beimpft.

2.2.2.2 Erste Wachstumskontrolle nach 72 Stunden mit dem MTT- Assay

Es erfolgte zunächst eine 72-stündige Bebrütung der Kulturplatten im CO₂-Inkubator, um den Zellen das exponentielle Wachstum und den adhären Zellen zusätzlich die Adhäsion zu ermöglichen. Danach wurde das Zellwachstum in den 12 Wells der zuvor angelegten Kontrollreihe auf der zusätzlichen Kulturplatte repräsentativ für alle Zellen des jeweiligen Versuches bestimmt.

In diesem Rahmen kam der sogenannte **MTT-Assay** zum Einsatz. Dabei erfolgte zunächst der Färbevorgang der Zellen mit 3[4,5- Dimethylthiazol-2 yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) indem in jedes Well 10 µl MTT-Reagenz pipettiert wurde. Während weiterer 3 Stunden im Inkubator bei 37° C erfolgte in den Mitochondrien der lebenden Zellen unter Verbrauch von NADH und NADPH die irreversible Umsetzung des gelben MTT zum violett-farbenem Formazan.

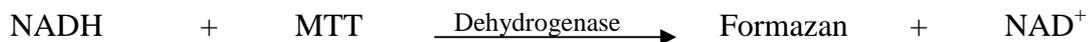


Abbildung 2.1: MTT-Färbereaktion

Im Anschluss an die Inkubation wurde zunächst vorsichtig das überstehende Medium aus den Wells der jeweiligen Kulturplatte ohne Berührung des Bodens abgesaugt. Platten mit Suspensionszellen wurden vorher für 7 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Wells mit jeweils 100 µl eines Lyse-Reagenzes (siehe Material) versehen und die Platten für 15 Minuten auf dem Schüttler bei 600 U/min bewegt. Dann erfolgte der Ablesevorgang durch photometrische Messung bei 570 nm und 650 nm als Referenz mit dem Multiscan Ascent-Microplate Reader sowie die Darstellung und Speicherung der Daten mit der entsprechenden Software am PC. Bei der Messung korrelierte die Extinktion mit der Menge an zu Formazan umgesetztem MTT und damit mit der Zahl lebender Zellen.

2.2.2.3 Anfertigen der Verdünnungsreihen und Beimpfen der Zellkulturplatten mit den Testsubstanzen

Für die Testung der Dosisabhängigkeit der einzelnen Substanzen hinsichtlich der Zytotoxizität wurden entsprechende Verdünnungsreihen von Einzelsubstanzen und Substanzkombinationen jeweils mit Hilfe von tiefgefrorenen Stammlösungen hergestellt. Um die jeweils höchste Zielkonzentration (Doxorubicin: 100 μ M, Rosiglitazon / Fenofibrat: 1000 μ M) zu erreichen, wurde die Stammlösung entsprechend mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Weiterverdünnung erfolgte dann stets im Verhältnis 1:10 mit frischem Zellkulturmedium, bis die Verdünnungsreihen mit jeweils sieben verschiedenen Konzentrationen fertiggestellt waren. *Tabelle 2.3* zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen.

Zur Untersuchung der kombinierten Effekte von PPAR Agonisten und Doxorubicin wurden dieselben Substanzkonzentrationen wie in den Versuchen mit den Einzelsubstanzen verwendet. Dabei wurde die jeweils höchste Konzentration der ersten Substanz mit der höchsten der zweiten Substanz gemeinsam mit Zellkulturmedium verdünnt. Ebenso wurden die jeweils zweit- und dritthöchsten bis hin zu den kleinsten Konzentrationen kombiniert. Das Konzentrationsverhältnis betrug auf diese Weise stets 1:10 (Zytostatikum : PPAR Agonist).

Tabelle 2.3: *Eigenschaften der Stammlösungen*

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Molekulargewicht	Verwendetes Lösungsmittel
Doxorubicin	2 mg / ml	543,5 g / mol	-
Rosiglitazon	1 mg / ml	357,4 g / mol	DMSO
Fenofibrat	1 mg / ml	360,8 g / mol	DMSO

Mit den Verdünnungsreihen wurden nun die zuvor seit 72 Stunden im CO₂-Inkubator bebrüteten Zellkulturplatten wie in *Abbildung 2.1* dargestellt beimpft. Dabei wurden stets 4 Wells mit derselben Substanzkonzentration versehen, um besser reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Die jeweils oberste Reihe einer Platte wurde lediglich mit zusätzlichen 100 µl Kulturmedium pro Well versehen.

In den Kombinationsversuchen wurden analog zu den Einzelkonzentrationen derselben Reihe das oben beschriebene Gemisch beider Substanzen hinzugefügt. Auch hier wurden je 4 Wells mit derselben Konzentration befüllt.

Abbildung 2.2: *Belegung der Zellkulturplatten*

		Doxorubicin (Substanz 1)				Kombination der Substanzen 1 + 2 oder 3				Fenofibrat oder Rosiglitazon (Substanz 2 oder 3)					
		C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0		
Konzentration der Testsubstanzen	C1 _{drug1}	C1 _{drug1}	C1 _{drug1}	C1 _{drug1}	C1 _{drug1}	C1 _{drug1} +	C1 _{drug1} +	C1 _{drug1} +	C1 _{drug1} +	C1 _{drug2}	C1 _{drug2}	C1 _{drug2}	C1 _{drug2}		
	C2 _{drug1}	C2 _{drug1}	C2 _{drug1}	C2 _{drug1}	C2 _{drug1}	C2 _{drug1} +	C2 _{drug1} +	C2 _{drug1} +	C2 _{drug1} +	C2 _{drug2}	C2 _{drug2}	C2 _{drug2}	C2 _{drug2}		
	C3 _{drug1}	C3 _{drug1}	C3 _{drug1}	C3 _{drug1}	C3 _{drug1}	C3 _{drug1} 1 +	C3 _{drug1} 1 +	C3 _{drug1} 1 +	C3 _{drug1} 1 +	C3 _{drug2}	C3 _{drug2}	C3 _{drug2}	C3 _{drug2}		
	C4 _{drug1}	C4 _{drug1}	C4 _{drug1}	C4 _{drug1}	C4 _{drug1}	C4 _{drug1} 1 +	C4 _{drug1} 1 +	C4 _{drug1} 1 +	C4 _{drug1} 1 +	C4 _{drug2}	C4 _{drug2}	C4 _{drug2}	C4 _{drug2}		
	C5 _{drug1}	C5 _{drug1}	C5 _{drug1}	C5 _{drug1}	C5 _{drug1}	C5 _{drug1} 1 +	C5 _{drug1} 1 +	C5 _{drug1} 1 +	C5 _{drug1} 1 +	C5 _{drug2}	C5 _{drug2}	C5 _{drug2}	C5 _{drug2}		
	C6 _{drug1}	C6 _{drug1}	C6 _{drug1}	C6 _{drug1}	C6 _{drug1}	C6 _{drug1} 1 +	C6 _{drug1} 1 +	C6 _{drug1} 1 +	C6 _{drug1} 1 +	C6 _{drug2}	C6 _{drug2}	C6 _{drug2}	C6 _{drug2}		
	C7 _{drug1}	C7 _{drug1}	C7 _{drug1}	C7 _{drug1}	C7 _{drug1}	C7 _{drug1} 1 +	C7 _{drug1} 1 +	C7 _{drug1} 1 +	C7 _{drug1} 1 +	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}		
			C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	C7 _{drug2}	

C0 = Zellkulturmedium ohne Substanz
 C1-C7 = Substanzkonzentrationen, C1>C2>C3>C4>C5>C6>C7

Betrachtet man die Belegung der Zellkulturplatten, so war bei der Herstellung der Verdünnungsreihen zu beachten, dass die Konzentration in den angefertigten Verdünnungsreihen der doppelten Zielkonzentration in den Wells entsprachen, da die Wells zum Zeitpunkt des Zufügens der Substanz schon mit 100 μ l Zellsuspension befüllt waren. Wurden nun weitere 100 μ l in Form der doppelt konzentrierten Verdünnungsreihen zugefügt, war die Zielkonzentration erreicht.

Es erfolgte aus arbeitsökonomischen Gründen die Herstellung von ausreichend Reagenzien für mehrere Versuche.

2.2.2.4 Erneute MTT-basierte Wachstumskontrolle nach Inkubation mit den Testsubstanzen

Nach 72stündiger Bebrütung der Zellen im CO₂-Inkubator mit den Testsubstanzen erfolgte eine erneute Beurteilung der Zellviabilität mit Hilfe des MTT-Assays [68,78]

2.2.2.5 Auswertung der MTT-Assays

Die im MTT-Assay gemessene optische Dichte der jeweiligen Zellsuspension korreliert mit der Aktivität von mitochondrialen Aldehyd-Dehydrogenasen. Eine einzelne Messung gibt so Hinweise auf die Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen. Setzt man verschiedene solcher Messungen zueinander in Relation, lassen sich daraus Aussagen über toxische Wirkung der Testsubstanzen machen.

2.2.2.6 Bestimmung der GI₅₀-Konzentrationen

Die GI₅₀ (= Growth Inhibition of 50 %) beschreibt die Substanzkonzentration, die nach der entsprechenden Inkubationszeit zu einer 50 %igen Hemmung des Zellwachstums führt. Als Bezugsgröße dient dabei die Vitalität der unbehandelten Zellen nach Abschluss des Versuches. Graphisch lässt sich dies anhand der Dosis-Wirkungskurve darstellen. Hier wurden auf der Abszisse die einzelnen Substanzkonzentrationen in µM und auf der Ordinate der Anteil vitaler Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufgetragen. Es ergab sich in der Regel eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve. Der Schnittpunkt einer Parallelen zur Abszisse mit der Kurve auf Höhe der 50 %igen Zellviabilität auf der Ordinate projizierte sich auf die entsprechend zu ermittelnde Substanzkonzentration auf der Abszisse.

Rechnerisch ließ sich die GI₅₀ anhand der folgenden Formel bestimmen:

$$50\% \times \left[\frac{(\text{Substanzkonzentration mit } > 50\% \text{ Zellüberleben}) - (\text{Substanzkonzentration mit } < 50\% \text{ Zellüberleben})}{[(\% \text{ überlebende Zellen } > 50\%) - (\% \text{ überlebende Zellen } < 50\%)]} \right]$$

Die Kalkulationen wurden in diesem Zusammenhang mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel Version XP durchgeführt und die zugehörige grafische Darstellung in Dosis-Wirkungs-Kurven mit Hilfe des Programmes SigmaPlot Version 9.0 umgesetzt.

2.2.2.7 Statistische Analyse

Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu bestimmen wurde die Software Sigma Stat 3.2 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) verwendet. GI₅₀-Konzentrationen von Doxorubicin allein und Doxorubicin in Kombination mit den PPAR-Agonisten wurden mittels des Wilcoxon Signed Rank Tests verglichen. Korrelationsanalysen zwischen den Wirkungen von Rosiglitazon und Fenofibrat innerhalb des Zelllinienpanels wurden mit Hilfe der „Pearson product moment correlation“ durchgeführt. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0.05$.

Substanzinteraktionen wie Synergismen, Antagonismen und additive Effekte zwischen Doxorubicin und Rosiglitazon bzw. Doxorubicin und Fenofibrat wurden mit dem sogenannten Combination Index ermittelt. Dieser leitet sich aus dem Median-Effekt-Prinzip, beschrieben durch Chou and Talalay [18], ab. Die Berechnung der Combination Indices erfolgte am PC mit Hilfe der CalcuSyn 2.0 Software. Definitionsgemäß wurde bei einem Index von $< 0,9$ ein Synergismus der Substanzwirkungen angenommen. Im Falle additiver Effekte lag der Index zwischen 0,9 und 1,1. Werte darüber deuteten auf einen Antagonismus hin. In die Berechnung flossen die GI₅₀-Konzentrationen der Einzelkonzentrationen sowie die GI₅₀-Konzentrationen bei Substanzkombination ein.

In den Versuchsreihen wurde nicht für multiple Testung korrigiert.

2.2.3 Expressionsanalysen

2.2.3.1 Herstellen von Zellpellets

Als Voraussetzung für die Durchführung von Genexpressionsanalysen musste zunächst ausreichend Zellmaterial für die RNA-Isolation gewonnen werden. Dazu wurde der Inhalt mehrerer ausreichend mit den Zellen derselben Zelllinie bewachsener Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen zusammengeführt.

Der Ablösevorgang vom Flaschenboden bei adhärennten Zellen war dabei derselbe wie beim Passagieren der Zellen. Der Flascheninhalt von 2-4 Flaschen wurde zunächst in einem 15 ml Falcontube gesammelt und bei 1300 U / min und 21° C für 8 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das überschüssige Medium abgegossen, die Zellen am Boden mit 1 ml Medium resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dann erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1300 U / min bei 23° C für 7 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets bei – 80° C eingefroren.

2.2.3.2 Isolation der RNA für die quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction (rtPCR)

Die Isolation von RNA als Grundlage für die Durchführung einer quantitativen reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (rtPCR) als Messparameter für die Expression der PPAR-Rezeptoren in den jeweiligen Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp RNA isolation kit gemäß den Vorgaben des Herstellers unter RNase-freien Bedingungen.

Nach Auftauen der zu untersuchenden Zellpellets wurden zunächst die Zellstrukturen mit den dafür vorgesehenen Reagenzien in entsprechenden Tubes lysiert und die Lösung homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol erfolgte die Bindung der reinen RNA an eine speziell dafür vorgesehene Silica-Gel-Membran. Durch Waschvorgänge wurden zelluläre Rückstände und Verunreinigungen von der Membran entfernt. Spuren von DNA wurden dabei durch zusätzliche Behandlung mit einem RNase-freien DNase-Set eliminiert. Anschließend wurde die reine RNA in 30-100 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.3.3 Quantitative reverse transcription-Polymerase Chain Reaction

Zunächst wurden RNA-Qualität und Quantität mit Hilfe des 2100-Bioanalysators von Agilent kapillarelektrophoretisch analysiert.

Im nächsten Schritt mussten aus der isolierten mRNA komplementäre DNA-Stränge (cDNA) synthetisiert werden. Die dafür notwendige reverse Transkription wurde mit dem Superscript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR von Invitrogen an 0,1 µg RNA entsprechend der Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

Dabei erfolgte zunächst die Resuspension der RNA gefolgt von einer Denaturierung bei 65° C für 5 Minuten mit anschließender sofortiger Abkühlung auf Eis. Ausgehend von den ermittelten RNA-Konzentrationen wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/10 µl verdünnt. Zu den 10 µl RNA wurde ein Mix aus dNTPs und einem Oligo-dT-Primer pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 2 Minuten bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde ein Mix aus dem Puffer Dithiothreitol (DTT), einem RNase-Inhibitor und der reversen Transkriptase zugesetzt und sorgfältig gemischt. Dieser Ansatz wurde erneut bei 42° C über 50 Minuten inkubiert. Durch eine 15minütige Erwärmung auf 70° C wurde anschließend die reverse Transkriptase wieder inaktiviert und der Transkriptionsvorgang mit dem entstandenen Endprodukt eines mRNA-cDNA-Hybrids beendet. In einem letzten Schritt wurde die noch vorhandene RNA durch Inkubation für 20 Minuten bei 37° C mit RNase H aus dem Ansatz entfernt. Damit war die Isolation der cDNA abgeschlossen. Von jeder Zelllinie wurden aus jeweils 2 unterschiedlichen Zellpellets einer Zelllinie auf diese Weise mindestens 2 RNA-Proben isoliert, transkribiert und der individuellen Expressionsanalyse durch real-time TaqMan® PCR zugeführt.

Tabelle 2.4: *Hilfsmittel für die cDNA-Synthese*

Substanzen	Menge
<i>Primer Mix</i>	<i>12 µl</i>
RNA	X µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Oligo(dt)12-18 (500 µg / ml)	1 µl
Nukleasefreies Wasser	ad 12 µl
<i>Reaktionsmix</i>	<i>7 µl</i>
5x First Strand Buffer	4 µl
0,1 m DTT	2 µl
RNase-Inhibitor, 40 U / ml	1 µl
Superscript II reverse Transkriptase, 200 Units	1 µl
RNase H	1 µl

2.2.3.4 Real-time TaqMan® Polymerase Chain Reaction

Die real-time TaqMan® PCR-Analysen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster durchgeführt.

Das Prinzip der TaqMan®-Technologie beruht auf der gleichzeitigen Amplifikation und quantitativen Analyse von PCR-Produkten in einem Reaktionsansatz und wurde aufbauend auf Arbeiten von Holland et al. und Lee et al. entwickelt [48,60]. Dabei wird das entstandene PCR-Produkt, also die vervielfältigte DNA, über sogenannte TaqMan-Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Sonden bestehen aus einem Oligonucleotid, welches komplementär zu den zu amplifizierenden DNA-Sequenzen und an beiden Enden jeweils mit einem fluoreszierenden Farbstoff verbunden ist. Der sogenannte Reporter-Farbstoff am 5'-Ende der Sonde wird bei Bestrahlung mit einem Laser normalerweise durch strahlungsfreie Energieübertragung (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET) auf den sogenannten Quencher-Farbstoff am 3'-Ende in seinen fluoreszierenden Eigenschaften gehemmt. Letzterer Effekt wird aufgehoben, wenn sich Reporter- und Quencher-Farbstoff räumlich voneinander entfernen. Eine derartige Trennung entsteht durch die zusätzliche 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase, welche eigentlich für die Elongation des neu synthetisierten DNA-Stranges notwendig ist. Dabei wird das 5'-Ende der Sonde mit dem Reporter-Farbstoff abgetrennt. Die dadurch bedingte Zunahme an Fluoreszenz dieses Farbstoffs lässt sich leicht quantifizieren und korreliert mit der Menge neu synthetisierter DNA.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von PPAR α und PPAR γ auf diese Weise untersucht. Als endogene Kontrolle wurde ebenfalls die Expression des Housekeeping Gens GAPDH durchgeführt. Außerdem wurden Negativkontrollen mit reinem Wasser mitgeführt.

Bei den Analysen kamen für je 10 ng reiner cDNA von der Firma Applied Biosystems vorgefertigte Taqman®-Assays mit den entsprechenden Primern und Sonden zur Anwendung (Tabelle 2.5). Zusätzlich wurde 2 x Universal PCR Master Mix ohne Uracil-N-Glykosylase (UNG) hinzugefügt und das ganze mit DEPC-Wasser aufgefüllt.

Tabelle 2.5: *Auswahl der verwendeten Taqman®-Assays*

Bezeichnung	Assay ID / RefSeq
PPAR α	Hs00947538_m1 / NM_001001928.2
PPAR γ	Hs01115512_m1 / NM_138711.3
GAPDH	Assay ID: 4333764T

Zur Durchführung der Messungen wurde das ABI Prism 7700 sequence detection system für die Quantifizierung der mRNA verwendet. Dazu wurden die oben beschriebenen Ansätze maschinell mit Hilfe des Tecan Genesis 150 robotic in 384-Well Platten pipettiert, mit Deckel versehen, abzentrifugiert und die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Zunächst erfolgte die Aktivierung der Taq-Polymerase für 10 Minuten bei 95° C. Darauf folgten 40 Zyklen der Amplifikation. Dazu war jeweils zunächst eine kurze Phase von 15 Sekunden bei 95° C für die Denaturierung der cDNA notwendig, dann folgte jeweils 1 Minute Synthese bei 60° C.

Alle cDNA Proben wurden in einem Analysenlauf jeweils 2 mal analysiert.

2.2.3.5 Auswertung der PCR-Daten

Die PCR-Daten wurden durch die Sequence Detection Software (SDS2.2, Applied Biosystems) erfasst und ausgewertet. Dabei konnte die Expression im zeitlichen Verlauf zunächst graphisch dargestellt werden (x-Achse: Zyklenzahl; y-Achse: Fluoreszenzintensität). Dabei ergab sich, wie zu erwarten, stets ein exponentielles Wachstum mit Erreichen eines Plateaus in den letzten Zyklen (bedingt durch den Verbrauch der Substrate).

Zur Quantifizierung der Expression ermittelte das Programm einen Schwellenwert (C_t -Wert oder Threshold Cycle) als Maß für die Menge an cDNA, bei der es statistisch gesehen zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz kam [67]. Damit entsprach dieser Wert der cDNA-Menge, die für den Reaktionsstart notwendig war.

Zur Berechnung der relativen PPAR Expression im Vergleich zum Housekeeping Gen GAPDH wurde die Differenz zwischen den PPAR (=Target) Crossing Points und den GAPDH Crossing Points ermittelt. Eine hohe Differenz zwischen PPAR und GAPDH zeigt im Gegensatz zu einer niedrigen Differenz an, dass PPAR im Vergleich zum Housekeeping Gen GAPDH vergleichsweise geringer exprimiert wird. Die größte Differenz zeigt die Probe mit der niedrigsten PPAR Expression und die niedrigste Differenz die Probe mit der höchsten PPAR Expression an. Um die PPAR alpha und gamma Expression zwischen den verschiedenen Zelllinien zu vergleichen, wurde größte Differenz zwischen den Crossing Points von PPAR alpha und gamma und GAPDH ermittelt, d.h. die Probe mit der niedrigsten Expression von PPAR alpha oder gamma. Es wurden die Expressionsdaten von PPAR alpha und gamma zusammengefasst, um nicht nur für die beiden Gene isoliert die Expression vergleichen zu können, sondern um auch Anhaltspunkte zu erhalten, wie sich die Expression von PPAR α zu PPAR γ in diesen Zellen verhält. Zur Berechnung um wie viel mehr PPAR in den anderen Proben exprimiert wurde, wurde die $-\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt.

Es wurde dabei die Differenz zwischen der Differenz von PPAR Crossing Point und GAPDH Crossing Point und der maximalen Differenz ermittelt. Dieser Wert wurde mit (-1) multipliziert und dann mit der Zahl 2 (Hintergrund: mit jedem PCR Zyklus verdoppeln sich die Kopien im PCR-Ansatz) potenziert. So lässt sich ein Faktor ermitteln, der angibt um wieviel mehr PPAR alpha oder gamma bezogen auf das Housekeeping Gen GAPDH in einer Probe im Vergleich zur Probe mit der niedrigsten Expressionsrate exprimiert wird. Die Ergebnisse der verschiedenen RNA Extraktionen einer Zelllinie wurden gemittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der in vitro-Toxizitätstests

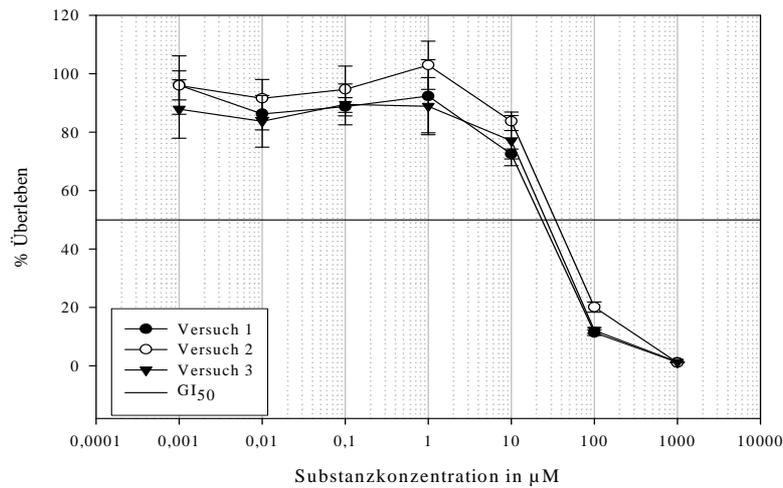
3.1.1 Dosis-Wirkungs-Kurven

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden für jede Zelllinie in dreifacher Versuchswiederholung an unterschiedlichen Tagen bestimmt. Dieses Vorgehen diente der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse. In der Regel zeigten die aus der unterschiedlichen Wachstumshemmung der verschiedenen Substanzkonzentrationen ermittelten Kurven einen sigmoiden Verlauf: es musste zunächst eine bestimmte Substanzkonzentration appliziert werden, um überhaupt eine sichtbare Wirkung auf die Zellen auszulösen. Bei weiter ansteigender Substanzkonzentration nahm dann auch die Wachstumshemmung zu und die Kurven fielen immer steiler ab, bis ein Substanzsättigungseffekt eintrat. Ab diesem Punkt wurden die Kurven flacher bis durch weitere Substanzkonzentrationserhöhung kein weiterer Effekt mehr beobachtet werden konnte. Anhand einer Parallelen zur Abszisse auf Höhe 50 %iger Wachstumshemmung auf der Ordinate wurde die GI_{50} wie zuvor beschrieben grafisch dargestellt.

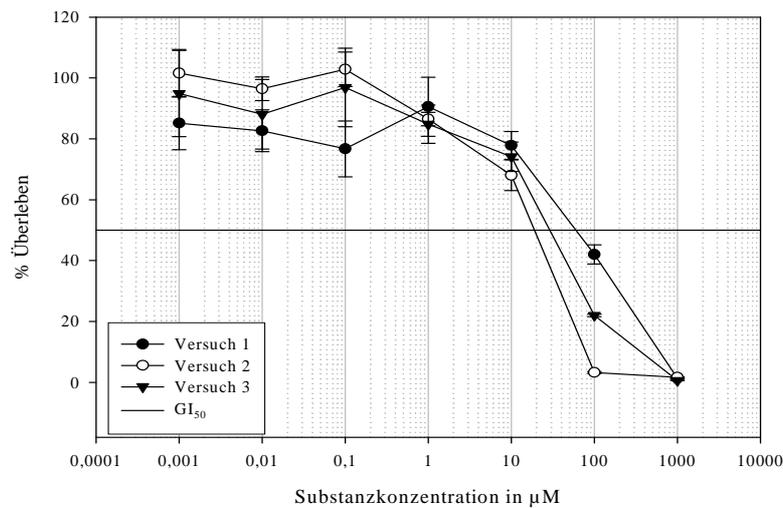
Auf diese Weise ließen sich alle Ergebnisse der MTT-Assays grafisch darstellen. Es zeigte sich dabei insgesamt eine hohe Reproduzierbarkeit, da es kaum zu gravierenderen Abweichungen kam (Beispiel: *Abbildung 3.1*).

Abbildung 3.1: Dosis-Wirkungs-Beziehung am Beispiel der Leukämie-Zelllinie HL-60 nach Behandlung mit Rosiglitazon (3.1.1) und Fenofibrat (3.1.2). Logarithmische Darstellung Substanzkonzentrationen.

3.1.1



3.1.2



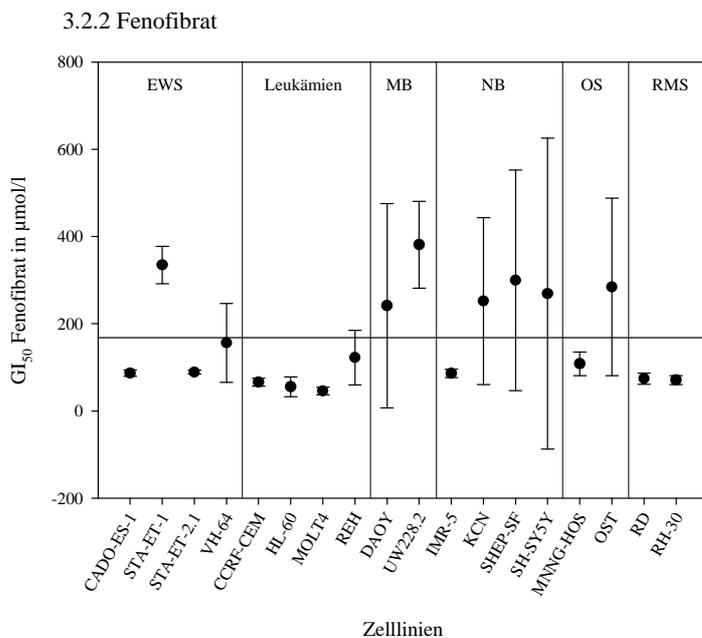
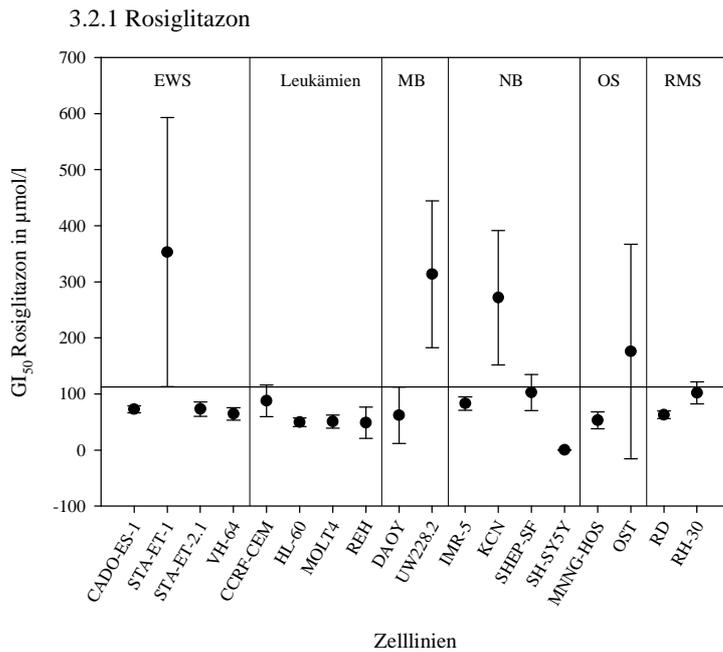
3.1.2 In vitro-Toxizität der PPAR-Agonisten

Insgesamt waren Rosiglitazon und Fenofibrat gegen alle 18 untersuchten Zelllinien zytotoxisch. Dabei gab es jedoch gravierende Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Zelllinien als auch zwischen beiden Substanzen (*Abbildung 3.2*). So betrug die für eine 50%ige Wachstumshemmung benötigten Substanzkonzentrationen (GI_{50}) von Rosiglitazon zwischen 37 nmol/l in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y und 353 $\mu\text{mol/l}$ beim Ewing-Sarkom STA-ET-1. Für Fenofibrat lagen die GI_{50} -Werte zwischen 46 $\mu\text{mol/l}$ bei der Leukämie-Zelllinie MOLT-4 und 381 $\mu\text{mol/l}$ beim Medulloblastom UW228.2.

Betrachtet man die GI_{50} -Konzentrationen im Mittel, so zeigte sich für Rosiglitazon im Verhältnis zum Fenofibrat eine etwas höhere Gesamttoxizität. So betrug die mittlere GI_{50} -Konzentration, d. h. die durchschnittliche Substanzkonzentration, welche in allen Versuchen zusammen genommen zu einer Wachstumshemmung von 50 % führte, für Rosiglitazon 112,5 $\mu\text{mol/l}$ und für Fenofibrat 167,9 $\mu\text{mol/l}$. Zur einfacheren Darstellung werden im Folgenden Zelllinien mit einer GI_{50} -Konzentration oberhalb dieses Mittelwertes als relativ resistent und Zelllinien mit GI_{50} -Werten unterhalb des Mittelwertes als relativ sensibel bezeichnet. Insgesamt waren auf diese Weise 14 von 18 Zelllinien gegen Rosiglitazon und 11 von 18 Zelllinien gegen Fenofibrat relativ sensibel.

Vergleicht man die GI_{50} -Werte beider PPAR-Agonisten im Bezug auf das gesamte Tumor-Zelllinien-Panel miteinander, so zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Zytotoxizitäten von Rosiglitazon und Fenofibrat ($p < 0.001$; $r^2 = 0.712$; Pearson Product Moment Correlation). Mit Ausnahme der Zelllinien DAOY, SHEP-SF und SH-SY5Y waren alle Zelllinien, die auf Rosiglitazon sensibel reagierten auch sensibel auf Fenofibrat und umgekehrt (*Abb. 3.2*).

Abbildung 3.2: Mittlere GI_{50} von Rosiglitazon und Fenofibrat der verschiedenen Zelllinien. Jeweils dargestellt sind Mittelwert [Punkt] +/- Standardabweichung [senkrechte Striche]. Die Gerade parallel zur Abszisse markiert die mittlere GI_{50} des Gesamtpanels. Zelllinien mit GI_{50} -Werten oberhalb dieser Geraden wurden als relativ resistent, unterhalb als relativ sensibel definiert.



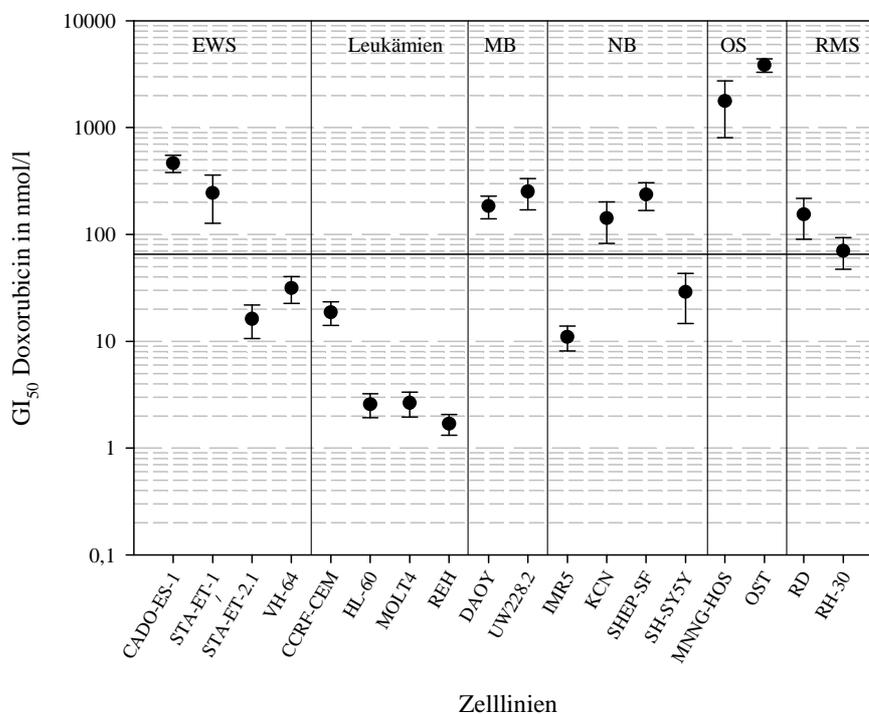
Alle vier Leukämie- und beide Rhabdomyosarkom-Zelllinien zeigten ein ähnliches, im Verhältnis zum Gesamtpanel sehr gutes Ansprechen auf Rosiglitazon und Fenofibrat. Außerdem waren 3 von 4 Ewing-Sarkom-Zelllinien und die Osteosarkom-Zelllinie MNNG-HOS relativ sensibel auf beide Substanzen mit einer GI_{50} unterhalb des Gesamtdurchschnittes von 112,5 $\mu\text{mol/l}$ (Rosiglitazon) bzw. 167,9 $\mu\text{mol/l}$ (Fenofibrat). Heterogener waren die ermittelten Werte bei Neuro- und Medulloblastomen: Die Medulloblastom-Zelllinie DAOY reagierte sensibel, UW228.2 relativ resistent auf Rosiglitazon. Beide Medulloblastome wurden durch Fenofibrat nur wenig im Wachstum beeinflusst. Von den 4 Neuroblastom-Zelllinien sprachen IMR-5, SHEP-SF und SH-SY5Y auf Rosiglitazon sowie ebenfalls IMR-5 auf Fenofibrat gut an. Ansonsten war das Ansprechen gegen beide Substanzen eher mäßig bis schlecht.

Insgesamt wies die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y gegen Rosiglitazon die höchste Sensitivität des gesamten Panels auf. Das schlechteste Ansprechen auf den $PPAR\gamma$ -Agonisten zeigte die Ewing-Sarkom-Linie STA-ET-1. Die höchste Resistenz gegen Fenofibrat wurde beim Medulloblastom UW228.2 beobachtet, die höchste Zytotoxizität bei der Leukämie HL-60.

3.1.3 In vitro-Toxizität von Doxorubicin

Das Anthrazyklin Doxorubicin war gegen alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zytotoxisch. Dabei übertraf dessen Wirksamkeit die zytotoxische Potenz der PPAR-Agonisten deutlich (*Tabelle 3.1*), wobei auch hier die Sensibilität der einzelnen Zelllinien gegenüber der Substanz variierte. Die ermittelten GI_{50} -Konzentrationen zeigten so insgesamt Differenzen von bis zu 4 log-Stufen (*Abbildung 3.3*).

Abbildung 3.3: *Mittlere GI_{50} von Doxorubicin der verschiedenen Zelllinien (Mittelwert +/- Standardabweichung). Die Gerade parallel zur Abszisse markiert die mediane GI_{50} des Gesamtpanels. Zelllinien mit GI_{50} -Werten oberhalb dieser Geraden wurden als relativ resistent, unterhalb als relativ sensibel definiert. Logarithmische Darstellung der Substanzkonzentrationen.*



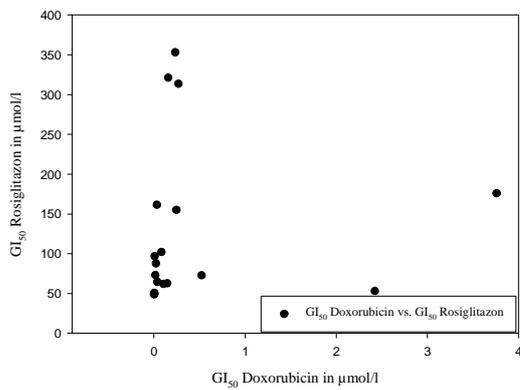
Die B-Vorläufer-ALL-Zelllinie REH war innerhalb des Panels mit einer GI_{50} von 1,7 nmol/l die Zelllinie mit der höchsten Sensitivität. Dagegen lag die höchste ermittelte GI_{50} mit 3,9 μ mol/l bei der Osteosarkom-Zelllinie OST um das 4000fache darüber.

Insgesamt unterschied sich das Sensitivitätsprofil des Zelllinienpanels nach Behandlung mit Doxorubicin deutlich vom Sensitivitätsprofil der Zellen gegenüber den PPAR-Agonisten Rosiglitazon und Fenofibrat: Die GI_{50} -Konzentrationen zeigten weder eine signifikante Korrelation zwischen den Wirkungen von Doxorubicin und Fenofibrat ($p = 0.278$; $r^2 = 0.270$; Pearson Product Moment Correlation) noch zwischen den Profilen von Doxorubicin und Rosiglitazon ($p = 0.633$; $r^2 = 0.121$; Pearson Product Moment Correlation). An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass zwischen den GI_{50} -Konzentrationen der PPAR-Agonisten untereinander eine signifikante Korrelation nachgewiesen wurde (s.o.).

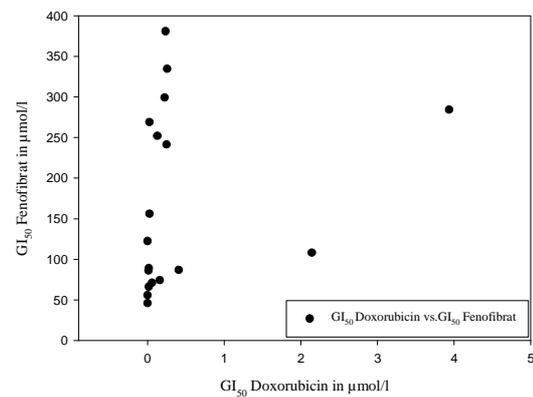
Zumindest andeutungsweise wird dies durch die *Abbildung 3.4* veranschaulicht. Hier werden für jede einzelne Zelllinie die GI_{50} -Konzentration von jeweils einer Substanz auf Abszisse und einer weiteren auf der Ordinate gegenüber gestellt. So repräsentiert der jeweilige Schnittpunkt 2 GI_{50} -Werte einer Zelllinie. Anhand des Verteilungsmusters der Schnittpunkte erkennt man, in wie weit die GI_{50} -Werte der beiden entsprechenden Substanzen miteinander korrelieren. Vergleicht man auf diese Weise die Wirkung von Doxorubicin auf einzelne Zelllinien (Abszisse) mit jener von Fenofibrat oder Rosiglitazon (Ordinate), so verteilen sich die Schnittpunkte äußerst unregelmäßig. Beim Vergleich von Rosiglitazon mit Fenofibrat jedoch zeigt sich, dass Zelllinien mit hoher Sensitivität gegenüber Fenofibrat in der Regel auch hoch sensitiv für Rosiglitazon sind, die Punkte also sowohl weit links als auch weit unten im Bild zu finden sind. Umgekehrt liegen die Punkte (entsprechend den Zelllinien), die weit rechts im Diagramm zu finden sind meist auch entsprechend weit oben, was jeweils einer hohen GI_{50} für beide Substanzen (Rosiglitazon und Fenofibrat) entspricht. Grafisch zeigt sich dies in einer Regressionsgerade (*Abb. 3.4.3*). Statistisch gesehen wird dies durch die zuvor beschriebenen errechneten Korrelationen erhärtet.

Abbildung 3.4: *Korrelation der GI_{50} -Konzentrationen verschiedener Substanzen nach Behandlung des Zelllinienpanels. Jeder Punkt entsteht anhand der GI_{50} -Konzentration einer Substanz auf der x-Achse sowie der GI_{50} -Konzentration einer zweiten zu vergleichenden Substanz auf der y-Achse. Er repräsentiert somit 2 Werte einer Zelllinie, so dass jedes Diagramm je einen Punkt pro Zelllinie, also insgesamt 18 Punkte aufweist. In 3.4.3 wird die positive Korrelation durch eine Regressionsgerade veranschaulicht.*

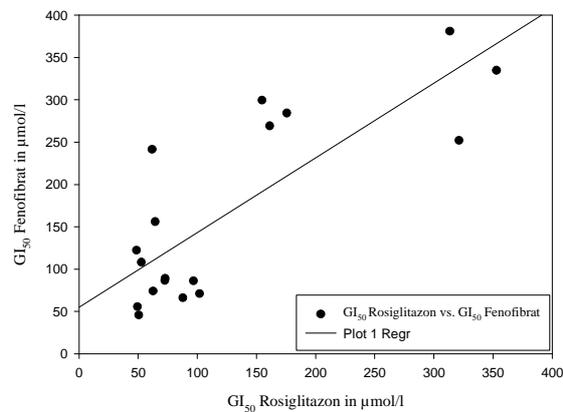
3.4.1



3.4.2



3.4.3



Betrachtet nach Tumorentitäten wurde die mit Abstand höchste Resistenz des gesamten Panels gegen Doxorubicin bei den Osteosarkomen beobachtet (GI_{50} -Osteosarkome: 2.8 $\mu\text{mol/l}$), gefolgt von den Medulloblastomen. Diese jedoch wiesen bei einer mittleren GI_{50} von 225 nmol/l bereits ein ca. 10fach besseres Ansprechen auf als die Osteosarkome. Die Rhabdomyosarkome, Ewing-Sarkome und Neuroblastome waren sogar jeweils um das 20fache sensitiver als die Osteosarkom-Zelllinien (GI_{50} -Rhabdomyosarkome: 112 nmol/l; GI_{50} -Neuroblastome: 129 nmol/l; GI_{50} -Ewing-Sarkome: 143 nmol/L). Die insgesamt höchste Sensitivität gegen Doxorubicin wiesen bei einer mittleren GI_{50} von 6,4 nmol/l die Leukämie-Zelllinien auf.

3.1.4 In vitro-Toxizität der PPAR-Agonisten in Kombination mit Doxorubicin

Bei Testung der kombinierten Wirkung von Doxorubicin und Rosiglitazon bzw. Fenofibrat wurden die Zelllinien mit einer Verdünnungsreihe beider Substanzen in einem konstanten Verdünnungsverhältnis von 1:10 (Doxorubicin : PPAR-Agonist) behandelt.

3.1.4.1 Doxorubicin + Rosiglitazon

In diesem Verhältnis konnte bezogen auf das Zelllinienpanel durch den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon eine signifikante Steigerung der Zelltoxizität von Doxorubicin erzielt werden ($p < 0.0001$; Wilcoxon Signed Rank Test). Nahezu alle ermittelten GI₅₀-Konzentrationen von Doxorubicin wurden durch die Hinzugabe von Rosiglitazon mehr oder weniger deutlich gesenkt. Eine genaue Auflistung der GI₅₀-Mittelwerte und Standardabweichungen bei Kombination von Rosiglitazon und Doxorubicin im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit Doxorubicin zeigt die *Tabelle 3.1*. Dabei muss beachtet werden, dass der jeweils dargestellte Wert für die Kombination der jeweiligen Konzentration von Doxorubicin entspricht. Die jeweilige GI₅₀ des PPAR-Agonisten ist entsprechend um den Faktor 10 höher.

Tabelle 3.1: *GI₅₀-Mittelwerte und Standardabweichungen für die Behandlung mit Doxorubicin allein im Vergleich zur Kombination mit Rosiglitazon. Das Verdünnungsverhältnis von Doxorubicin zu Rosiglitazon betrug dabei 1 : 10. Ebenfalls aufgeführt sind die jeweiligen Kombinationsindizes. Ein Index von < 0,9 deutet auf synergistische, zwischen 0,9 und 1,1 auf additive und > 1,1 auf antagonistische Effekte hin.*

Tumorart	Zelllinie	GI ₅₀ -Doxorubicin [nmol/l]		GI ₅₀ -Doxorubicin/Rosiglitazon [nmol/l]		Combination Index
		Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
Ewing Sarkom	CADO-ES1	465	84,5	230,7	170,25	0,71
	STA-ET-1	244	117	52,7	44,06	0,48
	STA-ET-2.1	16,2	5,62	5,7	4,04	0,31
	VH-64	31,5	8,9	7	1,73	0,19
Leukämie	CCRF-CEM	18,7	4,64	7,5	7,78	0,50
	HL-60	2,57	0,65	1,2	1,18	0,59
	MOLT-4	2,65	0,7	1,4	1,5	0,49
	REH	1,69	0,37	0,9	0,92	0,61
Medulloblastom	DAOY	184	44,1	59,5	64,65	0,84
	UW228.2	252	81,6	59,3	8,5	0,37
Neuroblastom	IMR-5	11	2,9	4,5	1,4	0,49
	KCN	142	59,5	28,7	37,53	0,62
	SHEP-SF	236	68,2	200	186,97	1,12
	SH-SY5Y	28,9	14,2	9,1	14,64	0,19
Osteosarkom	MNNG-HOS	1773	968	918	18,38	0,95
	OST	3848	549	2821	112,43	1,03
Rhabdomyosarkom	RD	154	63,8	54	22,54	0,92
	RH30	70,2	23,1	30,3	22,59	0,68

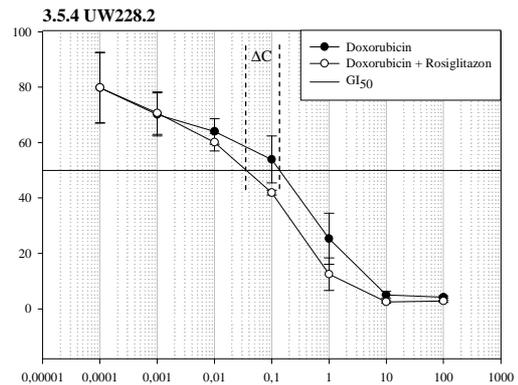
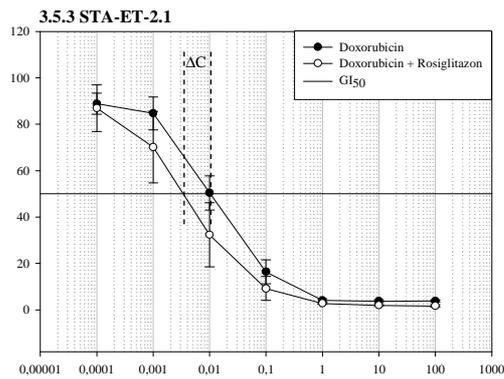
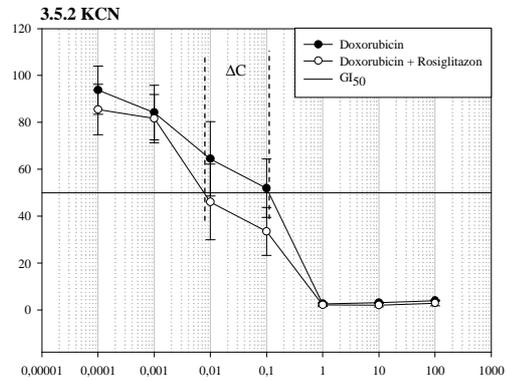
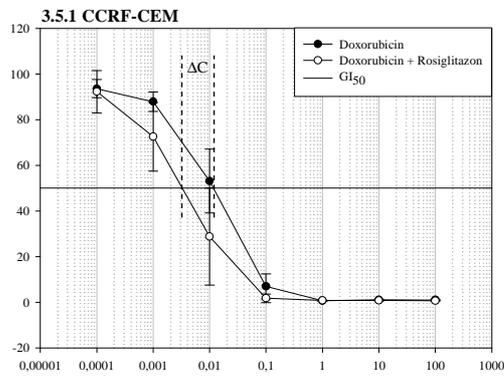
Insgesamt wurden in den Kombinationsversuchen mit Rosiglitazon GI_{50} -Werte für Doxorubicin zwischen 0,9 nmol/l (REH) und 2,82 μ mol/l (OST) ermittelt.

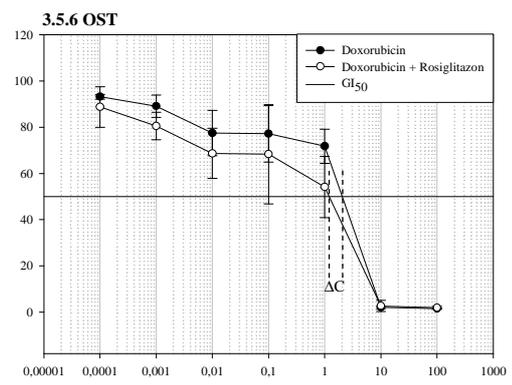
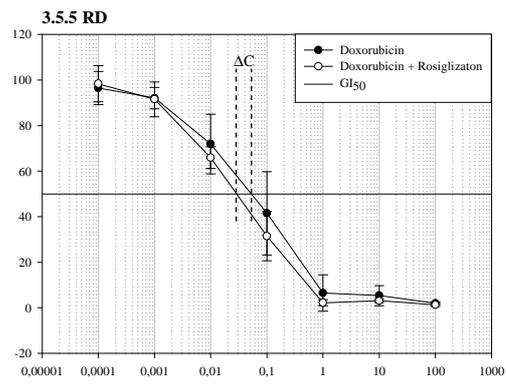
Dabei lag die GI_{50} in allen Leukämie-, Rhabdomyosarkom- und Medulloblastom-Zelllinien, sowie in je 3 der 4 Ewing-Sarkom- (STA-ET-1, STA-ET-2.1 und VH-64) bzw. Neuroblastom-Zelllinien (IMR-5, KCN und SH-SY5Y) eine GI_{50} für Doxorubicin im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich oder noch niedriger. Im dreistellig nanomolaren Bereich (bezogen auf Doxorubicin bei Kombination) lagen die Werte der Osteosarkom-Zelllinie MNNG-HOS, der Ewing Sarkom-Zelllinie CADO-ES-1 und der Neuroblastom-Zelllinie SHEP-SF. Lediglich die Osteosarkom-Zelllinie OST wies eine GI_{50} im einstelligen mikromolaren Bereich auf und zeigte damit die hier verhältnismäßig am stärksten ausgeprägte Resistenz.

Im Umkehrschluss - setzt man die um das 10fach höhere Konzentration von Rosiglitazon im Verhältnis zum Doxorubicin voraus - ergibt sich im Vergleich mit den ermittelten Werten nach alleiniger Behandlung mit Doxorubicin, dass Rosiglitazon in einem Konzentrationsbereich zwischen 9 nmol/l und 28 μ mol/l in der Lage war, eine GI_{50} -Reduktion zu bewirken.

Die konstante Verminderung der Doxorubicin-Dosis durch Zugabe von Rosiglitazon machte sich auch in der grafischen Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung bemerkbar. Die nach wie vor sigmoid verlaufenden Kurven imponierten bei allen Zelllinien mehr oder weniger stark nach links verschoben. Entsprechend wurde - wie im Vorfeld beschrieben - die jeweilige GI_{50} -Konzentration durch Zugabe von Rosiglitazon unterschiedlich stark gesenkt. Die *Abbildung 3.5* zeigt an 6 ausgewählten Zelllinien (stellvertretend 1 Zelllinie pro Tumorart) die Kombinationseffekte von Doxorubicin und Rosiglitazon auf das Zellwachstum.

Abbildung 3.5: Dosis-Wirkungs-Kurven zur Darstellung der Kombinationseffekte von Doxorubicin und Rosiglitazon auf das Zellwachstum im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit Doxorubicin. Der Schnittpunkt der Kurve mit der Geraden bei 50%igem Zellüberleben entspricht der GI_{50} -Konzentration. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten der ermittelten Substanzkonzentrationen, die senkrechten Striche stellen die Standardabweichung dar. ΔC entspricht der Dosisreduktion von Doxorubicin zum Erreichen der GI_{50} . Logarithmische Darstellung der Kurven.





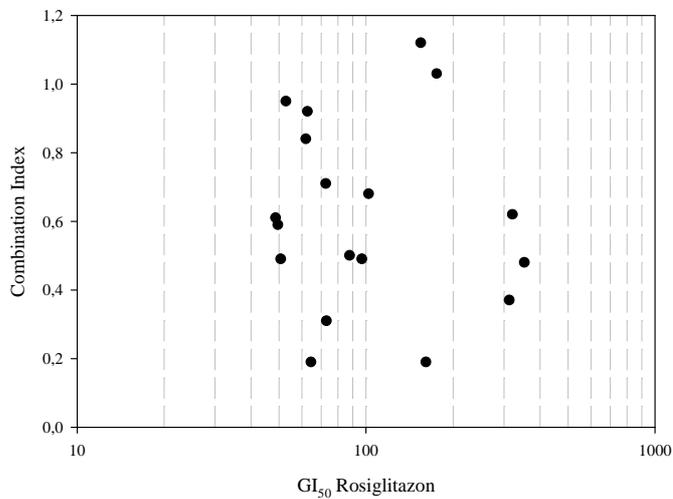
Zur weiteren Spezifizierung und Quantifizierung der gemeinsamen Effekte von Doxorubicin und Rosiglitazon wurden mit Hilfe der CalcuSyn 2.0 Software auf der Grundlage des Median-Effekt-Prinzips nach Chou und Talalay Kombinationsindices beider Substanzen berechnet. Diese sind ebenfalls in der *Tabelle 3.1* aufgeführt. Dabei wurde in 14 der 18 Zelllinien ein Kombinationsindex von unter 0,9 ermittelt, was für synergistische Wirkung der beiden Substanzen sprach (*Tabelle 3.1*). In den übrigen 4 Zelllinien (OST, MNNG-HOS, RD, SHEP-SF) wiesen Kombinationsindices zwischen 0,9 und 1,1 auf additive Effekte von Rosiglitazon und Doxorubicin hin.

Der insgesamt niedrigste Kombinationsindex von 0,19 und damit auch die prozentual stärkste effektsteigernde Wirkung wurde für die Zelllinien SH-SY5Y (Neuroblastom) und VH 64 (Ewing-Sarkom) ermittelt. Weitere Zelllinien mit deutlicher GI_{50} -Senkung waren STA-ET-2.1, ebenfalls ein Ewing-Sarkom mit einem Kombinationsindex von 0,31 oder das Medulloblastom UW228.2 mit einem Index von 0,37. Den höchsten Kombinationsindex von 1,12 wies die Neuroblastom-Zelllinie SHEP-SF auf. Ebenfalls eher leichtere Steigerung der Zytotoxizität wurde bei den Osteosarkomen OST (CI = 1,03) und MNNG-HOS (CI = 0,95) sowie beim Rhabdomyosarkom RD (CI = 0,92) erzielt.

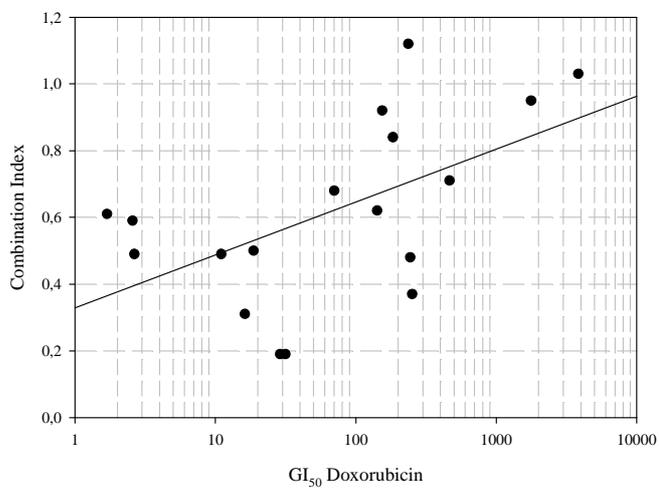
Interessanterweise bestand - wie in *Abbildung 3.6* gezeigt - keine signifikante Korrelation zwischen Kombinationsindices und GI_{50} -Konzentrationen von Rosiglitazon nach der Pearson Correlation ($p = 0.987$, $R^2 = 0.00405$). Das bedeutet, dass zwischen der Zytotoxizität von Rosiglitazon und dem Ausmaß der synergistischen Effekte kein Zusammenhang zu eruieren war. Auf der anderen Seite korrelierten jedoch die GI_{50} -Konzentrationen von Doxorubicin mit den Kombinationsindices ($p = 0.0239$; $R^2 = 0.529$; Pearson Correlation). Ein starker Synergismus wurde vor allem bei Zelllinien gefunden, die auch hoch sensibel auf Doxorubicin reagierten. Weniger synergistische Wirkung ging mit höherer Resistenz der Zelllinien gegen Doxorubicin einher. Dieser Befund legt nahe, dass Rosiglitazon vor allem die Wirksamkeit von Doxorubicin erhöht und nicht umgekehrt. Zumindest scheint so die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber dem Anthrazyklin maßgeblich für den durch Rosiglitazon möglicherweise zu erzielenden zusätzlichen toxischen Effekt zu sein.

Abbildung 3.6: Darstellung der Korrelation von GI_{50} -Konzentrationen zum entsprechenden Kombinationsindex. Jeder Punkt entspricht beiden Werten für eine Zelllinie. In 3.6.2 ist zur Veranschaulichung der positiven Korrelation eine Regressionsgerade eingefügt. Logarithmische Darstellung der GI_{50} -Werte.

3.6.1



3.6.2



3.1.4.2 Doxorubicin + Fenofibrat

Der PPAR α -Agonist Fenofibrat konnte trotz zytotoxischer Einzelwirkung in den Kombinationsversuchen keinen signifikanten Anstieg der Zytotoxizität von Doxorubicin bewirken ($p < 0.091$; Wilcoxon Signed Rank Test).

Fenofibrat war dementsprechend nicht in der Lage, eine kontinuierliche Verminderung der GI₅₀ zu erwirken. Der folgenden *Tabelle 3.2* sind die ermittelten Werte der Kombinationsversuche im Vergleich zur alleinigen Doxorubicin-Behandlung sowie die Kombinationsindizes, ermittelt nach dem Median-Effekt-Prinzip, dargestellt.

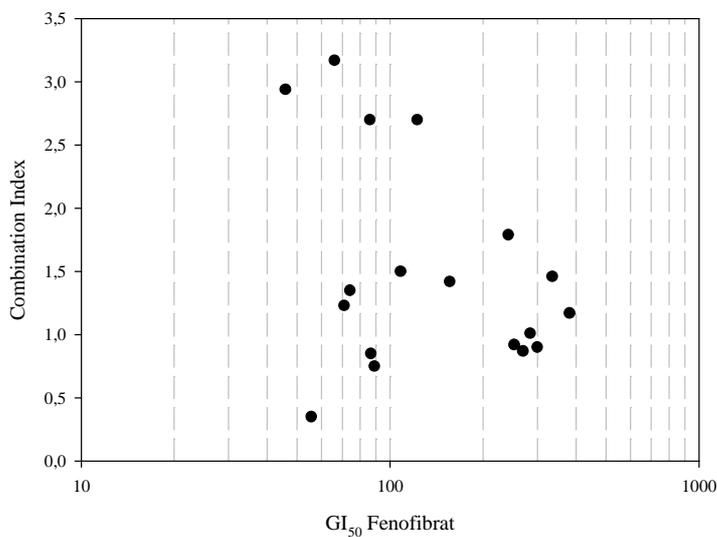
Wie ebenfalls aus der *Tabelle 3.2* ersichtlich, wurden für die Kombination mit Fenofibrat Kombinationsindices zwischen 0,35 und 3,17 ermittelt. Dabei zeigten sich lediglich in der Behandlung von 4 Zelllinien synergistische Effekte mit einem Index von weniger als 0,9. Additive Effekte mit einem Kombinationsindex zwischen 0,9 und 1,1 wurden an 3 Zelllinien beobachtet, während die Effekte der Substanzkombinationen an den übrigen 11 Zelllinien mit Kombinationsindices über 1,1 eher antagonistisch imponierten. Des Weiteren bestand keinerlei Korrelation zwischen der Wirksamkeit von Doxorubicin gemessen an der GI₅₀ und den in Kombination erzielten synergistischen, additiven und antagonistischen Effekten ($p = 0.492$; $R^2 = -0.173$; Pearson Correlation). Ebenso wenig korrelierten die GI₅₀-Konzentrationen von Fenofibrat mit den Kombinationsindizes ($p = 0.267$; $R^2 = -0.276$; Pearson Correlation). Dies wird in *Abbildung 3.7* graphisch dargestellt (vgl. auch *Abbildung 3.6*).

Tabelle 3.2: *GI₅₀-Mittelwerte und Standardabweichungen für die Behandlung mit Doxorubicin allein im Vergleich zur Kombination mit Fenofibrat. Das Verdünnungsverhältnis von Doxorubicin zu Fenofibrat betrug dabei 1:10. Ebenfalls aufgeführt sind die jeweiligen Kombinationsindizes. Ein Index von < 0,9 deutet auf synergistische, zwischen 0,9 und 1,1 auf additive und > 1,1 auf antagonistische Effekte hin.*

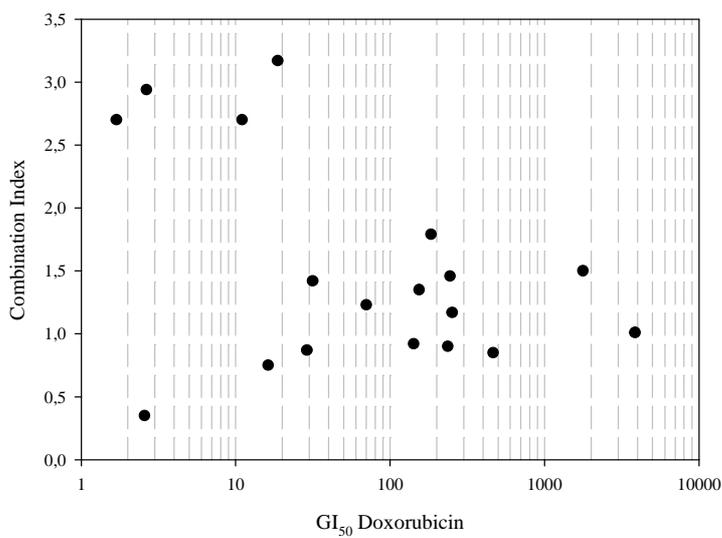
Tumorart	Zelllinie	GI ₅₀ -Doxorubicin [nmol/l]		GI ₅₀ -Doxorubicin/Fenofibrat [nmol/l]		Combination Index
		Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
Ewing Sarkom	CADO-ES1	465	84,5	266,7	218,04	0,85
	STA-ET-1	244	117	225,7	287,12	1,46
	STA-ET-2.1	16,2	5,62	23,3	35,23	0,75
	VH-64	31,5	8,9	20,8	20,08	1,42
Leukämie	CCRF-CEM	18,7	4,64	19,7	25,42	3,17
	HL-60	2,57	0,65	3,97	6,09	0,35
	MOLT-4	2,65	0,7	3,27	4,97	2,94
	REH	1,69	0,37	3,33	4,91	2,70
Medulloblastom	DAOY	184	44,1	197,8	94,17	1,79
	UW228.2	252	81,6	173,7	92,22	1,17
Neuroblastom	IMR-5	11	2,9	13,0	6,0	2,70
	KCN	142	59,5	119,7	185,67	0,92
	SHEP-SF	236	68,2	173,8	118,18	0,90
	SH-SY5Y	28,9	14,2	22,0	36,37	0,87
Osteosarkom	MNNG-HOS	1773	968	2415	3464	1,50
	OST	3848	549	3623	2042	1,01
Rhabdomyosarkom	RD	154	63,8	135	103,94	1,35
	RH30	70,2	23,1	67	14,73	1,23

Abbildung 3.7: Darstellung GI_{50} -Konzentrationen (Versuche mit Doxorubicin und Fenofibrat) im Verhältnis zum entsprechenden Kombinationsindex. Jeder Punkt entspricht beiden Werten für eine Zelllinie. Aufgrund der fehlenden Korrelation gibt es keine Regressionsgerade. Logarithmische Darstellung der GI_{50} -Werte.

3.7.1



3.7.2



3.2 Ergebnisse der Expressionsanalysen

Die Expression der PPAR-Rezeptoren zwischen den verschiedenen Tumorentitäten und Zelllinien variierte zum Teil erheblich. Im Bezug auf das gesamte Zelllinienpanel war die Expression von PPAR γ -mRNA durch die Tumorzellen im Mittel um das 20fache höher als die Expression von PPAR α -mRNA, was jedoch nicht darüber hinweg täuschen soll, dass beide Rezeptoren in einigen Zelllinien auch in ähnlicher Quantität exprimiert wurden. So wurden in den Zelllinien CADO-ES-1, RH30, und UW228.2 vergleichbare Expressionsraten mit weniger als 2facher Differenz gefunden. Auf der anderen Seite gab es besonders signifikante Unterschiede mit über 40fach erhöhter PPAR γ -mRNA-Expression gegenüber PPAR α -mRNA in den Ewing-Sarkom-Zelllinien VH-64, STA-ET-1 und STA-ET-2.1 und beim Osteosarkom OST (*Abbildung 3.8*).

3.2.1 Expression von PPAR α -mRNA

Die 3 genannten Ewing-Sarkom-Zelllinien wiesen von allen Zelllinien die niedrigste Expression von PPAR α auf. Dagegen zeigten die beiden Osteosarkomzelllinien OST mit 50facher und MNNG-HOS mit 80facher Expression gegenüber den Ewing-Sarkomen STA-ET-1 und STA-ET-2.1 die höchste PPAR α -mRNA-Expression.

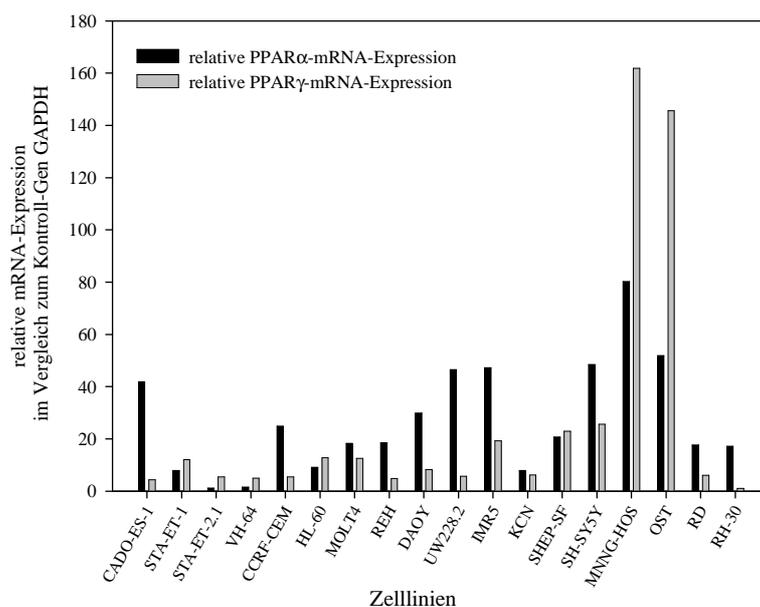
Betrachtet nach Tumorentität war die PPAR α -mRNA-Expression bei Ewing-Sarkomen am niedrigsten, gefolgt von Leukämien und Rhabdomyosarkom-Zelllinien. Höhere PPAR α -mRNA-Expression wurde in Neuro- und Medulloblastomzelllinien gefunden. Die maximalen Werte wurden wie bereits erwähnt in den Osteosarkomzellen erreicht.

3.2.2 Expression von PPAR γ -mRNA

Die detektierte Expression von PPAR γ -mRNA war ebenfalls in den beiden Osteosarkomzelllinien MNNG-HOS und OST mit Abstand am höchsten. Im Vergleich zur Rhabdomyosarkom-Zelllinie RH-30 mit der geringsten PPAR γ -Expression aller Zelllinien betragen die Expressionsraten hier das 145- (OST) bzw. 160-fache (MNNG-HOS).

Bezogen auf die Tumorentitäten wurde eine niedrige PPAR γ -Expression insbesondere bei den Rhabdomyosarkomen, gefolgt von den Medulloblastomen, Leukämien und Ewing-Sarkom-Zelllinien gemessen. Höhere mRNA-Expression zeigten die Neuroblastom- und Osteosarkom-Zelllinien.

Abbildung 3.8: *Relative mRNA-Expressions-Level (Mittelwerte) bezogen auf das untersuchte Zelllinien-Panel. Die schwarzen Balken repräsentieren die PPAR α -, der grauen die PPAR γ -Expression. Es wurde die mRNA Expression von mindestens 2 verschiedenen Pellets einer Zelllinien analysiert.*



3.2.3 Rezeptor-Expression vs. chemisches Ansprechen der Zellen auf PPAR-Agonisten

Zusammenfassend bestand keine Korrelation zwischen der Expression von PPAR α - oder PPAR γ -mRNA und den GI₅₀-Werten des jeweiligen Agonisten, d.h. dessen Wirksamkeit auf die Zelllinien. Einige Zelllinien zeigten eine gute Wirksamkeit von Fenofibrat bei hoher PPAR α -mRNA-Expression (z.B. MNNG-HOS), andere jedoch konnten auch bei geringer Rezeptor-Expression durch Fenofibrat in ihrem Wachstum gehemmt werden (z.B. STA-ET-2.1). Ebenso gab es Zellen, die bei relativ geringer Wirksamkeit von Fenofibrat eine hohe Rezeptordichte aufwiesen (z.B. UW228.2) und solche mit gleichsam geringer PPAR α -mRNA-Expression und schlechter Wirksamkeit bei hoher GI₅₀-Konzentration von Fenofibrat (z.B. STA-ET-1). Veranschaulicht wird dies in *Abbildung 3.9*.

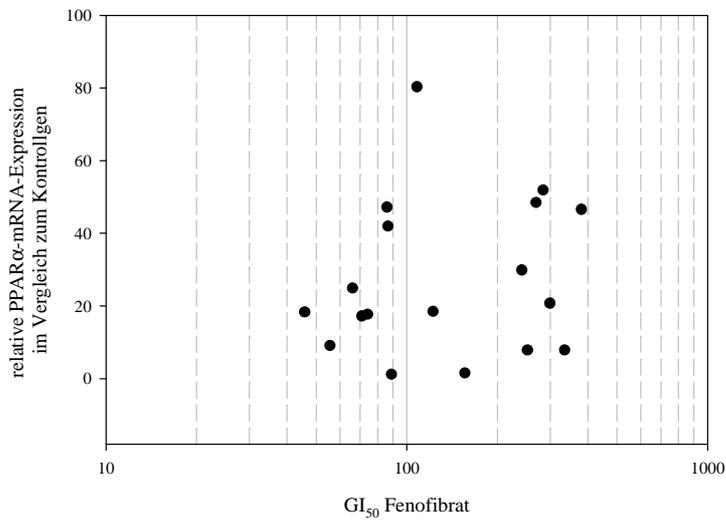
Eine Assoziation zwischen gutem Ansprechen auf Fenofibrat und hoher PPAR α -mRNA-Expression konnte mit diesen Ergebnissen somit nicht gezeigt werden. Allerdings konnte eine solche auch nicht sicher ausgeschlossen werden, da es sich um untereinander sehr unterschiedliche Zelllinien handelte. Somit wäre es durchaus möglich, dass bei bestimmten Zellpopulationen gegebenenfalls doch eine derartige Korrelation bestehen könnte.

Insofern bestand bei beiden Osteosarkom-Zelllinien eine relativ gute Wirksamkeit von Rosiglitazon bei außergewöhnlich hoher PPAR γ -Expression. Umgekehrt lag bei den Zelllinien STA-ET-1, KCN, SHEP-SF, SHSY-5Y und UW228.2 eine niedrige PPAR γ -Expression bei geringer Wirksamkeit von Rosiglitazon (in Form einer hohen GI₅₀-Konzentration) vor (*Abbildung 3.9.2*).

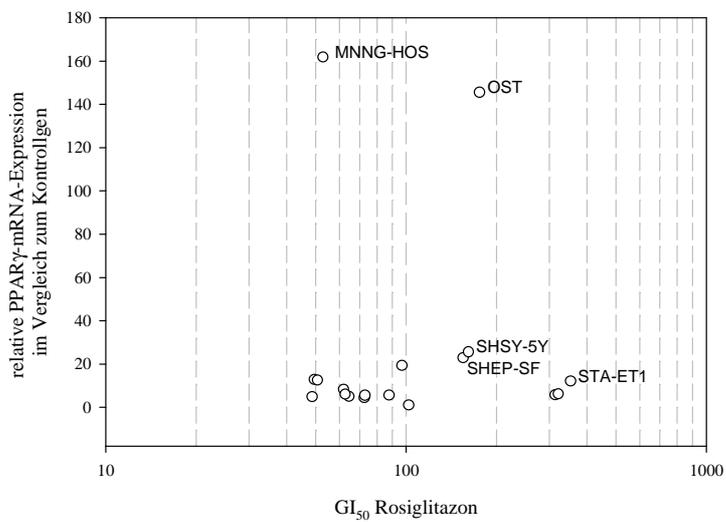
Auf der anderen Seite waren bei allen Leukämie- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien, sowie bei den Ewing-Sarkomen CADO-ES-1, STA-ET-2.1 und VH-64 und der Medulloblastom-Zelllinie DAOY die PPAR γ -mRNA-Expression niedrig und die Rosiglitazon-Wirksamkeit hoch.

Abbildung 3.9: Wirksamkeit der PPAR-Agonisten (gemessen an der GI_{50}) versus relative PPAR-Expression im Vergleich zum Housekeeping Gen GAPDH. Jeder Punkt repräsentiert die Werte einer Zelllinie. (●) steht dabei für $PPAR\alpha$, (○) für $PPAR\gamma$. In 3.9.2 wurden beispielhaft einige Punkte als Zelllinie benannt. Logarithmische Darstellung der GI_{50} -Konzentrationen.

3.9.1



3.9.2



4. Diskussion

4.1 Diskussion der MTT-Daten

4.1.1 Allgemeine Bemerkungen zur aktuellen Datenlage

Die lipidsenkenden Fibrate und die antidiabetischen Thiazolidinedione waren bereits in klinischer Anwendung, lange bevor sie als Liganden der PPAR-Rezeptoren identifiziert wurden. Die Entdeckung, dass diese Rezeptoren bei der Regulation von Tumorwachstum und -differenzierung involviert sind, initiierte die weitere Erforschung des Potenzials der PPAR-Agonisten in der Krebstherapie.

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es große Zahl präklinischer Studien, welche die Wirkung von PPAR-Agonisten auf bösartige Tumorzellen untersuchen. Dabei wurden Effekte wie Zellzyklusarrest, Apoptose, Induktion von Ausdifferenzierung der Zellen und Proliferationsinhibition beschrieben [109]. Bei den untersuchten Tumorentitäten handelt es sich meistens um für das Erwachsenenalter typische Krebserkrankungen, wie zum Beispiel - um hier nur eine kleine Auswahl zu nennen - Karzinome der Lunge [39,40,118], der Mamma [6], des Colons [14,16,38] oder der Blase [15,37]. Zur Wirkung der Substanzen auf typisch pädiatrische Krebserkrankungen gibt es im Gegensatz dazu nur wenige Daten. Auf diese soll später im Rahmen der Diskussion der Substanzwirkungen auf die einzelnen Tumorentitäten genauer eingegangen werden. Auch soll dann beschrieben werden, welche der oben erwähnten Effekte in präklinischen Untersuchungen an pädiatrischen Tumorerkrankungen eine Rolle spielen. Ein kurzer beispielhafter Überblick, auch hinsichtlich der zum Erzielen der entsprechenden Effekte verwendeten Substanzkonzentrationen, wurde bereits in der Einleitung in Form der *Tabelle 1.3* gegeben (siehe Seite 17).

4.1.2 Die Wirkung der PPAR-Agonisten im Vergleich Fenofibrat vs. Rosiglitazon

In dieser Arbeit wird über die Effekte des PPAR α -Agonisten Fenofibrat und des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf ein Panel von 18 verschiedenen Tumorzelllinien berichtet. Dieses Panel weist 6 der häufigsten und aggressivsten für das Kindesalter typischen Tumorentitäten auf.

Bezogen auf die Zelllinien konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl vergleichbare Effekte zwischen Rosiglitazon und Fenofibrat auf bestimmte Zelllinien als auch Unterschiede im Wirkungsprofil beider Substanzen ermittelt werden.

So zeigten sich nach Applikation der PPAR-Agonisten ohne zusätzliche zytostatische Behandlung bei 10 der insgesamt 18 Zelllinien recht ähnliche Effekte beider Substanzen: die Zelllinien CADO-ES-1, STA-ET-2.1, VH-64, CCRF-CEM, HL-60, MOLT-4, REH, MNNG-HOS, IMR-5, RD und RH-30 waren insgesamt gegen beide Substanzen eher sensitiv, UW228.2 sowie KCN waren eher resistent (jeweils gemessen an der mittleren GI₅₀ des Gesamtpanels, siehe Ergebnisse). Zusammengenommen zeigte sich dabei die bereits erwähnte signifikante Korrelation der Effekte beider Substanzen.

Auf der anderen Seite war Rosiglitazon im Bezug auf das gesamte Zelllinienpanel gemessen an der jeweils mittleren GI_{50} -Konzentrationen die insgesamt toxischere Substanz (mittlere GI_{50} Rosiglitazon 112,5 $\mu\text{mol/l}$, mittlere GI_{50} Fenofibrat 167,9 $\mu\text{mol/l}$). Im Detail zeigte sich Rosiglitazon in insgesamt 13 von 18 Zelllinien toxischer als Fenofibrat. Bei den 3 Zelllinien DAOY, SHEP-SF und SHSY-5Y war dieser Unterschied sogar erheblich (siehe Ergebnisse *Abbildung 3.2*). Bei Behandlung der übrigen 5 Zelllinien STA-ET-1, CCRF-CEM, MOLT-4, KCN und RH-30 war es umgekehrt, d.h. Fenofibrat war die toxischere Substanz, zumeist bestanden jedoch eher geringe Unterschiede.

Hinzu kommt, dass Fenofibrat - anders als Rosiglitazon - nicht in der Lage war, die Dosis von Doxorubicin *in vitro* zu reduzieren. Auf der einen Seite war Rosiglitazon zum größten Teil synergistisch oder zumindest additiv wirksam zum Zytostatikum Doxorubicin, was durch die Kombinationsindices zwischen 0,19 und 1,12 belegt wird (siehe *Tabelle 3.1*). Auf der anderen Seite deutete die Kombination von Doxorubicin mit Fenofibrat bei 11 von 18 Zelllinien durch Kombinationsindices (teilweise erheblich) größer 1,1 eher auf antagonisierende Wirkungen hin.

Während gleichartige Effekte beider Substanzen an identischen Geweben in der Literatur kaum dokumentiert sind, konnten unterschiedliche, teilweise gar gegensätzliche Effekte nachgewiesen werden. So zeigten beispielsweise Mossner et al. an verschiedenen Melanom-Zelllinien, dass Rosiglitazon (ähnlich wie andere PPAR γ -Agonisten) bei einer Dosis von 50 $\mu\text{mol/l}$ zu einer etwa 90%igen Wachstumssuppression in Form eines Zellzyklusarrest führt [79]. Dagegen konnte ein PPAR α -Agonist keinen derartigen Effekt erzielen.

Abgesehen von der antiproliferativen Potenz der Substanzen sind auch für andere Eigenschaften von PPAR α - und - γ -Agonisten gravierende unterschiedliche Wirkungen an identischen Geweben beschrieben. So konnte zum Beispiel im Rattenmodell gezeigt werden, dass Fenofibrat den Knochenaufbau fördern kann - im Gegensatz zu Pioglitazon, welches eher einen Knochenabbau bewirkt [113].

Letztendlich konnte somit in dieser Arbeit in weitgehender Übereinstimmung mit der Literatur gezeigt werden, dass Rosiglitazon und Fenofibrat neben vielen Gemeinsamkeiten auch sehr unterschiedliche Effekte auf jeweils identische Zelllinien haben können. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Wirkung der Einzelsubstanzen für jeden Zelltyp im einzelnen zu untersuchen und zu bewerten.

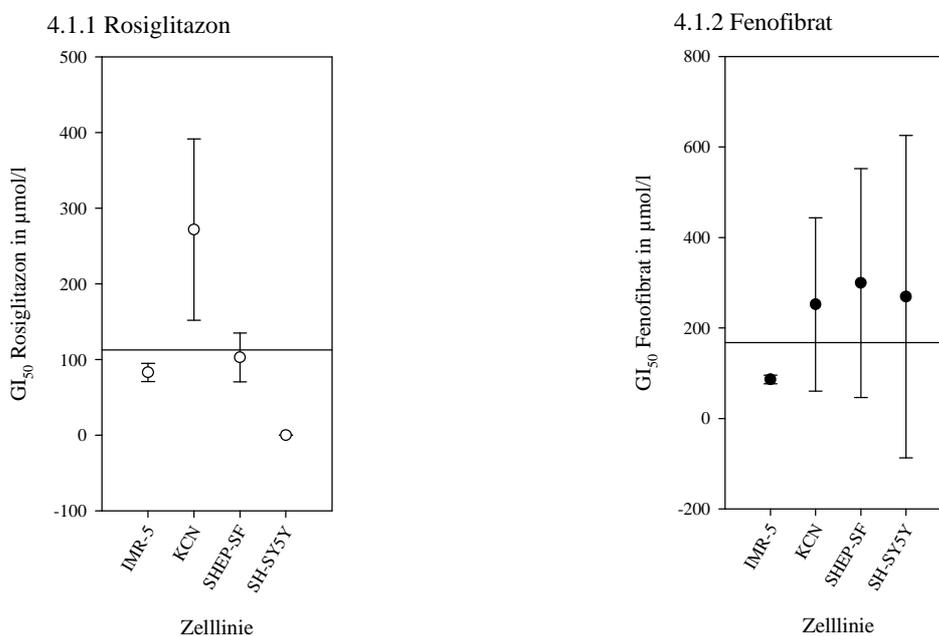
4.1.3 Die Effekte von PPAR-Agonisten auf die einzelnen Tumorentitäten

Nachfolgend sollen die Wirkungen von PPAR-Agonisten auf die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen mit Ergebnissen anderer Studien vergleichend diskutiert werden.

4.1.3.1 Die Wirkung auf Neuroblastom-Zelllinien

Die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y war mit einer GI_{50} im nanomolaren Bereich in dieser Arbeit gegenüber Rosiglitazon die sensitivste Zelllinie des gesamten Panels. Ansonsten war das Ansprechen der Neuroblastom-Zelllinien auf die Behandlung mit PPAR-Agonisten zwar nahezu stets vorhanden, in sich jedoch eher variabel. Insgesamt konnte in allen Zelllinien durch Rosiglitazon und Fenofibrat eine Wachstumshemmung erreicht werden. Gegen Fenofibrat war jedoch lediglich die Zelllinie IMR-5 im Verhältnis zur mittleren GI_{50} des Gesamtpanels sensibel, KCN, SHEP-SF und SHSY-5Y waren eher resistent. Außer KCN sprachen alle Neuroblastom-Zelllinien in diesem Verhältnis recht gut auf Rosiglitazon an (*Abbildung 4.1*).

Abbildung 4.1: Ausschnitt aus Abb. 3.2. GI_{50} der Neuroblastom-Zelllinien in $\mu\text{mol/l}$. (●) steht dabei für die Wirkung Fenofibrat, (○) für jene von Rosiglitazon (Mittelwert der aus den Einzelversuchen ermittelten GI_{50} -Konzentrationen \pm Standardabweichung). Die horizontale Linie entspricht der jeweiligen mittleren GI_{50} des Gesamtpanels für Rosiglitazon bzw. Fenofibrat.



Dies steht generell in Übereinstimmung mit anderen Studien [41,42,106,110,120], die die Zytotoxizität von PPAR-Agonisten an Neuroblastom-Zelllinien untersuchten. Die einzelnen Zelllinien untereinander variierten in ihrem Ansprechen auf die jeweilige Substanz, ähnlich wie es in der vorliegenden Untersuchung der Fall ist.

Im folgenden werden diese Studien beschrieben und ihre Bedeutung für die vorliegende Arbeit erörtert.

Han et al. wiesen 2001 erstmals eine signifikante Expression von PPAR γ in der Neuroblastom-Zelllinie LA-N-5 nach [42]. Ebenso konnten sie die Wirksamkeit der PPAR γ -Agonisten GW1929 und 15-deoxy-delta Prostaglandin J2 auf Neuroblastomzellen in Form verstärkter neuritischer Ausdifferenzierung der Zellen, Proliferationshemmung, erhöhter Acetylcholin-Esterase-Aktivität und Reduktion der N-Myc-Expression zeigen. Zumindest die Proliferationshemmung konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden.

In diesen Studien von Han et al. konnte außerdem eine Rezeptor-Abhängigkeit der Effekte in der Zelllinie LA-N-5 gezeigt werden [41]. Ebenso wiesen Servidei et al. PPAR-abhängige antiproliferative Effekte in Neuroblastomzelllinien nach [110]. Bei den nun vorliegenden Ergebnissen wird eine generelle Rezeptorabhängigkeit durch die fehlende Korrelation von Rezeptorexpression und GI₅₀-Konzentrationen eher in Frage gestellt (siehe Diskussion der Expressionsanalysen).

Von Valentiner et al. wurde 2005 ein Screening verschiedener verschiedener Thiazolidinedione (Ciglitazon, Pioglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon) an den Neuroblastom-Zelllinien Kelly, LA-N-1, LA-N-5, LS, IMR-32, SK-N-SH und SH-SY5Y mit generell positivem Ansprechen der Zellen durchgeführt [120]. Das Zellwachstum konnte dosisabhängig, allerdings in signifikanter Weise erst bei Konzentrationen von 10-100 μ mol/l reduziert werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann dieser Effekt nachvollzogen werden.

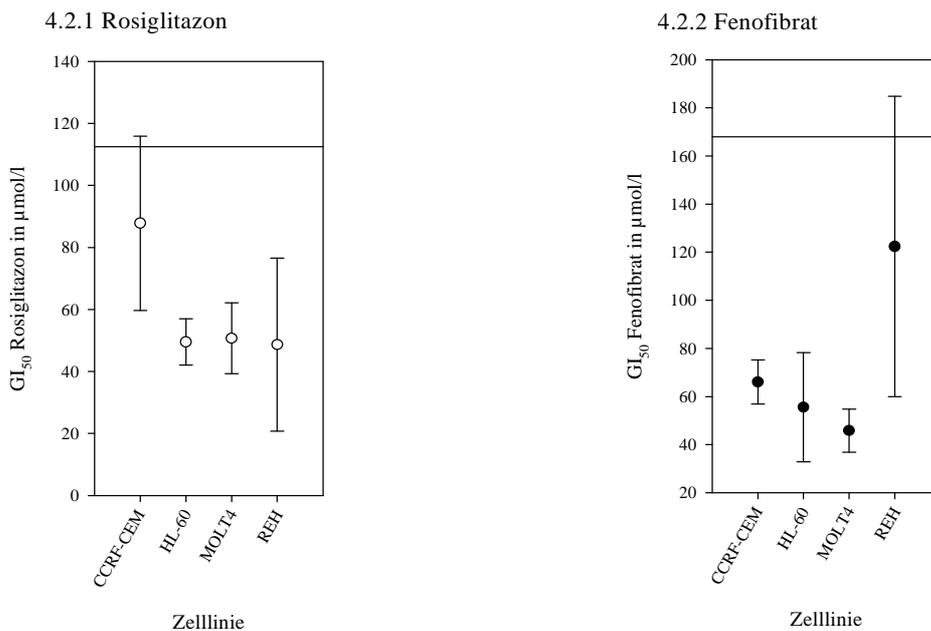
Interessant bleiben die teilweise gravierenden Unterschiede im Ansprechen der einzelnen Zelllinien. In diesem Zusammenhang beobachteten Cellai et al. eine wesentlich bessere Wirkung von Rosiglitazon bei der Zelllinie SK-N-AS im Vergleich zu SH-SY5Y [13]. Die proliferationshemmenden Konzentrationen lagen bei letzterer deutlich unter den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten (die Zellen waren in der vorliegenden Untersuchung die sensitivsten Zellen überhaupt). So konnten 20 $\mu\text{mol/l}$ Rosiglitazon die Zellviabilität von SH-SY5Y nur um 13 % reduzieren, eine Zellzahlreduktion von über 50 % wurde erst bei Konzentrationen von ca. 80 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Letztendlich wurde jedoch auch hier gezeigt, dass Rosiglitazon effektiv das Wachstum von Neuroblastomzellen hemmen kann und dass der Einsatz von Rosiglitazon beim Neuroblastom effektiv sein könnte.

Es ist bekannt, dass sich Neuroblastome bei jüngeren Kindern spontan zurückbilden können. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die Ausprägung von PPAR γ mit dem Regressionsgrad eines Neuroblastoms positiv korreliert [106]. Das bedeutet, dass ein sich in Regression befindendes Neuroblastom eine höhere PPAR γ -Expression hat. Inwieweit dies eine Rolle bei der möglichen Therapie der Erkrankung mit PPAR γ -Agonisten spielen kann, wurde nicht letztendlich geklärt, sollte aber in weiteren Untersuchungen bedacht werden.

4.1.3.2 Die Wirkung auf Leukämie-Zelllinien

Eine dosisabhängige Sensitivität der Leukämie-Zelllinien wurde in dieser Untersuchung sowohl für Rosiglitazon, als auch für Fenofibrat ermittelt (Abbildung 4.2). Die GI_{50} -Konzentrationen für Rosiglitazon lagen zwischen 48 und 87 $\mu\text{mol/l}$, jene für Fenofibrat reichten von 45 bis 122 $\mu\text{mol/l}$. Gegen die Zelllinien CCRF-CEM und MOLT-4 war Fenofibrat etwas wirksamer als Rosiglitazon, gegen HL-60 und REH verhielt es sich umgekehrt. Bei der letztgenannten bestand sogar ein relativ deutlicher Unterschied ($GI_{50\text{Rosiglitazon}}$ 48 $\mu\text{mol/l}$ vs. $GI_{50\text{Fenofibrat}}$ 122 $\mu\text{mol/l}$). Insgesamt konnten alle Leukämiezelllinien gegen beide Substanzen im Verhältnis zur mittleren GI_{50} des Gesamtpanels als relativ sensitiv bezeichnet werden.

Abbildung 4.2: Ausschnitt aus Abb. 3.2. GI_{50} der Leukämie-Zelllinien in $\mu\text{mol/l}$. (●) steht dabei für die Wirkung Fenofibrat, (○) für jene von Rosiglitazon (Mittelwert der aus den Einzelversuchen ermittelten GI_{50} -Konzentrationen +/- Standardabweichung). Die horizontale Linie entspricht der jeweiligen mittleren GI_{50} des Gesamtpanels für Rosiglitazon bzw. Fenofibrat.



Zu der hier ermittelten relativ hohen *in vitro*-Toxizität von PPAR-Agonisten stehen die im folgenden beschriebenen Daten zu anderen präklinischen Untersuchungen von PPAR-Agonisten an Leukämiezellen nur teilweise im Einklang. Bei den Substanzeffekten stehen Wachstumshemmung, Apoptose und Ausdifferenzierung der Zellen durch die *in vitro*-Behandlung mit PPAR γ -Agonisten im Vordergrund.

2004 wurden antiproliferative Effekte durch verschiedene PPAR-Agonisten (Rosiglitazon, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid u.a.) erstmals an einem Panel verschiedener Leukämie-Zelllinien beschrieben [57]. Inbegriffen waren die myeloischen Zelllinien U937 und HL-60, die akuten lymphatische Leukämien Su-DHL, Sup-M2, Ramos, Raji, sowie Hodgkin-Zelllinien und Zellen chronisch lymphatischer Leukämien. Um die Zellvitalität um 50 % zu reduzieren, waren bei der AML-Zelllinie U937 ca. 50 $\mu\text{mol/l}$ Rosiglitazon notwendig. In den ALL-Zelllinien Raji, Su-DHL und Sup-M2 war die Konzentration bei 25 $\mu\text{mol/l}$ geringer. Als zu Grunde liegende Mechanismen wurden am Beispiel der Zelllinie U937 insbesondere PPAR-unabhängige Apoptose detektiert. Interessanterweise wurde für Ramos (ALL) und HL-60 (AML) kein zytoreduktiver Effekt beobachtet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sehr wohl einen solchen Effekt gibt: die GI_{50} -Konzentration für Rosiglitazon gegen HL-60-Zellen betrug 49,5 $\mu\text{mol/l}$ (s. Abb. 4.2).

Dieses Ergebnis wird durch eine Arbeit von Liu et al. unterstützt [66]. In der Behandlung der AML-Zelllinien HL-60 und K562 konnte durch Troglitazon und 15-deoxy-delta(12,14)-Prostaglandin J2 ein dosisabhängiger antiproliferativer Effekt durch Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest in der G_1 -Phase ermittelt werden. Die Konzentration von Troglitazon, welche dabei zu einer 50%igen Wachstumsinhibition der HL-60-Zellen führte lag dabei zwischen 40 und 50 $\mu\text{mol/l}$. In einer weiteren Arbeit der Autoren wurde ferner nachgewiesen, dass *in vitro* ein antiinvasiver Effekt durch Downregulation von Matrix-Metalloproteinasen durch PPAR γ -Agonisten besteht [65,66], was den möglichen klinischen Nutzen weiter unterstreicht.

Saiki et al. untersuchten die antiproliferativen Effekte des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon auf primäre Leukämiezellen von Patienten und auf die permanenten Zelllinien HL-60 (myelozytäre AML), K562 (CML-Blastenkrise), U937 (monozytäre AML), HEL (erythrozytäre AML), CEM und Jurkat (T-lymphoblastische Leukämien), sowie NALM1 (B-lymphoblastische Leukämie) im Vergleich zu normalen hämatopoetischen Stammzellen gesunder Probanden [101]. Die ermittelten Effekte stehen weitestgehend in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So wurde die Zellproliferation nach 7 tägiger Inkubation mit 100-300 $\mu\text{mol/l}$ Pioglitazon abhängig von der jeweiligen Dosis mehr oder weniger stark gehemmt. Messungen erfolgten dabei nach 3, 5 und 7 Tagen. Die Daten wurden erhärtet durch die Ergebnisse von weiterhin durchgeführten Colony Assays. Hier ergaben sich unter 100 $\mu\text{mol/l}$ Pioglitazon eine verminderte Kolonieformation auf 20,8-71,8 % ($p < 0,01$) sowie unter 300 $\mu\text{mol/l}$ auf 1-25,2 % ($p < 0,01$) je nach Zelllinie. Neu an dieser Arbeit war, dass die gesunden hämatopoetischen Stammzellen insgesamt deutlich weniger in ihrem Wachstum affektiert wurden als die Leukämie-Zellen: 100 $\mu\text{mol/l}$ Pioglitazon reduzierte die Koloniebildung lediglich auf 77-87 %, bei Applikation von 300 $\mu\text{mol/l}$ ergab sich eine Reduktion auf 69-81 % der unbehandelten Kontrollen. Da allerdings sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch Leukämiezellen PPAR γ in ähnlicher Ausprägung aufwiesen, wurde hier am ehesten Rezeptor-unabhängige proliferationshemmende Mechanismen angenommen, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt würde.

Auch Liu et al. untersuchten die Philadelphia-Chromosom-positiven lymphoblastischen Leukämie-Zelllinien BV173, SD1 und SupB15 auf die Effekte von TZD18, einem Liganden von PPAR α und γ [64]. Im Vergleich zu Pioglitazon war TZD18 in der Lage, das Zellwachstum wesentlich stärker zu inhibieren (TZD18 20 $\mu\text{mol/l}$: 70-80 % Wachstumsreduktion nach 4 Tagen; Pioglitazon 20 $\mu\text{mol/l}$: 10-20% Wachstumsreduktion). Hierdurch zeigten sich wiederum die eingangs erwähnten Unterschiede in der Wirkpotenz einzelner Substanzen derselben Substanzgruppe. Als zu Grunde liegende Effekte ermittelt wurden hier am ehesten ein Zellzyklusarrest in der G_{0/1}-Phase sowie Apoptoseinduktion. Untermauert wird dies durch weitere Studien, die ebenfalls Apoptose-induzierende Effekte anderer PPAR γ -Agonisten, z.B. Troglitazon an B-Zell lymphoblastischen Leukämien beschreiben [114,131].

Interessanterweise konnte eine Behandlung mit dem PPAR γ -Antagonisten GW9662 bzw. dem PPAR α -Antagonisten MK886 den durch TZD18 bewirkten Zellzyklus-Arrest sowie die verstärkte Apoptose nicht vermindern. Dieser Effekt sprach für das Vorliegen Rezeptor-unabhängiger Proliferationshemmung [64].

Durch TZD18 verstärkt werden konnte auf der anderen Seite der Effekt des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib, der die durch das bcr-abl-Fusionsgen codierte Tyrosinkinase bei Philadelphia-positiven (Translokation t9;22) Leukämien hemmt. PPAR-Agonisten könnten so tatsächlich eine vielversprechende Option in der Therapie bcr-abl-positiven akuten lymphatischen Leukämien sein, da derartige genomische Veränderungen nach wie vor mit einer eher schlechten Prognose und schwierigeren Therapierbarkeit im Vergleich zu Philadelphia-Chromosom bzw. bcr-abl-negativen ALLs assoziiert sind [64].

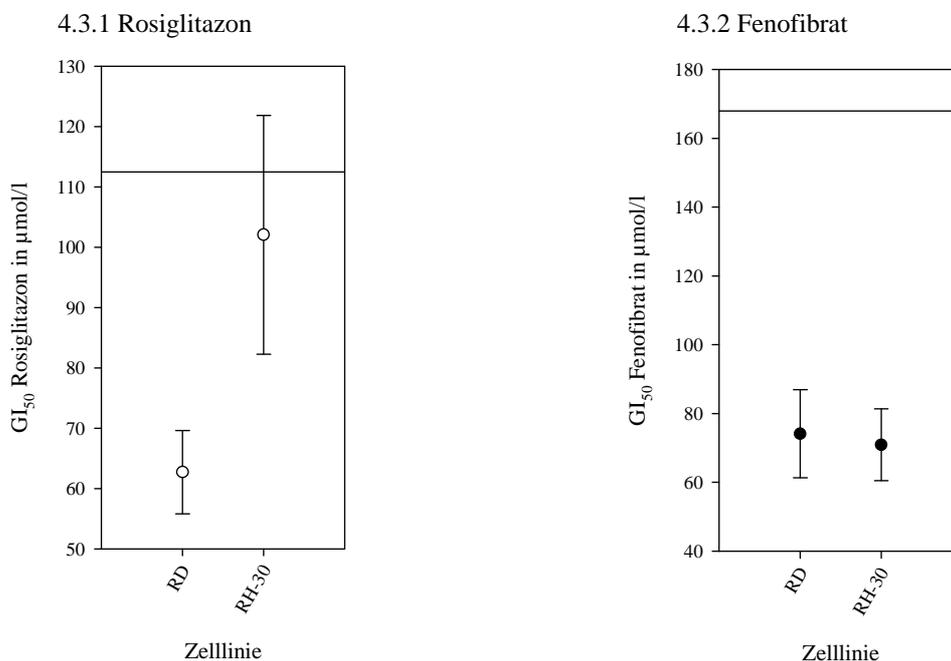
Derartige Kombinationseffekte mit Imatinib wurden auch bei chronisch myeloischen Leukämien beobachtet. Dies soll aufgrund der geringen Relevanz in der pädiatrischen Onkologie nur am Rande erwähnt werden [132].

Dass der Einsatz von PPAR γ -Agonisten für einen klinischen Einsatz somit durchaus als vielversprechend erscheint, konnte außerdem in der vorliegenden Arbeit durch die synergistischen Effekte von Doxorubicin und Rosiglitazon gegen die Leukämie-Zelllinien untermauert werden ($CI_{\text{Leukämien}}$: 0,49 bis 0,61; ein Synergismus lag vor, wenn $CI < 0,9$). Sollten gezielte Kombinationsversuche mit PPAR γ -Agonisten und Anthrazyklinen *in vivo* ebenfalls derartige synergistische Effekte erzielen, wäre eine Dosisreduktion von Anthrazyklinen in der Therapie akuter Leukämien und somit auch eine Reduktion der unerwünschten Substanzeffekte durchaus im Bereich des möglichen.

4.1.3.3 Die Wirkung auf Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Beide Rhabdomyosarkom-Zelllinien zeigten in der vorliegenden Testung sowohl gegen Rosiglitazon als auch gegen Fenofibrat ein relativ sensibles Ansprechen (GI_{50} -RMS-Rosiglitazon 62-102 $\mu\text{mol/l}$ < GI_{50} -Rosiglitazon-Gesamtpanel 112,5 $\mu\text{mol/l}$; GI_{50} -RMS-Fenofibrat 70-74 $\mu\text{mol/l}$ < GI_{50} -Fenofibrat-Gesamtpanel 167,9 $\mu\text{mol/l}$; siehe Abb. 4.3).

Abbildung 4.3: Ausschnitt aus Abb. 3.2. GI_{50} der Rhabdomyosarkom-Zelllinien in $\mu\text{mol/l}$. (●) steht dabei für die Wirkung Fenofibrat, (○) für jene von Rosiglitazon (Mittelwert der aus den Einzelversuchen ermittelten GI_{50} -Konzentrationen +/- Standardabweichung). Die horizontale Linie entspricht der jeweiligen mittleren GI_{50} des Gesamtpanels für Rosiglitazon bzw. Fenofibrat.



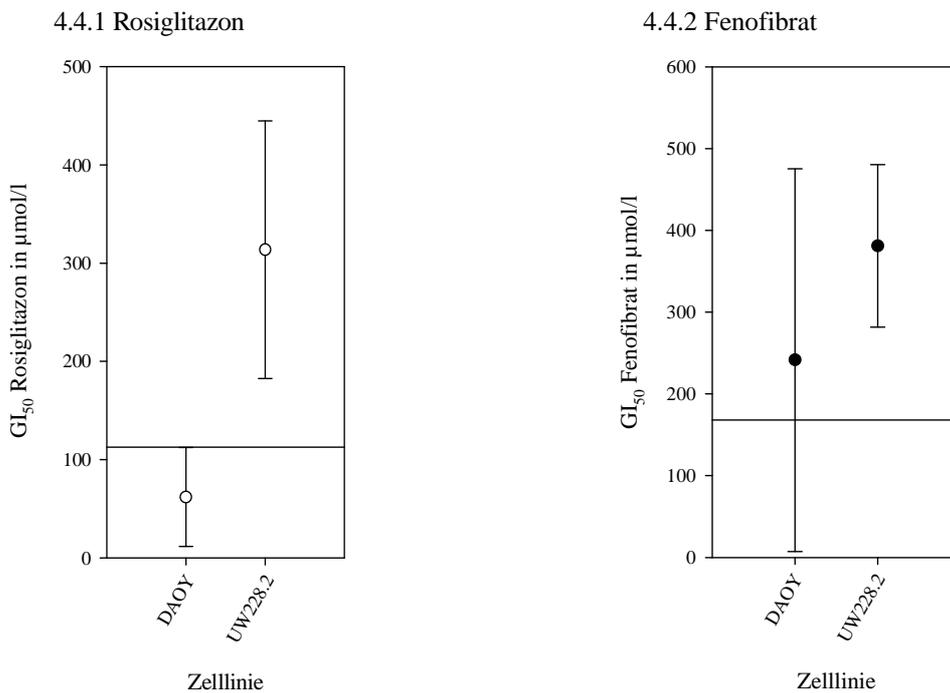
Lediglich eine weitere Arbeit von Maiguma et al. beschäftigt sich bisher mit der Wirkung von PPAR-Agonisten auf Rhabdomyosarkome [72]. Hier bewirkte eine Reihe von Fibraten, in diesem Fall also PPAR α -Agonisten, die selektive Affektion von humanen embryonalen Rhabdomyosarkomzellen im Sinne von dosisabhängig verminderter mitochondrialer Enzymaktivität. Es wurden Substanzdosen zwischen 10 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ appliziert. Eine 50%ige Wachstumsinhibition durch Fenofibrat wurde bei einer Konzentration von etwa (20-) 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. An parallel für 24-48 Stunden mit Benzafibrat inkubierte humanen mikrovaskulären Endothelzellen sowie an Zellen arterieller glatter Muskulatur wurden von Maiguma et al. hingegen keine Veränderungen beobachtet [72].

Die Beobachtungen von Maiguma et al. stimmen inklusive der detektierten zur Proliferationshemmung notwendigen Substanzdosen recht gut zu den hier gewonnen Daten bezüglich der Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH-30 überein. Es sei jedoch erwähnt, dass es sich bei der Zelllinie RH-30 alveoläre RMS-Zellen handelt, was die Genauigkeit eines Vergleichs mit Daten zu embryonalen RMS-Zellen erschwert. Dennoch scheint es eine eindeutige antiproliferative Wirksamkeit von PPAR-Agonisten gegen Rhabdomyosarkomen zu geben.

4.1.3.4 Die Wirkung auf Medulloblastom-Zelllinien

Die am vorliegenden Zelllinienpanel gewonnenen Daten zu Medulloblastomen waren heterogen. Gegen Rosiglitazon war lediglich die Zelllinie DAOY relativ sensitiv, gegen Fenofibrat bestand für beide Zelllinien eine relative Resistenz gemessen an der mittleren GI_{50} (Abbildung 4.4).

Abbildung 4.4: Ausschnitt aus Abb. 3.2. GI_{50} der Medulloblastom-Zelllinien in $\mu\text{mol/l}$. (●) steht dabei für die Wirkung Fenofibrat, (○) für jene von Rosiglitazon (Mittelwert der aus den Einzelversuchen ermittelten GI_{50} -Konzentrationen \pm Standardabweichung). Die horizontale Linie entspricht der jeweiligen mittleren GI_{50} des Gesamtpanels für Rosiglitazon bzw. Fenofibrat.



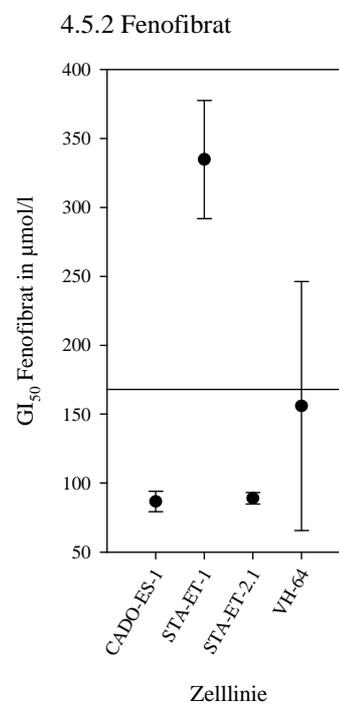
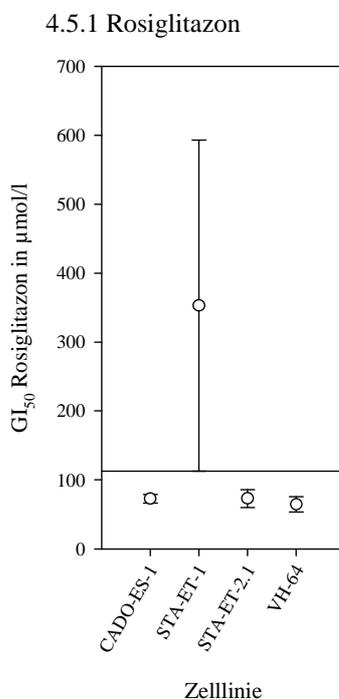
Auch für die Wirkung von PPAR-Agonisten gegen Medulloblastom-Zellen gibt es nur eine Referenzarbeit. Urbanska et al. ermittelten für Fenofibrat in humanen (D384, DAOY) und animalischen (BsB8) Medulloblastom-Zelllinien einen PPAR-vermittelten Zellzyklusarrest in der G₁ und G₂/M-Phase mit konsekutiver Proliferationshemmung und verstärkter Apoptose, sowie die Inhibition IGF-1-vermittelten Wachstums [119]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Wachstumshemmung in den Medulloblastomzelllinien nachgewiesen werden, jedoch war diese im Verhältnis zum Gesamtpanel als eher schwach einzustufen (GI₅₀ deutlich über der mittleren GI₅₀ für Fenofibrat, siehe *Abbildung 4.4.2*). Allein dies spricht gegen einen primären Einsatz von Fenofibrat gegen Medulloblastome. Hinzu kommt, dass eine Kombination mit Doxorubicin die Anthrazyklinwirkung eher abgeschwächt als verstärkt wird (CI_{DAOY} 1,79; CI_{UW228.2} 1,17; CI > 1,1: antagonistische Effekte).

Gegen Rosiglitazon hingegen bestanden relativ betrachtet erhebliche Unterschiede im Ansprechen der beiden Zelllinien DAOY und UW228.2. Während DAOY hochsensitiv (GI₅₀ 61,9 µmol/l) auf die Behandlung mit Rosiglitazon reagierte, bestand für UW228.2 (GI₅₀ 313,6 µmol/l) eine relative Resistenz gemessen an der mittleren GI₅₀-Konzentration von 112,5 µmol/l. Leider existieren hierzu keine Referenzdaten. Die synergistischen Kombinationseffekte mit Doxorubicin jedoch erscheinen für beide Zelllinien vielversprechend (CI_{DAOY} 0,84; CI_{UW228.2} 0,37; CI < 0,9: synergistische Effekte).

4.1.3.5 Die Wirkung auf Ewing-Sarkom-Zelllinien

Für die Gruppe der Ewing-Sarkome gibt es im Bezug auf PPAR-Agonisten noch keine entsprechenden Untersuchungen. Die Zelllinien CADO-ES1, STA-ET-2.1 und VH-64 zeigten sowohl gegen Rosiglitazon als auch gegen Fenofibrat ein im Verhältnis zum Gesamtpanel sensitives Ansprechen (*Abbildung 4.5*). Lediglich die Zelllinie STA-ET-1 reagierte verhältnismäßig resistent auf beide PPAR-Agonisten.

Abbildung 4.5: Ausschnitt aus Abb. 3.2. GI_{50} der Ewing-Sarkom-Zelllinien in $\mu\text{mol/l}$. (●) steht dabei für die Wirkung Fenofibrat, (○) für jene von Rosiglitazon (Mittelwert der aus den Einzelversuchen ermittelten GI_{50} -Konzentrationen \pm Standardabweichung). Die horizontale Linie entspricht der jeweiligen mittleren GI_{50} des Gesamtpanels für Rosiglitazon bzw. Fenofibrat.

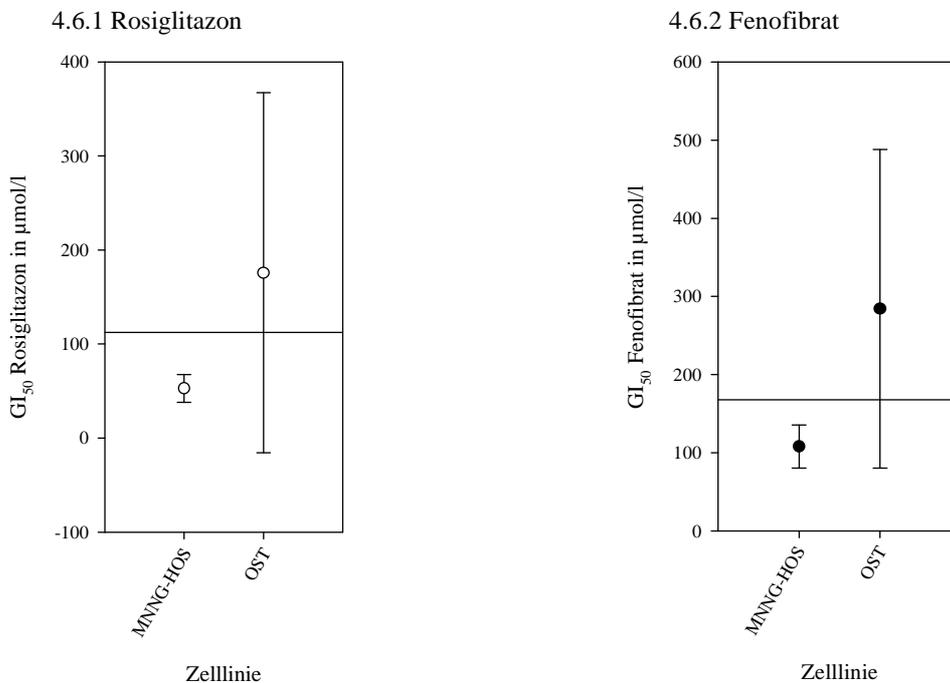


Interessant ist für den klinischen Einsatz jedoch eher die bei allen Ewing-Sarkom-Zelllinien vorhandene deutliche synergistische Wirkung von Rosiglitazon und Doxorubicin (CI 0,19-0,71; Synergismus bei CI < 0,9). Bei der Kombination von Doxorubicin und Fenofibrat waren die Effekte der Substanzen auf die Zelllinien CADO-ES1 (CI 0,85) und STA-ET-2.1 (CI 0,75) synergistisch und auf STA-ET1 (CI 1,46) und VH-64 (CI 1,42) antagonistisch. In diesem Zusammenhang kann man Rosiglitazon im Gegensatz zum Fenofibrat als möglicherweise für die weitere Optimierung der Ewing-Sarkom-Therapie als relevant erachten, da nur beim PPAR γ -Agonisten einheitliche Ergebnisse zu beobachten waren.

4.1.3.6 Die Wirkung auf Osteosarkom-Zelllinien

Die Osteosarkomzelllinien, welche insgesamt von allen Tumorentitäten die geringste Empfindlichkeit gegenüber dem Standard-Chemotherapeutikum Doxorubicin aufwiesen, zeigten ein uneinheitliches Ansprechen auf Rosiglitazon und Fenofibrat. Während die Zelllinie OST im Verhältnis zum Gesamtpanel gegen beide PPAR-Agonisten relativ resistent war, zeigte MNNG-HOS eine relativ hohe Sensibilität (*Abbildung 4.6*).

Abbildung 4.6: Ausschnitt aus *Abb. 3.2*. GI_{50} der Osteosarkom-Zelllinien in $\mu\text{mol/l}$. (●) steht dabei für die Wirkung Fenofibrat, (○) für jene von Rosiglitazon (Mittelwert der aus den Einzelversuchen ermittelten GI_{50} -Konzentrationen \pm Standardabweichung). Die horizontale Linie entspricht der jeweiligen mittleren GI_{50} des Gesamtpanels für Rosiglitazon bzw. Fenofibrat.



Troglitazon, ein anderer Vertreter der Thiazolidinedion-Substanzfamilie, war im Vorfeld an Osteosarkom-Zelllinien mit unterschiedlichen und teilweise widersprüchlichen Ergebnissen getestet worden [43,44,69]. Haydon et al. beschrieben eine signifikant reduzierte Proliferationsrate und Zellvitalität nach Behandlung der Zelllinien 143B, MNNG-HOS, MG-63 und TE-85 mit Troglitazon und Ciglitazon, während Lucarelli et al. über eine erniedrigte Apoptoserate sowie über eine Stimulation des Zellkulturwachstums der Zelllinien G292, MG63, SAOS and U2OS berichteten. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine signifikante Wachstumshemmung durch Rosiglitazon in beiden Osteosarkom-Zelllinien (insbesondere MNNG-HOS) beobachtet, wenn auch die Zelllinie OST im Verhältnis zu den übrigen Zelllinien des Panels eine eher geringe Sensitivität aufwies (GI_{50} -Rosiglitazon 175 $\mu\text{mol/l}$; GI_{50} -Fenofibrat 284 $\mu\text{mol/l}$). Diese Ergebnisse unterstützen die Daten der erstgenannten Studie von Haydon et al. 5 Tage nach Applikation der jeweiligen Substanz führte eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Troglitazon zu einer vollständigen Wachstumshemmung. Bei der Zelllinie MNNG-HOS lag die für einen signifikanten Effekt notwendige Dosis gar bei 50 $\mu\text{mol/l}$, was der in der vorliegenden Arbeit ermittelten GI_{50} für Rosiglitazon bei Behandlung dieser Zelllinie in etwa entspricht (GI_{50} -Rosiglitazon-MNNG-HOS 52,9 $\mu\text{mol/l}$). Auch 100 $\mu\text{mol/l}$ des PPAR γ -Agonisten Ciglitazon konnten das Wachstum der Zelllinien MNNG-HOS und 143B vollständig inhibieren. Es bestand jedoch hier eine verminderte Sensitivität von MG-63 und TE-85 bei zur Wachstumsinhibition notwendigen 200 $\mu\text{mol/l}$ Ciglitazon. Auch bei der hier untersuchten Zelllinie OST bestand relative Resistenz gegen Rosiglitazon. Hier wird ein weiteres mal gezeigt, wie unterschiedlich Zelllinien trotz eines ähnlichen Ursprungsgewebes reagieren können. Ferner wird demonstriert, dass verschiedene PPAR γ -Agonisten auch unterschiedlich starke proliferationshemmende Effekte aufweisen können.

Abschließend zu erwähnen bleibt, dass die Kombination der PPAR-Agonisten mit dem Anthrazyklin Doxorubicin allenfalls zu additiven Effekten geführt hat. Die Kombination mit Fenofibrat zeigte an der Zelllinie MNNG-HOS sogar ein eher verstärktes Wachstum der Zellen ($CI_{\text{Fenofibrat-MNNG-HOS}} > 1,1$ Antagonismus). Dieses Ergebnis legt insbesondere aufgrund teilweise wesentlich stärkerer antiproliferativer Wirkungen der Substanzkombinationen an anderen Tumorentitäten nahe, dass ein klinischer Einsatz der Substanzen bei Osteosarkomen eher kritisch betrachtet werden sollte. Die oben beschriebene nicht ganz einheitliche Datenlage kann dies letztendlich nur bestätigen.

4.2 Diskussion der Expressionsanalysen

Im Bezug auf das gesamte untersuchte Zelllinienpanel war keine Korrelation zwischen PPAR-mRNA-Expression und Zytotoxizität der Einzelsubstanzen Rosiglitazon und Fenofibrat erkennbar (siehe Ergebnisse, Kapitel 3.2.3 und *Abbildung 3.9*). Dies legt nahe, dass es sich bei den ermittelten zelltoxischen Effekten um Rezeptor-unabhängige Wirkungen mit alternativen Signalkaskaden handelt. Eine Reihe solcher Mechanismen, die nicht über die Interaktion mit dem korrespondierenden nukleären Rezeptor und damit verbundener Transkriptionsaktivierung von Zielgenen reguliert sind, wurde für PPAR γ -Agonisten bereits entdeckt und beschrieben. Darauf soll im Folgekapitel 4.2.1 im Detail eingegangen werden.

Auf der anderen Seite konnte eine PPAR-abhängige Wirkung an einzelnen Zelllinien nicht sicher ausgeschlossen werden.

So waren beide Osteosarkom-Zelllinien OST und MNNG-HOS durch eine im Bezug auf das Gesamtpanel außergewöhnlich hohe Expression von PPAR γ mRNA charakterisiert (145- bzw. 160fache Expression im Vergleich zum Referenzgen). Angesichts der ebenfalls in diesem Fall gezeigten Wirksamkeit von Rosiglitazon (besonders in den Osteosarkom-Kombinationsversuchen) ist es natürlich möglich, dass bei diesen Zellen die Transaktivierung von PPAR γ selbst eine nicht unerhebliche Rolle spielt. Dafür geben die ermittelten Daten jedoch noch keinen hinreichenden Aufschluss.

Auf ähnliche Weise wurde in den Zelllinien STA-ET-1, KCN, SHEP-SF und UW228.2 eine eher niedrige PPAR γ -Expression bei geringer Wirksamkeit von Rosiglitazon (hohe GI₅₀) beobachtet, was ebenfalls auf Rezeptor-Abhängigkeit hindeuten könnte.

Im Gegensatz dazu stehen die Leukämien, die Rhabdomyosarkome, die Ewing-Sarkome CADO-ES-1, STA-ET-2.1 und VH-64 sowie die Medulloblastom-Zelllinie DAOY. Hier war auf der einen Seite die PPAR γ -mRNA-Expression niedrig und auf der anderen Seite die Rosiglitazon-Wirksamkeit hoch. Diese Befunde deuten klar auf Rezeptor-unabhängige zytotoxische Effekte von Rosiglitazon hin, da trotz niedriger Rezeptordichte die Wirksamkeit der Substanz hoch war.

Dass es PPAR-unabhängige Wirkmechanismen gibt, ist mittlerweile in vielen Studien belegt. So hatte zum Beispiel das Ausschalten des PPAR-Gens sowie die Rezeptor-Inhibition durch einen PPAR-Antagonisten in pankreatischen β -Zellen keinerlei Effekt auf die Wirkpotenz des Agonisten [54]. Saiki et al. konnten, wie im Vorfeld bereits beschrieben, an einem Leukämie-Zelllinienpanel zeigen, dass trotz ähnlicher PPAR-Ausprägung in gesunden hämatopoetischen Stammzellen hier kein oder nur ein geringer antiproliferativer Effekt durch Pioglitazon erzielt werden konnte [101]. Dies spricht ebenfalls klar für das Vorhandensein von Rezeptor-unabhängigen Mechanismen.

4.2.1 Rezeptor-unabhängige Mechanismen

Für die antiproliferative Wirkung, insbesondere von PPAR γ -Agonisten, wird in der Literatur eine Reihe von teilweise miteinander zusammenhängenden Rezeptor-unabhängigen Mechanismen beschrieben.

So waren PPAR γ -Agonisten in der Lage, die TRAIL-induzierte Apoptose durch direkte Stabilisierung von mRNA in Prostata- und Ovarial-Karzinom-Zelllinien zu potenzieren [54,127]. TRAIL ist Bestandteil der Gruppe der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), welcher normalerweise durch das Apoptose-supprimierende Protein FLIP blockiert wird. PPAR-Liganden (sowohl Agonisten als auch Antagonisten) sind in der Lage, dieses Protein direkt zu inhibieren, wodurch wiederum die TRAIL-Spiegel erhöht werden und es vermehrt zu Apoptose kommt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auch bei Fehlen von PPAR-Rezeptoren bestehen bleibt.

Als weiterer Mechanismus konnte in Lungenkarzinom-Zelllinien der Tumor-Suppressor PTEN auf Rezeptor-unabhängigem Wege aktiviert werden, was eine geringere Synthese von Phosphor-Akt sowie eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität und damit eine geringere Cyclooxygenase-2-Expression (COX) zur Folge hatte [10].

Palakurthi et al. beschrieben ferner eine Rezeptor-unabhängige Depletion intrazellulärer Ca²⁺-Speicher, welche im Gegenzug die Phosphorylierung von eIF2 α (= eucariotic translation initiation factor 2 α) und damit die Inhibition der Translations-Einleitung bewirkte [86]. Es konnte eine Unabhängigkeit zwischen Rezeptordichte und Effektivität der PPAR-Agonisten nachgewiesen werden.

Noch ein weiterer Punkt ist die von Takenokuchi et al. beschriebene PPAR-unabhängige Herunterregulation des Apoptose-regulierenden c-myc-Gens nach Behandlung mit dem PPAR γ -Agonisten Troglitazon [114].

Insgesamt zeigen die bisherigen Daten wie auch die vorliegenden Ergebnisse für beispielsweise Leukämien, Rhabdomyosarkome und Ewing-Sarkome, dass auch bei niedriger Rezeptordichte durch Rezeptor-unabhängige Mechanismen in verschiedenen Tumorentitäten durch PPAR-Antagonisten ein antiproliferativer Effekt erzielt werden kann.

4.2.2 weitere mögliche Mechanismen

Eine weitere Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Wirksamkeit der PPAR-Agonisten könnte allerdings auch eine unterschiedliche Verfügbarkeit von Zielgenen nach der Rezeptoraktivierung in unterschiedlichen Zelltypen sein. So supprimiert beispielsweise ein aktivierter PPAR-Rezeptor die Transkription einiger seiner Zielgene, wie z. B. NF κ B, STATs oder Ap-I [109] oder reduziert - wie bereits im vorherigen Kapitel 4.2.1 erwähnt - die Spiegel Apoptose-supprimierender Proteine [54].

Wird nun beispielsweise ein solches Zielgen in einer bestimmten Tumorzelle per sé und ohne äußere Einflüsse stärker exprimiert als in einer anderen, so kann durch die Aktivierung von PPAR durch einen Agonisten absolut gesehen eine geringere Affektion der jeweilig resultierenden Signalkaskade bewirkt werden. Oder: wird ein durch PPAR-Agonisten beeinflussbarer Apoptose-supprimierender Faktor (z.B. FLIP) von einer Zelle nur in geringem Maße synthetisiert, so kann der PPAR-Agonist auf diesem Wege weniger Einfluss nehmen als bei starker Ausprägung des Faktors.

4.3 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das lebende Individuum

4.3.1 Maximale Plasmaspiegel vs. GI_{50} bei Monotherapie

Rosiglitazon und Fenofibrat werden bereits seit vielen Jahren klinisch beim Menschen eingesetzt. Rosiglitazon hat einen hohen Stellenwert in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2, Fenofibrat findet als Lipidsenker Anwendung. Beide Substanzen sind damit hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik beim Menschen gut charakterisiert.

So wurden für Erwachsene nach oraler Einnahme einer Standarddosis von 4 mg Rosiglitazon maximale Plasmaspiegel um 75 nmol/l gemessen. Immerhin ca. 2.3 μ mol/l wurden nach Einnahme der doppelten Dosis von 8 mg im Plasma erreicht [53,88]. Nach oraler Fenofibrat-Behandlung in einer Standarddosis von 200 mg werden aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit dieser Substanz lediglich Maximalkonzentrationen von 2,8 nmol/l im Plasma erreicht [76].

Betrachtet man die Versuchsergebnisse aus den MTT-Assays mit den Einzelsubstanzen Rosiglitazon bzw. Fenofibrat im Zusammenhang mit den unter Normalbedingungen maximal erreichbaren Plasmaspiegeln, so zeigt sich, dass in vivo unter den Dosierungen, wie sie derzeit eingesetzt werden, die notwendigen Wirkspiegel zur Tumor-Proliferationshemmung in der Regel nicht erreicht werden. Außer bei der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y unter Behandlung mit Rosiglitazon (GI_{50} von 37 nmol/l) lagen alle gemessenen Substanzkonzentrationen, die zur Zellviabilitätsreduktion von 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nötig waren, im zwei- bis dreistellig mikromolaren Bereich.

Da SH-SY5Y jedoch nur eine von 4 Neuroblastom-Zelllinien mit untereinander sehr unterschiedlichem Ansprechen auf die PPAR-Agonisten darstellt, kann aus diesem Ergebnis noch keine Indikation zum experimentellen *in vivo*-Einsatz von Rosiglitazon gegen Neuroblastome gestellt werden. Bestätigung findet dies in den Ergebnissen des *in vitro*-Neuroblastom-Screenings von Valentiner et al. Auch hier wurde eine signifikante Wirksamkeit verschiedener Thiazolidinedione (u.a. auch Rosiglitazon) erst im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich nachgewiesen [120].

Zusammenfassend liegen die zur signifikanten Zytoreduktion notwendigen Substanzkonzentrationen der PPAR-Agonisten deutlich über den bei oraler Monotherapie in Standarddosis erreichbaren Plasmaspiegeln. Dabei ist - außer vielleicht für die Leukämien - noch nicht einmal geklärt, ob die jeweils höchste Plasmakonzentration auch der höchsten Konzentration im jeweiligen Tumor entspricht. Diese könnte sowohl niedriger, als auch, z. B. durch Anreicherung der Substanz im Tumorgewebe, deutlich höher als der Plasmaspiegel liegen. An diesem Punkt könnten ggf. Tierexperimente weiteren Aufschluss bringen.

4.3.2 *In vivo*-Befunde bei der PPAR-Agonisten-Monotherapie anderer Tumorentitäten

Insgesamt erscheint der Einsatz von PPAR-Agonisten in der Monotherapie bei Krebserkrankungen im Kindesalter als nicht Erfolg versprechend. Dies wird auch durch Befunde in anderen Tumorentitäten belegt. Zwar gab es in der Vergangenheit diverse mehr oder weniger erfolgreiche Tierexperimente mit hoch dosierter PPAR-Agonisten-Monotherapie bestimmter Tumoren: So konnten Ohta et al. sowohl *in vitro* als auch im Nacktmausmodell einen das Tumorwachstum hemmenden Effekt an Schidddrüsenkarzinomzellen zeigen [85]. Hier wurde der sich aufgrund in klinischer Prüfung beobachteter toxischer Leberschäden nicht mehr auf dem Markt befindende PPAR γ -Agonist Troglitazon in einer Dosierung von 500 mg/kg Körpergewicht appliziert (kalkulierte Dosis beim Menschen: 200-800 mg täglich). Ähnliches gelang Sarraf et. al. mit Colon-Karzinomzellen. Hier genügte bereits eine geringere Dosis Troglitazon von 200 mg/kg Körpergewicht zur Hemmung des Tumorwachstums [104]. Bei ähnlichen Versuchen an Mamma-Karzinomzellen *in vitro* und im Tierversuch zeigte sich eine Verstärkung des zytotoxischen Effekts durch Kombination mit All-trans-Retinolsäure (ATRA) sowie keine Toxizität für gesunde Zellen [27]. In *Kapitel 4.4* soll auf diesen Kombinationseffekt noch detaillierter eingegangen werden.

Am Menschen zur Tumorbehandlung eingesetzte PPAR-Monotherapie zeigte im Gegensatz zu den beschriebenen präklinischen Versuchen keine signifikante Verbesserung des Outcome von behandelten Patienten. Dies zeigte sich zum Beispiel in Phase-II-Studien an Patientinnen mit therapierefraktärem Mamma-Karzinom [12] oder Patienten mit metastasiertem Colon-Karzinom [59]. Möglicherweise beruht die fehlende Effektivität auf dem bei „normaler“ Dosierung der PPAR-Agonisten zu geringen Plasmaspiegel. Die tierexperimentell verwendeten Dosierungen waren insgesamt höher als jene, die in der Studie eingesetzt wurden. Burstein et al. applizierten ihren 22 in die Studie eingeschlossenen Mamma-Karzinom-Patientinnen täglich 800 mg Troglitazon [12]. Verglichen mit 200 mg/kg Körpergewicht im Tierversuch von Elstner et al. ist diese Dosierung vergleichsweise niedrig und der Effekt möglicherweise entsprechend schwächer [27]. Aufgrund der Lebertoxizität ist allerdings im klinischen Einsatz an eine wesentlich höhere Dosis von Troglitazon eher nicht zu denken. Inwieweit die Dosis von dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Rosiglitazon im Verhältnis zur Normaldosis steigerbar ist und wie stark die Effektivität gegenüber Tumorzellen dadurch steigerbar wäre, müssten weitere Versuche *in vivo* zeigen.

In einer weiteren Phase-II-Studie wurden 12 Patienten mit Liposarkom mit 4 mg Rosiglitazon täglich behandelt [22]. Auch hier zeigte sich in engmaschigen Kontrollen (nach 6, 12, 20 und 32 Wochen sowie nach einem Jahr, keine histologische Kontrolle in Woche 20) weder klinisches noch histologisches Ansprechen des jeweiligen Tumors. Lediglich bei 2 Patienten kam es zu einer PPAR-abhängigen Veränderung der Genexpression, was jedoch ohne morphologisches Korrelat blieb. Bei einem der Patienten spielte bereits in der Standarddosierung von 4 mg die Lebertoxizität eine Rolle und führte zum Abbruch der Behandlung, bei 2 weiteren war die Erkrankung unter der Behandlung rapid progredient. Die mittlere Dauer bis zum Tumorprogress, entsprechend einer computertomographisch ermittelten Vergrößerung des Tumors um mindestens 100%, lag bei 6 Monaten. Es konnte somit keine Empfehlung für den Einsatz von Rosiglitazon gegen das Liposarkom gegeben werden.

Auf der anderen Seite gibt es für einige wenige Tumorentitäten positive klinische Ergebnisse in der Behandlung von Tumoren mit PPAR-Agonisten. Es handelt sich auch hier allerdings um Studien mit sehr geringen Fallzahlen, die nicht den breiten Einsatz dieser Substanzen in der Krebstherapie rechtfertigen können. So konnte beispielsweise in einer Phase-II-Studie an 41 Patienten mit nicht metastasiertem Prostata-Karzinom unter Behandlung mit 2 x täglich 400 mg Troglitazon über mindestens 12 Wochen nach Lokalthherapie oder Androgen-Deprivation eine signifikant verlängerte Stabilisierung des PSA-Wertes gezeigt werden [81]. In einem Fall wurde eine massive Reduktion des Serum-PSA erreicht. Der Aussagewert dieser Studie ist allerdings auch insofern fraglich, als dass alle Patienten zum Zeitpunkt der Behandlung keine durch bildgebende Verfahren nachweisbare Tumormasse mehr hatten. Es wird somit nicht klar, ob die Patienten nicht auch ohne die Behandlung mit Troglitazon progressionsfrei geblieben wären, da es leider keine Kontrollgruppe gab.

4.3.3 Einsatz der PPAR-Agonisten in Kombination mit konventioneller Chemotherapie

Im Gegensatz zu dem vermutlich wenig Erfolg versprechenden Einsatz einer PPAR-Agonisten-Monotherapie gegen kindliche Krebserkrankungen stehen jedoch die Ergebnisse aus den Kombinationsversuchen mit Doxorubicin.

Im Hinblick auf die steigende Zahl von Langzeitüberlebenden unter Kindern mit Krebserkrankungen rückt die Reduktion von unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei verbesserten Therapieeffekten immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung und stellt eine große Herausforderung für die Zukunft dar.

So zum Beispiel ist das in dieser Arbeit verwendete Doxorubicin eine Substanz mit hoher therapeutischer Potenz gegen Leukämien und viele solide Tumoren. Jedoch ist der Nutzen von Doxorubicin limitiert durch seine Kardiotoxizität, welche zu Rhythmusstörungen, Kardiomyopathie und Herzversagen führen kann. Ist nun eine Substanz in der Lage, bei gleicher Doxorubicin-Dosis einen besseren Effekt zu erzielen, so kann im Umkehrschluss für gleiche Effektivität eine geringere Doxorubicin-Dosis ausreichen. Daraus könnte entsprechend eine Reduktion der unerwünschten Wirkungen resultieren.

Bei allen hier untersuchten Zelllinien war durch Hinzugabe des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon eine derartige Wirkungsverbesserung von Doxorubicin möglich. Zusammenfassend konnte für den PPAR α -Agonisten Fenofibrat kein derart eindeutiger Effekt erzielt werden. Letzterer scheint auch aus diesem Grund für die weitere Datenermittlung nicht sehr vielversprechend.

Erfreulicherweise lagen die für eine signifikante Effektivität benötigten Substanzkonzentrationen von Rosiglitazon in einem durch eine normale Dosis von 4-8 mg täglich auch *in vivo* erreichbaren Rahmen. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen mit den Einzelsubstanzen. Während hier die GI₅₀-Konzentrationen zumeist im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich lagen, genügten in den Kombinationsversuchen bei vielen Zelllinien zwei- bis dreistellige nanomolare Konzentrationen des PPAR γ -Agonisten zum Erreichen einer 50 %igen Wachstumshemmung (die jeweilige Konzentration des PPAR-Agonisten war dabei um den Faktor 10 höher als die Konzentration von Doxorubicin, vgl. *Tabellen 3.1 und 4.1*).

Tabelle 4.1: *GI₅₀-Konzentrationen der einzelnen Zelllinien von Rosiglitazon bei kombinierter Behandlung mit Doxorubicin in nmol/l (Mittelwerte +/- Standardabweichung). Ebenso ist der jeweilige Kombinationsindex (CI) nochmals angegeben.*

Zelllinie	GI ₅₀ Rosiglitazon bei Kombination mit Doxorubicin in nmol/l	Standardabweichung	Kombinationsindex
CADO-ES1	2307	1702,5	0,71
STA-ET-1	527	440,6	0,48
STA-ET-2.1	57	40,4	0,31
VH-64	70	17,3	0,19
CCRF-CEM	75	77,8	0,5
HL-60	12	11,8	0,59
MOLT-4	14	15	0,49
REH	9	9,2	0,61
DAOY	595	646,5	0,84
UW228.2	593	85	0,37
IMR-5	45	14	0,49
KCN	287	375,3	0,62
SHEP-SF	2000	1869,7	1,12
SH-SY5Y	91	146,4	0,19
MNNG-HOS	9180	183,8	0,95
OST	28210	1124,3	1,03
RD	540	225,4	0,92
RH30	303	225,9	0,68

Die hier gezeigten positiven Ergebnisse für Rosiglitazon sind insofern mit Vorsicht zu betrachten, als dass in anderen Arbeiten eine Erhöhung der Resistenz von Zellen gegenüber Doxorubicin durch Gabe von Rosiglitazon beobachtet wurde. Tencer et al. untersuchten in diesem Rahmen die Kolon-Karzinom-Zelllinie HT-29 und beschrieben die in einer möglichen Therapie negativen Kombinationseffekte [115]. Diese Ergebnisse lassen sich anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht auf alle Tumorentitäten generalisieren. Wie beschrieben, waren die Kombinationseffekte der beiden Substanzen stets synergistisch oder additiv.

Auch in anderen Arbeiten sind eher synergistische Effekte von Rosiglitazon und Doxorubicin nachgewiesen worden. So wurde bei Prostata-Karzinom-Zellen eine Suppression von Insulin-like Growth factor 1 (IGF-1) durch Rosiglitazon bewirkt. Da IGF-1 bei diesen Zellen normalerweise die Apoptose-induzierende Wirkung von Anthrazyklinen vermindert, konnte der PPAR γ -Agonist die Zellen wieder sensibilisieren [87].

In ähnlicher Weise konnte bei Doxorubicin-resistenten Osteosarkom-Zelllinien gezeigt werden, dass die erhöhte Zytostatika-Resistenz mit einer erhöhten Expression von Interleukin-8 einherging [91]. Diese wiederum war assoziiert mit einer gleichzeitig erhöhten Expression von Krüppel-like-factor 2 (KLF2), welcher seinerseits die Expression von PPAR γ inhibierte. Dadurch wurde die normalerweise proapoptotisch erhöhte PPAR γ -Aktivität supprimiert, wodurch der programmierte Zelltod der resistenten Zelllinien verhindert wurde. Eine verstärkte Aktivierung der noch vorhandenen Rezeptoren durch einen Agonisten könnte - so die Theorie - diesen Effekt abschwächen und auf diese Weise die erhöhte Toxizität von Doxorubicin zumindest teilweise erklären.

Auch für andere Zytostatika sind synergistische oder additive Effekte mit PPAR γ -Agonisten beschrieben. Girnun et al. konnten beispielsweise *in vitro* und *in vivo* (Mausmodell) einen ausgeprägten Synergismus hinsichtlich der Zytotoxizität zwischen PPAR γ -Liganden und Platin-basierten Substanzen an verschiedenen epithelialen Tumorzellen (Lungen- und Ovariakarzinome) nachweisen [32]. Auch hier beruhte der Effekt vor allem auf einer Verminderung der Resistenz gegen das Zytostatikum (in diesem Fall Carboplatin) durch Rosiglitazon. In diesem Zusammenhang wurden durch die Gabe von PPAR γ -Agonisten 5 unterschiedliche Metallothionein-Gene vermindert exprimiert. Die entsprechenden Genprodukte bilden als Schwermetall-bindende Proteine einen wichtigen Bestandteil des zelleigenen Schutzes gegen die Toxizität von Platin-Derivaten. Werden diese Proteine nicht mehr oder zumindest weniger synthetisiert, entfällt der Schutzmechanismus, die Resistenz der Zelle wird gesenkt und die Toxizität von Platin steigt.

Girnun et al. konnten die Theorie der verminderten Chemotherapie-Resistenz von Tumorzellen nach Gabe von PPAR γ -Agonisten in einer weiteren Arbeit an Mäusen mit Chemotherapie-resistenten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen bekräftigen [31]. Wurden die entsprechenden Tiere mit Carboplatin oder Rosiglitazon allein behandelt, war die Tumormasse unverändert oder progredient, bei kombinierter Gabe zeigte sich ein gutes Ansprechen der Tumorzellen in Form von Proliferationshemmung und verstärkter Apoptose. Interessanterweise entstand bei der Kombination der Substanzen keine erhöhte Systemtoxizität von Carboplatin, was den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon in seiner Rolle als Dosis-modifizierende Substanz bestärkt. Das würde bedeuten, dass durch die Hinzugabe des PPAR-Agonisten zur Chemotherapie eine geringere Dosis letzterer für eine gleich bleibende Effektivität notwendig sein könnte. In der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie ist dieser Aspekt sicher besonders interessant, da hier bereits hohe Heilungsraten bei verschiedenen Tumoren erreicht werden und somit immer häufiger die Reduktion der therapiebedingten Systemtoxizität im Vordergrund steht.

4.3.4 Mögliche unerwünschte Effekte im klinischen Einsatz

4.3.4.1 Mögliche Gefahren der Kombination von PPAR γ -Agonisten mit Anthrazyklinen

Wie beschrieben, war vor allem Rosiglitazon in der Lage, die Dosis von Doxorubicin *in vitro* bei gleicher Effektivität zu reduzieren. Dies kann auf der einen Seite ein Hinweis sein, dass mit dem Einsatz beider Substanzen in Kombination möglicherweise unerwünschte Wirkungen des Chemotherapeutikums, wie zum Beispiel die Kardiotoxizität, reduziert werden können. Gerade im Bezug auf die Kardiotoxizität jedoch sollten in Anbetracht der Literaturdaten einige möglicherweise durch Kombination der Substanzen verursachten negativen Effekte bedacht werden. Derartige Mechanismen könnten darauf beruhen, dass PPAR γ -Agonisten in der Lage sind, Cyclooxygenase-2 (COX-2) zu inhibieren [10]. Im Gewebe wird dieses Enzym vor allem dann synthetisiert, wenn es zu einer erhöhten Konzentration freier Sauerstoffradikale kommt, wie es zum Beispiel bei einer Entzündungsreaktion oder auch bei einer Intoxikation (z.B. durch ein Anthrazyklin) der Fall ist. Durch die COX-2 wird die Synthese zytoprotektiver Prostaglandine gesteigert. Fällt dieser Schutz nun durch die Wirkung von Glitazonen weg oder wird vermindert, könnte sich die toxische Wirkung durch die Entstehung freier Sauerstoffradikale in Kardiomyozyten zum Beispiel im Rahmen einer Anthrazyklin-Therapie mit Doxorubicin gegebenenfalls stärker entfalten. Dass dieser Aspekt ein potenzielles Risiko für den praktischen Einsatz darstellen könnte, sollte in jedem Fall bei einem möglichen *in vivo*-Einsatz derartiger Substanzkombinationen bedacht und mit überprüft werden. Allerdings ist ebenfalls bekannt, dass die Expression von PPAR γ in Kardiomyozyten im Vergleich zu braunen und weißen Fettgewebszellen äußerst gering ist, weshalb die beschriebenen Effekte wahrscheinlich eher von unerheblicher Relevanz sind [25,74,84].

4.3.4.3 Erhöhtes Frakturrisiko bei Knochentumoren durch Glitazone?

Wegen einer Hemmung der Genese von Osteoblasten durch PPAR γ -Agonisten wurde in der groß angelegten ADOPT-Studie (A Diabetes Outcome and Progression Trial) bei Patienten, die mit Rosiglitazon behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko für Knochenfrakturen beobachtet [34,50]. Dieser Effekt wurde erklärt durch die vermehrte Induktion der Ausdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Adipozyten anstatt zu Osteoblasten, was zu einem verminderten Knochenaufbau führte [2,112]. Da Knochentumoren wie Osteosarkome und Ewing-Sarkome häufig sowieso zu einem erhöhten Frakturrisiko führen [99], scheint auf den ersten Blick eine Behandlung von Knochentumoren mit Rosiglitazon nicht indiziert. Auf der anderen Seite wurden die beschriebenen unerwünschten Effekte lediglich bei postmenopausalen weiblichen Studienteilnehmerinnen nachgewiesen. Da die vorliegende Arbeit auf eine Behandlung von Kindern, Heranwachsenden und jungen Erwachsenen abzielt, könnten die Effekte hier von geringerer Relevanz sein. Dabei bleibt zu bedenken, dass es nur sehr wenige Daten für die Behandlung junger Menschen mit PPAR α - und γ -Agonisten gibt [20,34]. Insgesamt wäre es möglich, dass selbst wenn ein (wahrscheinlich gering) erhöhtes Frakturrisiko besteht, die positiven Effekte einer Behandlung von Knochentumoren mit PPAR-Agonisten überwiegen.

4.3.4.3 PPAR-Agonisten und mögliche kanzerogene Effekte

Bezogen auf die Gruppe der Thiazolidinedione (Glitazone) gibt es in der Literatur nur wenige Hinweise auf eine Krebs-induzierende Wirkung. Eine Arbeit aus dem Jahre 1998 zeigte einen positiven Einfluss von PPAR γ -Agonisten auf die Größe und Zahl von Colontumoren bei C57BL/6J-APC/+-positiven Mäusen, also bei Tieren mit der Mutation einer familiären adenomatösen Polyposis coli [61]. Dies konnte auch in einer Reihe von neueren Folgearbeiten bestätigt werden [17,128]. Interessanterweise blieb die familiäre adenomatöse Polyposis Coli jedoch eine Ausnahme hinsichtlich der Kanzerogenität von Glitazonen.

Auf der anderen Seite wird der Einsatz von PPAR α -Agonisten in der Tumorbehandlung wesentlich kontroverser diskutiert. Es gibt Hinweise auf eine hepatokarzinogene Wirkung von Fibraten im Ratten- und Mausmodell. Allerdings wurden diese Effekte erst bei einem Vielfachen der regulären therapeutischen Dosis im Nagetierversuch beobachtet und sind in der klinischen Anwendung nicht beschrieben worden [95]. Aus diesem Grund erscheinen derartige Befunde für die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit als eher weniger relevant. Außerdem hat diese Arbeit die Überlegenheit von Rosiglitazon gegenüber Fenofibrat gezeigt, so dass eine Behandlung mit dieser Substanz und damit ggf. auch anderen PPAR α -Agonisten ohnehin eher in den Hintergrund tritt.

4.4 Anregungen für die weitere Erforschung der ermittelten Effekte

4.4.1 Verifizierung der gewonnenen Daten

Der Befund, dass beispielsweise die Ewing-Sarkom Zelllinien sehr divergent auf die kombinierte Gabe von Doxorubicin und Fenofibrat reagierten (bei 2 Zelllinien bestand ein Synergismus, bei 2 weiteren ein Antagonismus), unterstreicht den Vorteil einer breit angelegten Untersuchung vor dem praktischen Einsatz bestimmter Substanzen. Je mehr Zelllinien einer Tumorentität untersucht werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, auch eventuell vorhandene antagonistische Effekte zu detektieren. Daher ist es nicht falsch, vor dem klinischen Einsatz weitere Zelllinien der hier untersuchten Tumoritäten auf die kombinierte Wirkung von PPAR-Agonisten und Anthrazyklinen zu untersuchen. Auf der anderen Seite allerdings waren die synergistischen bzw. additiven Substanzeffekte von Rosiglitazon und Doxorubicin im vorliegenden Zelllinienpanel derart eindrücklich, dass eine noch breitere Untersuchung vermutlich keine gegensätzlichen Befunde erbringen würde.

Bezüglich der Methodik kann zur Verifizierung der in den Proliferationsassays gewonnenen Daten der Einfluss der entsprechenden Substanzen auf die Koloniebildung der untersuchten Tumorzellen überprüft werden. In sogenannten „Colony Assays“ konnten bereits Saiki et al., wie bereits im Kapitel zur Wirkung der PPAR-Agonisten auf Leukämie-Zellen beschrieben, eine derartige Hemmung unter anderem durch Pioglitazon zeigen [101]. Auch mit dieser Methode können verschiedene Substanzkonzentrationen in ihrer Wirksamkeit überprüft werden.

4.4.2 Thiazolidinedion-induzierte Effekte

Für unterschiedliche Tumorzellen sind verschiedenste Wirkungen der Thiazolidinedione beschrieben, die in der vorliegenden Untersuchung noch nicht im einzelnen aufgeschlüsselt werden. Han et al. konnten 2001 beispielsweise eine antiproliferative Wirksamkeit der PPAR γ -Agonisten GW1929 und 15-deoxy-delta Prostaglandin J2 auf die Neuroblastom-Zelllinie LA-N-5 in Form verstärkter neuritischer Ausdifferenzierung der Zellen, erhöhter Acetylcholin-Esterase-Aktivität und Reduktion der N-Myc-Expression nachweisen [42]. Auch Apoptose [117] und Arrest in verschiedenen Phasen des Zellzyklus [80] sind bekannte Thiazolidinedion-induzierte Effekte.

Welche dieser Mechanismen auch bei der Wirkung von PPAR γ -Agonisten gegen die hier untersuchten pädiatrischen Tumorentitäten eine Rolle spielen, sollte überprüft werden.

Methodisch wäre eine Messung der Caspaseaktivität in mit PPAR γ -Agonisten behandelten Zellen im Hinblick auf Apoptose-induzierende Wirkung von Rosiglitazon möglicherweise aufschlussreich. Caspasen sind Enzyme, die beim programmierten Zelltod eine Rolle spielen und hier z.T. verstärkt exprimiert werden. Eine erhöhte Aktivität spräche für eine erhöhte Apoptoserate.

Colony Assays bieten über die reine Untersuchung des Einflusses der PPAR-Agonisten auf die Koloniebildung hinaus mehrere Vorteile im Hinblick auf die Überprüfung zu Grunde liegender Mechanismen.

So könnten bestimmte nach Wachstumsabschluss durchgeführte Färbungen Hinweise auf eine Ausdifferenzierung von Tumorzellen geben. Es ist bekannt, dass die Gabe von Thiazolidinedionen eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen entweder in Adipozyten oder in Osteoblasten induzieren kann [43,44]. Dass Osteosarkome in der Regel als (osteoblastische) Neoplasien ebenfalls aus mesenchymalen Stammzellen entstehen, führt zu der Annahme, dass die Thiazolidinedione einen Einfluss auf die Genese von Osteosarkomen im Sinne einer weiteren Ausdifferenzierung haben könnten. Tatsächlich fanden Haydon et al. eine vermehrte Ausdifferenzierung von Osteosarkomzellen zu Osteoblasten. Durch eine Fettfärbung können Hinweise gewonnen werden, ob es auch eine Ausdifferenzierung von Osteosarkomzellen zu Adipozyten gibt.

4.4.3 Abklärung der Rezeptor-Abhängigkeit

Zusammenfassend lassen die Versuche zu Rezeptorexpression und Zytotoxizität der PPAR-Agonisten zwei Hypothesen zu: Zum einen deutet eine hohe Sensitivität gegen Rosiglitazon und Fenofibrat in Zelllinien mit niedriger Rezeptor-Expression möglicherweise auf überwiegend Rezeptor-unabhängige Effekte hin. Zum anderen jedoch konnte eine Rezeptor-Abhängigkeit in Zelllinien mit hoher Expression und gleichzeitig guter antiproliferativer Wirkung keinesfalls ausgeschlossen werden.

Es ist möglich, dass es sich beim Verhältnis von Rezeptordichte zu Substanzwirksamkeit um eine rein zufällige Verteilung handelt. Die Rezeptor-Abhängigkeit kann durch die vorliegenden Daten allein weder widerlegt noch bewiesen werden. Aus diesem Grund sollten die Effekte innerhalb des hier untersuchten Panels in weiteren Arbeiten genauer spezifiziert werden.

Interessant wäre in diesem Rahmen die Beobachtung, ob durch Ausschalten von PPAR beispielsweise durch selektive Antagonisten (z.B. GW6992 = irreversibler, selektiver PPAR γ -Antagonist [23,32,128]) oder aber durch die selektive Stilllegung der Rezeptorexpression mittels small interfering RNAs ähnliche antiproliferative Effekte erzielt werden können oder nicht. Sollte dies der Fall sein, wäre dies ein eindeutiger Hinweis auf Rezeptor-Unabhängigkeit. Eine derartige Testung wäre ebenfalls im Rahmen von Colony Assays durchführbar.

In den Untersuchungen mit PPAR-Antagonisten sollte allerdings berücksichtigt werden, dass diese Substanzen selbst antiproliferative Wirkungen haben können [107], was entsprechend zu Interpretationsfehlern führen kann. Dies kann auf der einen Seite darauf beruhen, dass durch kompetitive Hemmung am Rezeptor proportional mehr PPAR-Agonist für Rezeptor-unabhängige Effekte zur Verfügung steht. Zum anderen ist es möglich, dass der Antagonist selbst PPAR-unabhängige Effekte besitzt.

4.4.4 Möglichkeiten, die Wirksamkeit der PPAR γ -Agonisten zu erhöhen

Bisherige Daten belegen, dass *in vitro* die Wirksamkeit von PPAR-Agonisten gegen Tumorzellwachstum durch Zugabe verschiedener Substanzen erhöht werden kann.

Eine von Maiguma et al. beobachtete selektive Wachstumsinhibition von Rhabdomyosarkomen durch Fibrate konnte durch die zusätzliche Gabe des Lipidsenkers Simvastatin in Kombination mit Benzafibrat verstärkt werden [72]. Es ist bekannt, dass beide Substanzen *in vivo* zu einer Rhabdomyolyse führen können. Die Autoren nehmen an, dass bei der Zerstörung maligne entarteter Rhabdomyozyten möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegt. Dies könnte theoretisch Gegenstand weiterer Forschung sein, da auch in der vorliegenden Arbeit im Bezug auf die Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH-30 für die alleinige Behandlung der Zellen mit Fenofibrat hinsichtlich der Zytotoxizität positive Ergebnisse erzielt wurden. Allerdings wird diese Möglichkeit relativiert durch die eher antagonistische Wirkung von Fenofibrat zum Anthrazykin Doxorubicin.

Interessant wäre ebenso die Untersuchung, ob eine simultane Aktivierung von PPAR γ und α bessere Ergebnisse hinsichtlich der Proliferationshemmung erbringen kann. Liu et al. zeigten an Philadelphia-Chromosom positiven ALL-Zelllinien dass TZD18, ein Ligand für PPAR α und γ einen im Vergleich zu Pioglitazon stärkeren Zellzyklusarrest bewirkt [64]. Ähnliche Ergebnisse ermittelten Zang et al. für CML-Zelllinien [132]. Die beobachteten Effekte waren jedoch in beiden Arbeiten aufgrund ihrer Irreversibilität nach Behandlung mit PPAR-Antagonisten am ehesten unabhängig vom Rezeptor. Ob in zukünftig durchgeführten Untersuchungen Effekte durch die Aktivierung beider Rezeptoren bedingt sind oder ob auch hier PPAR-unabhängige Mechanismen zu Grunde liegen muss gegebenenfalls für den Einzelfall geklärt werden.

Die von Haydon et al. gezeigte vermehrte Ausdifferenzierung von Osteosarkomzellen zu Osteoblasten nach Behandlung mit PPAR γ -Agonisten wurde signifikant verstärkt durch deren Kombination mit Retinoid-X-Rezeptor-Agonisten [44]. Dieser Effekt lässt sich möglicherweise durch das Vorliegen von PPAR und RXR in Heterodimeren und somit gegenseitiger Verstärkung erklären. Eine weitere Untersuchung ergab ähnliche Befunde: Konopleva et al. wiesen potente Kombinationswirkungen hinsichtlich Wachstumshemmung und Ausdifferenzierung der Zellen unter anderem für Rosiglitazon und ATRA (all trans-retinoic acid) nach [57]. Inwieweit diese Entdeckungen auch für die Zelllinien im vorliegenden Panel relevant sind, sollte in jedem Fall weiter abgeklärt werden. Die Kombination von RXR- und PPAR-Agonisten stellt ein interessantes Feld für die weitere Erforschung der vorliegenden Substanzen an Tumorzellen dar.

4.4.5 Welcher PPAR γ -Agonist ist am besten für die weitere Überprüfung geeignet?

In dieser Arbeit konnten unterschiedlich starke antiproliferative Wirkungen von PPAR α - und - γ -Agonisten gezeigt werden. Da es möglich ist, dass es derartige Unterschiede nicht nur zwischen diesen beiden Substanzklassen gibt, sondern auch PPAR-Agonisten der selben Subgruppe unterschiedlich stark antiproliferativ wirksam sind, sollten verschiedene PPAR γ -Agonisten auf die Wirksamkeit gegen Tumorzelllinien überprüft werden, um so herauszufinden, welche Substanz sich für den klinischen Einsatz am besten eignen würde. Dabei könnten auf der einen Seite eine unterschiedlich hohe Rezeptoraffinität, vor allem aber auch Divergenzen im Spektrum den PPAR-unabhängigen Effekten relevant sein.

4.4.6 Untersuchung anderer Anthrazykline und weiterer Zytostatika auf Kombinationseffekte mit Rosiglitazon

Ebenso wie die vergleichende Untersuchung verschiedener PPAR γ -Agonisten ist eine Überprüfung anderer Anthrazykline bzw. weiterer Zytostatika auf ähnliche Kombinationseffekte mit Thiazolidinedionen ratsam. Die Untersuchungen von PPAR γ -Agonisten mit Platinderivaten von Girmun et al. haben (wie bereits beschrieben) ebenfalls eine vielversprechende Wirksamkeit der applizierten Substanzen *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Sollten in Untersuchungen mit anderen Zytostatika weitere positive Ergebnisse gesammelt werden, kann dies für den klinischen Einsatz von außerordentlicher Bedeutung sein.

4.4.7 Untersuchung der Toxizitätssteigerung von Doxorubicin durch die Kombination mit Rosiglitazon

Um die Kombinationseffekte insbesondere von Rosiglitazon und Doxorubicin weiter spezifizieren zu können sollte geklärt werden, in wie weit PPAR-Agonisten in der Lage sind, Einfluss auf die unterschiedlich ausgeprägte Doxorubicin-Resistenz bestimmter Tumorzellen zu nehmen. Derartige Resistenzmechanismen beruhen zum Beispiel auf einer Überexpression von Membran-assoziierten Substanz-Effluxpumpen wie dem P170-Glykoprotein. Diese sogenannten ABC-Transporter (ATP-binding Cassette) sind in Tumorzellen für den Substanztransport aus der Zelle zuständig [63,91]. Bei stärkerer Expression ist somit die Zelle dem Chemotherapeutikum für eine kürzere Zeitspanne ausgesetzt. Andere Resistenzmechanismen gegen Doxorubicin beruhen auf einer veränderten Expression von Topoisomerase II und Integrinen sowie Veränderungen des Spiegels des intrazellulären Antioxidans Glutathion [91].

Es gibt bereits Hinweise darauf, dass in einige dieser Resistenzmechanismen PPAR-abhängige Signalwege involviert sind [56]. Somit wäre es theoretisch möglich, dass der in der gezeigten Toxizitätssteigerung von Doxorubicin durch Rosiglitazon eine PPAR-vermittelte Verminderung der Resistenzmechanismen zu Grunde liegt. Diese Hypothese sollte in jedem Fall überprüft werden. In dieser Richtung könnte beispielsweise die Expression von ABC-Transporter-Proteinen moduliert oder der Energiestoffwechsel der Tumorzelllinien beeinflusst werden und im Anschluss eine erneute Toxizitätstestung der Substanzen erfolgen.

Ferner konnte gezeigt werden, dass der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Signalweg maßgeblich an der Vermittlung der Kardiotoxizität von Doxorubicin beteiligt ist [75]. Bei Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) handelt es sich um ein Enzym, welches eine Signaltransduktion durch Verbindung von Rezeptor-abhängigen mit -unabhängigen Tyrosinkinasen vermittelt [125]. Durch eine Untersuchung von LY294002 (= 2-(4-Morpholinyl)-8-Phenyl-4H-1-Benzopyran-4-on), einem hoch-selektiven Inhibitor von PI3K, in Kombination mit PPAR-Agonisten (z.B. im Rahmen von Colony Assays) könnten Hinweise auf eine Verstärkung der Kardiotoxizität von Doxorubicin durch die PPAR-Agonisten erlangt werden. Für LY294002 konnte eine Verminderung der kardiotoxischen Wirkung von Doxorubicin im Sinne einer abgeschwächten Doxorubicin-induzierten Hypertrophie von Kardiomyozyten nachgewiesen werden [75]. Sollte nach Zugabe von LY294002 eine verminderte Hemmung der Koloniebildung von mit den PPAR-Agonisten behandelten Zellen vorliegen, so spräche dies für eine Beteiligung des PI3K-Signalweges an der Toxizität von Rosiglitazon bzw. Fenofibrat. Dies ist aufgrund bereits ermittelter Daten durchaus möglich, da für LY294002 eine Reduktion der PPAR γ -Expression gezeigt werden konnte [130], was bei Vorliegen Rezeptor-abhängiger Toxizität der PPAR-Agonisten von Belang wäre.

Da der PI3K-Signalweg demnach sowohl bei der Wirksamkeit der PPAR-Agonisten wie auch bei der Kardiotoxizität von Doxorubicin involviert wäre, wäre dies für die klinische Anwendung einer Kombination von Anthrazyklinen und PPAR-Agonisten möglicherweise von einschränkender Bedeutung.

4.5 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend sollen an dieser Stelle die in der Zielsetzung der Arbeit formulierten Fragen kurz beantwortet werden:

1. Gibt es die vorbeschriebenen Tumor-proliferationshemmenden Effekte auch an typisch pädiatrischen Tumoren? Wenn ja, an welchen?

Wie für viele Tumorerkrankungen des Erwachsenenalters beschrieben, kann die Applikation von PPAR-Agonisten auch an pädiatrischen Tumorzellen unterschiedliche wachstumshemmende Effekte erzielen. Sowohl Fenofibrat, als auch in besonderem Maße Rosiglitazon waren in der Lage, das Zellwachstum aller 18 Zelllinien des getesteten Panels abhängig von ihrer Dosis zu reduzieren.

Starke antiproliferative Effekte durch beide PPAR-Agonisten wurden an allen Leukämie- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien sowie an einem der beiden untersuchten Osteosarkom- und 3 der 4 Ewing-Sarkom-Zelllinien beobachtet. Rosiglitazon war ebenfalls an einer der beiden Medulloblastom-Zelllinien sowie an 3 von 4 Neuroblastomen relativ effektiv, während durch Fenofibrat nur an einer der Neuroblastom-Zelllinien überdurchschnittlich wachstumshemmend wirkte.

Da in der Vergangenheit sehr unterschiedliche Wirksamkeiten der PPAR-Agonisten auf verschiedene Tumorentitäten festgestellt worden waren, war es im Vorfeld der vorliegenden Untersuchungen wahrscheinlich, dass es auch bei den bisher wenig untersuchten pädiatrischen Tumoren verschieden ausgeprägte Wirksamkeiten dieser Substanzen gibt. Tatsächlich wurden auch hier Unterschiede in der Substanzwirksamkeit zwischen einzelnen Tumorentitäten und teilweise auch zwischen einzelnen Zelllinien gleicher Entität gesehen: die gemessenen Substanzkonzentrationen zur Reduktion des Zellwachstums um 50 % lagen für Rosiglitazon zwischen 37 nmol/l und 353 μ mol/l, für Fenofibrat zwischen 46 μ mol/l und 381 μ mol/l.

Neben der stark variierenden Wirksamkeit gegen einzelne Zelllinien untereinander wurden im Bezug auf die Gesamtheit der Zelllinien Zusammenhänge hinsichtlich der Toxizität der PPAR-Agonisten Rosiglitazon und Fenofibrat beobachtet. Betrachtet man das ganze behandelte Panel, so korrelierten die GI_{50} -Konzentrationen beider Substanzen signifikant miteinander. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass bei beiden Substanzen die gleiche oder zumindest eine ähnliche Wirkungsweise bei der Proliferationshemmung von Tumorzellen *in vitro* haben.

2. Sollten signifikante Effekte gesehen werden, welche Mechanismen liegen diesen zu Grunde?

Die Ergebnisse der Zellproliferations-Assays sowie der Expressionsanalysen legen nahe, dass ein Großteil der antiproliferativen Effekte der PPAR-Agonisten nicht über PPAR selbst reguliert wird, sondern dass vor allem Rezeptor-unabhängige Mechanismen für die Wirksamkeit verantwortlich sind. In der Literatur wurde eine Reihe solcher Reaktionsmöglichkeiten beschrieben. Die bei pädiatrischen Tumor-Zelllinien zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen wurden im Rahmen dieser Arbeit noch nicht im Detail identifiziert. Allerdings befinden sich dahingehend richtungsweisende Untersuchungen bereits in der Durchführung und werden in Folgearbeiten berichtet.

3. Gibt es Unterschiede in der antiproliferativen Wirksamkeit von Rosiglitazon und Fenofibrat allein oder in Kombination mit konventionellen Zytostatika? Womit würde sich eine weitere Überprüfung am ehesten lohnen?

Es konnte vor allem Rosiglitazon, ein PPAR γ -Agonist, als wirksame Substanz gegen Tumorzellen identifiziert werden. Fenofibrat, ein Ligand von PPAR α , war deutlich weniger effektiv und erscheint für die pädiatrische Tumorthherapie als eher ungeeignet. Dies hat vor allem 2 Gründe: Zum einen war Fenofibrat hinsichtlich der Einzeltoxizität dem Rosiglitazon in nahezu allen Zelllinien unterlegen. Zum anderen - und dies dürfte einen weitaus höheren Stellenwert haben - war nur das Rosiglitazon in der Lage, die Dosis von Doxorubicin bei gleicher Effektivität signifikant zu reduzieren.

Besonders interessant dabei ist, dass auf der einen Seite eine signifikante Korrelation der GI₅₀-Konzentrationen von Doxorubicin allein mit den GI₅₀-Konzentrationen der Kombination von Doxorubicin und Rosiglitazon bestand. Auf der anderen Seite gab es keine solche Korrelation der Werte in Kombination mit den Werten für Rosiglitazon allein. Dies legt nahe, dass die Toxizität von Doxorubicin auf die Tumorzellen durch den PPAR γ -Agonisten erhöht wird. Somit modifiziert Rosiglitazon scheinbar die für Zytotoxizität erforderliche Anthrazyklindosis, wobei die eigene antiproliferative Wirkung des PPAR-Agonisten in den Hintergrund rückt. Diese Ergebnisse sprechen für einen möglichen klinischen Einsatz von PPAR γ -Agonisten als sogenannte „response modifier“. Vor allem die Kombination von PPAR γ -Agonisten mit konventionellen Zytostatika erscheint somit als sehr vielversprechend.

4. Sind die *in vitro* ermittelten Effekte ggf. ausreichend, um den Einsatz *in vivo* zu rechtfertigen?

Prinzipiell kann jedes noch so vielversprechende *in vitro*-Ergebnis möglicherweise im Tiermodell hinfällig sein. Daher sind derartige Untersuchungen vor dem klinischen Einsatz nahezu obligat. Somit müssten auch die vorliegenden Ergebnisse vor dem klinischen Einsatz im Tiermodell überprüft werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, gibt es auch bereits einige wenige interessante *in vivo*-Daten für PPAR-Agonisten in der Tumorthherapie. Bevor es zu einer weiteren Untersuchung der in dieser Arbeit genutzten Substanzen gegen pädiatrische Tumoren *in vivo* kommt, sollte zunächst zumindest noch ein Teil der molekularen Wirkprinzipien *in vitro* geklärt werden.

Weiterhin offene Fragen, die (wie in Kapitel 4.4 erläutert) durch Folgeversuche vor einem *in vivo*-Einsatz beantwortet werden sollen, bearbeiten zum Beispiel, wie genau es zur Wachstumshemmung kommt: Gibt es Zeichen für Apoptose? Besteht überwiegend ein Zellzyklusarrest? Ferner ist eine genauere Differenzierung zwischen den PPAR-abhängigen und -unabhängigen Wirkungen erforderlich. In Colony Assays sollte geklärt werden, ob sich Aussagen bezüglich der Auswirkungen von PPAR-Agonisten auf klonales Tumorstadium treffen lassen, was unter anderem die Signifikanz der Versuchsergebnisse erhöhen könnte. Sollten sich hier weiterhin vielversprechende Ergebnisse zeigen, wäre ein *in vivo* Modell die nächste logische Konsequenz.

In vitro konnte gezeigt werden, dass das Zellwachstum inhibierende Effekte abhängig von der jeweiligen Substanzkonzentration sind. Konzentrationen, die *in vitro* bei alleiniger Applikation der PPAR-Agonisten zu einer 50%igen Wachstumsinhibition geführt haben, sind mit den konventionellen Substanzdosen *in vivo* nur schwer oder gar nicht zu erreichen. Allerdings lagen die GI₅₀-Konzentrationen der PPAR(γ)- Agonisten bei der Kombination mit dem Anthrazyklin Doxorubicin in einem auch im Plasma erreichbaren Bereich.

Dies konnte theoretisch anhand verschiedener Daten belegt werden. Wie hoch der praktische Wert dieser Überlegung ist, muss letztendlich mit weiteren *in vivo*-Daten verifiziert werden.

5. Inwieweit lohnt es sich für bestimmte Tumorentitäten den Nutzen der PPAR-Agonisten im Detail zu erforschen und ggf. sogar den Weg für den klinischen Einsatz zu bereiten?

Ein wie hier verwendetes Zelllinienpanel kann wichtige Aufschlüsse geben, für welche Tumorarten und welche Substanzen eine Weiterentwicklung lohnenswert erscheint und für welche weniger. Im Gegensatz zu der vielversprechenden Wirksamkeit von Rosiglitazon als „response-modifier“ für Doxorubicin, konnte gezeigt werden, dass Fenofibrat und somit möglicherweise auch andere PPAR α -Agonisten für die pädiatrische Tumorthherapie ungeeignet sind.

Als Konsequenz aus dieser Arbeit sollte der nachgewiesene Anstieg der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin durch PPAR γ -Agonisten für jede einzelne Tumorentität selektiv auf zu Grunde liegende Mechanismen überprüft werden. Insbesondere bei den Ewing-Sarkomen, Leukämien und Medulloblastomen war die Wirksamkeit von Doxorubicin und Rosiglitazon zumeist ausgeprägt synergistisch. Auch bei den Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen und Neuroblastomen gab es synergistische bzw. zumindest additive Effekte. Für keine der untersuchten Tumorentitäten kann somit eine weitere Untersuchung als „nicht lohnenswert“ ausgeschlossen werden. Im Verlauf wäre dann zusätzlich eine Überprüfung der Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf andere Zytostatika interessant. Erst nach kritischer Bewertung aller Ergebnisse sollte dann eine klinische Prüfung erfolgen.

Die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der Effektivität von Rosiglitazon in der Behandlung von typisch pädiatrischen Tumorzellen sind somit insgesamt als positiv für die weitere Entwicklung zu bewerten. Klinische Relevanz dürfte dabei allerdings weniger die zytotoxische Wirkung von PPAR γ -Agonisten allein als insbesondere deren Dosis-modifizierende Wirkung auf das Doxorubicin erlangen.

5. Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2003-2004 - Häufigkeiten und Trends

Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 6. überarbeitete Auflage ed, 2008.

2. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL (2005) Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* **146**(3): 1226-35.
3. Allred CD, Kilgore MW (2005) Selective activation of PPARgamma in breast, colon, and lung cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol* **235**(1-2): 21-9.
4. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* **67**(7): 1886-93.
5. Asada N, Tsuchiya H, Tomita K (1999) De novo deletions of p53 gene and wild-type p53 correlate with acquired cisplatin-resistance in human osteosarcoma OST cell line. *Anticancer Res* **19**(6B): 5131-7.
6. Badawi AF, Eldeen MB, Liu Y, Ross EA, Badr MZ (2004) Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Res* **64**(3): 1181-9.
7. Baker DL, Reddy UR, Pleasure D, et al. (1989) Analysis of nerve growth factor receptor expression in human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. *Cancer Res* **49**(15): 4142-6.
8. Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* **53**: 409-35.
9. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* **38**(11 Pt 1): 3751-7.
10. Bren-Mattison Y, Meyer AM, Van Putten V, et al. (2007) Antitumorigenic Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR γ) in Non-small Cell Lung Cancer Cells (NSCLC) are Mediated by Suppression of COX-2 via Inhibition of NF- κ B. *Mol Pharmacol*.
11. Bren-Mattison Y, Van Putten V, Chan D, Winn R, Geraci MW, Nemenoff RA (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) inhibits tumorigenesis by reversing the undifferentiated phenotype of metastatic non-small-cell lung cancer cells (NSCLC). *Oncogene* **24**(8): 1412-22.
12. Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP (2003) Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* **79**(3): 391-7.

13. Cellai I, Benvenuti S, Luciani P, et al. (2006) Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPARgamma transactivation in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* **95**(7): 879-88.
14. Cesario RM, Stone J, Yen WC, Bissonnette RP, Lamph WW (2006) Differentiation and growth inhibition mediated via the RXR:PPARgamma heterodimer in colon cancer. *Cancer Lett* **240**(2): 225-33.
15. Chaffer CL, Thomas DM, Thompson EW, Williams ED (2006) PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer* **6**: 53.
16. Chintharlapalli S, Papineni S, Konopleva M, Andreef M, Samudio I, Safe S (2005) 2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid and related compounds inhibit growth of colon cancer cells through peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent pathways. *Mol Pharmacol* **68**(1): 119-28.
17. Choi IK, Kim YH, Kim JS, Seo JH (2008) PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Invest New Drugs* **26**(3): 283-8.
18. Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55.
19. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**(5635): 347-9.
20. Cree MG, Zwetsloot JJ, Herndon DN, et al. (2007) Insulin sensitivity and mitochondrial function are improved in children with burn injury during a randomized controlled trial of fenofibrate. *Ann Surg* **245**(2): 214-21.
21. Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* **71**(1): 242-7.
22. Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciote R, Debiec-Rychter M, Oyen R, Van Oosterom A (2003) A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* **89**(8): 1409-12.
23. Derlacz RA, Hyc K, Usarek M, Jagielski AK, Drozak J, Jarzyna R (2008) PPAR-gamma-independent inhibitory effect of rosiglitazone on glucose synthesis in primary cultured rabbit kidney-cortex tubules. *Biochem Cell Biol* **86**(5): 396-404.
24. Douglass EC, Valentine M, Etcubanas E, et al. (1987) A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet Cell Genet* **45**(3-4): 148-55.
25. Dowd NP, Scully M, Adderley SR, Cunningham AJ, Fitzgerald DJ (2001) Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo. *J Clin Invest* **108**(4): 585-90.
26. Eibl G, Wente MN, Reber HA, Hines OJ (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **287**(2): 522-9.

27. Elstner E, Muller C, Koshizuka K, et al. (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8806-11.
28. Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965) Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia. *Cancer* **18**: 522-9.
29. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, et al. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**(3): 713-33.
30. Gibson AA, Harwood FG, Tillman DM, Houghton JA (1998) Selective sensitization to DNA-damaging agents in a human rhabdomyosarcoma cell line with inducible wild-type p53 overexpression. *Clin Cancer Res* **4**(1): 145-52.
31. Girnun GD, Chen L, Silvaggi J, et al. (2008) Regression of drug-resistant lung cancer by the combination of rosiglitazone and carboplatin. *Clin Cancer Res* **14**(20): 6478-86.
32. Girnun GD, Naseri E, Vafai SB, et al. (2007) Synergy between PPARgamma ligands and platinum-based drugs in cancer. *Cancer Cell* **11**(5): 395-406.
33. GlaxoSmithKline. AVANDIA (R) 4 mg Filmtabletten - Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels, 2006.
34. Grey A, Bolland M, Gamble G, et al. (2007) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(4): 1305-10.
35. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT (2004) Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* **5**(7): 419-29.
36. Grommes C, Landreth GE, Sastre M, et al. (2006) Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. *Mol Pharmacol* **70**(5): 1524-33.
37. Guan YF, Zhang YH, Breyer RM, Davis L, Breyer MD (1999) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia* **1**(4): 330-9.
38. Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P, Willson TM, DuBois RN (2001) Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* **276**(32): 29681-7.
39. Han S, Roman J (2004) Suppression of prostaglandin E2 receptor subtype EP2 by PPARgamma ligands inhibits human lung carcinoma cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* **314**(4): 1093-9.
40. Han S, Roman J (2006) Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. *Mol Cancer Ther* **5**(2): 430-7.

41. Han S, Wada RK, Sidell N (2001) Differentiation of human neuroblastoma by phenylacetate is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Res* **61**(10): 3998-4002.
42. Han SW, Greene ME, Pitts J, Wada RK, Sidell N (2001) Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* **7**(1): 98-104.
43. Haydon RC, Luu HH, He TC (2007) Osteosarcoma and osteoblastic differentiation: a new perspective on oncogenesis. *Clin Orthop Relat Res* **454**: 237-46.
44. Haydon RC, Zhou L, Feng T, et al. (2002) Nuclear receptor agonists as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* **8**(5): 1288-94.
45. Hays T, Rusyn I, Burns AM, et al. (2005) Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis. *Carcinogenesis* **26**(1): 219-27.
46. He XM, Ostrowski LE, von Wronski MA, et al. (1992) Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in six human medulloblastoma cell lines. *Cancer Res* **52**(5): 1144-8.
47. Hisatake JI, Ikezoe T, Carey M, Holden S, Tomoyasu S, Koeffler HP (2000) Down-Regulation of prostate-specific antigen expression by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Cancer Res* **60**(19): 5494-8.
48. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7276-80.
49. Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985) Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**(5): 472-85.
50. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, et al. (2006) Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* **355**(23): 2427-43.
51. Karow T, Lang-Roth R (2006) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden. Thomas Karow ed. Köln
52. Keles GE, Berger MS, Srinivasan J, Kolstoe DD, Bobola MS, Silber JR (1995) Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. *Oncol Res* **7**(10-11): 493-503.
53. Kim KA, Park PW, Kim KR, Park JY (2007) Effect of multiple doses of montelukast on the pharmacokinetics of rosiglitazone, a CYP2C8 substrate, in humans. *Br J Clin Pharmacol* **63**(3): 339-45.
54. Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed JC (2002) An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**(25): 22320-9.

55. Kodama K, Doi O, Higashiyama M, et al. (1991) Establishment and characterization of a new Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* **57**(1): 19-30.
56. Konieczna A, Lichnovka R, Erdosova B, Ehrmann J (2009) The Role of PPARs in MDR - a lesson from embryonic development. *Neoplasma* **56**(4): 279-83.
57. Konopleva M, Elstner E, McQueen TJ, et al. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol Cancer Ther* **3**(10): 1249-62.
58. Kovacina KS, Roth RA (1995) Characterization of the endogenous insulin receptor-related receptor in neuroblastomas. *J Biol Chem* **270**(4): 1881-7.
59. Kulke MH, Demetri GD, Sharpless NE, et al. (2002) A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J* **8**(5): 395-9.
60. Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* **21**(16): 3761-6.
61. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, et al. (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* **4**(9): 1053-7.
62. Lehrke M, Lazar MA (2005) The many faces of PPARgamma. *Cell* **123**(6): 993-9.
63. Limtrakul P, Chearwae W, Shukla S, Phisalpong C, Ambudkar SV (2007) 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* **296**(1-2): 85-95.
64. Liu H, Zang C, Fenner MH, et al. (2006) Growth inhibition and apoptosis in human Philadelphia chromosome-positive lymphoblastic leukemia cell lines by treatment with the dual PPARalpha/gamma ligand TZD18. *Blood* **107**(9): 3683-92.
65. Liu J, Lu H, Huang R, et al. (2005) Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induced cell growth inhibition and its influence on matrix metalloproteinase activity in human myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**(4): 400-8.
66. Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, et al. (2005) Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Ann Oncol* **16**(3): 455-9.
67. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-8.
68. Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ (1992) Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem Int* **27**(3): 501-10.

69. Lucarelli E, Sangiorgi L, Maini V, et al. (2002) Troglitazone affects survival of human osteosarcoma cells. *Int J Cancer* **98**(3): 344-51.
70. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (2003) Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen, Medikamente gezielt einsetzen. Georg Thieme Verlag ed. Stuttgart, New York, 15. komplett überarbeitete Auflage
71. Maegawa H, Ide R, Hasegawa M, et al. (1995) Thiazolidine derivatives ameliorate high glucose-induced insulin resistance via the normalization of protein-tyrosine phosphatase activities. *J Biol Chem* **270**(13): 7724-30.
72. Maiguma T, Fujisaki K, Itoh Y, et al. (2003) Cell-specific toxicity of fibrates in human embryonal rhabdomyosarcoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **367**(3): 289-96.
73. McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC, Jr., Gardner MB (1969) Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* **24**(3): 520-6.
74. Mendez M, LaPointe MC (2003) PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE2 synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension* **42**(4): 844-50.
75. Merten KE, Jiang Y, Feng W, Kang YJ (2006) Calcineurin activation is not necessary for Doxorubicin-induced hypertrophy in H9c2 embryonic rat cardiac cells: involvement of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **319**(2): 934-40.
76. Miller DB, Spence JD (1998) Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (fibrates). *Clin Pharmacokinet* **34**(2): 155-62.
77. Minowada J, Onuma T, Moore GE (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* **49**(3): 891-5.
78. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
79. Mossner R, Schulz U, Kruger U, et al. (2002) Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit cell growth in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* **119**(3): 576-82.
80. Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* **60**(19): 5558-64.
81. Mueller E, Smith M, Sarraf P, et al. (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 10990-5.
82. Nahle Z (2004) PPAR trilogy from metabolism to cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**(4): 397-402.

83. Nakamura T, Kitagawa T (1985) Anticancer drug screening test with LDH in nude mouse bearing bone and soft part sarcoma. *Cancer* **56**(5): 1112-6.
84. Neilan TG, Doherty GA, Chen G, et al. (2006) Disruption of COX-2 modulates gene expression and the cardiac injury response to doxorubicin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(2): H532-6.
85. Ohta K, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T (2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(5): 2170-7.
86. Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM, Halperin JA (2001) Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* **61**(16): 6213-8.
87. Papageorgiou E, Pitulis N, Manoussakis M, Lembessis P, Koutsilieris M (2008) Rosiglitazone attenuates insulin-like growth factor 1 receptor survival signaling in PC-3 cells. *Mol Med* **14**(7-8): 403-11.
88. Park JY, Kim KA, Shin JG, Lee KY (2004) Effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* **58**(4): 397-402.
89. Peters JM, Cheung C, Gonzalez FJ (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med* **83**(10): 774-85.
90. Pfizer. Adriblastin (R) Lösung - Fachinformation, 2005.
91. Rajkumar T, Yamuna M (2008) Multiple pathways are involved in drug resistance to doxorubicin in an osteosarcoma cell line. *Anticancer Drugs* **19**(3): 257-65.
92. Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, et al. (1986) Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J Natl Cancer Inst* **76**(3): 375-87.
93. Rhim JS, Park DK, Arnstein P, Huebner RJ, Weisburger EK, Nelson-Rees WA (1975) Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* **256**(5520): 751-3.
94. Rhim JS, Putman DL, Arnstein P, Huebner RJ, McAllister RM (1977) Characterization of human cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Int J Cancer* **19**(4): 505-10.
95. Roberts WC (1989) Safety of fenofibrate--US and worldwide experience. *Cardiology* **76**(3): 169-79.
96. Rosenfeld C, Goutner A, Choquet C, et al. (1977) Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* **267**(5614): 841-3.
97. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* **71**(4): 741-7.

98. Rumi MA, Sato H, Ishihara S, et al. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **84**(12): 1640-7.
99. Ruza E, Sierrasesumaga L, Azcona C, Patino-Garcia A (2006) Bone mineral density and bone metabolism in children treated for bone sarcomas. *Pediatr Res* **59**(6): 866-71.
100. Saidi SA, Holland CM, Charnock-Jones DS, Smith SK (2006) In vitro and in vivo effects of the PPAR-alpha agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Mol Cancer* **5**: 13.
101. Saiki M, Hatta Y, Yamazaki T, et al. (2006) Pioglitazone inhibits the growth of human leukemia cell lines and primary leukemia cells while sparing normal hematopoietic stem cells. *Int J Oncol* **29**(2): 437-43.
102. Sandouk T, Reda D, Hofmann C (1993) The antidiabetic agent pioglitazone increases expression of glucose transporters in 3T3-F442A cells by increasing messenger ribonucleic acid transcript stability. *Endocrinology* **133**(1): 352-9.
103. SANDOZ. Fenofibrat Sandoz (R) 200 mg Hartkapseln - Fachinformation, 2003.
104. Sarraf P, Mueller E, Jones D, et al. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* **4**(9): 1046-52.
105. Sato H, Ishihara S, Kawashima K, et al. (2000) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists. *Br J Cancer* **83**(10): 1394-400.
106. Sato Y, Sasaki H, Kobayashi Y, et al. (2003) Expression of PPAR-gamma is correlated with the clinical course of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* **38**(2): 205-10.
107. Seargent JM, Yates EA, Gill JH (2004) GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol* **143**(8): 933-7.
108. Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, et al. (2002) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate* **51**(2): 108-16.
109. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J (2007) Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *J Cell Physiol* **212**(1): 1-12.
110. Servidei T, Morosetti R, Ferlini C, et al. (2004) The cellular response to PPARgamma ligands is related to the phenotype of neuroblastoma cell lines. *Oncol Res* **14**(7-8): 345-54.
111. Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A (2002) Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* **50**(5): 658-64.

112. Soroceanu MA, Miao D, Bai XY, Su H, Goltzman D, Karaplis AC (2004) Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. *J Endocrinol* **183**(1): 203-16.
113. Syversen U, Stunes AK, Gustafsson BI, et al. (2009) Different skeletal effects of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha agonist fenofibrate and the PPARgamma agonist pioglitazone. *BMC Endocr Disord* **9**: 10.
114. Takenokuchi M, Saigo K, Nakamachi Y, et al. (2006) Troglitazone inhibits cell growth and induces apoptosis of B-cell acute lymphoblastic leukemia cells with t(14;18). *Acta Haematol* **116**(1): 30-40.
115. Tencer L, Burgermeister E, Ebert MP, Liscovitch M (2008) Rosiglitazone induces caveolin-1 by PPARgamma-dependent and PPRE-independent mechanisms: the role of EGF receptor signaling and its effect on cancer cell drug resistance. *Anticancer Res* **28**(2A): 895-906.
116. Terasaki T, Kyo S, Takakura M, et al. (2004) Analysis of telomerase activity and telomere length in bone and soft tissue tumors. *Oncol Rep* **11**(6): 1307-11.
117. Toyoda M, Takagi H, Horiguchi N, et al. (2002) A ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer cells. *Gut* **50**(4): 563-7.
118. Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, et al. (2000) Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **270**(2): 400-5.
119. Urbanska K, Pannizzo P, Grabacka M, et al. (2008) Activation of PPARalpha inhibits IGF-I-mediated growth and survival responses in medulloblastoma cell lines. *Int J Cancer* **123**(5): 1015-24.
120. Valentiner U, Carlsson M, Erttmann R, Hildebrandt H, Schumacher U (2005) Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma have inhibitory effects on growth of human neuroblastoma cells in vitro. *Toxicology* **213**(1-2): 157-68.
121. van Valen F, Hanenberg H, Jurgens H (1994) Expression of functional very late antigen-alpha 1, -alpha 2, -alpha 3 and -alpha 6 integrins on Ewing's sarcoma and primitive peripheral neuroectodermal tumour cells and modulation by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Cancer* **30A**(14): 2119-25.
122. van Valen F, Kentrup-Lardong V, Truckenbrod B, Rube C, Winkelmann W, Jurgens WW (1997) Regulation of the release of tumour necrosis factor (TNF)alpha and soluble TNF receptor by gamma irradiation and interferon gamma in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumour cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **123**(5): 245-52.
123. van Valen F, Prior R, Wechsler W, Jurgens H, Schafer U, Keck E (1988) [Immunocytochemical and biochemical studies of an Ewing sarcoma cell line: evidence for neural differentiation in vitro]. *Klin Padiatr* **200**(3): 267-70.
124. Verspohl EJ, Weiland F (2002) [Against insulin resistance. Insulin sensitizers]. *Pharm Unserer Zeit* **31**(3): 280-92.

125. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**(7): 5241-8.
126. Voigt A, Hartmann P, Zintl F (2000) Differentiation, proliferation and adhesion of human neuroblastoma cells after treatment with retinoic acid. *Cell Adhes Commun* **7**(5): 423-40.
127. Wajant H (2003) Targeting the FLICE Inhibitory Protein (FLIP) in cancer therapy. *Mol Interv* **3**(3): 124-7.
128. Yamaguchi K, Cekanova M, McEntee MF, et al. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor ligand MCC-555 suppresses intestinal polyps in ApcMin/+ mice via extracellular signal-regulated kinase and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent pathways. *Mol Cancer Ther* **7**(9): 2779-87.
129. Yin F, Wakino S, Liu Z, et al. (2001) Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun* **286**(5): 916-22.
130. Yu W, Chen Z, Zhang J, et al. (2008) Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem* **310**(1-2): 11-8.
131. Zang C, Liu H, Posch MG, et al. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leuk Res* **28**(4): 387-97.
132. Zang C, Liu H, Waechter M, et al. (2006) Dual PPARalpha/gamma ligand TZD18 either alone or in combination with imatinib inhibits proliferation and induces apoptosis of human CML cell lines. *Cell Cycle* **5**(19): 2237-43.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-binding Cassette Transporter
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat
ATRA	All trans-retinoic Acid
CI	Kombinationsindex
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonuclein-Acid
EWS	Ewing Sarkom
FAB	French-American-British-Group: nach dem Konsens dieser Arbeitsgruppe wird die AML subklassifiziert (M0-M7).
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (engl.: hepatocellular Carcinoma)
KLF2	Krüppel-like factor 2
mRNA	Messenger Ribonuclein Acid
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MB	Medulloblastom
MTT	3[4,5- Dimethylthiazol-2 yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NB	Neuroblastom
NSCLC	Non-small cell lung cancer = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom

OS	Osteosarkom
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PC	Personal Computer
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
PPRE	PPAR-Response-Elements
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RGZ	Rosiglitazon
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonuclein Acid
RXR	Retinoid-X-Receptor
Tab.	Tabelle
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

7. Lebenslauf

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Boos danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens und für seine wertvollen Anregungen.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. C. Lanvers-Kaminsky für ihre stetige und engagierte Betreuung zu jeder Zeit, für die Beratung bei der Datenauswertung und ebenfalls für viele wertvolle Anregungen.

Außerdem danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Funktionsbereiches „Klinische Pharmakologie“ der Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Münster unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. C. Lanvers-Kaminsky. Insbesondere zu erwähnen sind hier Frau S. Schulz und Frau P. Schulze-Westhoff für die kompetente Einarbeitung in die laborspezifischen Abläufe und für die kontinuierliche Unterstützung während des praktischen Teils meiner Arbeit.

Ich danke ferner Herrn Dr. rer. nat. F. van Valen aus der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Münster für die Bereitstellung der Ewing-Sarkom-Zelllinien STA-ET1, STA-ET-2.1 und VH-64. Für die Bereitstellung von SHEP-SF, OST und MNNG-HOS danke ich Herrn Prof. Dr. C. Poremba aus dem pathologischen Institut der Universität Düsseldorf sowie für Bereitstellung der Zelllinie UW228.2 Herrn Prof. Dr. Dr. M. Frühwald aus der Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie am UKM.