



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Expression der Sulfotransferase SULT 1E1 in benignen und
malignen Knochentumoren

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Marlies Pusman
Matrikel-Nummer:	9803949
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger

Wien, im November 2008

Der experimentelle Teil dieser Arbeit fand im Zeitraum von September 2005 bis März 2006 im Department für klinische Pharmazie und Diagnostik in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathophysiologie des Allgemeinen Krankenhauses Wien (Vorstand: Univ. Prof. Dr. Erika Jensen-Jarolim) statt.

Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Theresia Thalhammer (Institut für Pathophysiologie, MUW), möchte ich für ihre Bemühungen und ihre freundliche Unterstützung danken. Ich danke ihr auch dafür, dass sie mir das Arbeiten am Institut für Pathophysiologie ermöglicht hat.

Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger möchte ich für seine hilfsbereite Unterstützung und stets freundliche Betreuung danken.

Herrn Mag. Martin Svoboda danke ich dafür, dass er mir stets geduldig mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und mir bei der praktischen Arbeit wertvolle Hilfe geleistet hat.

Bei meiner lieben Arbeitskollegin und Freundin Lena Secky bedanke ich mich ganz besonders für die sehr harmonische und produktive Zusammenarbeit.

Ich möchte mich bei meinem Vater und seiner Lebensgefährtin für die moralische und finanzielle Unterstützung bedanken.

Meinem Freund Clemens Wehrberger und seinen Eltern möchte ich für die geduldige und liebevolle Unterstützung danken.

1	PROBLEMSTELLUNG	8
2	EINLEITUNG.....	9
2.1	Knochentumoren	9
2.1.1	Tumorähnliche Knochenläsionen	9
2.1.1.1	Benigne Knochenläsionen	10
2.1.1.2	Maligne Knochenläsionen	10
2.1.2	Benigne primäre Tumore des Skelettsystems	11
2.1.3	Maligne primäre Tumore des Skelettsystems.....	12
2.1.4	Maligne, sekundären Knochentumoren.....	14
2.2	Estrogen	14
2.2.1	Bildung und Sekretion	14
2.2.2	Wirkmechanismus der Estrogene	14
2.2.3	Estrogen und Knochen.....	15
2.2.4	Estrogen und die Blutgerinnung	16
2.2.5	Estrogene und das Herz-Kreislauf-System	17
2.2.6	Estrogene und der Lipidstoffwechsel	17
2.2.7	Weitere Estrogenwirkungen	17
2.3	Biotransformation	18
2.3.1	Phase-I-Reaktion	18
2.3.2	Phase-II-Reaktion	19
2.4	Sulfotransferasen	19
3	MATERIAL UND METHODEN	22
3.1	Gesamt-RNA Isolierung aus Gefriergewebeproben	22
3.1.1	Vorbereitung.....	22
3.1.2	Homogenisierung	23
3.1.3	Phasentrennung.....	23

3.1.4	RNA-Präzipitation.....	24
3.2	RNA-Gehalt-Vermessung.....	24
3.2.1	Durchführung	25
3.3	Reverse Transkription	25
3.3.1	Ribonukleinsäuren (RNS, Ribonucleinacids RNA).....	25
3.3.2	Prinzip	26
3.3.3	Durchführung	28
3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
3.4.1	Prinzip	29
3.4.2	Durchführung	32
3.5	Gelelektrophorese	33
3.5.1	Prinzip	33
3.5.2	Durchführung	35
3.6	Statistische Auswertung	35
4	ERGEBNISSE.....	36
4.1	Probenauswahl.....	36
4.2	Demographische Daten der Patienten	36
4.3	Häufigkeiten der Tumoren	36
4.3.1	Tumorart.....	37
4.3.1.1	primäre Knochentumore.....	37
4.3.1.2	Sekundäre Knochentumore – Knochenmetastasen	38
4.4	mRNA Expression von β -Actin	39
4.5	Expression von SULT 1E1 in Knochentumoren.....	40
4.5.1	Primäre Knochentumore	42
4.5.2	Metastasen.....	43
5	DISKUSSION	44
6	ZUSAMMENFASSUNG	47

7	LITERATURVERZEICHNIS	48
8	CURRICULUM VITAE.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Knochenabbauhemmende Arzneistoffe und ihre Angriffsorte an Osteoblasten und Osteoklasten³⁵

Abbildung 2: Transkription der DNA zu mRNA und von mRNA zu Proteinen⁵³

Abbildung 3: Herstellung von cDNA durch Behandlung von mRNA mit reverser Transkriptase⁵⁶

Abbildung 4: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die PCR⁵⁸

Abbildung 5: Häufigkeiten der Tumore

Abbildung 6: Aufteilung der primären Knochentumore

Abbildung 7: β -Actin Expression

Abbildung 8: SULT 1E1 mRNA Expression

Abbildung 9: Häufigkeit der Expression von SULT 1E1 in den unterschiedlichen Tumorarten

Abbildung 10: Expression von SULT 1E1 in Metastasen

Abbildung 11: Intratumoraler Estrogenmetabolismus⁶⁴

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die SULT Isoenzyme, Expressionorte, Substrate und Funktion der zytosolischen Sulfotransferasen⁵⁰

Tabelle 2: SULT 1E1 Expression in Primärtumoren und Metastasen

Tabelle 3: Aufteilung der Expression von SULT 1E1 nach Dignität

Tabelle 4: Häufigkeiten der primären Knochentumore und ihre SULT 1E1 mRNA Expression

1 PROBLEMSTELLUNG

Primäre Neoplasien des Knochens sind seltene Erkrankungen. Maligne Knochentumore treten noch seltener auf und betreffen weniger als 1% aller bösartigen Geschwülste. Typischerweise treten 2/3 der Knochentumore beim Jugendlichen in der Wachstumsphase auf. Beim älteren Menschen überwiegen bei weitem metastatische Absiedlungen in den Knochen.

Estrogen hat einen anabolen Einfluss auf das Knochenwachstum. Über Stimulation von Osteoblasten und Hemmung von Osteoklasten wird die Homöostase zwischen Knochenauf- und -abbau in Richtung Knochenwachstum beeinflusst.

Über Stimulation der Zellproliferation fördert Estrogen nicht nur das Zellwachstum in physiologischem Gewebe, sondern beeinflusst auch das Tumorwachstum positiv. Es wird vermutet, dass einerseits über Aktivierung von Osteoblasten und andererseits über Förderung der Neoangiogenese die Tumorzellproliferation vorangetrieben wird.

Sulfotransferasen (SULTs) sind cytosolische Enzyme, die Sulfonylgruppen übertragen. Bedeutung haben diese Enzyme in der Phase-II-Biotransformation, bei der endogene Stoffe oder aber auch Arzneimittel verstoffwechselt werden. Zurzeit sind bereits 11 humane Sulfotransferasen bekannt, die oft nach ihren Substraten benannt werden. Ziel dieser Arbeit war, anhand von 65 Proben verschiedener Knochentumore die Expression von SULT 1E1 zu untersuchen. Dabei sollten sowohl benigne und maligne primäre Knochentumore, wie auch metastatische Absiedlungen in den Knochen von Tumoren anderer Organe auf das Vorhandensein von SULT 1E1 analysiert werden.

2 EINLEITUNG

2.1 Knochentumoren

Knochentumoren sind Neubildungen im Bereich des Knochens und haben im Vergleich zu anderen Neoplasien eine relativ geringe Inzidenz - nur ca 1% aller malignen Tumoren betrifft den Knochen¹. Klinisch werden sie in primäre Knochentumoren, die vom Knochen selbst ausgehen, sekundäre Knochentumoren, die Metastasen von malignen Tumoren sind, und tumorähnliche Knochendefekte mit intraossärer Raumforderung eingeteilt. In der Gruppe der primären Knochentumoren kann man wiederum benigne, langsam wachsende und differenzierte Neoplasien, wie zum Beispiel das Chordom oder das Osteochondrom, von semimalignen, destruktiv wachsenden Knochentumoren, die jedoch keine Metastasierungstendenz zeigen (benigner Riesenzelltumor), und den malignen bzw. hochmalignen Knochentumoren unterscheiden. Zur letzten Gruppe, die durch rasches Wachstum und frühe Tumorabsiedlung charakterisiert ist, zählt das Ewing- und das Osteosarkom. Die Knochenmetastasen teilt man in osteoplastische Metastasen mit Knochenneubildung – zum Beispiel Sekundärbastome von Mamma- oder Prostatakarzinom – und osteoklastische bzw. osteolytische Metastasen mit Knochenabbau auf. Typische Vertreter dieser Metastasenform sind Bronchus-, Nierenzell- und Schilddrüsenkarzinom. Die dritte Gruppe von Knochentumoren stellen die tumorähnlichen Knochenneubildungen dar. Hier sind als Beispiel das Knochenhämangiom und Knochenzysten zu erwähnen.

Nach ihrem histologischen Bild werden Knochentumore² gemäß der WHO-Klassifikation eingeteilt, eine Auswahl ist im Folgenden beschrieben:

2.1.1 Tumorähnliche Knochenläsionen

Obwohl Patienten allen Alters von gutartigen und bösartigen primären Knochenläsionen betroffen sind, zeigt sich ein Häufigkeitsgipfel bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen.³

2.1.1.1 Benigne Knochenläsionen

- Myositis ossificans

Hier handelt es sich um Läsionen des Weichteilgewebes, die oft durch ein Trauma verursacht werden und nicht-neoplastische Veränderungen – meist an Muskeln, Sehnen oder Bändern der oberen Extremität - hervorrufen. Durch Proliferation von Bindegewebe kommt es zur Bildung von neuem Knochen und Knorpel.^{4,5,6}

- Nicht ossifizierendes Knochenfibrom

Diese Tumorart besteht aus fibrösem Gewebe, das durch eine lokale Wachstumsstörung verursacht wird. Sie tritt vor allem im 2. Lebensjahrzehnt auf und nimmt in der Regel einen gutartigen Verlauf.⁷

2.1.1.2 Maligne Knochenläsionen

- Aneurysmatische Knochenzyste

Diese Zysten sind verdrängende, osteolytische Läsionen mit blutgefüllten Höhlen unterschiedlicher Größe und einer dünnen Membran, die oft Bindegewebe oder Knochenbälkchen und osteoklastische Riesenzellen enthalten. Diese Erkrankung betrifft vorwiegend junge Erwachsene im 2. Lebensjahrzehnt, Frauen doppelt so häufig wie Männer. Die Prädispositionsstellen sind die langen Röhrenknochen der unteren Extremität, selten können sie jedoch auch in der oberen Extremität und in den restlichen knöchernen Strukturen auftreten.

Meist entstehen aneurysmatische Knochenzysten posttraumatisch oder wegen erhöhten lokalen Venendrucks nach Einblutung. Da sie jedoch auch als Sekundärläsionen entstehen können, muss eine histologische Abklärung angestrebt werden. In den häufigsten Fällen sind Riesenzell-Tumore, Osteoblastome, Angiome oder Chondroblastome als Primum zu finden, selten kann jedoch auch eine fibröse Dysplasie, Chondromyxofibrom oder ein Osteosarkom die primäre Läsion sein.⁸

2.1.2 Benigne primäre Tumore des Skelettsystems

- Chondrom

Das Chondrom ist ein sehr häufig vorkommender gutartiger Tumor - 12% aller Tumore und 25% der gutartigen Tumore sind Chondrome. Im Unterschied zum Chondrosarkom bildet der reife Knorpel keine histologischen Charakteristika wie Zellreichtum, Pleiomorphie der Zellen und Anwesenheit von großen Zellen mit Doppelkernen und Mitosen aus. Die Altersgipfel liegt vor allem zwischen der 2. und 5. Dekade.⁹

- Riesenzelltumor des Knochens (Osteoklastom)

Mit 4-5% aller primären Knochentumoren und 18% aller benignen Knochentumoren ist der Riesenzelltumor relativ häufig, der Gruppe der 25 bis 40-jährigen sogar der häufigste. Der Riesenzelltumor tritt typischerweise in langen Knochen (distaler Femur, proxilame Tibia, distaler Radius) im Epiphysenbereich auf und ist charakterisiert durch ein solitäres Auftreten und ein lokal aggressives Wachstum. Einige Autoren wie Cheng und Johnson vertreten die Meinung, dass eine Metastasierung in die Lungen stattfinden kann.¹⁰ Diese Tatsache hat jedoch noch nicht restlos geklärt und hat bislang noch keine Auswirkung auf die Klassifikation gehabt.

Vom histologischen Bild her handelt es sich um einen aggressiven Tumor mit starker Vaskularisierung, der aus kollagenarmem Gewebes aufgebaut ist und aus spindelförmigen und ovalen Zellen sowie reichlich Riesenzellen vom osteoklastischen Typ besteht.^{11, 12}

- Fibromatosen

Unter Fibromatosen versteht man gutartige Bindegewebeneubildungen, die infiltraiv wachsen und nicht scharf abgrenzbar sind. Rezidive sind sehr häufig, sie neigen jedoch nicht zur Metastasierung.¹³

2.1.3 Maligne primäre Tumore des Skelettsystems

- Chondrosarkom

Das Chondrosarkom ist ein maligner Tumor, der, wenn er sich aus ortsständigem Knorpelgewebe entwickelt, primäres Chondrosarkom genannt wird und vor allem Kinder betrifft. Das sekundäre Chondrosarkom geht aus einer zunächst gutartigen Knorpelgeschwulst hervor.

Das Chondrosarkom unterscheidet sich von einem Chondrom durch stärkeren Zellreichtum und Pleiomorphie sowie durch das Vorkommen von plumpen Zellen mit großen Kernen und/oder deutlicher Doppelkernzahl, Mitosen und Zellatypien. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 5. und 7. Lebensjahrzehnt.^{14,15}

- Osteosarkom

Das Osteosarkom ist der häufigste primär-maligne Knochentumor (36%) und ist charakterisiert durch sehr aggressives Wachstum und frühe Metastasierung.¹⁶ Histologisch besteht der Tumor aus polymorphen Osteoid- oder Knochen-bildenden Zellen. Typischerweise betrifft dieser Tumor männliche Jugendliche und junge Erwachsene im Alter zwischen 15 und 25 Jahren. Ab dem 60. Lebensjahr kann sich das Osteosarkom in Form des Paget-Sarkoms zeigen. Auch wenn der Tumor rechtzeitig erkannt und operativ entfernt sowie mit aggressiver Chemotherapie behandelt wird, liegt die Rezidivrate dennoch bei 30%.¹⁷

Es sind mittlerweile zahlreiche verschieden Formen des Osteosarkomen bekannt, das conventional Osteosarkom ist mit 75-85% am häufigsten.¹⁸

- Ewing-Sarkom

Das Ewing-Sarkom macht circa 5% aller Knochentumoren aus und ist der häufigste Tumor des Kindes- und Jugendalters bis zu einem Alter von 15 Jahre. Ausgehend von undifferenzierten Mesenchymzellen des Knochenmarks betrifft das Ewing-Sarkom, das ein primitiver neuroektodermaler Tumor ist, vor allem die Metaphysen- und Diaphysenregion von Femur, Tibia und Humerus. Metastasen finden sich früh in

der Lunge. Im Vergleich zum Osteosarkom besteht jedoch eine hohe Strahlensensibilität, wodurch die Prognose deutlich verbessert wird.¹⁹

- Plasmozytom (Plasmazellmyelom, Morbus Kahler, multiples Myelom)

Das Plasmozytom ist ein maligner Tumor, der von den Plasmazellen des Knochenmarks ausgeht und prinzipiell jeden Knochen mit Blut bildendem rotem Knochenmark befallen kann, meist sind jedoch Wirbelsäule, Schädel, Rippen oder das Sternum betroffen. Die Tumordinfiltration kann lokalisiert oder diffus stattfinden, mit Knochendestruktion einhergehen und zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung führen. Im Blut ist eine monoklonale Gammopathie nachweisbar und im Urin findet man das Bence Jones Protein. Ablagerungen von Amyloid oder Paraamyloid sind sowohl im Tumor sowie in anderen Organen typisch. Ältere männliche Erwachsene im 6. und 7. Lebensjahrzehnt sind doppelt so häufig betroffen, als Frauen.^{20,21}

- Fibrosarkom

Das Fibrosarkom ist ein sehr seltener maligner Tumor, der meist vom Bindegewebe des Knochenmarks und selten vom Periost ausgeht. Destruktives Tumorwachstum, Durchbrüche durch die Kortikalis, Nekrosen und Blutungen sowie pathologische Frakturen kennzeichnen das Fibrosarkom. Spindelförmige Zellen bilden ein Geflecht von Kollagenfasern, das Kollagenmatrix, aber kein Osteoid oder Chondroid bildet.²²

- Leiomyosarkom

Das Leiomyosarkom geht von der glatten Muskulatur aus und hat einen Altersgipfel bei 60 Jahren, tritt aber gewöhnlich erst nach dem 30. Lebensjahr auf. Bekannt ist das Leiomyosarkom aus der Gynäkologie, wo es für eine rasche Uterusvergrößerung mit Blutungen verantwortlich ist. Leiomyosarkome können prinzipiell jedoch im gesamten Körper auftreten, so auch im Knochen. Kommt es zur malignen Entartung, findet man rasches Wachstum und hämatogene Metastasierung.²³

2.1.4 Maligne, sekundären Knochentumoren

Knochenmetastasen sind Absiedlungen eines Primärtumors in den Knochen. Die Ausbreitung von Skelettmetastasen geschieht fast immer auf hämatogenem Wege, eine lymphogene Ausbreitung spielt keine wesentliche Rolle. Die häufigsten metastasierenden Organtumoren entstehen in Bronchien, Nieren, Prostata, Schilddrüse, Mamma, Uterus, Magen und Haut. Knochenmetastasen können osteoblastisch, osteoklastisch oder als Mischform in Erscheinung treten. Sie machen etwa 16% aller Metastasen aus und sind zu 60% in der Wirbelsäule lokalisiert.²⁴

2.2 Estrogen

2.2.1 Bildung und Sekretion

Estrogene sind - wie Gestagene und Androgene - Steroidhormone, die vorwiegend im Ovar und in der Plazenta, jedoch auch in geringen Mengen in den Nebennieren und im Hoden gebildet werden. Die Biosynthese der Estrogene findet in den Theka- und Granulosazellen des Ovars statt. Luteinisierendes Hormon (LH) führt in den Thekazellen zur Testosteron Synthese und daraus wird in den Granulosazellen unter FSH-Einfluß und mit dem Enzym Aromatase das Estradiol.

Durch Aromatisierung von Androgenen im Fettgewebe können auch Estrogene entstehen. Sie regulieren zusammen mit den Gestagenen biologische Prozesse wie die Embryonalentwicklung, die neuroendokrine Steuerung, zentrale metabolische Vorgänge, die Fertilität, die Implantation einer Embryonalanlage und die Ausprägung der sekundär weiblichen Geschlechtsmerkmale.^{25, 26}

2.2.2 Wirkmechanismus der Estrogene

Steroidhormone diffundieren durch die Doppellipidmembran ins Zellinnere und binden an die Estrogenrezeptoren (ER) vom Subtyp α oder β ²⁷. Für die Bindung sind sowohl die aromatische Struktur von Ring A, als auch die Hydroxylgruppe an C-3 essentiell. ER α findet man vor allem in Ovar, Uterus, Brustdrüse und Hypothalamus.

ER β wird hauptsächlich im Knochen, der Prostata, im Ovar sowie in Lunge, Gehirn und im Gefäßsystem exprimiert. Hitzeschockproteine stabilisieren den Rezeptor im inaktiven Zustand und lösen sich aus der Bindung. Die ligandenbesetzten Estrogenrezeptoren bilden Dimere aus und binden an das Estrogen-Responsive-DNA-Element, wodurch die Transkription eingeleitet wird.²⁸

2.2.3 Estrogen und Knochen

Estrogene wirken wie auch die Androgene proteinanabol.²⁹ Estrogene fördern die Resorption und den Einbau von Calcium und verringern die Anzahl sowie die Aktivität der Osteoklasten. Dies erklärt unter anderem, warum durch das Hormondefizit in der Menopause bei Frauen Osteoporose auftritt.³⁰ Durch die Estrogene kommt es in den Osteoblasten zu einer Verschiebung des Zytokinmusters von Osteoklasten-aktivierenden Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α) hin zu antiresorptiven Faktoren (IGF-1, BMP-6, TGF- β).³¹ Es wird die Bildung von Osteoprotegerin (OPG) induziert, dies fungiert - als ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-Familie - als löslicher Rezeptor und kompetitiver den RANK-Liganden (RANKL), der von Osteoblasten gebildet wird. RANKL bindet an den Rezeptor RANK (receptor activator of NF- κ B“) und leitet die Proliferation und Reifung der Osteoklasten ein.³² In Gegenwart von Osteoprotegerin wird die Differenzierung und Aktivierung gehemmt, und auch das Überleben der Osteoklasten verringert.³³ Estrogene wirken am Knochen antiresorptiv und sind bei beiden Geschlechtern am Knochenwachstum und Epiphysenschluß beteiligt.³⁴

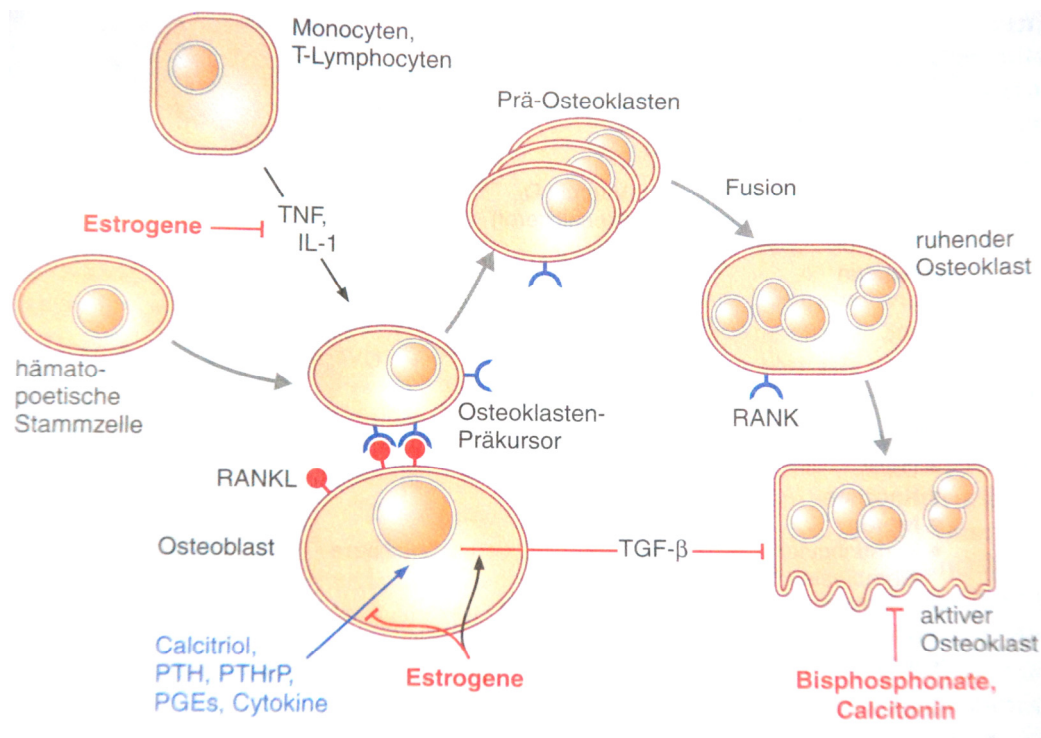


Abbildung 1: Knochenabbauhemmende Arzneistoffe und ihre Angriffsorte an Osteoblasten und Osteoklasten. Aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen zuerst Osteoklasten-Präkursorzellen und Präosteoklasten und dann durch Fusion die Osteoklasten. Knochenresorptive Substanzen (z.B: Calcitriol, Parathormon (PTH), PTH-related Peptide (PTHrP), Prostaglandin E (PGE) und Zytokine wie Interleukin (IL) 6 und IL 11) wirken auf Osteoblasten und stimulieren die Bildung des RANKL. RANKL bindet am RANK Rezeptor auf der Oberfläche des Osteoklasten und stimuliert dessen Reifung und Aktivierung. Die rot dargestellten Arzneistoffe hemmen die Funktion der Osteoklasten direkt, aber auch wie die Estrogene antiresorptiv durch Freisetzung des Tumornekrose Faktors β (TNF β) oder durch hemmen der Wirkung der resorptiven Faktoren. Es ist bekannt, dass chronische Entzündungen, aber auch manche Tumoren mit dem Abbau des Knochens einhergehen.³⁵

2.2.4 Estrogen und die Blutgerinnung

Estrogene wirken prokoagulatorisch durch eine vermehrte Produktion von Fibrinogen sowie der Gerinnungsfaktoren VII, VIII, X und XII, weiters fallen die Spiegel der gerinnungshemmenden Proteine wie Protein C, S und Antithrombin III. Die fibrinolytische Aktivität wird verstärkt über eine erniedrigte Bildung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-I). Aus diesem Grund führt eine Störung des

estrogenabhängigen Gleichgewichts zwischen fibrinolytischen und prokoagulatorischen Faktoren zu Nebenwirkungen.³⁶

2.2.5 Estrogene und das Herz-Kreislauf-System

Kleine Blutgefäße werden über eine gesteigerte Produktion von NO in der Gefäßwand durch Estrogen erweitert und der Gefäßwiderstand sinkt. Eine Einnahme über längere Zeit kann zu einer Abnahme des Renin Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), Endothelin-I und einer Verringerung der AT₁-Angiotensin-Rezeptoren führen, dies begünstigt zusätzlich die blutdrucksenkende Wirkung. Es wird aber reaktiv mehr Angiotensinogen in der Leber synthetisiert.³⁷

2.2.6 Estrogene und der Lipidstoffwechsel

Serumtriglyceride und HDL werden leicht erhöht und der LDL-Spiegel gesenkt, somit ein antiatherogener Effekt erreicht. Das Risiko einer Cholecystolithiasis wird unter Estrogeneinfluss möglicherweise erhöht, da die Cholesterinausscheidung in die Gallenflüssigkeit gesteigert wird.³⁸

2.2.7 Weitere Estrogenwirkungen

Nüchtern-Blutzuckerwerte und die Insulinkonzentration werden günstig beeinflusst.³⁹

Estrogene vermindern die Talgproduktion, über Hemmung der Proliferation von Talgzellen und haben dadurch einen positiven Einfluss auf die Haut.

Die Bildung von Serotonin-Rezeptoren wird erhöht und auch ein positiver Effekt auf die Stimmung wurde beobachtet.⁴⁰

2.3 Biotransformation

Die Aufgaben der Biotransformation sind Entgiftung, Inaktivierung, Umwandlung und Ausscheidung von Fremdstoffen.

Apolare, lipophile Verbindungen können nur schlecht oder nicht ausgeschieden werden. Die Biotransformation wandelt diese Substanzen in polare, wasserlösliche Verbindungen um, damit sie über den Harn oder die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden können. Diese Substanzen teilt man in Endobiotica, körpereigene oder endogen entstandene Substanzen (z.B.: Steroidhormone) oder Xenobiotica, körperfremde Substanzen (z.B.: Arzneistoffe), ein.

Solche Reaktionen finden in fast allen Geweben statt, wie Darm, Niere, Milz, Lunge, Blut und Haut. Vor allem aber in der Membran des glatten endoplasmatischen Reticulum der Leber, das besonders reich an Enzymen für Biotransformationsreaktionen ist.

Im Zytosol sind lösliche Enzyme vertreten (Esterasen, Amidasen, Sulfotransferasen), die wenig substratspezifisch sind.⁴¹

2.3.1 Phase-I-Reaktion

Die Aufgabe der Phase I Reaktion ist es lipophile Substanzen hydrolytisch, oxidativ oder reduktiv zu verändern.

Enzyme aus der Familie der Monooxygenasen stellen die wichtigste Gruppe dar. Durch Anlagerung des Sauerstoffes an das Cytochrom P₄₅₀ erfolgt die Aktivierung. Auf Grund dieses Sauerstoffatoms wird hydroxyliert, O- oder N-dealkyliert oder desaminiert.

Es werden reaktive Gruppen wie OH-, NH₂-, SH- bzw. COOH-Gruppen durch chemische Modifikation gebildet.⁴¹

2.3.2 Phase-II-Reaktion

In der Phase-II der Biotransformation werden die Produkte der Phase-I-Reaktion über ihre reaktiven Gruppen mit polaren Verbindungen konjugiert.

- Kopplung mit Glucuronsäure, Glucuronide
- Sulfatierung mit aktiviertem Sulfat oder 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat, z.B: Estrogene
- Acetylierung mit Acetyl-CoA
- Kopplung von Carboxylgruppen an Aminosäuren wie Glycin, Taurin bzw. Glutamin
- Methylierung, Desaminierung oder Ausbildung von Thioethern

Das Ziel der Konjugationsreaktionen ist die Entgiftung, beziehungsweise die Bioinaktivierung, trotzdem kann es aber auch zu Giftungsreaktionen kommen.⁴¹

2.4 Sulfotransferasen

Sulfotransferasen sind Enzyme, die genetisch zu einer Superfamilie gehören und eine entscheidende Rolle in der Phase-II-Konjugationsreaktion in der Biotransformation von vielen strukturell unterschiedlichen Verbindungen spielen.⁴²

Die biologische Funktion ist die Inaktivierung und die Detoxifikation von Substanzen. SULTs übertragen Sulfonylgruppen (SO^3) von dem Kofaktor 3'-Phosphoadenin-5'-Phosphosulfat (PAPS) auf Hydroxyl-, Amino-, Sulfhydryl- und N-Oxid-Gruppe ihre Substrate. Diese Reaktion bezeichnet man als Sulfonierung, da hier in der Regel Sulfate entstehen.⁴³ Die Folge der Übertragung der Sulfo-Gruppe ist die Erhöhung der Wasserlöslichkeit und dadurch die Erleichterung der Ausscheidung über Niere und Urin.⁴⁴

Makromolekulare Substrate werden durch membrangebundene SULTs metabolisiert, während niedermolekulare exogene und endogene Substanzen – wie z.B: Katecholamine, Cholesterin, Estrogene, Androgene und Gallensäuren – durch Sulfotransferasen im Zytoplasma verstoffwechselt werden.⁴⁵

Membranassoziierte SULT befinden sich vor allem im Golgi-Apparat und katalysieren die Sulfonierung von Glycosaminoglycanen, Glycoproteinen, Proteinen und Peptiden, im Golgi-Apparat.⁴⁶ Sie spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen wie der Leukozytenadhäsion, der Antikoagulation und dem Eintritt von Viren in Zellen.⁴⁷

Zytosolische Sulfotransferasen gehören zu einer großen Genfamilie⁴⁸, deren gemeinsames Merkmal die Ähnlichkeiten in der Nukleotidsequenz ihrer Gene/cDNAs ist, sie werden weiter in die Subfamilien 1A, 1B, 1C, 1E, 2A, 2B, und 3A eingeteilt. In der Vergangenheit gab es keine einheitliche Nomenklatur, sodass für das gleiche Gen bzw. Protein verschiedene Bezeichnungen geführt worden sind. Eine einheitliche Namensgebung findet sich auf der www.ihop-net.org SULT Page und bei www.Wikigenes.org.

Bislang sind elf verschiedenen humane SULTs bekannt.

Die Einteilung nach Isoenzym, Substrat, Expressionsort und Funktion der zytosolischen Sulfotransferasen sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die SULT Isoenzyme, Expressionsorte, Substrate und Funktion der zytosolischen Sulfotransferasen.⁴⁹

Isoenzym	Substrat	Expressionsort	Funktion
SULT 1A1	17 β -Estradiol, Estron, Monocyclische Phenole (Genistein)	Leber, Thrombozyten	Phenol-sulfierende SULT
SULT 1A2	2-Naphthol, p-Nitrophenol	Leber	thermostabile Phenol-SULT
SULT 1A3	Katecholamin, 2-Hydroxy-17 β -Estradiol	Leber, Darm, Thrombozyten	Katecholamin-Sulfat-übertragende Phenol-SULT, thermolabile Phenol-SULT
SULT 4A1	Neurotransmitter	Gehirn	Neuromodulation von verschiedenen Neurotransmittern und Arzneistoffen
SULT 1B1	Diethylstilbestrol	Kolon, Leber, Darm, Milz, Leukozyten, Schilddrüse	Throidhormon SULT

Tabelle 1: Fortsetzung

SULT 1C1	p-Nitrophenol	fetale Leber, Niere, Magen, Schilddrüse	
SULT 1C2	p-Nitrophenol	fetale Lunge Niere und Herz, Niere, Ovar, Rückenmark	
SULT 1E1	17 β -Estradiol, Estron, Pregneninolon, monocyclische Phenole	Leber, Dünndarm, Endometrium	Estrogen-SULT
SULT 2A1	DHEA, Epiandrosteron, Testosterone, 17 β -Estradiol, Cholesterin, Gallensäuren, Pregneninolone	Leber, Nebenniere, Dünndarm	Hydroxysteroid- oder DHEA-SULT
SULT 2B1a	DHEA	Leber, Plazenta, Prostata, Lunge	Hydroxysteroid-SULT
SULT 2B1b	DHEA	Haut	Hydroxysteroid-SULT

Es kann jedoch bei kationischen Sulfokonjugaten von Benzyl- und aliphatischen Alkoholen, Alkylbenzenen, aromatischen Aminen und Amiden, heterozyklischen aromatischen Aminen und polynuklären Kohlenwasserstoffen durch SULT auch zur Aktivierung von Präkanzerogenen kommen, da diese labile Zwischenprodukte bilden, die mit der DNA reagieren.^{50,51}

3 MATERIAL UND METHODEN

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden Präparate von Knochentumoren, die dankenswerter Weise von der Universitätsklinik für Orthopädie im Allgemeinen Krankenhaus Wien zur Verfügung gestellt worden sind, untersucht. Alle Proben wurden nach Einholung schriftlicher Patienteneinverständniserklärungen der Patienten gemäß den Richtlinien der medizinischen Universität entnommen.

3.1 Gesamt-RNA Isolierung aus Gefriergewebeproben

3.1.1 Vorbereitung

Die Szintillationsgefäße wurden beschriftet und anschließend das oberste Drittel abgetrennt; so wurden sie in einer Styroporbox bis zur späteren Befüllung gelagert. Die Gefriergewebeproben wurden während der gesamten Isolierung in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt, da RNA sehr temperaturempfindlich ist.

Verwendete Geräte

- Reibschlae mit Pristill
- Ultra Turrax
- Vortexer
- Tischzentrifuge
- Heizblock

Verwendete Reagentien und Materialien

- flüssiger Stickstoff
- Trizol®-Reagens (Invitrogen)
- Chloroform

- Isopropanol
- 75% Ethanol
- DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser)
- Knochentumorgefriergewebeproben

3.1.2 Homogenisierung

In einer Porzellanschale wurden die Gefriergewebeproben, die von flüssigem Stickstoff umgeben waren, mittels Pistill zu feinem Sand zerrieben, der im Anschluss in die vorbereiteten Szintillationsgefäße gefüllt worden ist. Nach Abdampfen des flüssigen Stickstoffs wurde TRIzol®Reagens zugesetzt, das bei den niedrigen Temperaturen sofort gefroren ist. Nach kurzem Auftauen bei Raumtemperatur wurde jede Probe mittels Turbomixer homogenisiert und anschließend in ein autoklaviertes 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß übergeführt. Um eventuell vorhandene Nukleoproteinkomplexe zu dissoziieren, mussten die Proben für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Im nächsten Arbeitsschritt mussten sie zehn Minuten lang gekühlt zentrifugiert (4°C/10min/12.000g) werden, um das Knochengewebe abzutrennen. Die TRIzol-Phase wurde in ein neues Eppendorf Gefäß pipettiert.

TRIzol ist eine Flüssigkeit, die aus Phenolen und Guanidinisocyanat besteht und die Isolierung von reiner, nicht degradierter RNA ermöglicht. Es kommt zur Cytolyse wodurch RNA, DNA und Proteine in Lösung gehen können. RNA ist als einziges hydrophil und trennt sich somit von der DNA und den Proteinen, die schlechter wasserlöslich sind, ab.

3.1.3 Phasentrennung

Beim nächsten Arbeitsschritt wird die Probe mit 200µl Chloroform versehen, durchgeschüttelt und anschließend einige Minuten bei Raumtemperatur im Abzug aufbewahrt. Bei der folgenden 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C/12.000g teilt sich die Probe in drei Phasen auf:

- in der oberen wässrigen Phase, die farblos ist, befindet sich die RNA
- in der schleimig-schaumigen Interphase ist die DNA zu finden
- die untere rosafärbige Phase besteht aus Chloroform und Phenol

Die obere wässrige Phase wird vorsichtig abpipettiert, ohne Kontamination mit der Interphase oder der unteren Chloroformphase, und in ein RNase freies Eppendorfgefäß überführt.

3.1.4 RNA-Präzipitation

Die obere Phase mit RNA wird sorgfältig in Isopropanol (500µl) pipettiert, durch schütteln vermischt und mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur (besser jedoch eine Stunde auf Eis oder über Nacht) inkubiert. Nach diesem Schritt bilden sich RNA-Pellets, die in der Kühlzentrifuge 15 Minuten abgetrennt werden. Isopropanol wird entfernt und durch 70%-iges Ethanol ersetzt. Das Pellet wird damit gewaschen, dann kurz „gevortext“ und wieder abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird die RNA bei 55°C getrocknet (max. 10min), in 10-20 µl sterilem Wasser gelöst und danach bei 55-60°C inkubiert und abermals suspendiert. Isolierte RNA ist bei Raumtemperatur nicht stabil und muss bei -80°C gelagert werden.

3.2 RNA-Gehalt-Vermessung

Verwendete Geräte

- Spektrophotometer

Verwendete Materialien und Reagentien

- Eppendorf Reaktionsgefäße
- Steriles Wasser

3.2.1 Durchführung

Bestimmung des RNA-Gehaltes mittels einer photometrischen Vermessung:

Dazu wurden 2 µl der Suspension mit 398 µl sterilem Wasser vermischt und gegen steriles Wasser bei einer Wellenlänge von 280nm bis 260nm vermessen. Für die Reinheit sollte der Quotient aus der Adsorption bei 260nm zur Absorption bei 280nm größer 1,6 sein (maximale Reinheit: 2,0).

Der Gehalt kann mit dieser Formel errechnet werden:

$$\text{Gehalt } \mu\text{g}/\mu\text{l} = OD_{260} * f * \text{Verdünnung pro } \mu \text{ Suspension} \\ 1000$$

OD.....optische Dichte

f.....40 µg/ml bei $OD_{260}=1$

3.3 Reverse Transkription

3.3.1 Ribonukleinsäuren (RNS, Ribonucleinacids RNA)

RNA ist ein sogenanntes Polynucleotid, eine Kette aus vielen Nucleotiden und ist im Gegensatz zur DNA meist einzelsträngig.

Die Mononukleotide der RNA bestehen aus einem Ribose-5'-Phosphat, einem Phosphatrest und einer organischen Base. Nukleobasen sind: Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil. Uracil kommt nur in RNA vor, in DNA ist stattdessen Thymin die als komplementäre Base zu Adenin. Vermutlich nutzt RNA Uracil, da dieses energetisch wemniger aufwändig herzustellen ist (keine Methyl-Substituierung).

Die Funktion der RNA ist es, die genetische Information in Proteine umzusetzen.

Man unterscheidet drei Typen von RNA mit verschiedenen Aufgaben:

- Messenger RNA (mRNA) dient als Kopie der Information der DNA und bringt sie zum Ribosom wo die Proteinbiosynthese stattfindet

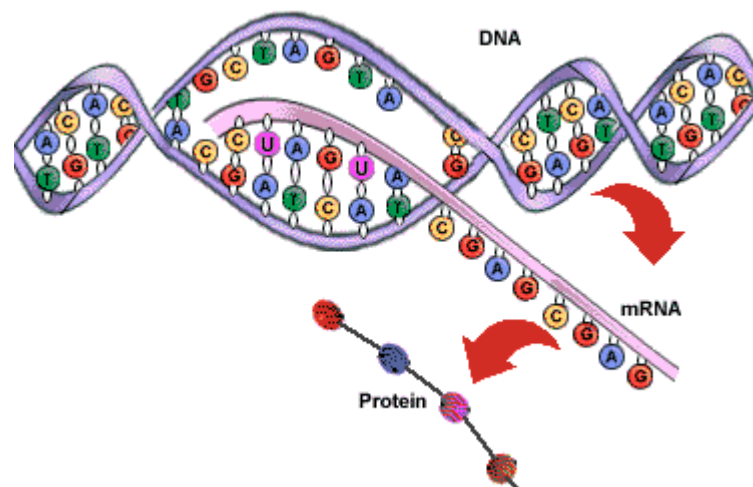


Abbildung 2: Transkription der DNA zu mRNA und von mRNA zu Proteinen. Die komplementäre mRNA wird von der DNA „abgeschrieben“ und dient als Matrize für die Proteinbiosynthese.⁵²

- Ribosomale RNA (rRNA) hilft bei der Übersetzung des Codes in die Aminosäuresequenz
- Transfer-RNA (tRNA) ist ein wichtiger Bestandteil der Ribosomen, die die Proteinbiosynthese durchführen und transportiert die einzelnen Aminosäuren aus dem Cytoplasma zum Ribosom.

Weiters fungieren Ribozyme als Katalysatoren und Regulatoren.⁵³

3.3.2 Prinzip

Die gesamte mRNA ist Ausgangsmaterial für die reverse Transkription. Mittels dem Enzym „Reverse Transkriptase“ wird diese in einen komplementären DNA-Strang (cDNA, complementary DNA) umgeschrieben, und amplifiziert, zur Identitätsprüfung oder für den Nachweis der Expression herangezogen.⁵⁴

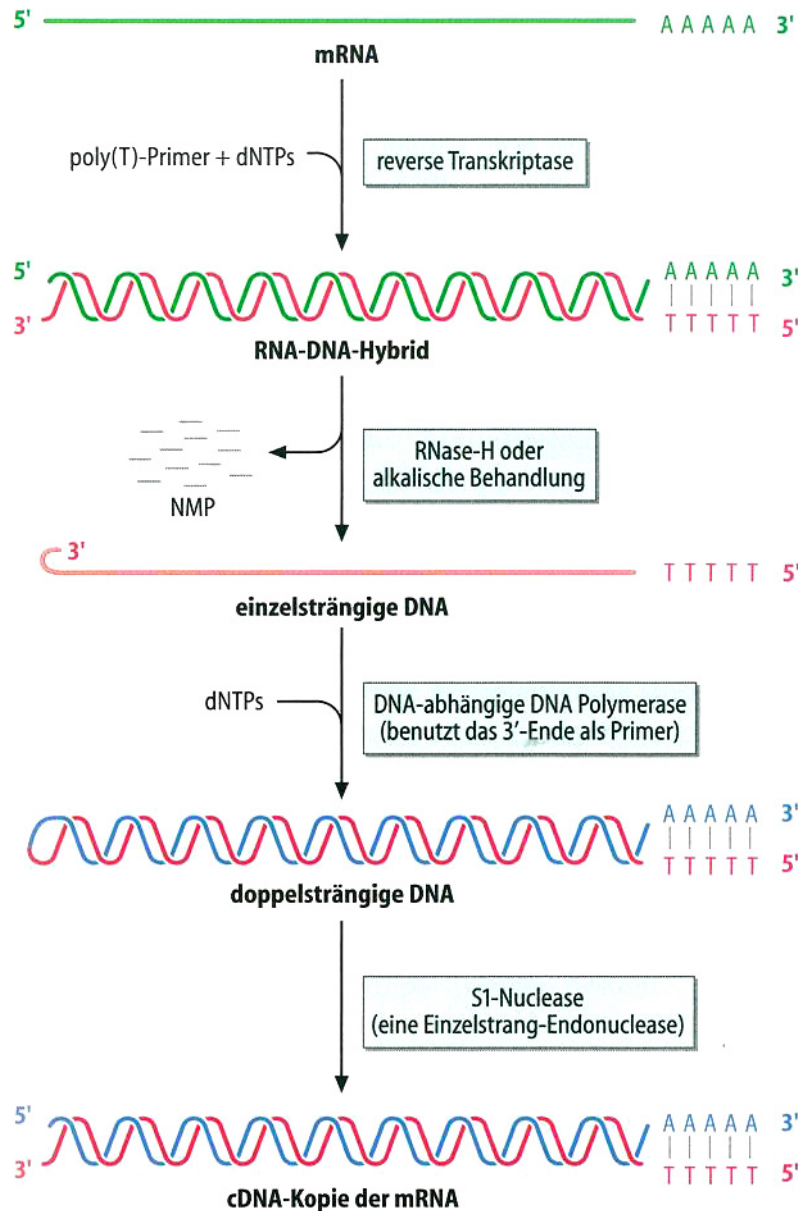


Abbildung 4: Herstellung von cDNA durch Behandlung von mRNA mit reverser Transkriptase. Die mRNA bekommt mittels Primer, dNTPs und reverser Transkriptase einen komplementären DNA-Strang (cDNA, complementary DNA). Anschließend wird dieser hydrolysiert und die reverse Transkriptase beginnt von Neuem. Die einzelsträngige cDNA wird durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase vervollständigt. So erreicht man ein Umschreiben von mRNA in cDNA und Vervielfältigung der cDNA, mit der man dann weiterarbeiten kann.⁵⁵

Verwendete Geräte

- Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Verwendete Materialien und Reagentien

- Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- DTT (Invitrogen)
- dNTP (Finnzymes, Finnland)
- RNase OUT
- SuperscriptTMII (Invitrogen)
- 5x First Strand Buffer (Invitrogen USA)
- Steriles Wasser

3.3.3 Durchführung

Für die Reverse Transkription wird 1 µg reine, isolierte RNA verwendet, zu der 1 µl random primer zugesetzt wird. Anschließend wird die Probe mit sterilem Wasser auf 11 µl verdünnt und für fünf Minuten bei 70°C am Heizblock erhitzt und auf dem Eis gekühlt.

Pro Probe werden 8 µl Master Mix hinzugefügt. Dieser setzt sich aus folgenden Substanzen zusammen:

Menge	Reagenz
4 µl	5 x First Strand Buffer
2 µl	dNTP mix
1 µl	RNase OUT
2 µl	DTT (Dithiothreitol)

Danach wird wieder bei Raumtemperatur fünf Minuten inkubiert und anschließend 1 µl revert aid reverse Transkriptase zugegeben. Nach weiteren zehn Minuten bei Zimmertemperatur wird die Probe erst für 60 Minuten bei 42°C und dann für 10 Minuten bei 70°C am Heizblock inkubiert. Zuletzt muss die fertige cDNA bei -20 °C gelagert werden, ist aber bei Raumtemperatur stabil.

3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.4.1 Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (englisch polymerase chain reaction, PCR) ist eine in vitro-Technik zur gezielten Amplifikation von DNA, da diese nur in sehr geringen Mengen verfügbar ist.

Als Starthilfe benötigt man Oligonukleotidprimer, sogenannte „Initialmoleküle“, kurze einzelsträngige DNA-Moleküle die komplementär zu der gewünschten DNA-Sequenz der Matrize („Template“) sind und aus 20-25 Basen bestehen. Man verwendet zwei Primer, die zwischen zwei Nukleotidsequenzen mit Hilfe einer DNA-Polymerase, Mg^{+} und Desoxynukleosidtriphosphaten die Nukleotide in der Richtung 3,-OH-Primer Enden amplifizieren.

So erhält man DNA-Einzelstränge, die komplementär zur Ausgangsmatrize sind und am Ende der Reaktion liegen komplette DNA-Stränge vor.⁵⁶

Dieser Vorgang wird wiederholt, zuerst werden die Stränge wieder gespalten und dann neusynthetisiert., sodass bei jedem Zyklus die Zahl der DNA-Stränge verdoppelt wird.

Diese Reaktion findet im Thermocycler mit einem definierten Inkubationsprogramm statt. Wie in Abbildung

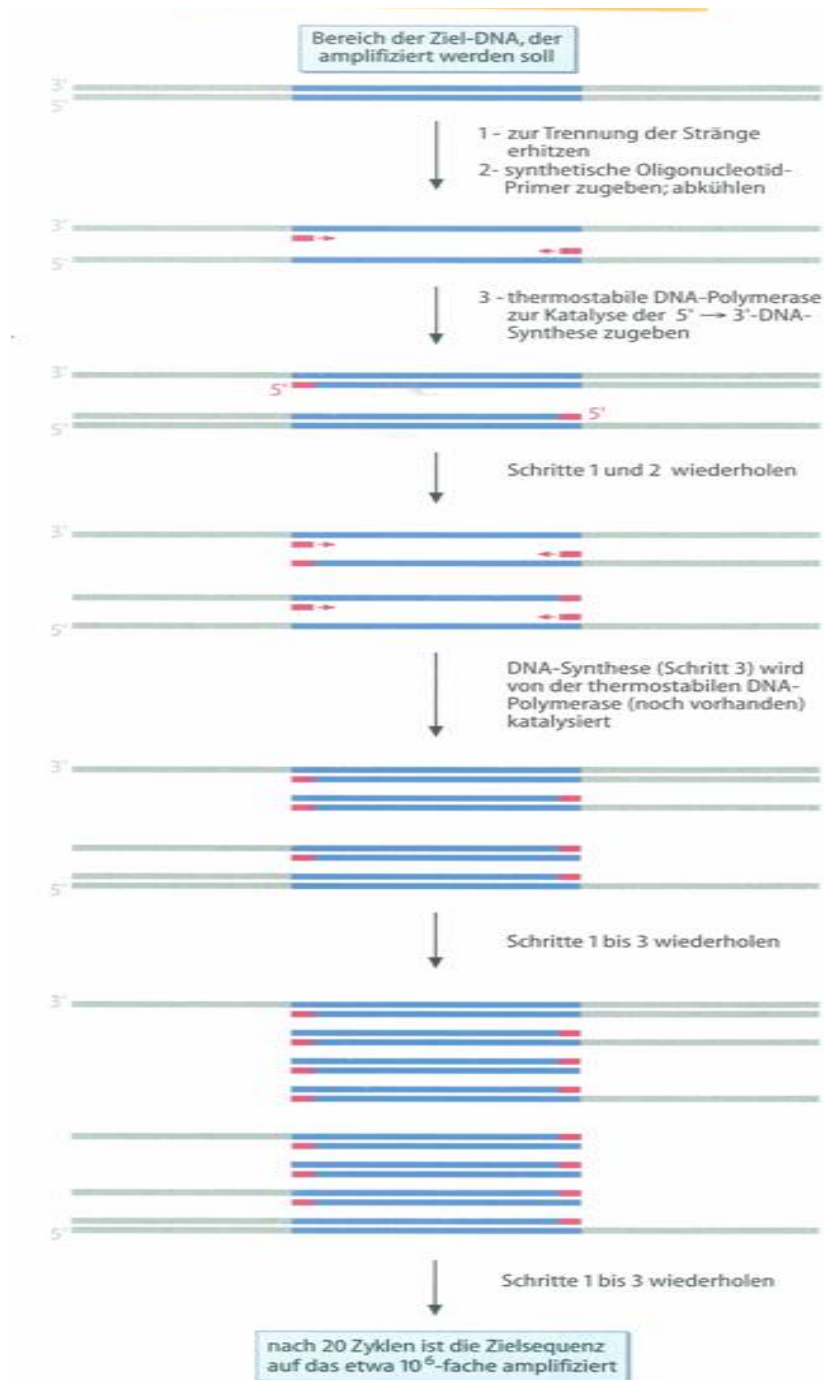


Abbildung 4: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion.⁵⁷ Die genauere Beschreibung siehe oben bei Programm Schritte 1-3.

Das Programm:

Wichtig und immer erforderlich sind der „Hot Start“ zu Beginn 94°C für 2 Minuten, damit die DNA-Stränge auseinanderweichen können und die Elongationszeit am Schluss jedes Zyklus 72°C für 7 Minuten.⁵⁷

1. Denaturierung: 5 Minuten wird auf 95°C erhitzt, damit die doppelsträngige DNA denaturiert wird und am Ende dieses Schrittes nur noch Einzelstränge vorliegen.
2. Annealing: (Anlagern der Primer): die Temperatur wird auf 55°C für 30 Sekunden gesenkt, damit die Primer an den komplementären Bereichen binden können.
3. Extension: es wird auf 72°C für eine Minute erwärmt. Die DNA-Synthese kann jetzt von der DNA-Polymerase vervollständigt werden.

Diese Schritte werden nun 20-45 Mal wiederholt, wobei sowohl die Menge der Wiederholungen, als auch die Länge und die Temperaturen variabel sein können.

Verwendete Geräte

- Thermocycler Biometra

Verwendete Materialien und Reagentien

- PCR Reaktionsgefäße
- Steriles Wasser
- 10x PCR Buffer (Finnzymes)
- Taq DNA-Polymerase (Finnzymes)
- dNTP Mix (Finnzymes)
- sense Primer
- antisense Primer

3.4.2 Durchführung

Um die cDNA zu vervielfältigen werden in jedem Reaktionsgefäß 9,5 µl PCR-Wasser mit 12,4µl Master Mix vermengt und danach 3µl cDNA hinzugefügt.

Die Effizienz der reversen Transkription kontrolliert man mittels β -Actin-PCR, das hier als Standard verwendet wurde. Dieses bezeichnet man auch als „house-keeping gene“, da es in jeder Zelle vorhanden ist und somit als Marker für die erfolgreiche Transkription von mRNA in cDNA dient.

Master Mix:

Menge	Reagenz
5 µl	10 x PCR Buffer
1 µl	dNTP Mix
0,5 µl	sense Primer 5´
0,5 µl	antisense Primer 3´
1 µl	Taq Polymerase
17 µl	PCR-Wasser

Primer β -actin:

f: 5´-ATCTGGCACACACCTTCTACAATGAGGCTGCG-3´

r: 3´- CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC- 3´

Die kleinen Gefäße werden gut verschlossen und in den vorgeheizten Thermocycler gestellt mit dem PCR Programm gestartet.

Programm für die β -Actin-PCR:

2 min 94°C („Hot Start“)
30 sek 94°C (Denaturierung)
1 min 61°C (Annealing)
1 min 72°C (Extension)
Stopp und halten bei 4°C

die Schritte 2-4 werden 24 mal wiederholt.⁵⁸

Primer SULT 1E1:

f: 5'-TTGCCACCTGAACTTCTTCCTGCC-3'

r: 5'- TTGGATGACCAGCCACCATTAGAA-3'

Programm für die SULT 1E1-PCR:

4 min 94°C („Hot Start“)
15 min 95°C (Denaturierung)
30 sek 55°C (Annealing)
1min 72°C (Extension)
Stopp und halten bei 4°C

die Schritte 2-4 werden 35 mal wiederholt

3.5 Gelelektrophorese

3.5.1 Prinzip

Zur Analyse der erhaltenen PCR-Produkte wurde ein Agarose-Gel System verwendet. Dieses 2% Agarose-Gel-System dient zur Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten mit einer Kettenlänge von 100-2000 Basenpaaren („base pairs“).⁵⁹

Unter elektrophoretischen Bedingungen liegen die Phosphatgruppen im Rückgrat der Nukleinsäuren ionisiert vor. Die als Polyanionen vorkommenden Polydesoxynukleotide wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.⁶⁰

Die Geschwindigkeit, der DNA-Stücke durch die Agarose-Gele, hängt von verschiedenen Bedingungen ab. Die Größe der DNA stellt dabei ein wichtiges Kriterium dar. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich durch die Matrix mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Die Wanderung ist außerdem von der Stromstärke, den Pufferbedingungen und der Agarose-Konzentration abhängig.⁵⁷

Zur Färbung der Nukleinsäuren in den Gelen wird Ethidiumbromid im Verhältnis 1:20000 (1mg/ml Stammlösung) bei der Herstellung, der noch flüssigen Gel-Lösung, zugesetzt. Eine Detektion ist dann möglich, da Ethidiumbromid mit der vorhandenen doppelsträngigen DNA fluoreszierende Interkalationskomplexe bildet.⁶¹

Verwendete Geräte

Gelwanne (Hoefer, Submarine Agarosegel Unit; HE 33)

Power Supply (Biorad)

Mikrowelle (Elin, MK 4600)

UV – Detektor (Herolab, Molecular Trenntechnik)

Verwendete Materialien und Reagenzien

- Agarose D-1 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) (Merck)
- PCR-Marker Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas)
- 40x TAE-Puffer: - 193,6 g TRIS (Merck)
 - 108,9 g Natriumacetat (Merck)
 - 15,2 g EDTA (Merck)
 - auf 1000ml mit Wasser pH 7,2
- 10x TAE-Puffer wird 1:10 zu 1x TAE-Puffer verdünnt
- 6 x Loading Dye Solution (MBI Fermentas)

3.5.2 Durchführung

Dazu werden 0,6g Agarose eingewogen und in 30ml 1xTAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) in der Mikrowelle solange erhitzt bis die Agarose sich gelöst hat. Nach Abkühlen der Lösung wurde 0,1 µg Ethidiumbromid zugesetzt, gemischt, die Lösung in den „Schlitten“ gegossen, die Kämme für die Slots hineingesteckt und zum Erstarren stehen gelassen. Die Kämme wurden nach Festwerden des Gels entfernt und das Gel in die Gelelektrophorese gelegt, wo es der 1xTAE-Puffer vollständig bedeckte. Die PCR-Produkte wurden mit 3µl Loading Buffer vermischt und anschließend in die Vertiefungen pipettiert.

Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug 30 Minuten bei 75Volt.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels Statistical Package for Sozial Science (SPSS) , Version 11,5, und die statistischen Berechnungen mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Probenauswahl

Ursprünglich standen 186 Knochentumorpräparate zu Verfügung, von denen jedoch nur 65 für die weiteren Analysen verwendet werden konnten, da teilweise nicht ausreichend Probenmaterial vorhanden oder die Qualität der Proben eine Isolierung der RNA nicht erlaubte.

Für die Untersuchung der Expression der SULT1E1 wurden Proben verwendet, in denen eine ausreichende Expression des „House-keeping“ Gens β -Actin nachgewiesen werden konnte.

4.2 Demographische Daten der Patienten

Das mittlere Alter jener Patienten, deren Tumorproben untersucht wurden, war 43,4 Jahre, die Standardabweichung betrug 20,9 Jahre. In der Gruppe mit benigner Erkrankung war das Alter im Mittel 34,8 Jahre (Standardabweichung 17,9 Jahre), in jener mit malignem Tumor 46,2 Jahre (Standardabweichung 21,2 Jahre).

Es wurden nahezu gleich viele Tumoren von männlichen wie von weiblichen Patienten untersucht (50,8% Männer, 49,2% Frauen).

4.3 Häufigkeiten der Tumoren

Die Einteilung der Proben erfolgte nach Art, Herkunft und Dignität des Tumors.

16 Tumore (24,6%) waren gutartig und 49 (75,4%) bösartig.

4.3.1 Tumorart

Die häufigsten Tumoren waren mit 43,1% primären Knochentumoren (n=28), gefolgt von den sekundären Knochentumoren mit 27,7% (n=18). Primäre Bindegewebstumoren (n=8) waren zu 12,3% vertreten, Tumoren des lymphatischen Gewebes zu 10,8% (n=7), tumorähnliche Läsionen und Knorpeltumoren schließlich zu je 3,1% (n=2). Während alle Tumoren des lymphatischen Gewebes und alle Bindegewebstumoren malign waren, waren von den primären Knochentumoren etwa 2/3 gutartig und etwa 1/3 bösartig.

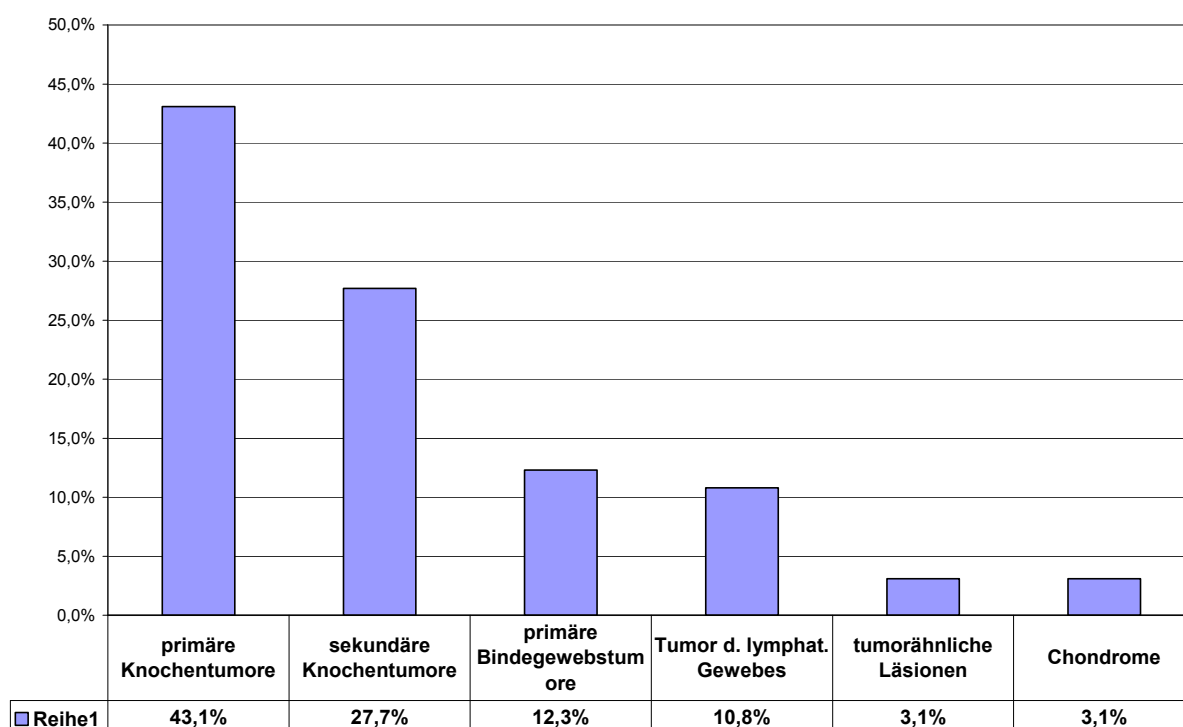


Abbildung 5: Häufigkeiten der Tumoren: In den ausgewerteten 65 Knochenproben verteilten sich die Tumoren auf 43,1% primäre Knochentumoren (n=28), 27,7% sekundäre Knochentumoren (n=18), 10,8% Tumoren des lymphatischen Systems (n=7), 12,3% primäre Bindegewebstumoren (n=8) und jeweils 3,1% auf tumorähnliche Läsionen (n=2) und Chondrome (n=2).

4.3.1.1 primäre Knochentumore

Die größte Gruppe mit 28 Proben stellten die primären Knochentumore dar. Die Patienten - 43% Männer (n=12) und 57% Frauen (n=16) - waren im Durchschnitt 33,1 Jahre (sd 18,9 Jahre) alt. Nach der histologischen Aufteilung waren 10 Tumoren

benign (36%) und 18 malign (64%). Die Patienten mit Osteosarkom bildete mit 44,8% die größte Gruppe, gefolgt von den Patienten mit Ewing-Sarkom und Riesenzelltumoren mit jeweils 17,2%.

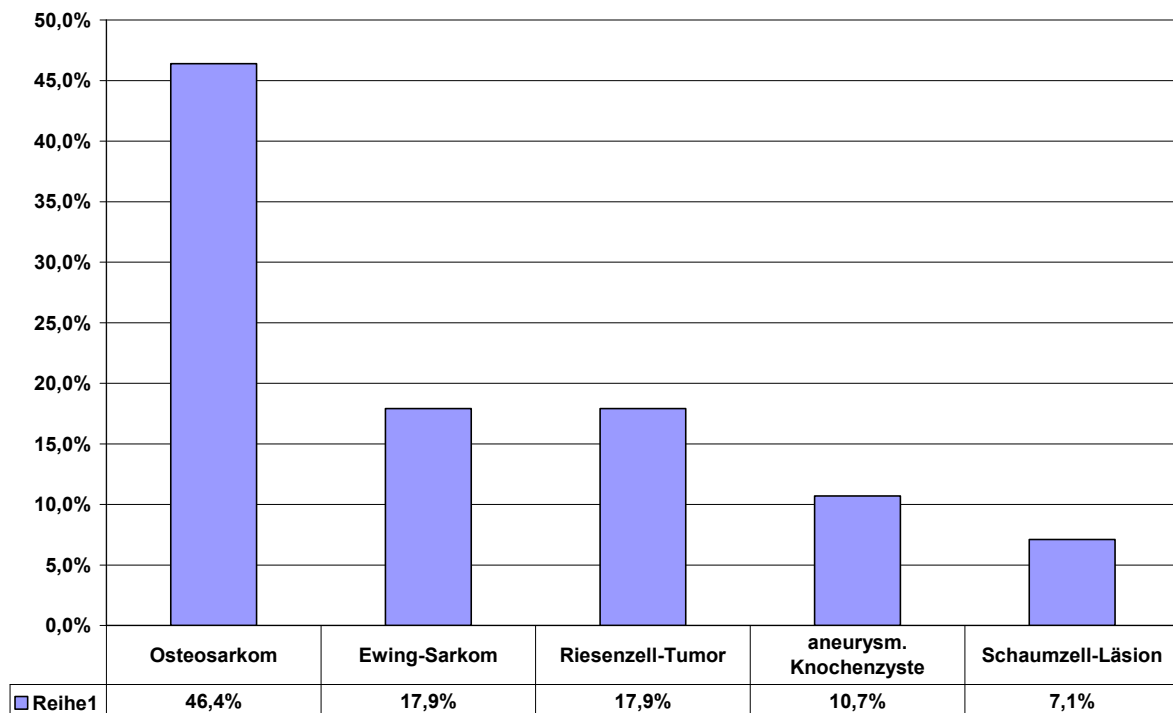


Abbildung 6: Aufteilung der primären Knochentumoren: Das Osteosarkom stellt mit 46,4% (n=13) die größte Gruppe dar, gefolgt von Ewing-Sarkom (n=5) und Riesenzell-Tumor (n=5) mit jeweils 17,9%. Des weiteren fanden sich 3 aneurysmatische Knochenzysten (10,7%) und 2 Schaumzell-Läsionen (7,1%)

4.3.1.2 Sekundäre Knochentumore – Knochenmetastasen

Das mittlere Alter der Patienten mit Knochenmetastasen (n=18) war 60,3 Jahre (sd 12,1 Jahre), die geschlechtsspezifische Verteilung war 50%.

Die häufigste Primärläsionen der metastatischen Absiedlungen waren in Niere (22%, n=4), Brust (n=3), Lunge (n=3) und Magen (n=3) mit je 17% zu finden. Weiters waren 2 Metastasen eines Schilddrüsenkarzinoms (11,1%), 2 eines hepatozellulären Karzinoms (11,1%), und eine Absiedlung eines Fibrosarkoms (5,6%) unter den Proben.

4.4 mRNA Expression von β -Actin

Wie bereits erwähnt, wurde, um die Effizienz der reversen Transkription zu überprüfen, bei allen Proben eine PCR zum Nachweis von β -Actin durchgeführt. Hier ein Beispiel eines β -Actin Geles.

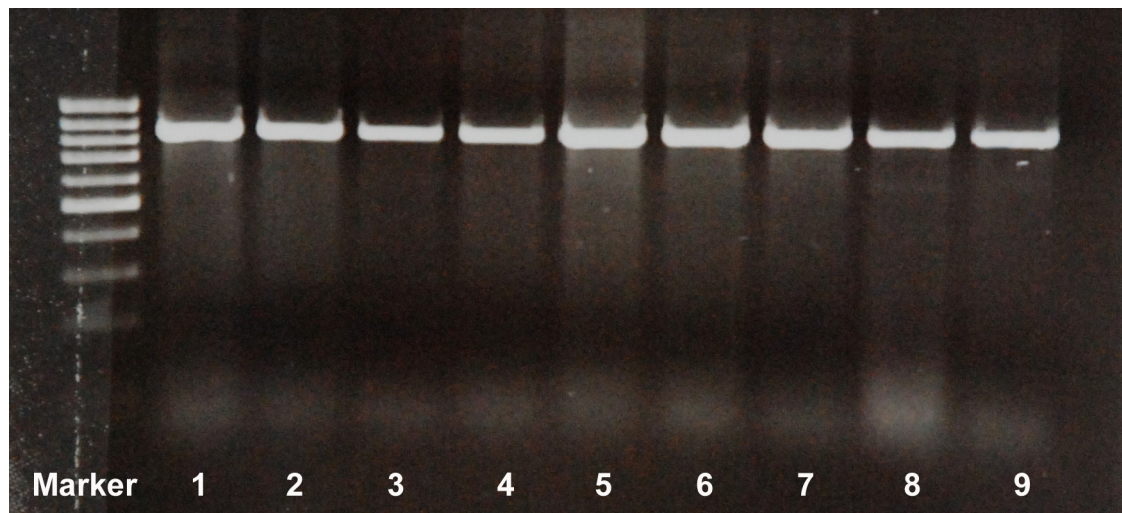


Abbildung 7: β -Actin Expression: ganz links befindet sich der Marker, Lane 1: Metastase (Magen) des Patienten Nr.31, Lane 2: Riesenzelltumor des Patienten Nr.48, Lane 3: Osteosarkom des Patienten Nr.61, Lane 4: Ewing Sarkom des Patienten Nr.32, Lane 5: Aneurysmatische Knochenzyste des Patienten Nr.33, Lane 6: Metastase der Brust des Patienten Nr.20, Lane 7: Osteosarkom des Patienten Nr.34, Lane 8: Leiomyosarkom des Patienten Nr.55, Lane 9: Chondrom des Patienten Nr. 44

4.5 Expression von SULT 1E1 in Knochentumoren

Ein positives Ergebnis kann anhand der Banden des Gel, bei 127bp, nach der Gelelektrophorese detektiert werden. Einige Ergebnisse finden sich in der folgenden Abbildung.

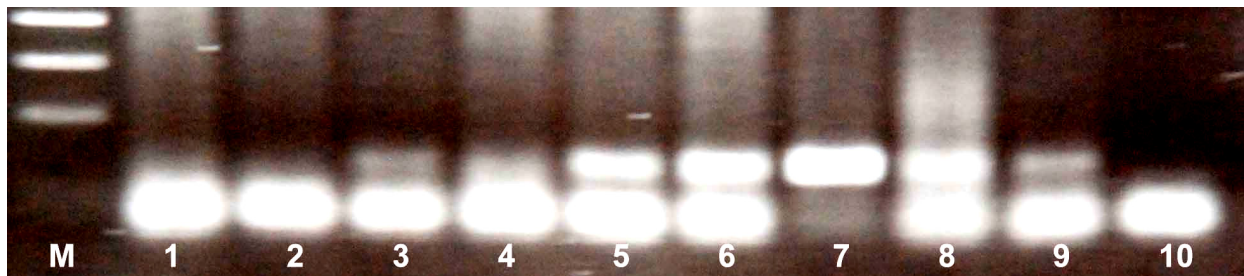


Abbildung 8: SULT 1E1 mRNA Expression . ganz links befindet sich der Marker (M), Lane 1: Aneurismatische Knochenzyste des Patienten Nr. 41, Lane 2: Ewing Sarkom des Patienten Nr. 43, Lane 3: Metastase (Brust) des Patienten Nr. 20, Lane 4: Leiomyosarkom des Patienten Nr. 30 , Lane 5: Osteosarkom des Patienten Nr. 13, Lane 6: Riesenzelltumor des Patienten Nr. 48, Lane 7: Fibrosarkom des Patienten Nr. 51, Lane 8: Metastase (Niere) des Patienten Nr. 52, Lane 9: Metastase (Lunge) des Patienten Nr. 58 , Lane 10: Plasmozytom des Patienten Nr. 23.

Von den 65 Tumorproben wurden 40 positiv auf SULT 1E1 getestet, dies entspricht einem Prozentsatz von 61,5%. Vergleicht man nun alle Primärtumoren (primäre Knochentumoren, primäre Bindegewebstumoren, Tumoren des lymphatischen Gewebes Knorpeltumore und tumorähnliche Läsionen, n=47) mit den Knochenmetastasen (n=18), fällt auf, dass SULT1E1 in 83,3% der Knochenabsiedlungen, jedoch nur in 53% der primären Tumoren exprimiert wird. Dieser Unterschied ist mit $p=0,025$ signifikant. Dies ist den folgenden Tabellen, 3 und 4, und der Abbildung 9 dargestellt

Tabelle 2: SULT1E1-Expression in Primärtumoren und Metastasen. Vierfeldertafel zur Berechnung des Unterschiedes zwischen positiver und negativer SULT1E1-Expression in Primärtumoren und Knochenmetastasen. Chi²-Test: p=0,0025

			Knochen- metastasen	Primär- tumoren	Gesamt
SULT1E1	neg	Anzahl	3	22	25
		% von SULT1E1	12,0%	88,0%	100,0%
		% von Meta/Prim	16,7%	46,8%	38,5%
	pos	Anzahl	15	25	40
		% von SULT1E1	37,5%	62,5%	100,0%
		% von Meta/Prim	83,3%	53,2%	61,5%
Gesamt	Anzahl	18	47	65	
	% von SULT1E1	27,7%	72,3%	100,0%	
	% von Meta/Prim	100,0%	100,0%	100,0%	

Unterteilt man alle Tumoren in gutartige (n=16) und bösartige Neubildungen (n=49) und untersucht die SULT 1E1 Expression, zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Chi², p=0,61).

Tabelle 3: Aufteilung der Expression von SULT 1E1 nach Dignität. Leider gibt es im Vergleich der benignen und der malignen Tumore keine Signifikanten Unterschiede in der SULT 1E1 mRNA Expression.

		SULT1E1		Gesamt
		neg	pos	
benign	Anzahl	7	9	16
	% von Dignität	43,8%	56,3%	100,0%
	% von SULT1E1	28,0%	22,5%	24,6%
malign	Anzahl	18	31	49
	% von Dignität	36,7%	63,3%	100,0%
	% von SULT1E1	72,0%	77,5%	75,4%
Gesamt	Anzahl	25	40	65
	% von Dignität	38,5%	61,5%	100,0%
	% von SULT1E1	100,0%	100,0%	100,0%

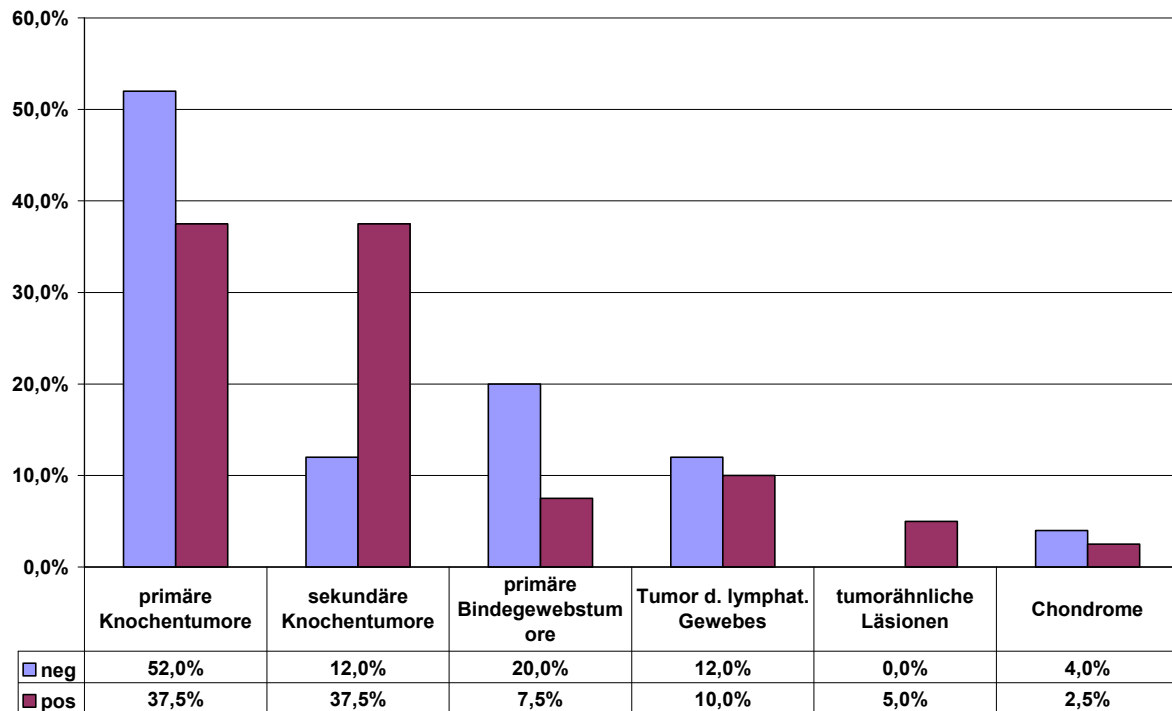


Abbildung 9: Häufigkeit der Expression von SULT 1E1 in den unterschiedlichen Tumorarten. In Blau sind die negativen Proben und in Violett die positiven getesteten Proben.

4.5.1 Primäre Knochentumore

Die primären Knochentumore wurden auf ihre SULT 1E1 mRNA Expression untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorarten und der Expression.

Tabelle 4: Häufigkeiten der primären Knochentumoren und ihre SULT 1E1 mRNA Expression (Anzahl der Proben und die dazugehörigen Prozentangaben)

		SULT1E1		Gesamt
		neg	pos	
Aneurysmatische Knochenzyste	Anzahl	1	2	3
	% von Diagnose	7,7%	12,5%	10,3%
Ewingsarkom	Anzahl	2	3	5
	% von Diagnose	15,4%	18,8%	17,2%
Fibröser Corticalisdefekt	Anzahl	0	1	1
	% von Diagnose	,0%	6,3%	3,4%
Schaumzellläsion	Anzahl	0	2	2
	% von Diagnose	,0%	12,5%	6,9%
Riesenzelltumor	Anzahl	3	2	5
	% von Diagnose	23,1%	12,5%	17,2%
Osteosarkom	Anzahl	7	6	13
	% von Diagnose	53,8%	37,5%	44,8%
Gesamt	Anzahl	13	16	29
	% von Diagnose	100,0%	100,0%	100,0%

4.5.2 Metastasen

Es wurden 18 Knochenmetastasen von verschiedenen Tumoren untersucht. SULT1E1 mRNA wurde in 15 Proben (83,3%) nachgewiesen. Im statistischen Vergleich zwischen Primärtumoren und Metastasen war SULT1E1 mRNA signifikant häufiger in den Absiedlungen exprimiert. (χ^2 , $p=0,025$)

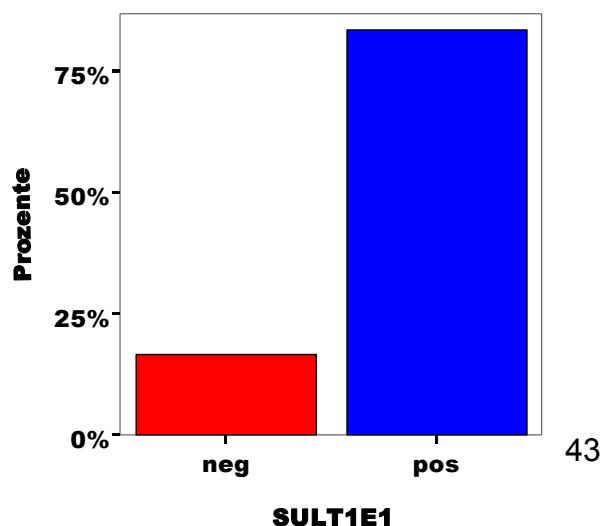


Abbildung 10: Expression von SULT 1E1 in Metastasen. SULT 1E1 wurde in 83,3% der Proben (n=15) gefunden. Die 16,7% (n=3) negativen Proben sind in Rot dargestellt.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Expression von SULT 1E1 in Knochentumoren untersucht. Die Regulation des Knochenwachstums und des -wiederaufbaus wird von verschiedenen Hormonen gesteuert, unter anderem von Estrogen, das in gesunden Knochenzellen über die Zirkulation zu Verfügung gestellt wird. 17 β -Estradiol (E2) beeinflusst den Knochenumbau über Steigerung der Osteoblasten-vermittelten Knochenformation und über Reduktion der Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption, sodass in Summe die knochenaufbauende Wirkung überwiegt. Außerdem wirkt E2 auf die Skelettreifung, in dem die Verknöcherung der Epiphysenfugen gefördert wird, was zum Sistieren des Längenwachstums führt^{62,63}. Das Gleichgewicht zwischen Synthese und Biotransformation reguliert die Aktivität von E2, das die höchste Affinität zu den nukleären Estrogenrezeptoren (ER) α und β hat.

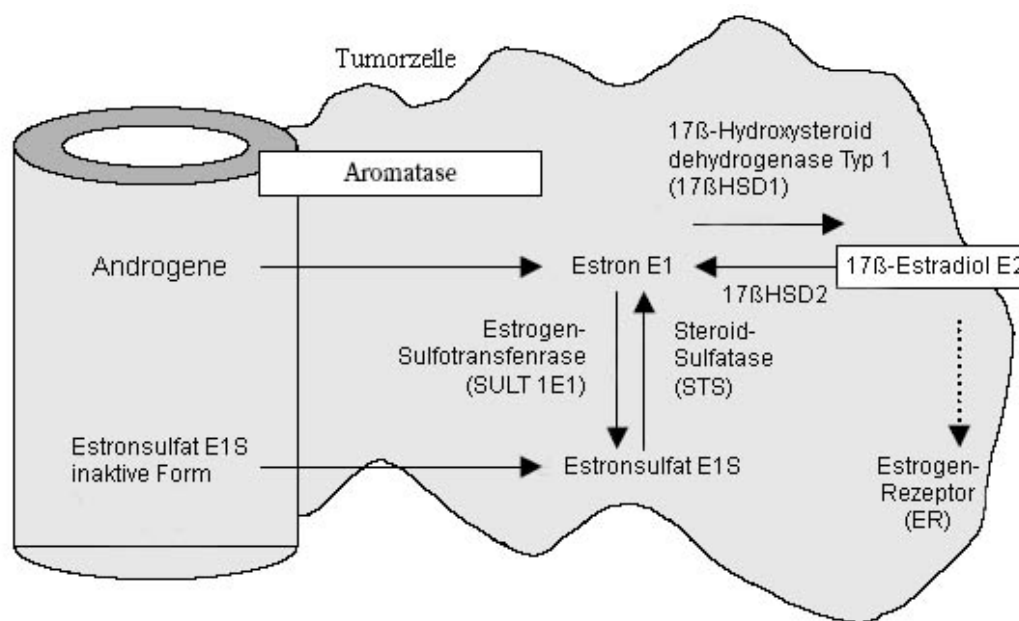


Abbildung 12: Intratumoraler Estrogenmetabolismus.⁶⁴ Inaktives Estronsulfat (E1-S) wird über die Steroidsulfatase zu Estron (E1) hydrolysiert und dieses wiederum durch die 17- β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ1 (17 β HSD1) in das aktive 17 β -Estradiol (E2) reduziert. Umgekehrt kann E2 durch 17- β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ2 zu E1 oxidiert und durch die SULT 1E1 wieder zu E1S inaktiviert werden

Den größten Anteil des Estrogens im Blut bildet das inaktive Estronsulfat (E1-S), das als Depot fungiert, aus dem bei Bedarf aktive Estrogene freigesetzt werden können.⁶⁵ Es wird von der Steroidsulfatase (STS) zu E1 hydrolysiert und von der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 (17 β HSD 1) in seine biologisch aktive Form, dem 17- β -Estradiol reduziert. In umgekehrter Reihenfolge kann E2 durch die 17 β HSD 2 wieder zu E1 oxidiert werden. Die cytosolische Sulfotransferase (SULT1E1) inaktiviert das entstandene E1 durch Sulfat-Konjugation in Estronsulfat (E1S).⁶⁶ In Estrogen-antwortenden Geweben - wie zum Beispiel in der weiblichen Brust – sind sehr große Mengen von SULT1E1 zur Inaktivierung von E2 vorhanden.⁶⁷ Deswegen spielen SULT 1E1 und STS eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung und Inaktivierung von Estrogen.

In pathologischen Knochengeweben, und hier besonders in Knochenmetastasen, begünstigt Estrogen das Tumorwachstum und einen Anstieg der Neoangiogenese.⁶⁸ Die intratumorale Metabolisierung und die Synthese von Estrogen ist ein Resultat der Interaktion verschiedener Enzyme, welche eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Ausbildung von hormon-abhängigen Tumoren spielen. Die Expression der Schlüsselenzyme für diese Reaktion, nämlich die Aromatase und die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD), konnten bereits nachgewiesen werden.⁶⁹ Ebenso konnten in normalen und malignen humanen Knochenzellen Sulfatasen, welche E1 aus E1S freisetzen, identifiziert werden.^{67,70} Sulfonierung und Desulfonierung reguliert eventuell auch die Konzentration von E2 im Knochen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden insgesamt 65 Knochentumorproben auf die Expression von SULT1E1 untersucht. Unter den verschiedenen Neoplasien waren 28 primäre Knochentumoren, 18 sekundäre Knochentumoren, 8 primäre Bindegewebstumoren, 7 Tumoren des lymphatischen Gewebes, 2 Knorpeltumoren und schließlich 2 tumor-ähnliche Läsionen.

Von den 65 Tumorproben wurden 40 positiv auf SULT 1E1 mRNA getestet, dies entspricht einem Prozentsatz von 61,5%. Vergleicht man nun alle Primärtumoren (primäre Knochentumoren, primäre Bindegewebstumoren, Tumoren des

lymphatischen Gewebes Knorpeltumore und tumorähnliche Läsionen, n=47) mit den Knochenmetastasen (n=18), fällt auf, dass SULT1E1 in 83,3% der Knochenabsiedlungen, jedoch nur in 53% der primären Tumoren gesamt exprimiert wird. Dieser Unterschied ist signifikant (χ^2 p=0,025). Unterteilt man alle Tumoren in gutartige (n=16) und bösartige Neubildungen (n=49) und untersucht die SULT 1E1-Expression, zeigen sich keine statistisch signifikanten Differenzen (χ^2 , p=0,61).

Aus den Ergebnissen dieser Diplomarbeit lässt sich ableiten, dass SULT 1E1 mRNA signifikant häufiger in Knochenmetastasen exprimiert wird, was in Zukunft für die Arzneimitteltherapie von Bedeutung sein könnte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Sulfotransferasen nehmen eine wichtige Rolle in der Biotransformation der Phase-II-Reaktion ein und können die lokale Konzentration von Arzneimitteln und Hormonen wie z.B: Estrogen am Wirkort beeinflussen und damit die Wirksamkeit negativ beeinflussen. Eine verminderte Expression von SULT 1E1 könnte auch eine erhöhte Estrogenkonzentration im Knochengewebe zur Folge haben, welche die Zellproliferation und die Neoangiogenese und damit das Tumorwachstum fördern könnte.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Expression von SULT 1E1 in 65 Proben von Knochenumoren analysiert, von denen 29 (davon 16 positiv) primäre Knochentumore und 18 (davon 15 positiv) Knochenmetastasen waren. Die übrigen 18 (davon 8 positiv) Proben waren von tumor-ähnlichen Läsionen (n=2), primären Bindegewebstumoren (n=5), Tumoren des lymphatischen Gewebes (n=7) und Knorpeltumoren (n=4). Signifikante Unterschiede zeigten sich bei den Knochenmetastasen, in denen SULT 1E1 zu 83,3% exprimiert war ($p=0,025$). Zwischen den benignen und malignen primären Knochentumoren waren keine relevanten Differenzen feststellbar ($p=0,76$).

Ob und inwieweit eine unterschiedliche SULT 1E1 Expression einen Einfluss auf das Wachstum von Knochentumoren hat, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

¹ Bertoni F, Bacchini P, Stalls EL. Malignancy in giant cell tumor of bone. Cancer. 2003; 97: 2520-2529.

² Schajowicz F, Sissons HA, Sobin LH. The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition. Cancer. 1995; 75:1208-14.

³ O'Dowd A: Research identifies the most common cancers in teenagers and young adults. BMJ 2006; 332:814

⁴ Betsy M, Kupersmith LM, Springfield DS. Metaphyseal fibrous defects. J Am Acad Orthop Surg. 2004;12:89-95

⁵ Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injury and myositis ossificans traumatica. Clin Orthop Relat Res. 2002;403 (Suppl):S110-9.

⁶ Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. Am J Sports Med. 2005; 33: 745-64.

⁷ Niethard FU, Pfeil J. Duale Reihe: Orthopädie, 4.komplett überarbeitete Auflage, 2003; S 1-592

⁸ Kransdorf MJ, Sweet DE. Aneurysmal bone cyst: concept, controversy, clinical presentation, and imaging. Am J Roentgenol. 1995;164: 573-80

⁹ Freyschmidt J, Ostertag H, Jundt G.: Knochentumoren, Klinik, Radiologie, Pathologie, 2.Auflage, 1998:S 312-342

-
- ¹⁰ Cheng JC, Johnson JO. Giant cell tumour of bone. Prognosis and treatment of pulmonary metastasis. Clin Orthop Res. 1997; 338: 205-214
- ¹¹ Haque AU, Moatasim A. Giant cell tumor of bone: a neoplasm or a reactive condition? Int J Clin Exp Pathol. 2008;1:489-501.
- ¹² Werner M. Giant cell tumor of bone: morphological, biological and histogenetical aspects. Int Orthop. Res. 2006; 30: 484-489
- ¹³ Bankl H. Arbeitsbuch Pathologie III, Spezielle Pathologie, Teil2, 2002; S.418-464
- ¹⁴ Freyschmidt J, Ostertag H, Jundt G.: Knochentumoren, Klinik, Radiologie, Pathologie, 2.Auflage, 1998:S 359-418
- ¹⁵ Guidici. Cartilaginous bone tumors. Radiol Clin North Am. 1993; 31: 237-259
- ¹⁶ Herzog CE. Overview of sarcomas in the adolescent and young adult population. J Pediatr Hematol Oncol. 2005;27:215-218
- ¹⁷ Hahn M, Dormans JP. Primary bone malignancies in children. Curr Opin Pediatr. 1996; 8:71-74.
- ¹⁸ Bloem JL, Koon HM. Osseous Lesions. Radiol Clin North Am. 1993; 31:261-277
- ¹⁹ Bernstein M., Kovar H., Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H. Ewing's Sarcoma family of tumors: current management. Oncologist. 2006; 11: 503-519

²⁰ Rajkumar SV, Buadi F. Multiple myeloma: new staging system for diagnosis, prognosis and response evaluation. Best Pract Res Clin Haematol. 2007; 20: 665-680

²¹ Tohan I, Seale J, EWdwards D. IgM multiple myeolma presenting with spinal cord compression caused ba a plasmocytoma: A case report. Cases J. 2008:1: 207

²² Freyschmidt J, Ostertag H, Jundt G.: Knochentumoren, Klinik,Radiologie,Pathologie, 2.Auflage, 1998:S 553-562

²³ Bankl H., Arbeitsbuch Pathologie III, Spezielle Pathologie, Teil 2, 2002; S.418-464

²⁴ Niethard FU, Pfeil J. Duale Reihe: ORTHOPÄDIE, 4. komplett überarbeitete Auflage, 2003; S 1-592

²⁵ Aktories Förstermann Hofmann Starke. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Verlag Urban & Fischer. 9.Auflage, 2004:S 684-696

²⁶ Löffler G., Petrides PE, Heinrich PC, Biochemie und Pathochemie, 8.Auflage. 2007; 880-884

²⁷ Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G,Nordenskjold M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82:4258–4265

-
- ²⁸ Gustafsson JA, Pettersson K, Delaunay F. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*. 2000;19:4970–4978
- ²⁹ Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature*. 2003. 424:389.
- ³⁰ Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL, Wark JD. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:3366-3371.
- ³¹ Riggs BL, Khosla S, Melton LJ III. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998; 13:763-773.
- ³² Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P & Willvonseder R. Serum levels of osteoprotegerin increases with age in a healthy adult population. *Bone*. 2003; 32: 681-686
- ³³ Hofbauer LC, Heufelder AE, Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone. cell biology. *J Mol Med*. 2001; 79:243-253
- ³⁴ Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest*. 2000; 106:1553-1560.
- ³⁵ Aktories Förstermann Hofmann Starke. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Verlag Urban & Fischer. 9.Auflage, 2004:S 729

³⁶Conrad J, Biological coagulation findings in third-generation oral contraceptives. Hum Reprod Update. 1999; 5: 672-80.

³⁷ Mendelsohn ME, Karas RH, The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. N Engl J Med. 1999; 340: 1801-1811.

³⁸Mudali S, Dobs AS, Ding J, Cauley JA, Szklo M, Golden SH. Endogenous postmenopausal hormones and serum lipids: the atherosclerosis risk in communities study. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90: 1202-1209.

³⁹ Villa P, Sagnella F, Perri C, Suriano R, Costantini B, Macri F, Ricciardi L, Lanzone A. Low- and standard-estrogen dosage in oral therapy: dose-dependent effects on insulin and lipid metabolism in healthy postmenopausal women. Climacteric. 2008;11:498-508

⁴⁰ Aktories Förstermann Hofmann Starke. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Verlag Urban & Fischer. 9.Auflage, 2004:S 683-713

⁴¹ Löffler G., Petrides PE, Heinrich PC, Biochemie und Pathochemie, 8.Auflage. 2007; S 1090-1091

⁴² Charles N. Falany. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases, FASEB J. 1997; 11:206-216.

⁴³ Glatt H, Engelke CE, Pabel U, Teubner W, Jones AL, Coughtrie MW, Andrae U, Falany CN, Meini W. Sulfotransferases:genetics and role in toxicology. Toxicol Lett. 2000; 15;112-113:341-8

⁴⁴ Efferth T, Molekulare Pharmakologie und Toxikologie, Verlag Springer. 2006:S 33-34

⁴⁵Coughtrie MWH, Gilissen RAHJ, Shek B, Strange RC, Fryer AA, Jones PW, Bamber DE. Phenol sulfotransferase SULT1A1 polymorphism: molecular diagnosis and allele frequencies in Caucasian and African populations. Biochem J. 1999; 1:337: 45-49

⁴⁶ Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, Mcmanus ME. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. Toxicol. Sci. 2006; 90: 5-22

⁴⁷ Efferth T. Molekulare Pharmakologie und Toxikologie, Verlag Springer. 2006: 33-34

⁴⁸Yamazoe Y, Nagata K, Ozawa S, Kato R. Structural similarity and diversity of sulfotransferases.Chem Biol Interact. 1994; 92:107-17.

⁴⁹Scheinpflug C, Bestimmung der Expression von Sulfotransferasen in Mammagewebe und Mammatumoren mittels PCR: Bedeutung für die Arzneimittel-Therapie. 2003;S 14-16

⁵⁰Glatt H, Bartsch I, Christoph S, Coughtrie MW, Falany CN, Hagen M, Landsiedel R, Pabel U, Phillips DH, Seidel A, Yamazoe Y. Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. Chem Biol Interact.1998; 20:109: 195-219.

⁵¹ Glatt H, Davis W, Meini W, Hermersdörfer H, Venitt S, Phillips DH. Rat, but not human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture. *Carcinogenesis*. 1998; 19:1709-13.

⁵² Datum: 11.11.2008: www.scientificpsychic.com/fitness/aminoacids1.html

⁵³ Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Biochemie und Pathochemie, 8. Auflage. 2007; S 256-259

⁵⁴ Burger A, Wachter.: Hunnius-Pharmazeutisches Wörterbuch, 7. Auflage, Walter de Gruyter; Berlin, New York; 1993; S 905

⁵⁵ Löffler G., Petrides PE, Heinrich PC, Biochemie und Pathochemie, 8. Auflage. 2007; S 244

⁵⁶ Knippers R.; Molekulare Genetik, 8. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2001; S 23,476

⁵⁷ Löffler G., Petrides PE, Heinrich PC, Biochemie und Pathochemie, 8. Auflage. 2007; S 246

⁵⁸ Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A.: Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 2001; 111:1834-1841

⁵⁹ Dingermann T, Gentechnik Biotechnik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 1999; S 40-47.

⁶⁰Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T Molecular Cloning – A Laboratory Manual.
2nd Cold Spring Harbour Laboratory, 1998; 33-34

⁶¹Signal Transduction Catalog and technical Resource, 1998 Calbiochem®

⁶²Grumbach MM; Estrogen, bone, growth and sex: A sea change in conventional wisdom. J Pediatr Endocrinol Metab. 2000; 13:1439-1455.

⁶³Seyd F, Khosla S: Mechanisms of sex steroid effects on bone. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 328:688-696.

⁶⁴Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T, New development in intracrinology of breast carcinoma. Breast Cancer. 2006;13:129-36.

⁶⁵Muir M, Romalo G, Wolf L, Elger W, Schweikert HU, Estrone sulfat is a major source of local estrogen formation in human bone. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:4685-4692.

⁶⁶Falany JL, Macrina N, Falany CN, Regulation of MCF-7 breast cancer cell growth by beta-estradiol sulfation. Breast Cancer Res Treat. 2002; 74:167-176.

⁶⁷Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T, New development in intracrinology of breast carcinoma. Breast Cancer. 2006; 13:129-136.

⁶⁸Elkin M., Orgel A, Kleinman HK, An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. J Natl Cancer Inst. 2004; 96:875-878

⁶⁹Saito H, Yanaihara T, Steroid formation in osteoblast-like cells. J Int Med Res. 1998; 26:1-12.

⁷⁰Purohit A, Flanagan AM, Reed MJ, Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. Endocrinology. 1992; 131:2027-2029.

8 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Marlies Pusman
Geburtsdatum:	14. Februar 1980
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	Ledig
Bekenntnis:	röm. kath.
Fremdsprachen	Englisch
Computerkenntnisse	Microsoft Office, SPSS

Ausbildung

Juni 1998	Reifeprüfung am Realgymnasium Diefenbachgasse, 1150 Wien
Oktober 1998	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien, dzt. 2.Studienabschnitt
WS 2005	Diplomarbeit am Institut für Pathophysiologie zum Thema ‚Bestimmung der Expression von Sulfotransferasen in Knochentumorgewebe‘ bei ao. Univ.Prof. Dr. Walter Jäger
seit November 2005	Ehrenamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäter beim Österreichischen Roten Kreuz Bezirksstelle Mödling
WS 2007	Beginn des Studiums an der Medizinischen Universität Wien

Wissenschaftliche Tätigkeit

September 2005 bis Februar 2006 Wissenschaftliche Erhebungen im Rahmen der Diplomarbeit am Institut für Pathophysiologie der medizinischen Universität Wien bei Univ. Prof. Dr. Jürg Graf und ao. Univ.Prof. Theresia Thalhammer:

- Isolierung von RNA aus Knochenzellen
- Nach Extrahierung Vervielfältigung der RNA mittels PCR und Nachweis der Enzyme mittels Gelelektrophorese

seit März 2006 Department für Diagnostik und klinische Pharmazie der Universität Wien, ao. Univ.Prof. Dr. Walter Jäger und Univ. Prof. Dr. Gerhard Buchbauer

- Erstellung und Betreuung einer e-learning Plattform für die Vorlesung ‚Allgemeine und anorganisch-pharmazeutische Chemie‘
- Erstellung und Betreuung einer e-learning Plattform für die Übungen der ‚Qualitativen pharmazeutischen Analytik‘

Juni 2006 bis Dezember 2007 Medizinische Universität Wien, Universitätsklinik für innere Medizin I, Abteilung für Krebsforschung; ao. Univ. Prof. Dr. Andrea Gsur

- Interviews mit Patienten mit Prostata-Karzinom oder BPH auf der Univ. Klinik für Urologie
- Isolierung und Extrahierung von DNA aus Blutproben
- Real-Time PCR

seit November 2007	Medizinische Forschungsgesellschaft des Sozialmedizinischen Zentrums Ost, Abteilung für Urologie und Andrologie; Prim. Univ. Doz. Dr. M. Rauchenwald und Univ. Doz. Dr. S. Madersbacher • Literaturrecherche • Interviews mit Patienten mit Prostata-Karzinom oder BPH • Dateneingabe für diverse Studien
--------------------	--

Berufserfahrung

Juli 1996, Juli 1997, Juli und September 1998	Ferialpraktikum bei der Fa. Aventis-Pasteur MSD
Juni 1999 bis Dezember 2000	European Telekom, 1060 Wien • Verschiedene Tätigkeiten im Engineering-Bereich, wie z.B. Programmierung von Dialern
September und Oktober 1999	Ferialpraktikum bei der Fa. Aventis-Pasteur MSD
Juli 2000, Juli u. August 2001, Juli 2002	Fa. ALLBAU, Telefonzentrale Telefondienst und administrative Tätigkeiten
2002 bis 2008	Infocenter der BEST (Berufsinformationsmesse Wien), jeweils 1 Woche
Januar 2005 bis August 2005	Apotheke zum Hl. Rochus, 1140 Wien
November 2005 bis November 2006	Flora-Apotheke, 1140 Wien