

**Bisphosphonat-assoziierte  
Osteonekrose der Kiefer:  
In-vitro Untersuchungen zur Pathologie und zu  
möglichen Therapieansätzen**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
“Doktor der Naturwissenschaften“**

im Promotionsfach Pharmazie  
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Nadine Josefine Imelda Hagelauer  
geboren in Wiesbaden

Mainz, 2014

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Prüfung: 04.12.2014

Meinen lieben Eltern  
und meiner verstorbenen Oma

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Knochenstoffwechsel .....	1
1.1.1 Knochenzellen .....	2
1.1.2 Regulation des Knochenumbaus .....	5
1.2 Bisphosphonate .....	9
1.2.1 Chemie .....	9
1.2.2 Pharmakokinetik .....	11
1.2.3 Medizinische Indikationen .....	12
1.2.4 Wirkmechanismus .....	14
1.2.5 Nebenwirkungen, Kontraindikationen, Interaktionen .....	18
1.3 Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer .....	20
1.3.1 Definition und klinische Präsentation .....	20
1.3.2 Theorien zur Pathogenese .....	21
1.3.3 Prophylaxe und Therapie .....	24
1.3.4 Geranylgeraniol als neue therapeutische Option .....	25
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>28</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
3.1 Materialien und Geräte .....	30
3.1.1 Verbrauchsmaterialien/ Einmalartikel .....	30
3.1.2 Geräte .....	31

3.1.3	Bisphosphonate .....	32
3.1.4	Isoprenoide .....	32
3.1.5	Chemikalien/ Reagenzien .....	33
3.1.6	Biochemische Kits.....	36
3.1.7	Antikörper.....	36
3.1.8	Zelllinien.....	37
3.1.9	Zellkulturmedien.....	37
3.1.10	Hergestellte Lösungen .....	38
3.2	Methoden.....	40
3.2.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	40
3.2.1.1	Versuchsdurchführung: Chemotaxis neutrophiler Granulozyten .....	41
3.2.1.2	Versuchsdurchführung: Phagozytose neutrophiler Granulozyten.....	43
3.2.1.3	Versuchsdurchführung: Oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten.....	45
3.2.2	Arbeiten mit Zellen .....	47
3.2.2.1	Zellkultivierung.....	47
3.2.2.2	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	48
3.2.2.3	Konservierung und Auftauen der Zellen .....	49
3.2.3	Zellversuche.....	49
3.2.3.1	MTT Assay.....	49
3.2.3.1.1	Ansatz: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden.....	50
3.2.3.1.2	Ansatz: Zoledronat kombiniert mit Clodronat.....	50
3.2.3.2	Scratch Wound Assay .....	51
3.2.3.2.1	Ansatz: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden.....	51
3.2.3.3	Phalloidin-Färbung.....	52
3.2.3.3.1	Ansatz: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden.....	52
3.2.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot .....	53
3.2.4.1	Proteinextraktion.....	53

3.2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	53
3.2.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.2.4.4	Probenvorbereitung .....	55
3.2.4.5	Gelelektrophorese .....	56
3.2.4.6	Western Blot .....	56
3.2.4.7	Immunologische Detektion immobilisierter Proteine .....	57
3.2.4.8	“Stripping” von Membranen .....	58
3.2.4.8.1	Ansatz: Zoledronat-Einfluss auf die Proteine Paxillin, FAK, deren aktivierte Formen sowie die kleinen GTPasen RhoA und RhoB.....	59
3.2.4.8.2	Ansatz: Zoledronat-Einfluss auf durch Cycloheximid gehemmte Rho-A- Neusynthese .....	60
3.2.5	Immunologischer Nachweis von aktivem RhoA mittels G-LISA™ .....	60
3.2.6	Statistische Auswertung.....	61
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
4.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	63
4.1.1	Bisphosphonat-Einfluss auf neutrophile Granulozyten.....	63
4.1.1.1	Chemotaxis.....	63
4.1.1.2	Phagozytose .....	64
4.1.1.2.1	Anteil phagozytierender Granulozyten-Konzentrationsabhängigkeit.....	64
4.1.1.2.2	Anteil phagozytierender Granulozyten-Zeitabhängigkeit.....	64
4.1.1.3	Oxidativer Burst .....	67
4.1.1.3.1	Anteil oxidierender Granulozyten.....	67
4.1.1.3.2	Oxidativer Burst pro Zelle .....	67
4.2	Zellversuche .....	70
4.2.1	Isoprenoid-Einfluss auf die Zoledronat-Wirkung .....	70
4.2.1.1	MTT Assay.....	70
4.2.1.1.1	Fibroblasten .....	70
4.2.1.1.2	HUVEC.....	70

4.2.1.1.3	Osteoblasten .....	71
4.2.1.2	Scratch Wound Assay .....	79
4.2.1.2.1	Fibroblasten .....	79
4.2.1.2.2	HUVEC.....	79
4.2.1.2.3	Osteoblasten.....	80
4.2.1.3	Phalloidin-Färbung.....	87
4.2.2	Clodronat-Einfluss auf die Zoledronat-Wirkung.....	91
4.2.2.1	MTT Assay.....	91
4.2.2.1.1	Fibroblasten .....	91
4.2.2.1.2	HUVEC.....	92
4.2.2.1.3	Osteoblasten.....	93
4.2.2.1.4	Keratinocyten .....	94
4.3	Untersuchungen auf Proteinebene .....	96
4.3.1	Zoledronat-Einfluss (mit und ohne GGOH bzw. FOH) auf die Proteine Paxillin, FAK, deren phosphorylierte Formen Paxillin (Tyr118) und FAK (Tyr925) sowie auf die GTPasen RhoA und RhoB gingivaler Fibroblasten.....	96
4.3.1.1	Paxillin .....	96
4.3.1.2	Phospho-Paxillin (Tyr118) .....	97
4.3.1.3	FAK (Fokale Adhäsionskinase) .....	98
4.3.1.4	Phospho-FAK (Tyr925).....	99
4.3.1.5	Die GTPase RhoA .....	100
4.3.1.5.1	Cycloheximid-Versuch .....	101
4.3.1.6	Die GTPase RhoB .....	102
4.3.2	Zoledronat-Einfluss (mit und ohne GGOH bzw. FOH) auf aktives RhoA gingivaler Fibroblasten .....	103
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>105</b>
5.1	Chemotaxis, Phagozytose und oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten unter Bisphosphonat-Einfluss.....	105

5.2	Einfluss verschiedener Isoprenoide auf Vitalität, Migration und Architektur von Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten .....	111
5.3	Clodronat-Einfluss (nicht-N-BP) auf die vitalitätsschädigende Wirkung Zoledronats (N-BP) auf gingivale Fibroblasten, HUVEC, Osteoblasten und Keratinozyten .....	116
5.4	Zoledronat-Einfluss (mit und ohne GGOH bzw. FOH) auf die Proteine FAK, Phospho-FAK (Tyr925), Paxillin, phospho-Paxillin (Tyr118), RhoA, GTP-gebundenes RhoAs sowie RhoB gingivaler Fibroblasten .....	119
5.4.1	Die Tyrosinkinasen FAK und Paxillin .....	120
5.4.2	GTPasen der RhoA-Familie .....	123
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>155</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	155
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	158
8.3	Tabellenverzeichnis .....	162
8.4	Lebenslauf .....	163
8.5	Danksagung.....	164



# 1 Einleitung

Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer (BP-ONJ) gilt als ernsthafte Nebenwirkung der Bisphosphonat-Therapie, deren Frequenz in den letzten Jahren zugenommen hat (Walter et al., 2007). Trotz zahlreicher Theorien, die nahelegen, dass es sich um einen multifaktoriellen Prozess handelt, sind die pathologischen Mechanismen, die zur Entwicklung der BP-ONJ führen, bis heute nicht vollständig geklärt (Walter et al., 2013).

Bevor das Krankheitsbild der BP-ONJ, die einzelnen Theorien zur Pathogenese und die bisherigen Therapiemöglichkeiten näher charakterisiert werden, sollen zunächst die physiologischen Grundlagen des Knochenstoffwechsels sowie die Gruppe der Bisphosphonate vorgestellt werden.

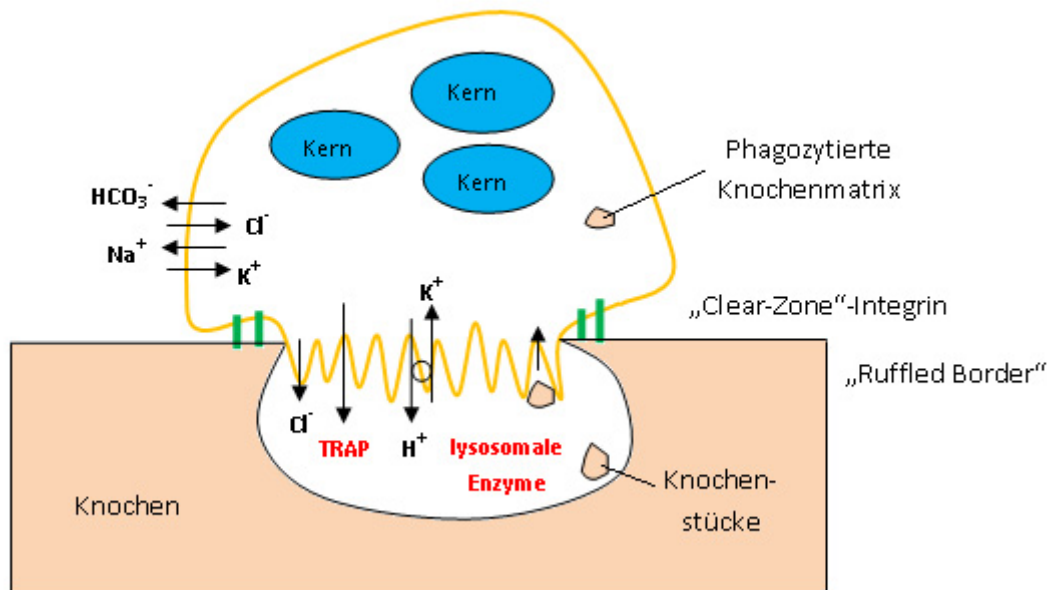
## 1.1 Knochenstoffwechsel

Knochen erfüllt verschiedene Aufgaben, die für den menschlichen Organismus von grundlegender Bedeutung sind. Neben seiner Stützfunktion, die dem Körper Form und Festigkeit verleiht, ist er Teil des Bewegungsapparates und trägt zum Schutz der inneren Organe bei. Außerdem dient er als wichtigster Speicher für Kalzium- und Phosphationen und ist an der Hämatopoese beteiligt. Neben dem Dentin und dem Schmelz des Zahnes stellt der Knochen das härteste Gewebe des Körpers dar. Als dynamisches Gewebe unterliegt er ständigen geordneten Auf- und Abbauvorgängen (Remodelling), die eine Anpassung des Skelettsystems an Wachstumsprozesse im Rahmen der Entwicklung sowie an Veränderungen der mechanischen Belastung ermöglichen. Außerdem dient diese Eigenschaft, neben der Reparatur von Knochenbrüchen, der Heilung von Mikrofrakturen, mikroskopisch kleiner Brüchen der Knochenbälckchen. Der geordnete Umbau stellt ein empfindliches Gleichgewicht dar, das durch hormonell gesteuerte Wechselwirkungen hochspezialisierter Knochenzellen ermöglicht wird (Bartl, 2006).

An den Umbauprozessen sind neben den knochenabbauenden Osteoklasten sowohl die knochenaufbauenden Osteoblasten als auch die knochenerhaltenden Osteozyten beteiligt, die im Folgenden vorgestellt werden.

### 1.1.1 Knochenzellen

**Osteoklasten** gehören zum mononukleär-phagozytären System (MPS) und sind für die Knochenresorption zuständig. Es handelt sich um mehrkernige Riesenzellen, die durch asynchrone Fusion mononuklearer Zellen des Knochenmarks entstehen (Quinn et al., 1998). Entscheidend für die frühe Phase der Differenzierung ist die Stimulation des M-CSF- (*Macrophage-colony stimulating factor*) Rezeptors mononucleärer Vorläuferzellen, die zur Hochregulierung des Rezeptors RANK (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B*) führt. Eine weitere Schlüsselfunktion der Osteoklastogenese liegt in der Interaktion zwischen RANK und seinem von Osteoblasten gebildeten Liganden RANKL (Crockett et al., 2011a). Charakteristika der knochenabbauenden Zellen sind unter anderem Calcitoninrezeptoren sowie die tartratresistente saure Phosphatase (TRAP). Um Knochen resorbieren zu können, binden sie über den ebenfalls für Osteoklasten charakteristischen Vitronectinrezeptor ( $\alpha$  v  $\beta$  3-Integrin) an die extrazelluläre Matrix (EZM). Die zur Resorption aktivierten Knochenzellen polarisieren und nisten sich in die sich bildenden Resorptionslakunen (Howship'sche Lakunen) ein (Nijweide et al., 1986). Immunhistochemisch dargestellt, weist der apikale, dem Knochen zugewandte Pol der Zelle in der Peripherie eine intensive Färbung (sealing-zone) auf. Zentral lässt sich eine hellere, streifige und vakuolisierte Zone mit extrem stark gefalteter Zellmembran erkennen. Dieser Bürstensaum („ruffled border“) schafft durch seine mikrovilliartigen Ausstülpungen eine deutliche Vergrößerung der Zelloberfläche. Durch die Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Zellmembran wird eine große Menge proteolytischer Enzyme ins Resorptionskompartiment freigesetzt (unter anderem Matrix Metalloproteasen und Kathepsine). Des Weiteren sorgen vakuoläre ATPase-abhängige Protonenpumpen (V-ATPasen) der „ruffled border“ für ein saures Milieu innerhalb der Resorptionslakune. Durch diese Azidifizierung löst sich Hydroxylapatit aus der kollagenen Knochenmatrix heraus. Das übriggebliebene organische Material wird von den freigesetzten Proteasen verdaut (Amling and Delling, 1996). Im Falle des dominierenden Typ1 Kollagens erfolgt der Abbau durch die Cystein Protease, Kathepsin K (Crockett et al., 2011b). Im Laufe des Resorptionsprozesses kommt es somit zur Anreicherung von Kollagenfragmenten in der Resorptionslakune (Nesbitt and Horton, 1997).



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung eines knochenresorbierenden Osteoklasten, modifiziert nach (Bartl, 2008).

Diese „Knochenabbauprodukte“ werden vom Osteoklasten endozytiert, im Zellinneren weiter proteolytisch gespalten und schließlich über die sogenannte „functional secretory domain“ (FSD) ins Blut abgegeben (Nesbitt and Horton, 1997). An diesem weiteren Verdau der Kollagenfragmente ist unter anderem die osteoklastenspezifische TRAP beteiligt (Ljusberg et al., 2005). Zahlreiche Prozesse wie Polarisierung und der vesikuläre Transport, die für die Funktion der Osteoklasten als knochenresorbierende Zellen essentiell sind, werden durch kleine GTPasen wie Rho, Rac und Rab reguliert (Coxon and Taylor, 2008).

**Osteoblasten** sind Zellen der Knochenbildung (Osteogenese). Sie stammen von mesenchymalen, ursprünglich pluripotenten Stammzellen ab. Bei diesen handelt es sich um Vorläuferzellen, die außerdem in der Lage sind, sich in Adipozyten, Fibroblasten, Muskel- sowie Knorpelzellen zu differenzieren. Eine teildifferenzierte Vorstufe des Osteoblasten stellt der im Periosteum und im Knochenmarkstroma vorkommende Präosteoblast dar (Hinrichs et al., 1993). Die weitere Differenzierung erfolgt über den kubisch geformten aktiven Osteoblasten, über den intermediären bis hin zum abgeflachten „ruhenden“ Osteoblasten (Battmann et al., 1997). In diesem terminalen Zustand verweilen die meisten Osteoblasten als Deckzellen (lining cells) auf der Knochenoberfläche oder unterliegen dem programmierten Zelltod. Die in

Schichten epithelartig angeordneten Zellen sind über „gap junctions“ miteinander verbunden (Miller et al., 1980). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Bildung der Knochenmatrix (Osteoid). Charakteristisch sind die Produktion von Typ1 Kollagen, welches über 90% der Knochenmatrix ausmacht sowie die der nicht kollagenen Proteine Osteocalcin, Osteonectin, Bone Sialoprotein, Fibronectin, Osteopontin und verschiedener Proteoglykane (Bartl, 2008; Malaval et al., 1994). Diese Proteine bilden im extrazellularen Raum die organische Matrix, in die Calcium und Phosphat in Form kleinster Hydroxylapatit-( $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ ) Kristalle eingebaut werden. Diese Kristalle enthalten zusätzlich Fluorid, Carbonat und Spurenelemente. Beim Erwachsenen beträgt der mineralische Anteil des kortikalen Knochens fast 60%. Der Rest besteht in etwa zu gleichen Teilen aus organischem Material und Wasser (Crockett et al., 2011b). Ein weiteres Charakteristikum der Osteoblasten stellt die Produktion der alkalischen Phosphatase dar (Gomez et al., 1995). Darüber hinaus weisen sie Rezeptoren für Parathormon, Vitamin D, Schilddrüsenhormone, Glykokortikoide, Sexual- und Wachstumshormone (Migliaccio et al., 1992) sowie solche für IL-1 (*Interleukin-1*), IL-6 (*Interleukin-6*), TNF- $\alpha$  (*Tumornekrosefaktor- $\alpha$* ), Prostaglandine, TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ), verschiedene BMPs (*Bone morphogenetic protein*), FGF (*Fibroblast growth factor*), PDGF (*Platelet derived growth factor*) und VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) auf (Pfeilschifter et al., 1993). Etwa jeder zehnte Osteoblast wird nach abgeschlossener Proteinsynthese von der neugebildeten Knochenmatrix umgeben und als fixer Osteozyt in den Knochen eingelagert (Aarden et al., 1994).

**Osteozyten** sind sowohl untereinander als auch mit den ruhenden Osteoblasten durch kleine Matrixkanälchen (Canaliculi) verbunden. Mit etwa 95% stellen sie die größte Fraktion der Knochenzellen dar, die eingelagert in die Knochenmatrix eine Lebensdauer von mehreren Jahrzehnten haben kann (Crockett et al., 2011b). Die Canaliculi bilden ein ausgedehntes Netzwerk, das sogenannte lakuno-kanalikuläre System, welches den Austausch von Mineralien und Mediatoren während des Knochenumbaus ermöglicht. Wie die Osteoblasten, sind die einzelnen Osteozyten über „gap junctions“ sowohl untereinander als auch mit den „lining cells“ der Knochenoberfläche verbunden. Als mechanosensorische Zellen sind sie wesentlich an der funktionellen Anpassung des Knochens beteiligt (Bartl, 2006).

### 1.1.2 Regulation des Knochenumbaus

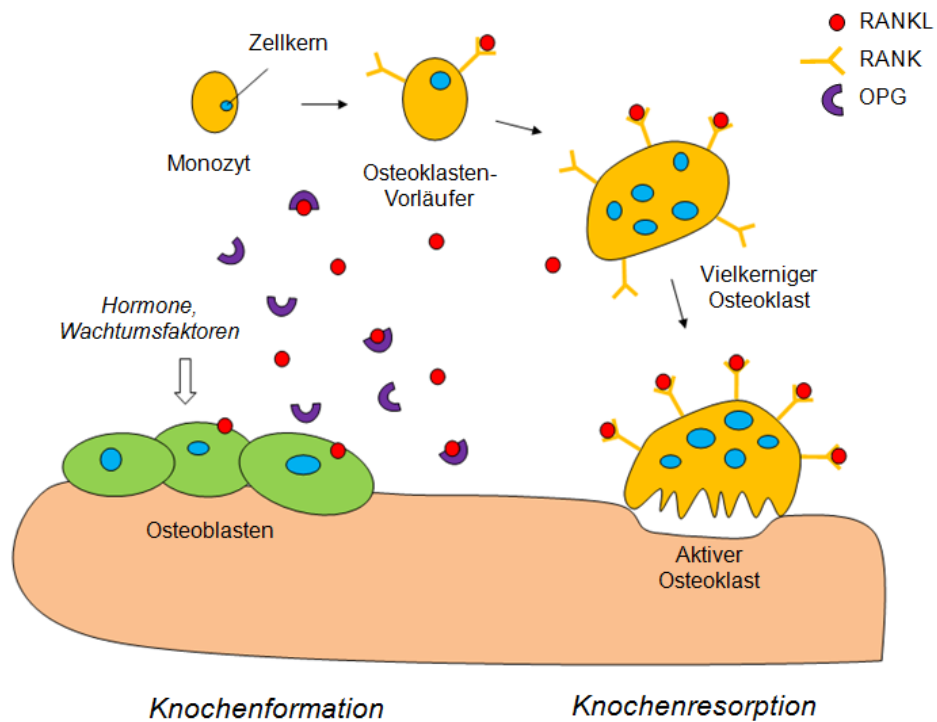
Knochen unterliegt ständigen, geordneten Ab- und Aufbauprozessen, um eine Anpassung an veränderte Bedingungen zu ermöglichen. Auf veränderte biomechanische Kräfte reagiert er ebenso wie auf Schädigungen und Alterung der Knochenmatrix. Dieses sogenannte „**Bone remodelling**“ trägt außerdem zum Erhalt der Calcium- und Phosphathomöostase bei. In regelmäßigen Abständen erfolgt daher ein Materialaustausch der gesamten Knochensubstanz. Diese physiologische Funktion erfüllen zwei bis fünf Millionen Knochenumbaueinheiten („Bone remodelling units“, BRU), die jeweils aus wenigen knochenresorbierenden Osteoklasten und zahlreichen knochenaufbauenden Osteoblasten bestehen (Bartl, 2008). Die Balance zwischen Auf- und Abbaurate sowie deren zeitliche Abfolge bezeichnet man als „coupling“. Während die Resorptionsphase nur etwa zwei Wochen beträgt, dauert die Mineralisation deutlich länger. Ein Umbauzyklus ist etwa nach 120 Tagen abgeschlossen und eine von etwa 35 Millionen „strukturellen Einheiten“ im menschlichen Skelett ist entstanden (Bartl, 2006).

An der komplexen Regulation des Knochenumbaus sind zahlreiche systemisch wirkende Hormone und lokal wirkende Zytokine beteiligt. Die wichtigsten systemischen Regulationsfaktoren stellen das Parathormon (PTH), Calcitonin, Vitamin D<sub>3</sub> und die Sexualhormone dar. Das in der Nebenschilddrüse gebildete PTH ist ein wichtiger Regulator der Calcium-Homöostase. Die Hauptaufgabe des Hormons besteht darin, die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Blut zu steigern und diejenige des Phosphats zu senken. Dies gelingt durch eine gesteigerte tubuläre Ca<sup>2+</sup>-Resorption sowie durch vermehrten Knochenabbau (Talmage and Elliott, 1958). Letzteres erfolgt indirekt durch die Interaktion des PTHs mit dessen vom Osteoblasten exprimierten Rezeptor. Hierdurch kommt es zur Stimulation der M-CSF- und RANKL-Expression, was wiederum zur Aktivierung knochenresorbierender Osteoklasten führt. PTH steigert außerdem indirekt die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Blut, indem es die Calcitriolsynthese stimuliert (Crockett et al., 2011b). Neben PTH ist Calcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>], die Wirkform des Vitamin D<sub>3</sub>, der wichtigste Regulator des Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsels. Auch Calcitriol steigert die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Blut durch dessen Freisetzung aus dem Knochen und durch eine verringerte Ausscheidung über die Niere. Außerdem steigert die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub> die intestinale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme (Crockett et al., 2011b). Somit wirkt es wie PTH einerseits resorptiv durch eine indirekte Stimulation der Osteoklasten-Aktivierung, andererseits

ermöglicht es die Knochenneubildung durch den Erhalt der  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphatkonzentration im Blut. Das Peptidhormon Calcitonin inhibiert hingegen direkt über die Bindung an seinen spezifischen membranständigen Rezeptor die Osteoklastenaktivität und wirkt somit antiresorptiv (Reginster, 1992). Sexualhormone spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel. Geschlechtsunabhängig sind sowohl Androgene als auch Östrogene beteiligt. Östrogene hemmen die Osteoklastenaktivität, stimulieren die Kollagensynthese durch Osteoblasten, steigern die Calcitonin-Freisetzung aus der Schilddrüse und fördern die intestinale  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption. Postmenopausaler Östrogenmangel führt zum Abfall des Serumcalcitonins, wodurch dessen inhibierende Wirkung auf die Knochenresorption abnimmt (Reginster et al., 1992). Der resultierende Knochenverlust kann teilweise durch eine Östrogensubstitution kompensiert werden. Dabei interagiert das Steroidhormon mit seinem intrazellulären Rezeptor (Östrogenrezeptor  $\beta$ ) und inhibiert somit die von Osteoblasten ausgelöste, Zytokin-induzierte Osteoklastenbildung und -reifung. Außerdem hemmen Östrogene über die Bildung des transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) die Aktivität der Osteoklasten und induzieren deren Apoptose. Androgene verfügen ebenfalls über antiresorptive Eigenschaften, die jedoch größtenteils über eine Umwandlung zu Östrogenen erfolgt (Forth, 2005). Einen großen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben auch Glucocorticoide. Sie steigern indirekt die Knochenresorption durch die Stimulation der osteoblastären RANKL-Expression und die Reduktion der OPG-Expression. Außerdem führen sie zur Beeinträchtigung der Osteoblastenfunktion und hemmen somit die Knochenbildung. Diesen Effekten liegt die „Glucocorticoid-induzierte Osteoporose“ (GIOP) zugrunde (Canalis and Delany, 2002). Neben den beschriebenen systemisch wirkenden Hormonen, sind zahlreiche lokal wirkende Zytokine und Wachstumsfaktoren an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt. Diese Signale werden über das interzelluläre Netzwerk des Knochengewebes vermittelt und beeinflussen über auto- bzw. parakrine Effekte die Differenzierung und Proliferation der verschiedenen Knochenzellen. Essentiell für die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten ist beispielsweise der „BMP-Signalweg“, über den mitunter die Expression des RunX2 (*Runx2* (*Runt-related transcription factor 2*))-Proteins erfolgt (Cao and Chen, 2005; Ducky et al., 1997). Ebenfalls von besonderer Bedeutung ist der „Wnt-Signalweg“. Dem an diesem Signaltransduktionsweg beteiligten LRP 5 (*low-density lipoprotein receptor-*

*related protein 5*) wird eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Knochenstoffwechsels zugesprochen. Mutationen des LRP 5 Gens werden mit angeborenen Skeletterkrankungen assoziiert (Boyden et al., 2002; Little et al., 2002). Des Weiteren wurde an differenzierten Osteoblasten nachgewiesen, dass eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu einer Stimulation der Osteoprotegerin (OPG)-Expression und einem Abfall der RANKL-Expression führt, was sich hemmend auf die Osteoklastendifferenzierung auswirkt (Glass et al., 2005).

Die Steuerung des „Couplings“ zwischen Knochenauf- und abbau erfolgt über das erwähnte **RANK/ RANKL/ OPG System** (Crockett et al., 2011b), welches in Abbildung 1.2 dargestellt ist. RANKL (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*), ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie, wird von Osteoblasten sowohl als transmembranes Protein gebildet als auch in löslicher Form sezerniert. Durch die Interaktion mit seinem Rezeptor RANK, auf der Oberfläche von Osteoklastenvorstufen wird deren Differenzierung angeregt, es kommt zu einem Aktivitätsanstieg und zu einer Inhibition des programmierten Zelltods. Eine erhöhte RANKL-Expression hat somit einen gesteigerten Knochenabbau zur Folge, wohingegen eine eingeschränkte Stimulation der Osteoklasten durch RANKL das Gleichgewicht seitens der Knochenformation verschiebt (Sobacchi et al., 2007). Das von Osteoblasten sezernierte Osteoprotegerin (OPG) interagiert mit RANKL und verhindert dadurch dessen stimulierende Wirkung auf die Knochenresorption. Das Verhältnis zwischen RANKL und OPG ist demzufolge entscheidend für die Bilanz des „Bone remodellings“. Eine Vielzahl verschiedener Hormone und Zytokine nimmt hierauf Einfluss (Crockett et al., 2011b).



**Abbildung 1.2** RANK/ RANKL/ OPG- System, modifiziert nach (Boyle et al., 2003).

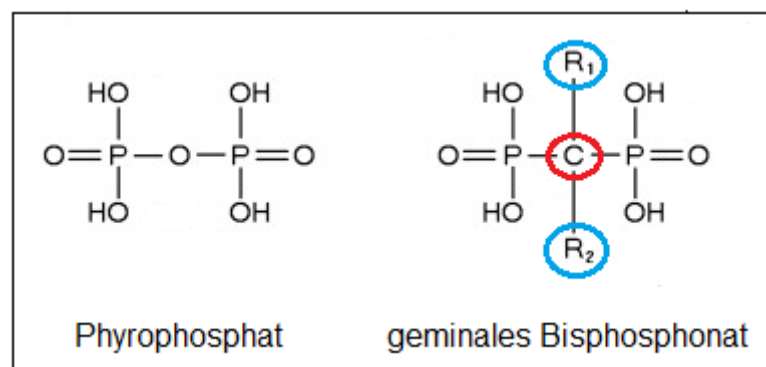
Als Beispiel seien das Parathormon und Calcitriol genannt, welche das Gleichgewicht zugunsten des RANKLs verschieben sowie die Östrogene, die über einen Anstieg der OPG-Konzentration zu einer Erhöhung der Knochendichte beitragen. OPG wird außer in Osteoblasten in zahlreichen anderen Geweben, wie im Magen, der Leber oder der Lunge gebildet. Die RANKL-Produktion durch aktivierte T-Lymphozyten macht eine Beteiligung des Immunsystems am Knochenumbau deutlich. Eine enge Beziehung zwischen diesen beiden Systemen lässt ebenfalls die Tatsache erkennen, dass Osteoklasten von mononukleären Vorläuferzellen abstammen, die erst in Anwesenheit von M-CSF (*Macrophage colony stimulating factor*) zu Vorläufern der knochenresorbierenden Zellen differenziert werden (Crockett et al., 2011b).



## 1.2 Bisphosphonate

### 1.2.1 Chemie

Bisphosphonate (BP) stellen eine potente Wirkstoffgruppe dar, die aufgrund ihrer osteotropen Eigenschaft zur Diagnose und Behandlung verschiedener Knochenerkrankungen eingesetzt wird. Chemisch handelt es sich um metabolisch stabile Strukturanaloga des natürlich vorkommenden Pyrophosphats (P-O-P), bei denen das zentrale Sauerstoffatom durch ein Kohlenstoffatom substituiert ist (Rogers et al., 2000) (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3 Chemische Struktur von Pyrophosphat und Bisphosphonaten in ihrer protonierten Form.**

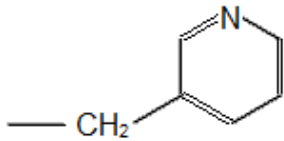
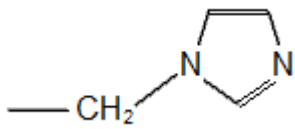
Beim Bisphosphonat ist das zentrale Sauerstoffatom durch ein Kohlenstoffatom ersetzt. Der Unterschied zwischen den einzelnen Bisphosphonaten besteht in der Substitution verschiedener Seitenketten R1 und R2 am zentralen C-Atom.

Obwohl BP bereits Mitte des 19. Jahrhunderts erstmalig durch den Chemiker Menschutkin (Menschutkin, 1865) synthetisiert wurden, entdeckte man erst über 100 Jahre später deren klinisches Potential. Zunächst kam die Substanzgruppe im Bereich des Korrosionsschutzes, in der Düngerherstellung und zahlreichen Bereichen der Industrie zum Einsatz. Wie auch das physiologisch vorkommende Pyrophosphat haben Bisphosphonate die Fähigkeit Calciumphosphat zu lösen und weisen eine hohe Knochenaffinität auf (Jung et al., 1973). Der Austausch des zentralen Sauerstoffatoms durch ein Kohlenstoffatom führt zu einer deutlichen Stabilisierung des leicht hydrolysierbaren und enzymatisch spaltbaren Pyrophosphats. Die stabilere P-C-P-Bindung verschafft der Substanzgruppe Resistenz gegenüber einem enzymatischen Abbau und ermöglichte somit erst den oralen Einsatz und entsprechende Studien über die Wirkung auf den Knochenstoffwechsel (Fleisch, 2002).

BP lassen sich in Abhängigkeit der Substituenten R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> (Abbildung 1.3) in verschiedene Generationen unterteilen (Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1 Einteilung der Bisphosphonate in drei Generationen.**

Die Einteilung erfolgt in Abhängigkeit von den Seitenketten R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> und die daraus resultierende relative Wirkpotenz, modifiziert nach (Bartl, 2006).

Generation	Substanz	Stickstoffgruppe	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Relative Potenz
1	Etidronat	N-frei	-OH	-CH <sub>3</sub>	1x
	Clodronat		-Cl	-Cl	10x
2	Pamidronat		-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	100x
	Alendronat		-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	1000x
3	Ibandronat	N-haltig	-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	5000x
	Risedronat		-OH		10000x
	Zoledronat		-OH		20000x

Besteht der Rest R<sub>1</sub> aus einer Hydroxylgruppe, ist die Affinität zur Chelatbildung erhöht. Außer den beiden Phosphatgruppen steht in diesem Fall die Hydroxylgruppe als dritter Ligand für die Komplexbildung eines Metallions zur Verfügung. Das heißt, dass BP, die einen Hydroxylrest am zentralen C-Atom aufweisen, eine verstärkte Bindung zum Hydroxylapatit des Knochens eingehen. Der Rest R<sub>2</sub> bestimmt die Potenz der Hemmung der Knochenresorption (Rodan and Fleisch, 1996; Russell et al., 2008). BP der ersten Generation (Etidronat und Clodronat) enthalten im Gegensatz zu denen der zweiten und dritten Generation keinen Stickstoff. Die

Substitution einer einfachen Aminoalkylkette am zentralen C-Atom führt bei BP der zweiten Generation zu einer Erhöhung des antiresorptiven Potentials (Pamidronat, Alendronat) (Schenk et al., 1986). Dies lässt sich durch die Einführung einer sekundären (Risedronat) oder tertiären Aminogruppe (Ibandronat) wie auch durch stickstoffhaltige Heterozyklen (Risedronat und Zoledronat) bei BP der 3. Generation weiter steigern (Sietsema et al., 1989).

### 1.2.2 Pharmakokinetik

Aufgrund ihrer geringen Lipophilie beträgt die orale Bioverfügbarkeit von Bisphosphonaten nur 0,3 bis 6%. Die gastrointestinale Aufnahme erfolgt ausschließlich parazellulär. Hinzu kommt eine Beeinträchtigung der Resorption durch Bildung von Chelatkomplexen, insbesondere mit zweiwertigen Kationen wie Calcium oder Magnesium aus der Nahrung (Lin, 1996). Im Blut liegen BP größtenteils an Albumin gebunden vor oder komplexieren mit zweiwertigen Kationen. Die einzelnen BP zeigen eine deutliche Variation ihrer Plasmahalbwertszeiten. Die Ursache hierfür liegt in der sehr unterschiedlich ausgeprägten Tendenz an Plasmaeiweiß zu binden, was wiederum durch die Polaritätsunterschiede der verschiedenen Liganden bedingt ist. Je größer der proteingebundene Anteil ist, umso länger befindet sich die Substanz im Blut (Bartl, 2006).

**Tabelle 1.2 Pharmakokinetische Daten i.v. applizierter Bisphosphonate, modifiziert nach (Bartl, 2006).**

Bisphosphonat	Dosis/Zeit der Applikation	Plasmaeiweiß-Bindung (%)	Plasmahalbwerts-Zeit $t_{1/2\beta}$ (h)	Cmax (ng/ml)
Clodronat	300mg i.v./2h	36	2,0-2,3	12000
Ibandronat	6mg i.v./15min	87	12-16	384
Pamidronat	60mg i.v./1h	54	0,8-1,6	2790
Zoledronat	4mg i.v./15min	22	1,4-1,9	468

Zwischen 20 und 50% der im Plasma verfügbaren Substanz bindet zügig an Calcium der Knochenoberfläche, bevorzugt an Stellen verstärkten Umbaus (Bartl, 2006).

Der restliche Wirkstoff wird unverändert über die Nieren ausgeschieden. Auch das Verhältnis zwischen Akkumulation im Knochen und renaler Elimination variiert deutlich zwischen den einzelnen BP. Die Substanzen können sehr lange im Knochen gespeichert werden, so dass die terminale Halbwertszeit mehrere Jahre betragen kann. Dies erklärt die lange Wirkdauer dieser Arzneistoffgruppe. Die Freisetzung aus dem Knochen ins Blut ist schließlich vom Ausmaß der Knochenresorption abhängig (Bartl, 2006; Steinhilber, 2005).

### **1.2.3 Medizinische Indikationen**

Bisphosphonate stellen eine weit verbreitete Arzneistoffgruppe dar. Sie werden aufgrund ihrer antiresorptiven Eigenschaft bei zahlreichen Erkrankungen des Knochenstoffwechsels eingesetzt. Indiziert sind sie zur Prävention und Therapie der postmenopausalen sowie Glukocorticoid-induzierten Osteoporose, dem Morbus Paget, der tumorinduzierten Hypercalcämie sowie zur Prävention tumorbedingter Skelettkomplikationen (Kurth et al., 2007). Die Substanzen sind außerdem bei Patienten mit Prostatakarzinom (Goodin et al., 2002) und solchen mit Mamakarzinom indiziert (Pavlakakis et al., 2005). Neben diesen beiden Tumorleiden, die am häufigsten mit einer ossären Metastasierung assoziiert sind (Kurth et al., 2007), werden BP auch bei anderen metastasierenden Tumoren wie dem Nierenzell- sowie dem Bronchialkarzinom eingesetzt (Aapro et al., 2008; Rosen et al., 2004). Eine weitere wichtige Indikation ist das Multiple Myelom (Plasmozytom) (Bartl, 2006; Berenson et al., 2002). In Tabelle 1.3 sind die Einsatzgebiete der einzelnen BP nochmals dargestellt.

**Tabelle 1.3 Einsatzgebiete gängiger Bisphosphonate (Rote Liste, Stand 2014).**

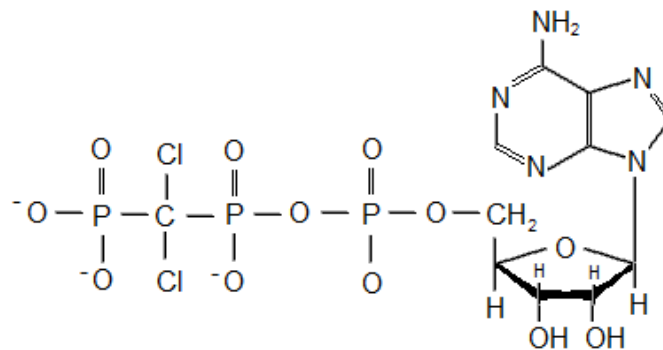
Wirkstoff	Handelsnamen (Beispiele)	Indikation	Darreichungsform	Dosierung
<b>Stickstofffreie Bisphosphonate</b>				
Clodronat	Bonfos®	tumorinduzierte Osteolyse	Tabletten, Kapseln, Infusionslösung	1600-3200 mg <i>p.o.</i> /Tag über 6 Monate oder 1500 mg <i>i.v.</i> einmalig oder 300 mg <i>i.v.</i> über max. 7 Tage
		tumorinduzierte Hypercalcämie		1600-3200 mg <i>p.o.</i> /Tag über 6 Monate
Etidronat	Didronel®	Osteoporose	Tabletten	400 mg/Tag <i>p.o.</i> über 14 Tage, kann wiederholt werden
<b>Stickstoffhaltige Bisphosphonate</b>				
Pamidronat	Pamifos®	tumorinduzierte Hypercalcämie	Infusionslösung	15-90 mg <i>i.v.</i>
		Knochenmetastasen		90 mg <i>i.v.</i> alle 4 Wochen
Risedronat	Actonel®	Osteoporose	Tabletten	5 mg <i>p.o.</i> /Tag oder 35 mg <i>p.o.</i> 1x wöchentlich
		Morbus Paget		30 mg <i>p.o.</i> /Tag über zwei Monate
Ibandronat	Bondronat®	Osteoporose	Tabletten, Infusionslösung	50 mg/Tag <i>p.o.</i>
		Prävention tumorbedingter Skelett-Komplikationen		6 mg <i>i.v.</i> alle 3-4 Wochen
		Tumorinduzierte Hypercalcämie		2-4 mg <i>i.v.</i> einmalig
Alendronat	Fosamax®	Osteoporose	Tabletten	10 mg <i>p.o.</i> / Tag oder 70 mg <i>p.o.</i> 1x wöchentlich
Zoledronat	Zometa®	Tumorinduzierte Hypercalcämie	Infusionslösung	4 mg <i>i.v.</i> einmalig
		Prävention tumorbedingter Skelett-Komplikationen		4 mg <i>i.v.</i> alle 3-4 Wochen
	Aclasta®	Osteoporose		5 mg <i>i.v.</i> 1x jährlich
		Morbus Paget		5 mg <i>i.v.</i> einmalig

#### 1.2.4 Wirkmechanismus

Der erfolgreiche Einsatz der Bisphosphonate bei metabolischen Knochenerkrankungen ist im Wesentlichen auf deren Eigenschaft, die Knochenresorption zu hemmen zurückzuführen. Die knochenabbauenden Osteoklasten stellen in diesem Zusammenhang den wichtigsten Angriffspunkt dar. BP wirken sich bereits hemmend auf die Osteoklastogenese aus (Clohisy et al., 2001; Hughes et al., 1995). Eine mögliche Ursache für diesen Effekt ist eine Stimulation der osteoblastären OPG-Freisetzung durch stickstoffhaltige Bisphosphonate (N-BP). Ein Anstieg dieses Zytokin-Rezeptors wirkt sich negativ auf die Osteoklastenreifung aus. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt fungiert OPG nämlich als Fängermolekül, das RANKL antagonisiert und somit die Interaktion mit dessen Rezeptor RANK auf der Osteoklastenoberfläche verhindert. Eine für die Differenzierung der Osteoklasten notwendige RANK Aktivierung bleibt folglich aus (Viereck et al., 2002). BP binden mit hoher Affinität an Calciumphosphatkristalle der Knochenoberfläche. Eine rasche Wirkstoffanreicherung erfolgt besonders im Bereich der Resorptionslakunen unterhalb der knochenabbauenden Zellen. Deren Adhäsion auf der Knochenoberfläche ist unter BP-Einfluss deutlich reduziert. Knochenresorbierende Osteoklasten können eingebettete Wirkstoffmoleküle aus dem Hydroxylapatit herauslösen und diese endozytotisch aufnehmen (Stepensky et al., 2003). Die intrazelluläre Substanzanreicherung führt in Abhängigkeit der biologischen Potenz und Konzentration des jeweiligen BP zu zahlreichen Funktionsverlusten der Osteoklasten bis hin zum programmierten Zelltod. Diese Effekte sind durch die Beeinflussung wichtiger zellulären Signaltransduktionsprozesse zu erklären.

Der Wirkmechanismus der stickstofffreien Bisphosphonate (nicht-N-BP) der ersten Generation unterscheidet sich von dem, der stickstoffhaltigen Vertreter der zweiten und dritten Generation. Beide Gruppen greifen auf unterschiedliche Weise in den Mevalonatstoffwechsel ein. Nicht-N-BP werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Pyrophosphat in die Phosphatkette des Adenosintri-phosphats (ATP) eingebaut. Die gebildeten ATP-Analoga (Abbildung 1.4) sind nicht hydrolysierbar und stehen somit nicht als Energielieferant für die Metabolisierung von Mevalonat zu Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) zur Verfügung. Eine Akkumulation dieser Analoga wirkt sich somit zytotoxisch auf die Osteoklasten aus. Deren Zellfunktion wird

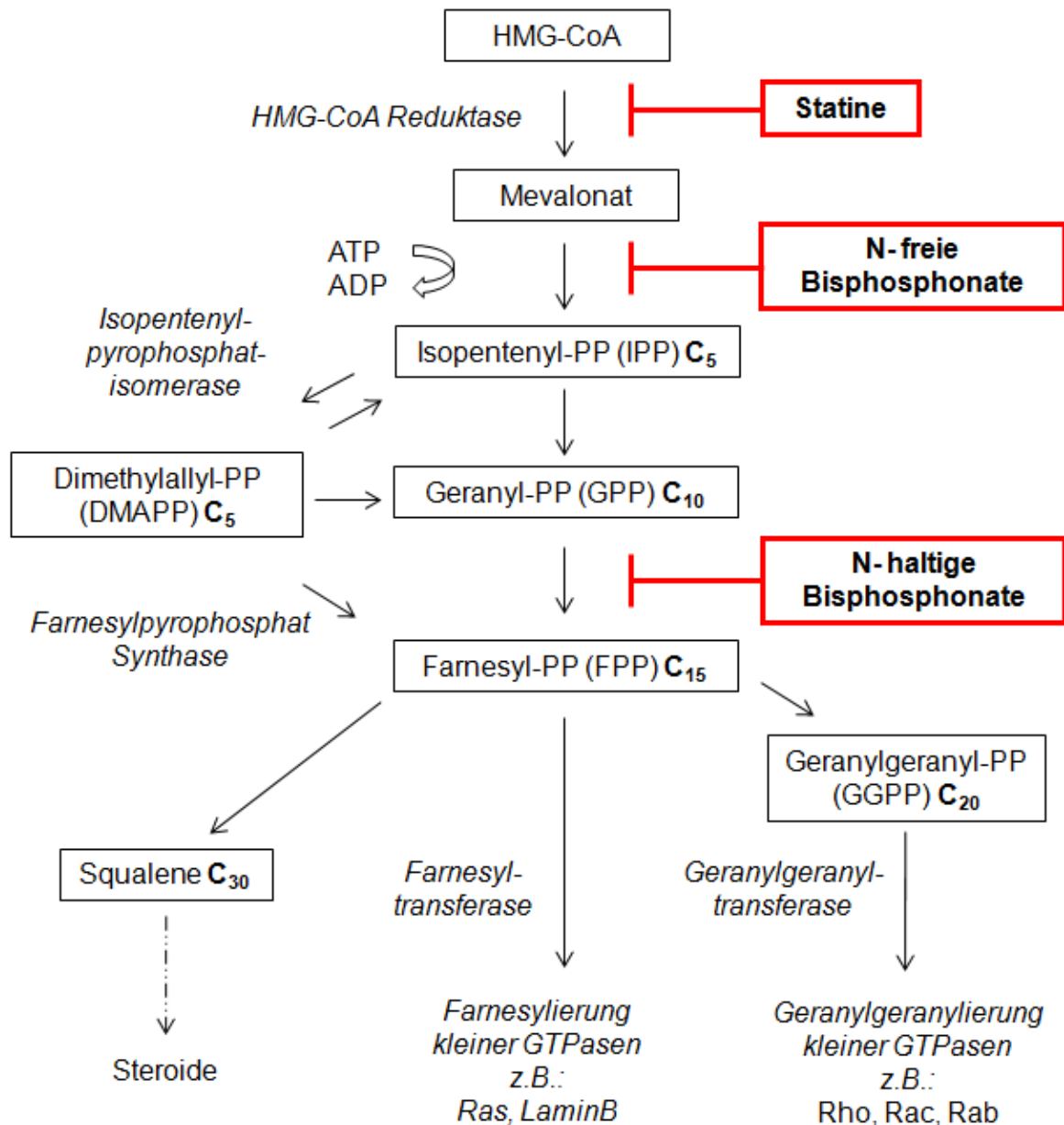
beeinträchtigt und die Apoptose induziert (Fleisch, 2003; Frith et al., 1997; Rogers et al., 1994).



**Abbildung 1.4** Bildung toxischer ATP-Analoga durch stickstofffreie Bisphosphonate, dargestellt am Beispiel Clodronats.

N-BP hingegen inhibieren kompetitiv die Farnesyl Pyrophosphat Synthase, ein Schlüsselenzym des Mevalonatstoffwechselwegs (van Beek et al., 1999a; b) (Abbildung 1.5). Die Bindungsaffinität der einzelnen N-BP zu diesem Enzym wird durch die Seitenkette  $R_2$  bestimmt und korreliert mit deren antiresorptiver Potenz (Dunford et al., 2001). Durch die Enzymhemmung wird die Bildung der Isoprenoide Farnesyl Pyrophosphat (FPP) und Geranylgeranyl Pyrophosphat (GGPP), die für die posttranslationale Prozessierung kleiner GTPasen notwendig sind, verhindert. Erst die Prenylierung der GTP-bindenden Proteine ermöglicht deren Membranlokalisation und die Interaktion mit regulatorischen Proteinen. Diese wiederum sind an zahlreichen Signaltransduktionswegen verschiedener Kinasen beteiligt und somit von grundlegender Bedeutung für essentielle Zellfunktionen (Rogers, 2003).

Die GTPasen Ras bzw. Lamin B können beispielsweise erst nach Farnesylierung in der Zellmembran verankert und somit aktiv werden. Ras ist für die Zellproliferation (Ostad et al., 1996) und Lamin B für den Verbund der Kernmembran (Neamati et al., 1995) essentiell. Die Membrantranslokation der Proteine Rho, Rab und Rac wird hingegen durch eine Geranylgeranylierung ermöglicht. Rho-Proteine sind entscheidend an der Organisation des Zytoskeletts (Ridley and Hall, 1992) und Rab-Proteine am vesikulären Transportsystem (Jordens et al., 2005) beteiligt. Rac spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Bürstensaums (ruffled border) der Osteoklasten (Palokangas et al., 1997). Die Inhibition der Isoprenoidbiosynthese hat somit entscheidende Veränderungen der Zellmorphologie zur Folge.



**Abbildung 1.5** Angriffspunkte von stickstofffreien und stickstoffhaltigen Bisphosphonaten sowie von Statinen im Mevalonatstoffwechsel.

Neben den konsekutiven Veränderungen des Zytoskeletts und des intrazellulären Transports, sind sowohl die Enzymaktivität als auch die für die Knochenresorption wichtige Säureproduktion und -sekretion beeinträchtigt. Außerdem wird die Zelldifferenzierung gehemmt und die Apoptose induziert. Hieraus resultiert neben einer eingeschränkten Aktivität auch eine verkürzte Lebensdauer der knochenabbauenden Zellen (Hughes et al., 1995; Kimmel, 2007). Eine weitere Theorie besagt, dass der antiresorptive Effekt der stickstoffhaltigen Bisphosphonate



nicht nur auf einen Mangel prenylierter Proteine zurückzuführen ist sondern auch auf die Anreicherung der unprenylierten Form der entsprechenden GTPasen und es dadurch zu einer unangemessenen Aktivierung nachfolgender Signalwege kommt (Dunford et al., 2006).

Osteoklasten stellen nicht das einzige Target der BP im Knochenmetabolismus dar. Wie bereits erwähnt, scheint auch die Beeinflussung des RANK/RANKL/OPG-Regelkreises eine wichtige Rolle zu spielen. Die stickstoffhaltigen Vertreter stimulieren die OPG-Sekretion und hemmen die Expression des membrangebundenen RANKL in Kulturen humaner Osteoblasten (Pan et al., 2004; Viereck et al., 2002). Des Weiteren sind stimulierende Effekte der BP auf die Osteoblastenvorläuferzellen (Giuliani et al., 1998), die Differenzierung der Osteoblasten (Itoh et al., 2003) sowie die Hemmung der osteoblastären Apoptose (Abe et al., 2000) bekannt. Auch die Apoptose der Osteozyten kann durch BP gehemmt werden (Plotkin et al., 1999). Darüber hinaus ist belegt, dass BP nicht nur Zellen des Knochenstoffwechsels beeinflussen. Ihr erfolgreicher Einsatz bei tumorinduzierten Knochenerkrankungen beruht nicht allein auf ihrer Fähigkeit die Knochenresorption zu inhibieren. So weisen zahlreiche in-vitro Studien eine direkte antitumorale Wirkung der BP auf verschiedene Tumorzelllinien nach, die über die Hemmung des Zellwachstums bis hin zur Apoptoseinduktion reicht (Aparicio et al., 1998; Riebeling et al., 2002; Senaratne et al., 2000). Zudem wurde eine invasions- und adhäsionshemmende Wirkung auf Tumorzellen beschrieben (Magnetto et al., 1999). Matrix-Metalloproteasen (MMP), proteolytische Enzyme, die für die Tumorzell-Invasion von großer Bedeutung sind, werden in ihrer Aktivität gehemmt und deren Expression herab reguliert (Cheng et al., 2004; Teronen et al., 1999). Außerdem besitzen BP antiangiogenetische Eigenschaften, die einen weiteren Erklärungsansatz für ihre Wirksamkeit in der Tumorthherapie liefern (Fournier et al., 2002). N-BP hemmen darüber hinaus essentielle Endothelzellfunktionen. In Zellkulturen kommt es neben einer Beeinträchtigung von HUVECs (*human umbilicord vein endothelial cells*) zu einer Schädigung von EPCs (*endothelial progenitor cells*), die eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung spielen (Walter et al., 2010b). Zusätzlich konnte eine Reduktion des zirkulierenden VEGFs (*vascular endothelial growth factor*) im Blut von Tumorpatienten nach BP-Infusion nachgewiesen werden (Santini et al., 2002). Neben diesen Effekten ist bekannt, dass BP Zellen des Weichgewebes schädigen. Dokumentiert ist auch die

schleimhautschädigende Wirkung oral applizierter BP auf den Gastrointestinaltrakt (de Groen et al., 1996). Die stickstoffhaltigen Wirkstoffe wirken sich zudem negativ auf Vitalität und Migrationsverhalten humaner oraler Keratinozyten aus, außerdem können sie deren Apoptose induzieren (Pabst et al., 2011). Ebenfalls geschädigt werden essentielle Funktionen gingivaler Fibroblasten (Walter et al., 2010b). In Untersuchungen an oralen Keratinozyten und gingivalen Fibroblasten konnte eine direkte apoptotische Wirkung Zoledronats auf Proteinebene gezeigt werden. Das N-BP bewirkt hier in klinisch relevanten Konzentrationen eine Heraufregulierung der aktiven Form der Caspasen 3 und 9 sowie eine Herunterregulierung des antiapoptotischen Survivins (Scheper et al., 2009).

### **1.2.5 Nebenwirkungen, Kontraindikationen, Interaktionen**

Bisphosphonate sind bei vorschriftsgemäßer Anwendung gut verträglich und weisen nur wenige schwerwiegende Nebenwirkungen auf (Bartl, 2006). Eine davon stellt die Nephrotoxizität bei intravenöser Applikation dar. Bei zu schneller Infusion oder bei unzureichender Verdünnung der Infusionslösung kann es, wahrscheinlich durch die Bildung unlöslicher Komplexe, zu akutem Nierenversagen kommen (Berenson and Hirschberg, 2004). Um schwerwiegende renale Komplikationen zu vermeiden, ist es deshalb sehr wichtig die angegebene Infusionsdauer und die entsprechende Verdünnung einzuhalten. Die notwendige Infusionsdauer der neueren BP ist deutlich verkürzt, da sie in wesentlich niedrigeren Dosen eingesetzt werden können als die älteren Vertreter. Bei Niereninsuffizienz sollten eine Anpassung der Dosis sowie eine Verlängerung der Infusionsdauer erfolgen (Berenson and Hirschberg, 2004). Nach der ersten intravenösen Applikation kann es zum Auftreten von Akute-Phase-Reaktionen kommen. Charakteristisch hierfür sind grippeähnliche Symptome wie Fieber oder Knochenschmerzen (Conte and Guarneri, 2004). Neben leichten gastrointestinalen Beschwerden kann die Missachtung des strengen Einnahmeregimes oraler Bisphosphonate eine ulzerierende Ösophagitis zur Folge haben. Die orale Darreichungsform sollte auf nüchternen Magen zügig und im Sitzen oder Stehen mit einer ausreichenden Menge Wasser eingenommen werden. Außerdem sollte der Patient mindestens 30 Minuten nach BP-Einnahme die aufrechte Position des Oberkörpers beibehalten (Bartl, 2006). Das Auftreten von Hypocalcämien, als Folge einer Komplexierung des Serumcalciums, stellt eine

weitere mögliche Nebenwirkung der Substanzgruppe dar. Durch eine regelmäßige Kontrolle des Calciumspiegels und der bedarfsgerechten Substitution des Salzes lässt sich diese meist symptomlose unerwünschte Wirkung verhindern (Bartl, 2006). Unter den weniger potenten BP kam es auch zu Mineralisationsstörungen (Osteomalazie), einem Effekt, den die neueren hochpotenten Substanzen nicht zeigen. Des Weiteren wurden Seh- und Hörstörungen, eine lokale Phlebitis sowie allergische Hautausschläge beobachtet. Aufgrund ihrer Wirkung auf den Knochenstoffwechsel stellen Schwangerschaft und Stillzeit eine absolute Kontraindikation für die Therapie mit BP dar. Der Einsatz bei Kindern ist möglich, erfolgt jedoch nur bei streng gestellter Indikation. Bei Patienten mit Schluckstörungen, Refluxösophagitis sowie entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sollte die BP-Applikation intravenös erfolgen (Bartl, 2006).

Eine weitere in den letzten Jahren immer ernstzunehmendere Nebenwirkung stellt die **Bisphosphonat assoziierte Osteonekrose der Kiefer** (BP-ONJ) dar (Walter et al., 2007). In-vitro-Untersuchungen zu den pathologischen Mechanismen der Entwicklung der BP-ONJ sowie mögliche Präventions- bzw. Therapieansätze sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## 1.3 Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer

### 1.3.1 Definition und klinische Präsentation

Im Jahr 2003 wurde erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten avaskulärer Knochennekrosen der Kiefer und der intravenösen Applikation von Bisphosphonaten (Pamidronat, Zoledronat) beschrieben (Marx, 2003). Seitdem sind zahlreiche Fälle der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose der Kiefer (*Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw*, BP-ONJ) bekannt geworden, wobei die Frequenz in den letzten Jahren zugenommen hat (Walter et al., 2007). 2004 publizierten Rogers et al. die ersten Fallberichte im Zusammenhang mit einer peroralen BP-Applikation (Ruggiero et al., 2004).

Nach der Definition der *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (AAMOS) ist das Charakteristikum der BP-ONJ ein über eine Periode von mindestens acht Wochen freiliegender Kieferknochen, der keine Anzeichen der Spontanheilung zeigt und im zeitlichen Zusammenhang mit einer Bisphosphonattherapie steht. Des Weiteren sollte keine Bestrahlungstherapie des Kiefers Bestandteil der Anamnese sein (AAMOS, 2007).

Der anfangs angezweifelte kausale Zusammenhang zwischen BP-Therapie und der Entstehung der avaskulärer Nekrosen (Tarassoff and Csermak, 2003) ist mittlerweile anerkannt und in die Fachinformationen aufgenommen worden. Die Inzidenz der BP-ONJ liegt nach dem 2009 veröffentlichten Angaben der AAMOS bei 8-12% (Ruggiero et al., 2009). Es gibt jedoch zahlreiche Studien, deren Ergebnisse abhängig von der Grunderkrankung deutlich von diesen Daten abweichen. So wurde beispielsweise für das Auftreten einer BP-ONJ bei der Therapie des metastasierenden Prostatakarzinoms eine Inzidenz von über 18% beschrieben (Walter et al., 2010a). Auffällig ist, dass hauptsächlich N-BP, die intravenös appliziert werden, mit dem Auftreten von Nekrosen assoziiert sind. Im Gegensatz dazu sind im Zusammenhang mit nicht-N-BP nur wenige Fallberichte bekannt (Montazeri et al., 2007; Senel et al., 2007). Zahnextraktionen, Erkrankungen des Zahnhalteapparates (Parodontopathien) oder oralchirurgische Eingriffe stellen Triggerfaktoren dar. Eine BP-ONJ kann sich jedoch auch spontan ohne erkennbare Auslöser entwickeln (Abu-Id et al., 2006). Betroffen sein können der Unterkiefer (*Mandibula*), der Oberkiefer (*Maxilla*) sowie beide Kieferknochen (Bagan et al., 2006). Das unspezifische klinische Bild reicht von nicht heilenden Alveolen nach Zahnextraktion über kleinere Bereiche freiliegenden

Knochens bis zur Nekrose des gesamten Kiefers. Je nach Ausprägung und Lokalisation kann eine bestehende BP-ONJ über lange Zeit asymptomatisch verlaufen oder mit starken Schmerzen und Sensibilitätsstörungen einhergehen. Außerdem treten Entzündungen des Zahnfleisches sowie der Mundschleimhaut, Zahnlockerungen und starker Mundgeruch auf. Daneben kann es zur Bildung von Fisteln und Abszessen kommen (Diel et al., 2007; Marx et al., 2005; Otto et al., 2009; Zervas et al., 2006).

### 1.3.2 Theorien zur Pathogenese

Die genaue Pathogenese der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose ist noch ungeklärt. In der Literatur werden derzeit folgende Mechanismen diskutiert (Allen and Burr, 2009):

**Vermindertes *Bone remodelling*:** Dieser Theorie liegt die Eigenschaft der BP zu Grunde, die physiologischen Knochenumbauprozesse zu unterdrücken. BP hemmen nicht nur die knochenresorbierenden Osteoklasten, sondern beeinträchtigen auch Osteoblasten und Osteozyten und somit alle am Umbau beteiligten Zellen. Ein vermindertes *Bone remodelling* kann zu einer Anreicherung von Mikrofrakturen und einer veränderten Mineralisation führen (Komatsubara et al., 2004; Mashiba et al., 2005). Die Exklusivität der Kieferknochen wird unter anderem durch deren besonders hohe Umbaurate erklärt. Diese ermöglicht eine raschere und höhere Akkumulation der Bisphosphonate im Kiefer verglichen mit anderen Teilen des Skeletts (Reid et al., 2007; Vignery and Baron, 1980). Eine Reduktion der notwendigen Fähigkeit alten Knochen abzubauen und neuen Knochen zu bilden, fällt hier entsprechend stark ins Gewicht.

**Antiangiogenetische Wirkung:** Der hemmende Effekt der BP auf die Angiogenese liefert eine weitere mögliche Erklärung für die Entstehung der avaskulären Nekrosen. Zahlreiche Untersuchungen im Zusammenhang mit der Klärung der antitumoralen Wirkmechanismen der Arzneistoffe belegen deren antiangiogenetisches Potential (Santini et al., 2002). Neben der Expressionshemmung des VEGFs (*Vascular endothelial growth factor*) wurde ein direkter inhibitorischer Effekt auf die Proliferation sowie auf weitere essentielle Funktionen von Endothelzellen nachgewiesen (Scavelli et al., 2007). Des Weiteren werden endotheliale Progenitorzellen (EPC) geschädigt, die eine wichtige Rolle bei der Vaskulogenese, der Gefäßneubildung spielen (Walter

et al., 2010b). Als Folge dieser BP-Wirkung kann es zu einer Ischämie des Kieferknochens und der Weichteile, die den Knochen bedecken, kommen. Immunhistologische Untersuchungen zeigen eine verminderte Neovaskularisation sowie eine Einschränkung des Gefäßremodellings der oralen Mucosa in Bereichen Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen (Wehrhan et al., 2011).

**Gestörte Wundheilung:** Toxische Effekte der BP auf die den Knochen bedeckenden Weichteile werden ebenfalls als ursächlich bei der Entstehung der BP-ONJ diskutiert. Der schädigende Einfluss der Substanzen auf Proliferation und Wundheilungsvermögen von Keratinozyten wurde beschrieben (Landesberg et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch N-BP sowohl die Vitalität als auch die Migrationsfähigkeit gingivaler Fibroblasten reduziert wird (Walter et al., 2010b).

**Infektion:** Andere Autoren betonen die Bedeutung der bakteriellen Kontamination an der Pathogenese der BP-ONJ. Die teils sehr dünne Mucosa, die den Kieferknochen bedeckt, kann, wie bereits erwähnt, durch BP geschädigt sein. Verletzungen können aber auch beispielsweise bei der Nahrungsaufnahme oder durch dentalchirurgische Eingriffe entstehen. An diesen Stellen kann es sehr leicht zum Eindringen von Bakterien kommen. *Actinobacillus actinomycescomitans* (AA) und *Porphyromonas gingivalis* (PG) sind Beispiele für Pathogene, die an der Knochendestruktion im Rahmen der Parodontitis beteiligt sind (Nair et al., 1996). Der Nachweis der mikrobiellen Kontamination fast aller Kiefernekrosen bekräftigt die Theorie, dass auch in der Pathogenese der BP-ONJ Bakterien eine wichtige Rolle spielen (Hansen et al., 2007). Lesclous et al. zeigten 2009 erstmals eine Korrelation zwischen dem Entzündungsgrad des perinekrotischen Knochens und dem klinischen Ausmaß der BP-ONJ (Lesclous et al., 2009). Unklar ist jedoch, ob die Infektion der Auslöser für die Entwicklung einer Nekrose ist oder, ob es möglicherweise durch eine bereits bestehende Nekrose zur Infektion kommt (Allen and Burr, 2009). Im zweiten Fall bestände keine direkte Kausalität, trotzdem würde die Entzündungsreaktion den weiteren Untergang des Knochengewebes triggern. Eine andere Theorie basiert auf der Tatsache, dass Entzündungsreaktionen mit einer Absenkung des pH-Wertes einhergehen. Der Kiefer ist häufig Infektionen im Zusammenhang mit dentalchirurgischen Eingriffen oder Parodontopathien ausgesetzt. Durch die lokale Azidifizierung des Gewebes kann es zu einer Protonierung der im Knochen gebundenen Bisphosphonate kommen. In dieser Form werden die Wirkstoffe aus

dem Hydroxylapatit freigesetzt. Ein starker Anstieg der lokalen BP-Konzentration und eine damit einhergehende Verstärkung der zytotoxischen Effekte sind die Folge (Otto et al., 2010). Jüngste in-vitro Untersuchungen weisen auf einen weiteren möglichen Zusammenhang zwischen dem Einfluss N-BP und der Beteiligung bakterieller Mikroorganismen am Pathomechanismus der BP-ONJ hin. Es konnte gezeigt werden, dass ein breites Spektrum grampositiver sowie gramnegativer Bakterien in signifikant stärkerem Maße an Hydroxylapatit, das zuvor mit Pamidronat behandelt wurde, adhäriert, als an die unbehandelte Substanz. Nach Kos et al. liefert die, durch das N-BP strukturell veränderte Oberfläche des Knochenmaterials eine denkbare Erklärung für diese gesteigerte bakterielle Bindungsfähigkeit. Vermutet wird, dass die aus dem Hydroxylapatit herausragende reaktive Aminogruppe des N-BP sowohl stereochemisch als auch elektrostatisch mit der Oberfläche der Bakterien in Wechselwirkung tritt und somit die Ausbildung eines Mikrofilms begünstigt (Kos et al., 2013).

**Genetische Prädisposition:** Auf genetischer Ebene könnte das MMP2 Gen eine wichtige Rolle spielen (Lehrer et al., 2009). Des Weiteren wird über einen Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) im Cytochrom P450 CYP2C8 als möglicher Risikofaktor, eine BP-ONJ zu entwickeln diskutiert (Sarasquete et al., 2008).

**Weitere Risikofaktoren:** Es gibt zahlreiche Hypothesen über weitere Risikofaktoren bezüglich Co-Morbidität und Co-Medikation. Besonders über den Einfluss von Glucocorticoiden, Zytostatika (Jadu et al., 2007) sowie den von antiangiogenetischen Wirkstoffen (Christodoulou et al., 2009) wird diskutiert. Zusätzlich sind Co-Faktoren wie Diabetes, einige Autoimmunerkrankungen, Alkoholismus, Rauchen und mangelnde Mundhygiene im Gespräch (Assouline-Dayyan et al., 2002; Campisi et al., 2007). Die Theorie, dass zahnmedizinische Interventionen, insbesondere Zahnextraktionen, das Risiko eine BP-ONJ zu entwickeln erhöhen, gilt als etabliert. Ebenso nachgewiesen ist, dass sowohl der Typ des BP sowie die Dauer der Therapie eine entscheidende Rolle spielen (Bamias et al., 2005). So geht man davon aus, dass die BP-ONJ eine Komplikation der Langzeittherapie (Migliorati et al., 2006) besonders hochpotenter N-BP wie Pamidronat oder Zoledronat nach intravenöser Applikation darstellt (Diel et al., 2007; Reid, 2009). Es gibt ebenfalls Daten, die belegen, dass das Risiko von der Grunderkrankung selbst abhängt. So sind besonders Patienten mit malignen Erkrankungen, wie dem Multiplen Myelom, Mamma- oder Prostatakarzinom von der BP-ONJ betroffen (Boonyapakorn et al.,

2008; Marx et al., 2005; Reid and Cundy, 2009) . Möglicherweise erhöht auch eine vorrangigene Radiotherapie des Kiefers das Risiko eine BP-ONJ zu entwickeln (Grotz et al., 2007).

### **1.3.3 Prophylaxe und Therapie**

In der Literatur ist eine große Varianz unterschiedlicher sowohl konservativer als auch invasiver Behandlungsstrategien beschrieben. Prophylaxe und Minimierung möglicher Risikofaktoren haben höchste Priorität. Vor Beginn der BP-Therapie müssen sowohl Patient als auch die behandelnden Ärzte über das Risiko der Nebenwirkung aufgeklärt werden. Um die spätere Notwendigkeit zahnärztlicher Interventionen und damit mögliche dentoalveolare Traumata zu vermeiden, sollte vor Therapiebeginn eine Zahnsanierung erfolgen. Während der Therapie sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen in kurzen Zeitabständen erforderlich. Ist ein zahnärztlicher Eingriff unumgänglich, sind konservative Maßnahmen gegenüber chirurgischen Interventionen zu präferieren. Abhängig vom Stadium der BP-ONJ empfiehlt die American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) unterschiedliche therapeutische Strategien (Ruggiero et al., 2009). Im ersten Stadium liegt bereits eine manifeste Osteonekrose vor, die jedoch keine Anzeichen einer Infektion zeigt. Im Vordergrund stehen hier der Einsatz antibakteriell wirksamer Mundspüllösungen sowie ein enges zahnärztliches Recall. Ab dem zweiten Stadium ist neben minimalinvasiven Maßnahmen, der Einsatz von erregerspezifischen Antibiotika sowie Analgetika notwendig. Erst im dritten Stadium sind ausgedehnte chirurgische Eingriffe empfohlen. (Marx et al., 2007; Ruggiero et al., 2009; Van den Wyngaert et al., 2009). Die S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde sieht im Gegensatz zu den angloamerikanischen Empfehlungen bereits in früheren Stadien die Notwendigkeit chirurgischer Interventionen bei denen der nekrotische Knochen vollständig entfernt wird, um einem weiteren Progress der Erkrankung entgegenzuwirken (Grotz et al., 2012).

Weitere Maßnahmen wie der Einsatz von hyperbarem Sauerstoff (Freiberger, 2009) oder der eines Low Level Lasers (Scoletta et al., 2009) werden in der Literatur ebenso kontrovers diskutiert wie der von *Platelet-rich Plasma* (PRP) (Curi et al., 2007), des osteoinduktiven *Bone morphogenetic proteins 2* (BMP-2) (Herford and Boyne, 2008), des Parathormons (PTH) (Harper and Fung, 2007) oder des *Platelet-*



*derived growth factors* (PDGF) (Adornato et al., 2007). Ob eine Unterbrechung der BP-Therapie, beim Auftreten erster Symptome der BP-ONJ, den Krankheitsverlauf aufhält, ist wegen der extrem langen Knochenhalbwertszeit der Substanzen zweifelhaft (Nastro et al., 2007).

#### 1.3.4 Geranylgeraniol als neue therapeutische Option

Aufgrund der bis heute begrenzten und teils kontrovers diskutierten Möglichkeiten diese schwerwiegende Arzneimittelnebenwirkung zu therapieren, ist die weitere Erforschung der genauen Pathomechanismen von größter Bedeutung. Denn nur, wenn diese bekannt sind, kann frühzeitig interveniert bzw. kausal therapiert werden. Gegenstand aktueller Untersuchungen ist die Antagonisierung, der durch BP verursachten Blockade des Mevalonatstoffwechsels. Ziebart et al. zeigten 2011 den Erhalt wichtiger Funktionen mit N-BP behandelter Zellen durch die Substitution von Geranylgeraniol (GGOH) (Ziebart et al., 2011).

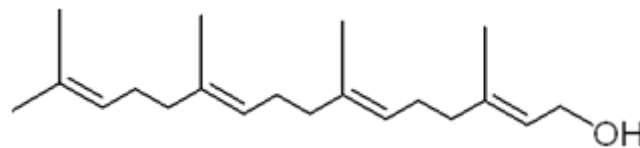
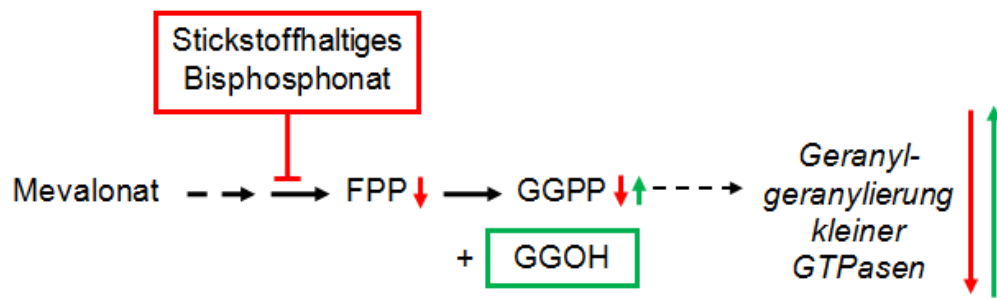


Abbildung 1.6 Strukturformel des Mevalonatstoffwechsel-Intermediates Geranylgeraniol

Bei dem Isoprenoid handelt es sich um ein Stoffwechselintermediat, welches der durch N-BP gehemmten Farnesylpyrophosphat (FPP) Synthase nachgeschaltet ist. In der genannten in-vitro Studie konnte der präventive Effekt des GGOHs auf essentielle Funktionen von gingivalen Fibroblasten, Endothelzellen (HUVEC) und Osteoblasten, die jeweils parallel mit N-BP (Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat) behandelt wurden, nachgewiesen werden. Da die Funktionseinschränkungen der untersuchten Zellen mit der BP-ONJ assoziiert sind, könnte der therapeutische Einsatz des natürlichen Isoprenoids bei BP-ONJ-Patienten oder Patienten, die mit N-BP behandelt werden, eine Möglichkeit darstellen, der Entwicklung bzw. dem Verlauf dieser ernsthaften Arzneimittelnebenwirkung entgegenzuwirken (Ziebart et al., 2011).



**Abbildung 1.7** Antagonisierung der N-BP-induzierten Hemmung des Mevalonatstoffwechsels durch Geranylgeraniol (GGOH).

Die besondere Rolle des Mevalonatstoffwechsel-Intermediats GGOH am Erhalt essentieller Zellfunktionen wurde bereits in Studien deutlich, die sich mit den zugrundeliegenden Mechanismen der Wirkung von N-BP auf Osteoklasten beschäftigten. Externes GGOH zeigte sich sowohl in der Lage dem schädigenden Einfluss der FPP Synthase-Hemmer auf die Osteogenese als auch auf die Knochenresorption entgegenzuwirken. Die Substitution von Farnesol sowie von Squalene, beides ebenfalls Mevalonatstoffwechsel-Intermediate, die dem gehemmten Enzym FPP Synthase nachgeschaltet sind, führten stattdessen nicht zum Erhalt der Osteoklastenfunktion (Fisher et al., 1999).

Auch an Zellen des Ovarialkarzinoms (Sawada et al., 2002) und des Mammakarzinoms (Denoyelle et al., 2003) konnte der antagonisierende Effekt GGOHs gegenüber der N-BP-Wirkung nachgewiesen werden. Während in einer Studie an Prostatakrebszellen der Linie PC-3 aus dem Jahr 2002 sowohl GGOH als auch Farnesol zumindest teilweise die Invasionsfähigkeit der Zellen vor der Wirkung des stickstoffhaltigen Alendronats schützten (Virtanen et al., 2002), zeigte eine 2006 publizierte Untersuchung an den durch Zoledronat beeinträchtigten Prostatakrebs-Zelllinien PC-3 und LnCap sowie an der Prostatazelllinie PNT1-A ausschließlich einen protektiven Effekt durch GGOH (Goffinet et al., 2006). Die Theorie, dass die antiinvasive N-BP-Wirkung auf Tumorzellen durch eine mangelnde Geranylgeranylierung und nicht durch eine Reduktion der Proteinfarnesylierung zustande kommt, wird durch die Ergebnisse einer Studie an einer äußerst aggressiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 unterstützt. Neben der Tatsache, dass GGOH im Gegensatz zu FOH die durch Zoledronat unterdrückte Invasivität der Zellen wieder herstellte, war ausschließlich GGOH in der Lage, das durch das N-BP zu Gunsten des cytosolischen RhoAs verschobene Verhältnis zwischen dem freiem

und membrangebundenem Protein wieder zu normalisieren (Denoyelle et al., 2003). Des Weiteren haben in-vitro Untersuchungen im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis gezeigt, dass die Vitalität synovialer Fibroblasten unter dem Einfluss des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Simvastatin sinkt. GGOH war in der Lage die Zellen vor diesem Effekt zu bewahren. Die antagonisierende Wirkung GGOHs gegenüber dem Statin konnte auch anhand der GTPasen RhoA und Rac1 nachgewiesen werden. Während der HMG-CoA- Reduktase-Hemmer einen Anstieg der G-Proteine im Cytosol und eine Verringerung des membrangebundenen Anteils bewirkt, führt die Kombinationsbehandlung mit GGOH zur Normalisierung der zellulären Verteilung (Connor et al., 2006).

Die hier aufgeführten Beispiele zeigen, dass sich GGOH bereits in zahlreichen in-vitro Studien als potenter „N-BP-Antagonist“ bewiesen hat. Das offensichtlichste Problem dieser Wirkung stellt die Tatsache dar, dass GGOH nicht nur die schädigenden Effekte der N-BP auf die an der Entwicklung der BP-ONJ beteiligten Zellen zu antagonisieren vermag, sondern möglicherweise auch deren gewünschte Wirkungen auf Tumor- und Knochenstoffwechsel. Aus diesem Grund schlagen Ziebart et al. in der 2011 erschienenen Publikation die topische Anwendung GGOHs zum Beispiel in Mundspülungen oder in „Drug delivery“-Systemen vor. Durch den lokalen Einsatz des natürlichen Isoprenoids könnte die Entwicklung der BP-ONJ möglicherweise gezielt verhindert werden, ohne die systemische Wirkung der N-BP zu beeinträchtigen. Betont wird die Notwendigkeit weiterer umfangreicher Studien, die über die bisherigen in-vitro Untersuchungen hinausgehen (Ziebart et al., 2011).

## 2 Fragestellung

Aufgrund der zunehmenden Frequenz der BP-ONJ als schwerwiegende Arzneimittelnebenwirkung, deren zugrunde liegenden Pathomechanismen bis heute nicht genau geklärt sind und der bislang begrenzten Therapiemöglichkeiten, befasst sich die vorliegende Arbeit mit den folgenden Fragestellungen:

- Im ersten Teil sollte der potentielle Einfluss verschiedener Bisphosphonate auf die Abwehrmechanismen der granulozytären Immunantwort untersucht werden. Neben der fMLP-stimulierten Chemotaxis galt es mögliche Effekte auf die Phagozytose sowie den oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten zu analysieren.

Des Weiteren sollte geprüft werden, ob sich die potentiellen Effekte der stickstoffhaltigen Bisphosphonate Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat von denen des stickstofffreien Bisphosphonats Clodronat unterscheiden und ob mögliche Unterschiede zwischen den beiden Bisphosphonat-Gruppen mit deren Häufigkeit eine BP-ONJ zu entwickeln korrelieren.

- Angesichts der protektiven Wirkung, die externes Geranylgeraniol auf durch stickstoffhaltige Bisphosphonate geschädigte Zellen ausübt und die damit verbundenen vielversprechende Optionen dem pathologischen Geschehen der BP-ONJ entgegenzuwirken, sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere natürliche Isoprenoide untersucht werden. Hierzu zählten neben Intermediaten des Mevalonatstoffwechsels (Farnesol und Squalene), die drei Monoterpene Eugenol, R-Limonene und Menthol. Getestet wurde der Einfluss der verschiedenen Substanzen auf Vitalität, Migrationsfähigkeit und Zellarchitektur gingivaler Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten sowohl allein als auch in Kombination mit dem stickstoffhaltigen Bisphosphonat Zoledronat. Die potentiell antagonisierende Wirkung sollte mit der des Geranylgeraniols verglichen werden.
- Des Weiteren sollte der Einfluss einer Kombinationsbehandlung aus stickstofffreiem Bisphosphonat (Clodronat) und stickstoffhaltigem Bisphosphonat (Zoledronat) auf die Vitalität gingivaler Fibroblasten, HUVEC, Osteoblasten und Keratinozyten untersucht werden um zu ermitteln, ob Clodronat die Zellen eventuell vor der schädigenden Wirkung Zoledronats zu schützen vermag.
- Um die zugrundeliegenden Mechanismen der schädigenden Wirkung Zoledronats (und der protektiven Effekte Geranylgeraniols) auf gingivale Fibroblasten genauer

zu verstehen, sollten verschiedene für essentielle Fibroblastenfunktionen relevante Proteine untersucht werden. Hierzu galt es den alleinigen Einfluss Zoledronats mit dem Einfluss einer Kombinationsbehandlung aus Zoledronat und Geranylgeraniol bzw. Farnesol auf die Expression der beiden Tyrosinkinassen FAK (Fokale Adhäsionskinase) und Paxillin sowie auf deren Phosphorylierungsgrad an ausgewählten Tyrosinresten [Phospho-FAK (Tyr925) und Phospho-Paxillin (Tyr118)] zu vergleichen. Darüber hinaus sollte der Einfluss der zu testenden Substanzen auf die Expression der kleinen Rho-GTPasen RhoA und RhoB ermittelt und verglichen werden.

In einer hierauf aufbauenden Studie galt es schließlich die Frage zu klären, inwiefern die aktive Form RhoAs durch die Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung beeinflusst wird.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien und Geräte

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien/ Einmalartikel

Tabelle 3.1 Verbrauchsmaterialien/ Einmalartikel.

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Amersham Hybond™-P (PVDF-Membran)	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
BD Falcon™ Culture Slides (4-well)	BD Biosciences, Erembodegem, B
BD Falcon™ Polystyrene Round-Bottom Tubes 5ml	BD Biosciences, Erembodegem, B
Einmal- Küvetten PMMA Halbmikro 1,5ml	VWE, Darmstadt, D
Gewebekulturflächen mit Filter Cellstar® 75 cm <sup>2</sup> , 225 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Mikropipetten Pipetman® 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Multipipette Pipetman® 200µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Pasteurpipetten 5ml	VWR, Darmstadt, D
Pipetten mit Spitze 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen Diamond® D10, D200, D1000	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH, Neuhof, D
PP Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Safe Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, D

Whatman™ Chromatography Paper	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Zellkulturplatten Cellstar® 6 Well, 12 Well, 24 Well, 96 Well	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

### 3.1.2 Geräte

Tabelle 3.2 Geräte.

Art, Typbezeichnung	Hersteller
BD FACSCalibur™ , CELLQuest software	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Brutschrank, BB16	Heraeus instruments, Hanau, D
Dispensierpipette, Multipette® stream	Eppendorf, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Neuhausen, D
Mikroplattenreader	Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA
Mikroplattenreader Synergy HT	Biotek, Winooski, Vermont, USA
Mikroskop, DMIL Typ 090131001	Leica Microscopy and systems GmbH, Wetzlar, D
Mikrozentrifuge, Thermo Scientific Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Osterode, D
Mini Protean 2™ (Elektrophoresekammer)	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Neubauer Zählkammer 0,100 mm Tiefe	LO Laboroptik, Friedrichsdorf, D
Sicherheitswerkbank, HS 12	Heraeus instruments, Hanau, D
Spectrophotometer, Spectronic™ Genesys 20™	Thermo Electron Corporation, Dreieich, D

Thermoblock, Eppendorf Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg, D
Trans-Blot®SD Semidry Transfer Cell	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Vortexer, MS3 basic	IKA, Staufen, D
Wasserbad, VWB 6	VWR, Haasrode, B
Zentrifuge, Labofuge 400e	Heraeus instruments, Osterode, D

### 3.1.3 Bisphosphonate

**Tabelle 3.3 Bisphosphonate.**

Handelsname	Stoffbezeichnung	Hersteller
Bonefos® 60mg/ml	Clodronsäure, Dinatriumsalz x 4H <sub>2</sub> O	Bayer, Leverkusen, D
Bondronat® 1mg/ml	Ibandronsäure, Mononatriamsalz x 4H <sub>2</sub> O	Roche, Shire Park, Welweyn Garden City, UK
Pamifos® 3mg/ml	Pamidronsäure, Dinatriumsalz	Medac, Hamburg, D
Zometa® 4mg/5ml	Zoledronsäure, Monohydrat	Novartis Pharma, Basel, CH

### 3.1.4 Isoprenoide

**Tabelle 3.4 Isoprenoide.**

Bezeichnung	Hersteller
Eugenol	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Farnesol 95%, mixture of isomers	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Geranylgeraniol ≥ 85%	Sigma Aldrich, Missouri, USA



R-(+)Limonene	Sigma Aldrich, Missouri, USA
(+)Menthol	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Squalene ≥98%	Sigma Aldrich, Missouri, USA

### 3.1.5 Chemikalien/ Reagenzien

Tabelle 3.5 Chemikalien/ Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest.	Braun, Melsungen, D
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Missouri, USA
bFGF	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
BODIPY ®FL Phalloidin	Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Missouri, USA
BSA	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Calcein	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dexamethason	Sigma Aldrich, Missouri, USA
DL-Norleucin	Sigma Aldrich, Missouri, USA
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) 1g/l Glucose	Sigma Aldrich, Missouri, USA
DMSO	Sigma Aldrich, Missouri, USA

Fixierer (AGFA Dentus F)	Heraeus, Hanau, D
Entwickler (AGFA Dentus D)	Heraeus, Hanau, D
Endothel cell groth medium	Provitro, Berlin, D
FCS (Fetal Calf Serum)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Full Range Rainbow Marker	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Glycerol	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Glycin	Sigma Aldrich, Missouri, USA
HCl (2N)	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Hedinger, Horgen, CH
Kodak Bio Max light film	Sigma Aldrich, Missouri, USA
L-Ascorbic acid 2-phosphate	Sigma Aldrich, Missouri, USA
L-Glutamin 200mM (100x)	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
MTT	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D

Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Poly- L-Lysin	ScienCell, San Diego, Kalifornien, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, Missouri, USA
PSN (Penicillin/ Streptomycin/ Neomycin) (100x)	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Ripa Puffer	Sigma Aldrich, Missouri, USA
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ultra pure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris (Trizma®) Base	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Tris-Glycine NB 12% (Gele)	PeqLab, Erlangen, D
TritonX100	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Trypanblau	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypsin-EDTA (1x)	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Tween20	Sigma Aldrich, Missouri, USA

### 3.1.6 Biochemische Kits

Tabelle 3.6 Biochemische Kits.

Bezeichnung	Hersteller
ECL™ Western Blot detection kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
G- LISA™ RhoA Activation Assay (Luminescence Based)	Cytoskeleton, Colorado, USA
Migratest™	Glykotope Biotechnology, Heidelberg, D
Pierce® BCA Protein Assay kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Phagotest™	Glykotope Biotechnology, Heidelberg, D
Phagoburst™	Glykotope Biotechnology, Heidelberg, D

### 3.1.7 Antikörper

Tabelle 3.7 Antikörper.

Bezeichnung	Hersteller
Anti- rabbit IgG, HPR- linked Antibody	Cell Signaling, Massachusetts, USA
FAK Antibody	Cell Signaling, Massachusetts, USA
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Paxillin Antibody	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Phospho- FAK (Tyr925) Antibody	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Phospho- Paxillin (Tyr118) Antibody	Cell Signaling, Massachusetts, USA

RhoA (67B9) Rabbit mAb	Cell Signaling, Massachusetts, USA
RhoB Antibody	Cell Signaling, Massachusetts, USA

### 3.1.8 Zelllinien

**Tabelle 3.8 Zellenlinien.**

Bezeichnung	Hersteller
<i>Human gingival fibroblasts</i> No. CC-7049	Lonza, Basel, CH,
<i>Human oral keratinocytes</i> (HOK) No. 2610	ScienCell, San Diago, Kalifornien, USA
<i>Human osteogenic cells</i> (HOB) No. C-12720	PromoCell, Heidelberg, D
<i>Human umbilicord vein endothelial cells</i> (HUVEC) No. CC-2517	Lonza, Basel, CH

### 3.1.9 Zellkulturmedien

**Tabelle 3.9 Zellkulturmedien.**

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
DMEM (1000mg/l Glucose)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Endothel Cell growth medium	Provitro, Berlin, D
Fibroblastenmedium	<i>siehe</i> Hergestellte Lösungen Tabelle 3.10
Keratinocyte growth medium (advanced)	ScienCell, San Diago, Kalifornien, USA
Osteoblastenmedium	<i>siehe</i> Hergestellte Lösungen Tabelle 3.10

### 3.1.10 Hergestellte Lösungen

Tabelle 3.10 Hergestellte Lösungen.

Hergestellte Lösung	eingesetzte Substanzen	Menge
Anodenpuffer 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tris-Base</li> <li>✓ Methanol</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	18,1g 100ml 400ml
Anodenpuffer 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tris-Base</li> <li>✓ Methanol</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	1,5g 100ml 400ml
BSA "Blocking Solution"	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ TBS</li> <li>✓ BSA</li> <li>✓ Tween20</li> </ul>	200ml 10g 200µl
Fibroblastenmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ DMEM</li> <li>✓ PSN</li> <li>✓ FCS</li> <li>✓ bFGF</li> </ul>	500ml 5ml 50ml 500µl
Kathodenpuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tris-Base</li> <li>✓ DL-Norleucin</li> <li>✓ SDS 10%</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	3,03g 5,25g 2,5ml ad 1000ml
Laufpuffer (5x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tris-Base</li> <li>✓ Glycin</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	150g 720ml ad 5000ml
Milchpulver "Blocking Solution"	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Milchpulver</li> <li>✓ TBSW</li> </ul>	10g Ad 200ml
Osteoblastenmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ DMEM</li> <li>✓ L-Glutamin</li> <li>✓ Ascorbinsäure</li> <li>✓ PSN</li> <li>✓ FCS</li> <li>✓ Dexamethason</li> </ul>	500ml 5ml 150mg 5ml 50ml 20µl
5xPDP-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Glycerol</li> <li>✓ β-Mercaptoethanol</li> <li>✓ Tris (1M, pH6,8)</li> <li>✓ Bromphenolblau</li> <li>✓ SDS</li> </ul>	5ml 2,5ml 2,5ml 0,025g 0,4g
TBS (pH 7,4) (10x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ NaCL</li> <li>✓ Tris-Base</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	81,8g 12,1g ad 1000ml
TBSAK	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 10xTBS</li> <li>✓ Tween 20</li> <li>✓ Milchpulver</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	5ml 50µl 1g ad 50ml

TBSW	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 10xTBS</li> <li>✓ Tween 20</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	100ml 4ml ad 1000ml
Tris 1M (pH 6,8)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tris-Base</li> <li>✓ Aqua dest.</li> </ul>	121,14g ad 1000g

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Einleitend zu den Untersuchungen neutrophiler Granulozyten soll an dieser Stelle das Prinzip der durchflusszytometrischen Analyse vorgestellt werden.

Die Durchflusszytometrie (FACS, „*Fluorescence Activated Cell Sorting*“) stellt eine Möglichkeit der qualitativen und quantitativen Zellanalyse dar. Zellen in Suspension werden durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt. Hierdurch kann eine Zelle nach der anderen durch einen Laserstrahl geleitet und einzeln gemessen werden.

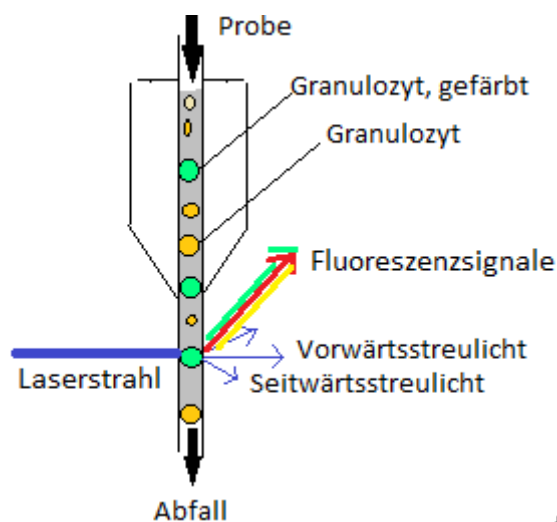
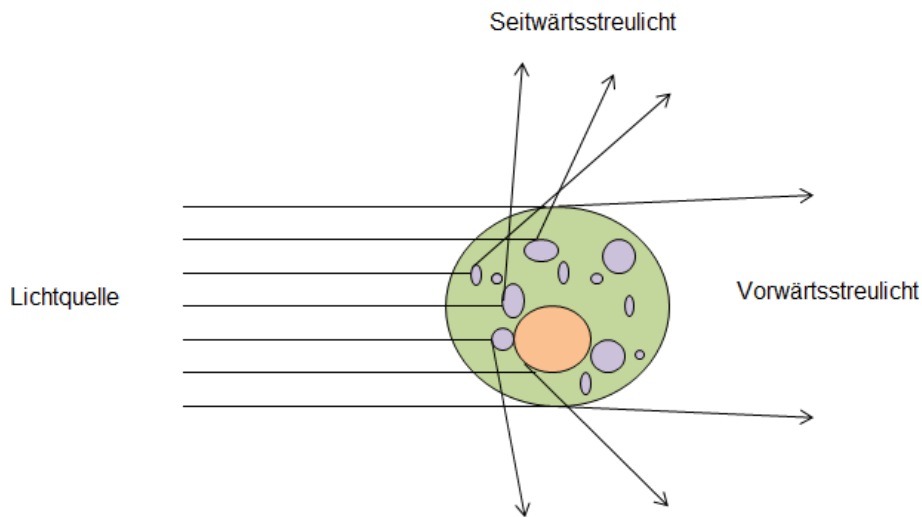


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.

Dabei kommt es zur Emission charakteristischer Lichtsignale, die mit Hilfe geeigneter Detektoren ausgewertet werden. Mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (FSC = *Forward Scatter*) lässt sich die relative Zellgröße bzw. das Zellvolumen bestimmen, dagegen stellt das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) ein Maß für die Granularität der Zelle dar. Wurde die Zellsuspension zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, z.B. gegen zellspezifische Oberflächenantigene behandelt, lassen sich die Zellen aufgrund dieser Merkmale charakterisieren.





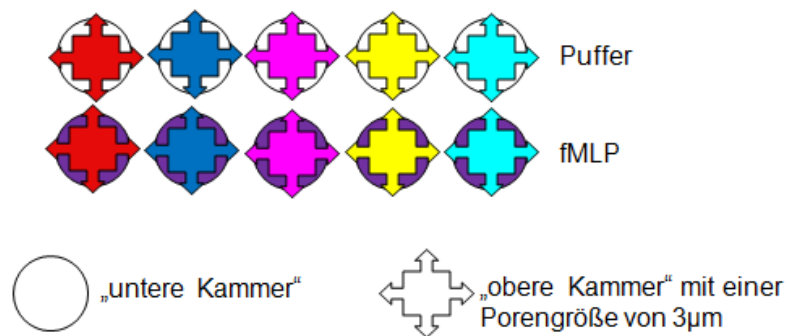
**Abbildung 3.2 Durchflusszytometrische Signale.**

Um den Einfluss verschiedener Bisphosphonate (Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat) auf die granulozytäre Erregerabwehr zu untersuchen, wurden die kommerziellen Kits Phagotest™, Phagoburst™ und Migratest™ verwendet. Die Assays wurden mit Ausnahme der im Folgenden beschriebenen Modifikationen nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Des Weiteren wurden stets die im jeweiligen Kit enthaltenen Reagenzien verwendet. Die durchflusszytometrische Analyse der Assays erfolgte unter Verwendung des FACSCalibur (488nm argon-ion laser, CELLQuest Software, Becton Dickinson, Heidelberg).

### 3.2.1.1 Versuchsdurchführung: Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Heparinisiertes Vollblut wurde 16h mit jeweils 50µM der verschiedenen Bisphosphonate im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die einzelnen Proben wurden nun nach dem Protokoll des Chemotaxis-Assays Migratest™ bereitet. Die Leukozytenisolation erfolgte durch ein vorsichtiges Überschichten der Vollblutproben auf das im Kit enthaltene Leukozyten-Separationsmedium. Nach etwa zwei Stunden sedimentierten die Erythrozyten relativ plötzlich und der aus leukozytenreichem Plasmas (LRP) bestehende Überstand konnte abgenommen werden. Pro Ansatz wurden je 100µM des LRP in zwei der im Kit enthaltenen Zellkultureinsätze („obere Kammern“) mit einer Porengröße von 3,0µm pipettiert. In je einer der „unteren Kammern“, in die die Einsätze eingehängt wurden, befand sich

das Chemokin fMLP (Positivansatz) und in der anderen eine Pufferlösung (Negativansatz) ohne Stimulans.

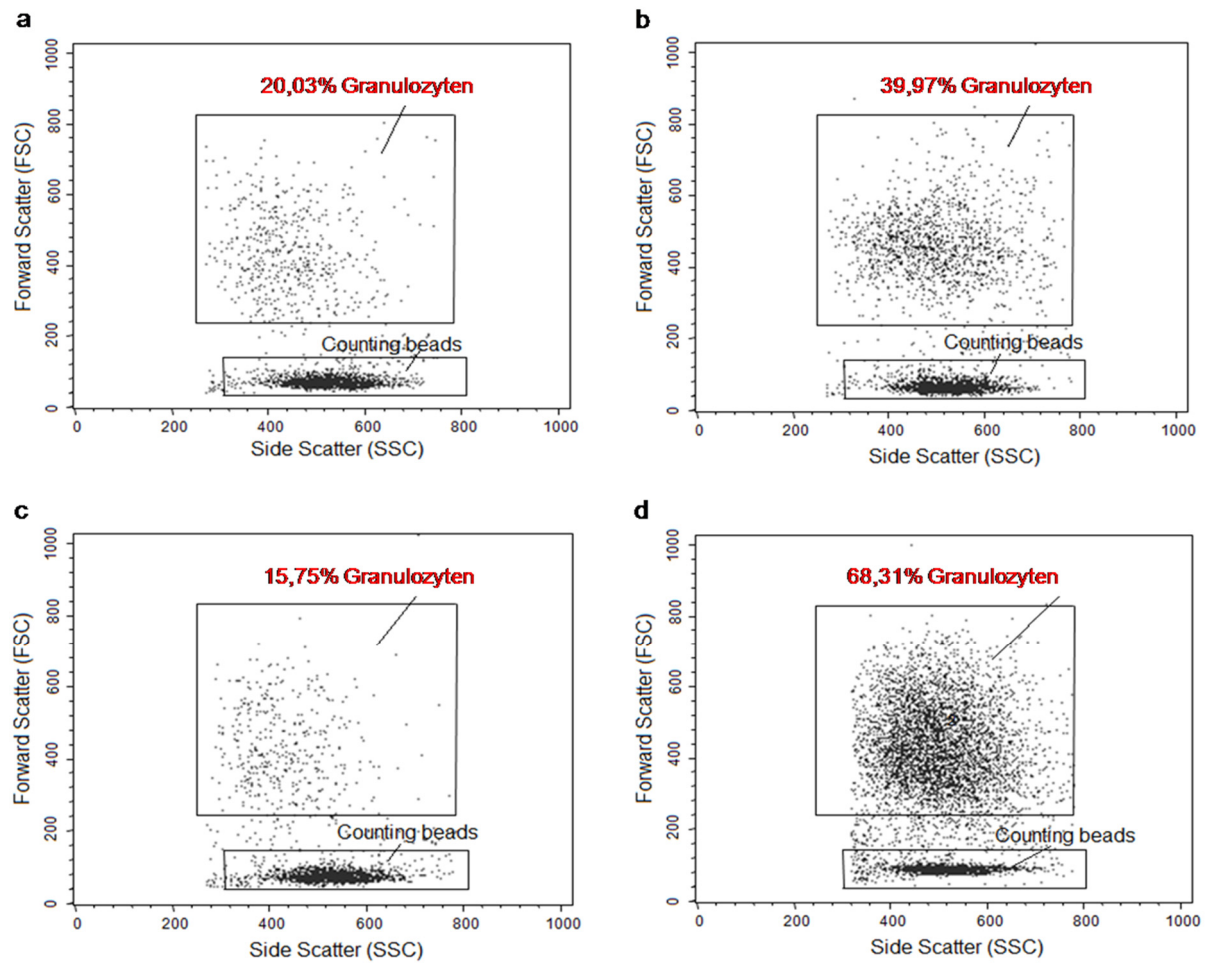


**Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Chemotaxis-Versuchsansatzes.**

Die unteren Kammern der 1. Reihe sind mit Puffer (weiß) befüllt, die der 2. Reihe enthalten das Chemokin fMLP (lila). Mit leukozytenreichem Plasma (LRP) befüllte Zellkultureinsätze („obere Kammern“) sind in die „unteren Kammern“ eingehängt. Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen, mit welcher Substanz das dem LRP zugrunde liegende Vollblut behandelt wurde. Kontrolle (rot), Clodronat (blau), Ibandronat (violett), Pamidronat (gelb), Zoledronat (türkis).

Während einer 30-minütigen Inkubation im Wasserbad bei 37°C erfolgte die Migration der Zellen des LRP durch die Poren der Zellkultureinsätze in die jeweilige untere Kammer. Anschließend wurden die Einsätze entnommen und das komplette Flüssigkeitsvolumen jeder einzelnen „unteren Kammer“ in jeweils ein FACS-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Nachdem die im Kit enthaltenen Zählpartikel („Counting beads“) sowie die DNA-Färbelösung hinzugegeben wurden, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der einzelnen Proben. Zunächst wurde im Dotplot-Diagramm (SSC gegen FL3) ein Gate um die Zählpartikel und Leukozyten gesetzt. Die nähere Untersuchung der hiermit erfassten Zellen erfolgte im Streulicht Dotplot-Diagramm (SSC gegen FSC).

Um die einzelnen Proben mit einander vergleichen zu können, wurden bei jeder Probe 2000 Zählpartikel „gated“. Die Granulozyten wiesen eine ähnliche Granularität wie diese auf, waren jedoch deutlich größer und konnten somit quantifiziert werden. Der Anteil spontan migrierter, neutrophiler Granulozyten jedes Ansatzes wurde von dem Granulozytenanteil abgezogen, der unter fMLP-Stimulation migriert ist. Die Fähigkeit zur Chemotaxis wurde jeweils in Relation zu der der Kontrolle gesetzt. Abbildung 3.4 zeigt Beispiele unterschiedlicher SSC/FSC-Diagramme, die zur Auswertung herangezogen wurden.



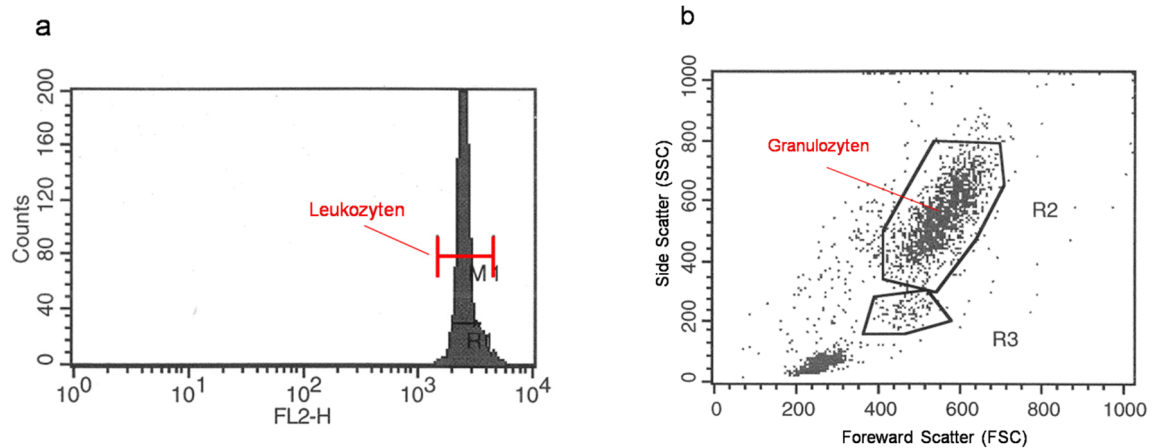
**Abbildung 3.4 Exemplarische Dotplot-Diagramme des Chemotaxis-Versuches.**

Zoledronat, unstimuliert (a), Zoledronat, stimuliert mit fMLP (b), Kontrolle, unstimuliert (c), Kontrolle, stimuliert mit fMLP (d). Es wurden jeweils 2000 Zählpartikel erfasst und der prozentuale Granulozytenanteil in Bezug zur Gesamtzellzahl ermittelt. Im Vergleich zu den unstimulierten Ansätzen (spontan migrierte Zellen: a, c) ist der Anteil migrierter Granulozyten nach fMLP-Stimulation deutlich erhöht (b, d). Während fMLP den Anteil migrierter Granulozyten im Falle der unbehandelten Kontrolle von 15,75% (c) auf 68,31% (d) steigert, bewirkt die vorherige Zoledronat-Behandlung eine Reduktion dieses Anstiegs von 20,03% (a) auf 39,97% (b).

### 3.2.1.2 Versuchsdurchführung: Phagozytose neutrophiler Granulozyten

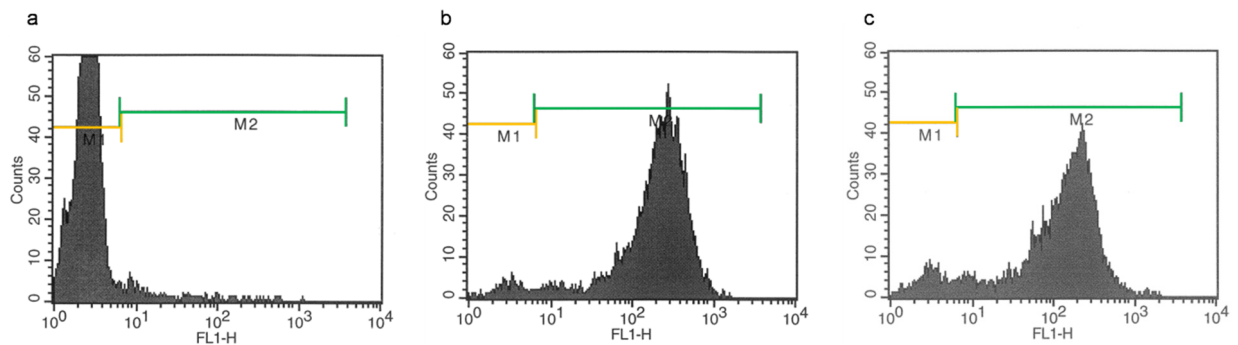
Um den Einfluss der Inkubationszeit verschiedener Bisphosphonate auf die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten zu testen, wurde heparinisiertes Vollblut entweder 8h, 16h oder 24h mit jeweils 50 $\mu$ M der Testsubstanz in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Konzentrationsabhängigkeiten ermittelt. Hierzu erfolgte die Inkubation über einen Zeitraum von 16h mit 2,5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M beziehungsweise 100 $\mu$ M des jeweiligen Bisphosphonats. Als Kontrolle diente heparinisiertes Vollblut, das den gleichen Bedingungen im Zellkulturschrank über die gleiche Zeit ausgesetzt war, dem jedoch

kein Bisphosphonat zugesetzt wurde. Der Substanzeinfluss auf den Anteil phagozytierender Granulozyten wurde im Anschluss an die Bisphosphonatinkubation unter Verwendung des Phagozytose-Assays Phagotest™ untersucht. Hierzu wurden die Probenröhrchen auf Eis überführt und mit den im Test-Kit enthaltenden opsonierten FITC (*Fluoresceinisothiocyanat*)-markierten *E.coli* (*Escherichia coli*) versetzt. Nach gründlicher Homogenisierung erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C. In dieser Zeit fand die Aufnahme der Bakterien durch die neutrophilen Granulozyten abhängig von deren Phagozytoseaktivität statt. Als Negativ-Kontrolle diente eine unbehandelte Blutprobe ebenfalls mit Bakterienzusatz, die, statt im Wasserbad, 10 Minuten in Eis inkubiert wurde. Die Positiv-Kontrolle hingegen stellte eine Probe ohne Bisphosphonate mit *E.coli* Bakterien dar, die der Wasserbadinkubation ausgesetzt war. Durch das gleichzeitige Überführen aller Proben ins Eisbad wurde der Phagozytoseprozess gestoppt. Um die Fluoreszenz der Bakterien zu löschen, die sich an der Zellaußenseite befanden, erfolgte die Zugabe des im Testkit enthaltenen Comassie Blues. Schließlich sollte nur die Fluoreszenz der Bakterien erfasst werden, die phagozytiert wurden und sich somit innerhalb der Zelle befanden. Nach zweimaligem Waschen der zellulären Blutbestandteile erfolgte die Erythrozytenlyse. Um aggregierte Bakterien von der durchflusszytometrischen Messung auszuschließen, wurde unmittelbar vor der Analyse eine DNA-Färbelösung zugegeben. Aufgrund dieser Markierung konnten nun die human diploiden Zellen im FL2-Histogramm laut Protokoll als lebende Leukozyten identifiziert werden und ein „Live Gate“ gesetzt werden. 10 000 dieser Zellen wurden pro Probe erfasst. Diese ausgewählten Zellen wurden weiter in einem Dotplot-Diagramm (FSC gegen SSC) untersucht. Anhand der Größe und Granularität der Zellen ließen sich die einzelnen Zellpopulationen zuordnen. Indem ein Gate um die Granulozyten gesetzt wurde, konnten diese bezüglich ihrer Fluoreszenz weiter untersucht werden. Das Grünfluoreszenz FL1-Histogramm ermöglichte schließlich die Differenzierung zwischen Granulozyten, die fluoreszenzmarkierte Bakterien aufgenommen hatten und solchen, die keine Erreger phagozytiert hatten. Der Anteil phagozytierender Granulozyten der einzelnen Proben wurde zu dem der unbehandelten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.



**Abbildung 3.5 Exemplarische Darstellung der Granulozyten-Identifizierung.**

Identifizierung lebender diploider Zellen im FL2-Histogramm (a). 10 000 dieser Zellen wurden im FSC/SSC Dotplot-Diagramm anhand ihrer Größe und Granularität weiter charakterisiert (b). Eingegrenzt wurden Granulozyten (R2) sowie Monozyten (R3). Die Granulozytenpopulation wurde zur weiteren Analyse herangezogen.



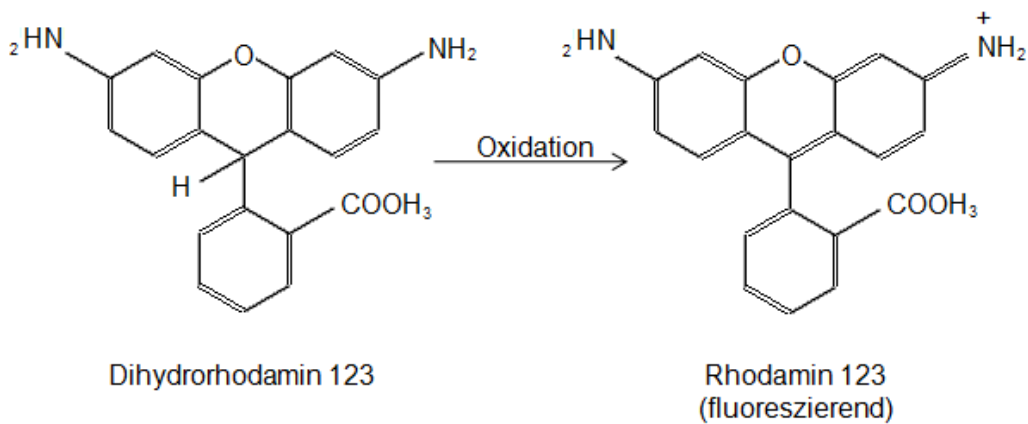
**Abbildung 3.6 Exemplarische Darstellung der FL1-Histogramme des Phagozytoseversuchs.**

Negativkontrolle (a: Zellen, die keine Phagozytose betrieben haben, da sie sich während der *E.coli*-Inkubation auf Eis befanden), Positivkontrolle (b: unbehandelte Zellen, die bei 37°C *E.coli* phagozytiert haben) sowie eine Zoledronat-behandelte Probe (c: behandelte Zellen, die bei 37°C *E.coli* phagozytiert haben) im FL1-Histogramm.

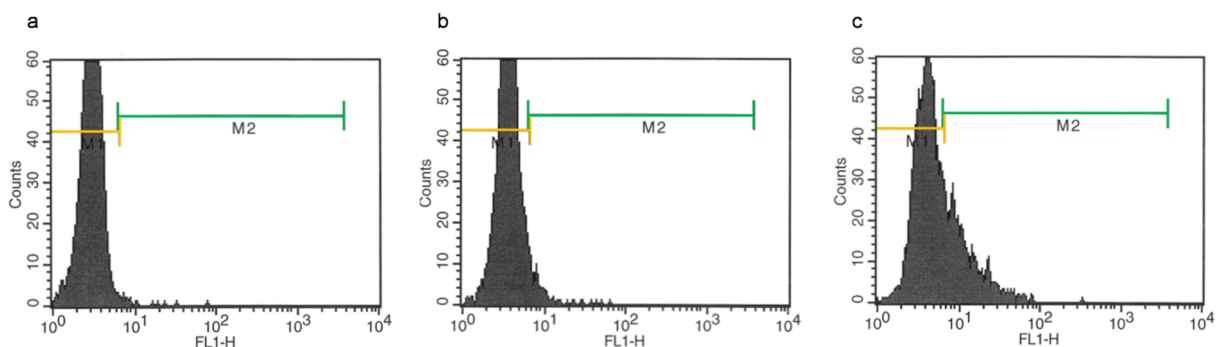
### 3.2.1.3 Versuchsdurchführung: Oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten

Um den oxidativen Burst und somit die Fähigkeit zur intrazellulären Erregervernichtung durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) neutrophiler Granulozyten zu untersuchen, wurde der Standardassay Phagoburst™ herangezogen. Vorbereitend wurde heparinisiertes Vollblut über eine Zeit von 16h mit verschiedenen Bisphosphonaten in unterschiedlichen Konzentrationen (0µM, 2,5µM, 5µM, 25µM und 50µM) im Zellkulturschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Um die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite in den

Granulozyten anzuregen, wurde das im Kit enthaltene Peptid N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) als schwaches physiologisches Stimulans verwendet. Die Inkubation aller Proben erfolgte 10min bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde das Substrat Dihydrorhodamin (DHR) zu allen Proben hinzugegeben und für weitere 10min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Schließlich folgten die Erythrozytenlyse und die Färbung der DNA. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden anhand der gefärbten DNA im FL2-Histogramm 10 000 lebende Leukozyten erfasst. Im Streulicht-Diagramm (FSC gegen SSC) konnten die Granulozyten aufgrund ihrer Größe und Granularität von den übrigen Leukozyten abgegrenzt werden. Das Ausmaß des oxidativen Umsatzes des nichtfluoreszierenden Substrates Dihydrorhodamin (DHR) 123 zum fluoreszierenden Rhodamin (R) 123 korreliert mit dem der Grünfluoreszenz der Granulozyten.



**Abbildung 3.7** Intrazelluläre Oxidation des Substrats Dihydrorhodamin 123 zum fluoreszierenden Rhodamin 123 durch reaktive Sauerstoffspezies.



**Abbildung 3.8** Exemplarische Darstellung der FL1-Histogramme des Burstversuchs.

Negativkontrolle (a: Zellen, die nicht mit fMLP stimuliert wurden), Positivkontrolle (b: unbehandelte Zellen, die mit fMLP stimuliert wurden) sowie eine Zoledronat-behandelten Probe (c: behandelte Zellen, die mit fMLP stimuliert wurden) im FL1-Histogramm. Die Abbildung zeigt deutlich, dass fMLP ein sehr schwaches Stimulans des oxidativen Bursts darstellt.

Ausgewertet werden konnte sowohl der prozentuale Anteil der Granulozyten, die oxidative Aktivität besitzen als auch die mittlere Burstaktivität einer einzelnen Zelle. Letzteres wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität der Proben bestimmt, da sie die Menge des Oxidationsproduktes Rhodamin (R) 123 pro Zelle widerspiegelt. Die Ergebnisse wurden jeweils in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

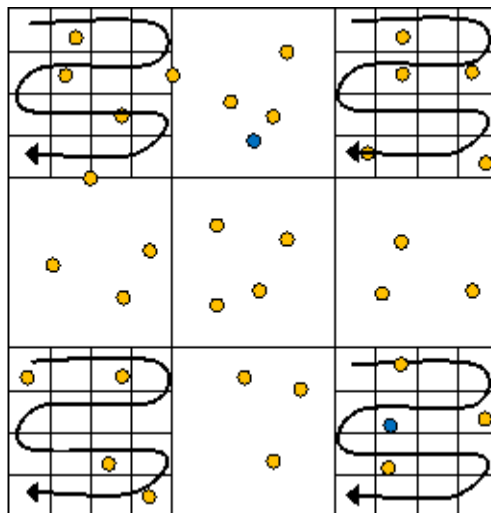
### **3.2.2 Arbeiten mit Zellen**

#### 3.2.2.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen in den jeweiligen Proliferationsmedien erfolgte im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter Wasserdampfsättigung. Die verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent als Monolayer in Zellkulturflaschen bzw. Well-Platten, die einen Gasaustausch mit der Umgebung zuließen. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Arbeitsmaterialien und Reagenzien sowie einer aseptischen Arbeitsweise durchgeführt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Hierzu wurde das alte Medium inklusive toter Zellen abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Das Zellwachstum wurde täglich mikroskopisch beobachtet. Nach Erreichen einer 80%-igen Konfluenz erfolgte das Ablösen der adhären Zellen vom Flaschenboden. Zu diesem Zweck wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 5ml einer Trypsin/EDTA-Lösung 5min bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Ablösung der Zellen vom Boden wurde mikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls durch Aufklopfen der Kulturfläche mechanisch unterstützt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10ml FCS-haltigem Medium. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und 5min bei RT und 1100U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Abnahme des Überstandes und die Resuspension des Zellpellets in 10ml Kulturmedium. Nach Einstellung der gewünschten Zellkonzentration mit frischem Medium, wurden die Zellen entweder weiter kultiviert oder für die jeweiligen Versuchsansätze ausgesät.

### 3.2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Als Neubauer-Zählkammer bezeichnet man einen speziellen Objektträger, auf dem sich zwei 3x3mm große Zählnetze befinden. Ein Zählnetz umfasst neun eingravierte Großquadrate, deren Fläche jeweils 1mm<sup>2</sup> beträgt. Aus dem Abstand von 0,1mm zwischen Objektträger und Deckgläschen resultiert ein Volumen von 0,1µl pro Großquadrat. Jedes große Quadrat ist weiter in 16 kleinere Quadrate unterteilt. Für die Zellzahlbestimmung wurden 50µl einer definierten Menge der Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Der anionische Azofarbstoff dient der Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Während er tote Zellen blau anfärbt, werden vitale Zellen mit intakter Membran nicht gefärbt und nur diese zur visuellen Zellzahlbestimmung herangezogen. Gezählt wurden jeweils die Zellen der vier großen Eckquadrate, wobei die Zellen der oberen und rechten Seitenlinie mit erfasst wurden. Aus dem Zählergebnis der vier einzelnen Großquadrate wurde schließlich der Mittelwert gebildet. Da die Zellsuspension zuvor um den Faktor zwei mit Trypanblau verdünnt wurde, musste der Mittelwert mit zwei multipliziert werden. Hiermit war die Zellzahl bekannt, die sich in 0,1µl der Suspension befand. Die Multiplikation dieses Wertes mit dem Faktor 10<sup>4</sup> lieferte schließlich die Zellzahl pro ml.



**Abbildung 3.9** Schematische Darstellung der Neubauer-Zählkammer.

Dargestellt sind die neun Großquadrate, die jeweils eine Fläche von 1mm<sup>2</sup> besitzen. Die Zellen der vier Eckquadrate wurden jeweils in Pfeilrichtung ausgezählt. Bei der Zählung wurden ausschließlich die Zellen berücksichtigt, die nicht blau gefärbt und somit vital waren.



### 3.2.2.3 Konservierung und Auftauen der Zellen

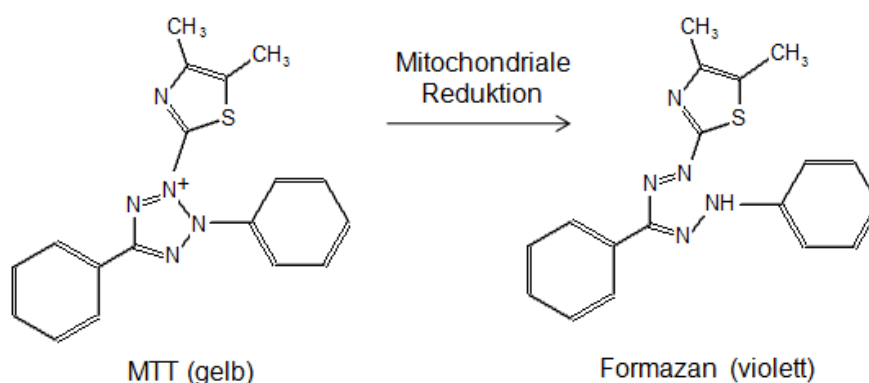
Die in Kryo-Medium (10% DMSO in FCS) konservierten und in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig aufgetaut und in auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 5min bei Raumtemperatur und 1100U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 10ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

### 3.2.3 Zellversuche

#### 3.2.3.1 MTT Assay

Der MTT Assay dient der quantitativen Bestimmung der Zellvitalität. Der Nachweis basiert auf der NADPH-abhängigen mitochondrialen Umsetzung des gelben wasserlöslichen 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zum violetten, wasserunlöslichen Formazan. Hierfür wurde eine Stammlösung der Konzentration 5mg/ml (MTT gelöst in PBS) angesetzt, die in 10-facher Verdünnung zum Einsatz kam (0,5mg/ml).

Nach einer drei- bis vierstündigen Inkubation bei 37°C wurde die MTT-Lösung entfernt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und schließlich durch Zugabe eines Salzsäure/Isopropanol-Gemisches (1 Teil 2 N Salzsäure + 49 Teile Isopropanol) lysiert. Die optische Dichte des freigesetzten Formazans wurde bei einer Wellenlänge von 550nm photometrisch bestimmt. Die gemessene Absorption ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen bzw. derer mitochondrialen Stoffwechselaktivität (Mosmann et al., 1983).



**Abbildung 3.10** Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen zum unlöslichen Formazan-Farbstoff.

### 3.2.3.1.1 Ansatz: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden

Der Versuch wurde jeweils mit Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten durchgeführt. Getestet wurden die sechs verschiedenen Isoprenoide (IP) Geranylgeraniol (GGOH), Eugenol (Eu), Farnesol (FOH), R-Limonene (Li), Menthol (MOH) sowie Squalene (Sq) alleine und in Kombination mit Zoledronat. Es fand jeweils eine Dreifachbestimmung statt. 40 000 Zellen/ml der jeweiligen Zelllinie wurden stets in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 24h erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen (Tabelle 3.11). Nach 72-stündiger Inkubation wurde der MTT Assay durchgeführt und die gemessenen Absorptionswerte in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

**Tabelle 3.11** Versuchsansatz des MTT Assays: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden.

Kontrolle	10µM Isoprenoid	25µM Isoprenoid	50µM Isoprenoid	100µM Isoprenoid
50µM Zoledronat	10µM Isoprenoid + 50µM Zoledronat	25µM Isoprenoid + 50µM Zoledronat	50µM Isoprenoid + 50µM Zoledronat	100µM Isoprenoid + 50µM Zoledronat

### 3.2.3.1.2 Ansatz: Zoledronat kombiniert mit Clodronat

Der Versuch wurde jeweils mit gingivalen Fibroblasten, HUVEC, Keratinozyten und Osteoblasten durchgeführt. Es wurden 40 000 Zellen/ml der jeweiligen Zelllinie in 12-Well-Platten ausgesät. Im Falle der Keratinozyten mussten die Wells zuvor mit Poly-L-Lysin (1:10 in PBS) beschichtet werden, um eine ausreichende Adhärenz zu gewährleisten. Nach 24h erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen (Tabelle 3.12).

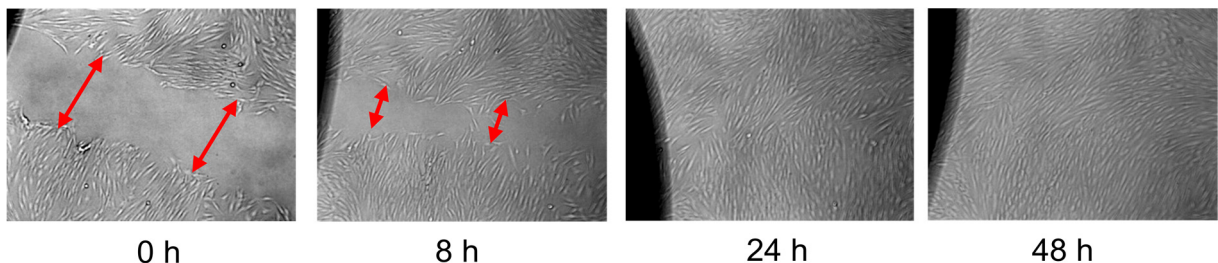
**Tabelle 3.12** Versuchsansatz des MTT Assays: Zoledronat kombiniert mit Clodronat.

Kontrolle	5µM Zoledronat	10µM Zoledronat	50µM Zoledronat	100µM Zoledronat
100µM Clodronat	5µM Zoledronat + 100µM Clodronat	10µM Zoledronat + 100µM Clodronat	50µM Zoledronat + 100µM Clodronat	100µM Zoledronat + 100µM Clodronat
1000µM Clodronat	5µM Zoledronat + 1000µM Clodronat	10µM Zoledronat + 1000µM Clodronat	50µM Zoledronat + 1000µM Clodronat	100µM Zoledronat + 1000µM Clodronat

Nach 72-stündiger Inkubation wurde die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt und die gemessenen Absorptionswerte in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

### 3.2.3.2 Scratch Wound Assay

Zur Untersuchung des Wundheilungsverhaltens wurden die verschiedenen Zelllinien in Zellkulturschalen (12-Well-Platten) ausgesät. Als die Konfluenz ca. 80% betrug wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze durch einen Kratzer eine Lücke im Monolayer erzeugt („Scratch Wound“). Diese künstliche Wunde wurde sofort unter dem Mikroskop fotografiert (Zeitpunkt 0). Anschließend erfolgte die Zugabe der verschiedenen zu untersuchenden Substanzen (Zoledronat, Isoprenoide). Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank weiter kultiviert. Der Verlauf der Wundheilung wurde nach 8h, 24h und 48h fotografisch festgehalten. Die Breite jeder Wunde wurde an 8 verschiedenen Punkten bestimmt. Der hieraus resultierende Mittelwert ergab die mittlere Wundbreite. Die jeweilige mittlere Breite zum Zeitpunkt 0 wurde gleich 100% gesetzt. Alle Versuche wurden als Triplett durchgeführt.



**Abbildung 3.11** Zusammenwachsen einer „Scratch“- Wunde am Beispiel unbehandelter gingivaler Fibroblasten.

#### 3.2.3.2.1 Ansatz: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden

Der Versuch wurde jeweils mit Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten durchgeführt. Getestet wurden die sechs verschiedenen Isoprenoide (IP) Geranylgeraniol (GGOH), Eugenol (Eu), Farnesol (FOH), R-Limonene (Li), Menthol (MOH) sowie Squalene (Sq) alleine und in Kombination mit Zoledronat. Es fand jeweils eine Dreifachbestimmung statt. Hierfür wurden 100 000 Zellen/ml in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 24h erfolgte der Scratch Wound Assay nach Protokoll. Die

Substanzen wurden unmittelbar nach dem Setzen der künstlichen Wunde (Zeitpunkt: 0h) nach folgendem Schema hinzugegeben:

**Tabelle 3.13** Versuchsansatz des Scratch Wound Assays: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Bisphosphonaten.

Kontrolle	10µM Isoprenoid
50µM Zoledronat	10µM Isoprenoid + 50µM Zoledronat

### 3.2.3.3 Phalloidin-Färbung

Zur Visualisierung der Zellarchitektur wurde fluoreszenzmarkiertes Phalloidin eingesetzt. Dies weist eine hohe Selektivität gegenüber f-Aktin auf und dient somit der lasermikroskopischen Darstellung des Zytoskellets.

Vor der Färbung wurden die auf 4-Well-Chamber Slides kultivierten Zellen mittels 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für 10min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine fünfminütige Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton-X-100 in PBS. Nach erneutem Waschen wurde eine halbe Stunde mit einer 1%igen BSA-Lösung inkubiert und anschließend 20min im Dunkeln mit BODIPY®FL Phalloidin (1:1000 in PBS) gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte durch eine 2-minütige Inkubation mit Bisbenzimid (Hoechst 33258).

#### 3.2.3.3.1 Ansatz: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden

Der Versuch wurde jeweils mit Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten durchgeführt. Getestet wurden die sechs verschiedenen Isoprenoide (IP) Geranylgeraniol (GGOH), Eugenol (Eu), Farnesol (FOH), R-Limonene (Li), Menthol (MOH) sowie Squalene (Sq) alleine und in Kombination mit Zoledronat. Es fand jeweils eine Dreifachbestimmung statt.

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Organisation des Zytoskellets zu ermitteln, wurde das Pipettierschema des Scratch-Wound-Versuchs übernommen (Tabelle 3.13). Der einzige Unterschied lag in der Verwendung von 4-Well-Chamber Slides statt 12-Well-Platten, in denen die Zellen kultiviert wurden. Die Phalloidin/Bisbenzimid-Färbung erfolgte nach 72-stündiger Inkubation im Brutschrank.

### **3.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot**

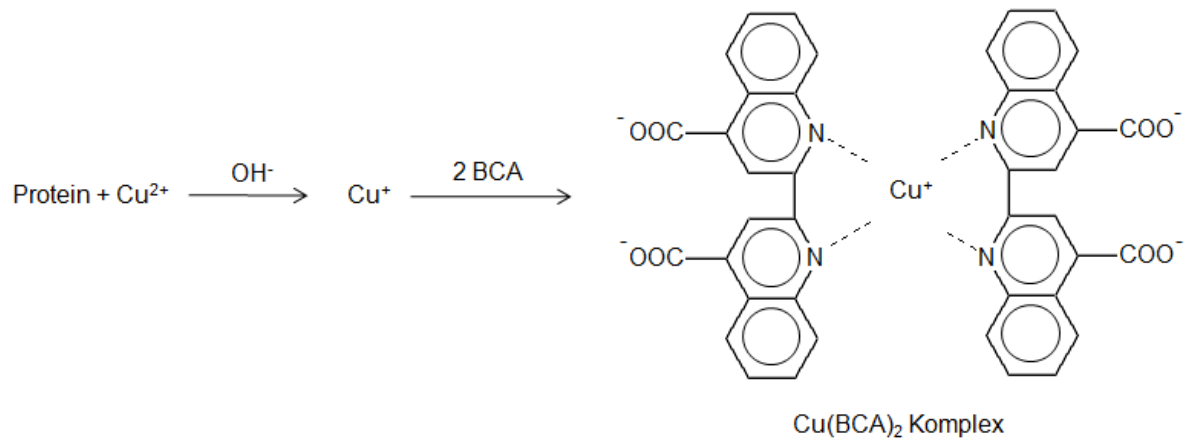
Um einzelne Proteine semiquantitativ nachzuweisen, erfolgte zunächst die Extraktion der Proteine aus der Zelle. Das Proteingemisch wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). Anschließend wurden die der Größe nach getrennten Proteine vom Gel auf eine Membran transferiert (Western Blot) und immunologisch detektiert. Die durchgeführten Einzelschritte sind im Folgenden näher beschrieben.

#### **3.2.4.1 Proteinextraktion**

Nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension wurde diese zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen und das Falconröhrchen auf Eis gestellt. Parallel erfolgte die Herstellung des Lyse-Cocktails aus 1000µl Ripa Puffer, 10µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, 10µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 und 100µl Protease Inhibitor Cocktail. 500µl des Lyse-Cocktails wurden auf jedes der Zellpeletts aufpipettiert und die Zellen homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis konnten die nun lysierten Zellen in Safe Lock Tubes überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung erfolgte schließlich bei -80°C.

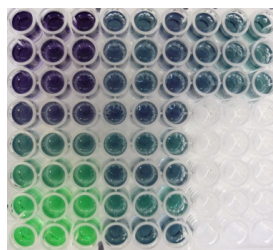
#### **3.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Pierce® BCA (Bicinchonic acid) Protein Assay Kits. Der Test basiert darauf, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Das zweiwertige Kupfer dieses Komplexes wird zu  $\text{Cu}^+$  reduziert. Schließlich bilden zwei Moleküle der Bicinchoninsäure mit dem einwertigen Kupfer einen tief violett-gefärbten Chelatkomplex. Da zwischen der Lichtabsorption des Farbstoffs bei 562nm und der Proteinkonzentration über einen breiten Konzentrationsbereich ein nahezu linearer Zusammenhang besteht, ist eine genaue Bestimmung des Proteingehalts möglich.



**Abbildung 3.12 Reaktionsabfolge des BCA Protein Assays.**

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (Bovines Serum Albumin) als Proteinstandard nach dem vom Hersteller angegebenen Schema angesetzt. Als Diluent diente eine Mischung aus Ripa Puffer und Aqua dest. im Verhältnis 1:1. Nach dem Auftauen der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben mussten diese zunächst gut homogenisiert werden. Anschließend wurden je  $45\mu\text{l}$  der Proteinlösung mit  $45\mu\text{l}$  Diluent gemischt und die Verdünnung erneut gründlich homogenisiert. Als nächstes erfolgte die Herstellung des „Working Reagent“ (WR) aus den im Kit enthaltenen Reagenzien A und B im Verhältnis (8:1). In die Vertiefungen einer 96-Well-Platte wurden jeweils  $25\mu\text{l}$  der Probe bzw. eines BSA-Standards pipettiert. Sowohl für die Proben als auch für die Standardverdünnungen erfolgte eine Dreifachbestimmung. Nach dem Zusatz von  $200\mu\text{M}$  WR und kurzem Schütteln der Platte folgte die 30-minütige Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die Quantifizierung erfolgte photometrisch im ELISA-Reader bei  $562\text{nm}$  mit Hilfe der SoftMaxPro Software, die anhand der BSA-Standardkurve die jeweilige Proteinkonzentration der einzelnen Proben in  $\mu\text{g/ml}$  berechnete.



**Abbildung 3.13 Darstellung des Farbergebnisses des BCA Protein Assays.**

### 3.2.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

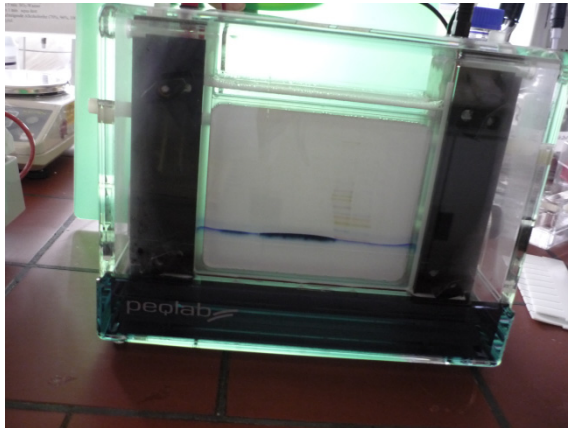
Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteinen eines Gemisches ihrer Größe nach aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). SDS hat die Funktion, die Proteine zu denaturieren und gleichmäßig negativ zu laden. Hierdurch wird gewährleistet, dass das Wanderungsverhalten der einzelnen Proteine durch die Matrix des Polyacrylamidgels nur von deren Größe und nicht von deren Eigenladung abhängt. Je geringer die Molekülmasse der denaturierten Proteine ist, desto weniger werden sie von den Maschen des Gels zurückgehalten und umso weiter ist die zurückgelegte Wegstrecke zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der Einsatz eines Proteinmarkers, der Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthält, ermöglicht die Abschätzung der Proteingröße in der zu untersuchenden Probe. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde ein „Rainbow“-Marker eingesetzt, dessen Proteine je nach Molekulargewicht unterschiedlich gefärbte Banden zeigten. Hierdurch konnte der Auftrennungsprozess visuell verfolgt werden.

### 3.2.4.4 Probenvorbereitung

Um die mittels Gelelektrophorese getrennten Proteine der verschiedenen Proben quantitativ miteinander vergleichen zu können, musste in jede Tasche des Sammelgels die gleiche Menge Gesamtprotein der zu untersuchenden Proben aufgetragen werden. Dies konnte erreicht werden, indem unterschiedliche Volumina, der zuvor aufgetauten Proben, bekannter Konzentration entnommen wurden. Das Volumen, das benötigt wurde, um die gewünschte Proteinmenge von 20µg zu erhalten, berechnete sich nach einem einfachen Dreisatz, indem jeweils 20µg durch die mittels BCA Assay ermittelte Gesamtproteinmenge (in µg) dividiert wurden. Hierauf folgte die Multiplikation des Ergebnisses mit dem Volumen, in dem sich die ermittelte Menge des Gesamtproteins befand. Die auf diese Weise berechneten Volumina (Xµl) der Proteingemische wurden jeweils mit X/4µl 5xPDP-Puffer auf Eis gemischt, anschließend fünf Minuten im Thermomixer bei 95°C denaturiert und direkt wieder auf Eis überführt.

### 3.2.4.5 Gelelektrophorese

Nach dem Aufbau der Elektrophoresekammer erfolgte deren Befüllung mit Laufpuffer. Die einzelnen Proben wurden vorsichtig in die Starttaschen der verwendeten Fertiggele pipettiert. Als Größenstandard diente der „Rainbow“- Marker. Die Elektrophorese lief die erste viertel Stunde bei 20mA und anschließend für 1 bis 2 Stunden bei 40mA.



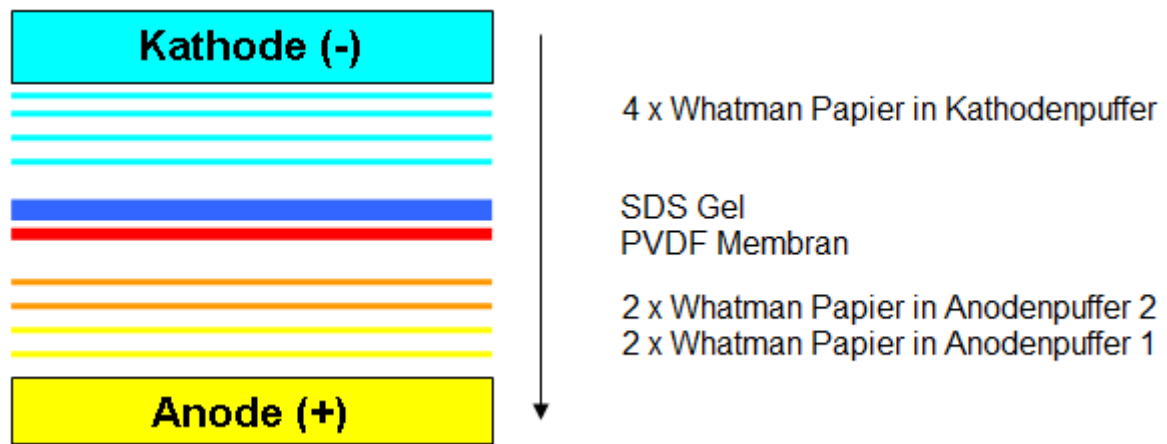
**Abbildung 3.14** Fotografie einer Elektrophoresekammer.

### 3.2.4.6 Western Blot

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Trennung wurden die Proteine im „semi-dry“-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Als Vorbereitung hierfür musste das Gel zunächst für 15min in Kathodenpuffer gewaschen werden. Die PVDF-Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, in Methanol geschwenkt und anschließend mehrmals in Aqua dest. gewaschen. Des Weiteren wurden acht Whatman-Filterpapierstücke zurechtgeschnitten, zwei davon in Anodenpuffer 1, zwei in Anodenpuffer 2 und vier in Kathodenpuffer eingeweicht. Schließlich erfolgte das luftblasenfreie Bestücken der Blotkammer mit den einzelnen Schichten nach dem Sandwich-Prinzip in der in Abbildung 3.15 dargestellten Reihenfolge.

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran wurde über 20min eine Stromstärke von 300mA angelegt.





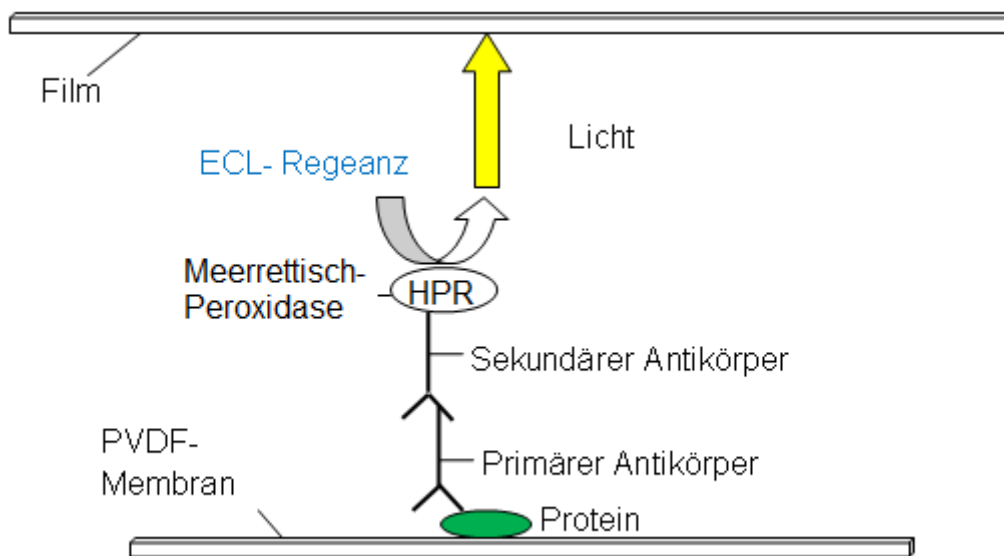
**Abbildung 3.15 Schematische Darstellung einer Western Blot-Einheit.**

Der Pfeil gibt die Richtung des Stromflusses an.

### 3.2.4.7 Immunologische Detektion immobilisierter Proteine

Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst in Waschpuffer (TBSW) gewaschen und anschließend für eine Stunde in Milchpulver-„Blocking Solution“, bzw. BSA-„Blocking Solution“ (je nach Ansatz: siehe Abschnitt 3.2.4.8.1) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem Waschen in TBSW erfolgte die Inkubation mit einem primären Antikörper (1:1000 in 5ml TBSAK bzw. BSA-„Blocking Solution“, je nach Ansatz: siehe Abschnitt 3.2.4.8.1) in einem 50ml-Falkon-Tube über Nacht bei 4°C und permanenter „end-over-end“ Rotation. Am folgenden Tag musste die Membran mehrmals gründlich in TBSW gewaschen werden, darauf folgte die Inkubation mit dem HPR-(Horseradish peroxidase= Meerrettich Peroxidase) konjugierten Sekundärantikörper (je nach Species des Primärantikörper, 1:1000 in 5ml TBSAK bzw. BSA-„Blocking Solution“, je nach Ansatz: siehe Abschnitt 3.2.4.8.1) über eine Stunde bei Raumtemperatur und „end-over-end“ Rotation. Nach mehrmaligem Waschen mit TBSW wurde die frisch hergestellte 1:1 Mischung der im „ECL™ Western Blot detection kit“ enthaltenen Reagenzien A und B auf die Oberseite der PVDF-Membran gegeben. Die „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)- Reaktion basiert darauf, dass die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Luminophor 3-Aminophtalhydrazid (Luminol) oxidiert. Das entstandene energiereiche und kurzlebige Oxidationsprodukt zerfällt unter Lichtemission. Das auf diese Weise emittierte Licht wurde durch Auflage eines Röntgenfilms erfasst. Die Belichtung des Films in einer dafür vorgesehenen Kassette dauerte je nach zu

testendem Protein bzw. verwendeten Antikörpern einige Minuten bis zu einer Stunde. Die Filmentwicklung erfolgte manuell in der Dunkelkammer mit Hilfe einer Entwickler- und einer Fixierlösung.



**Abbildung 3.16 Schematische Darstellung der Immundetektion.**

Der primäre Antikörper bindet an das auf der PVDF-Membran fixierte Protein. An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet ein sekundärer, HPR gekoppelter Antikörper. HPR katalysiert die ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Reaktion. Das emittierte Licht bewirkt schließlich die Belichtung des Films.

#### 3.2.4.8 "Stripping" von Membranen

Um eine Membran nach erfolgter Immunodetektion erneut mit Antikörpern zu behandeln, ist es notwendig die vorhandenen Antikörper zu entfernen. Hierdurch wird vermieden, dass es zur Überlagerung von Banden auf dem Röntgenfilm kommt. Zum sogenannten „Stripping“ der Membran erfolgte eine 30-minütige Behandlung mit 25mM Glycin (pH 2,0). Nach zweimaligem Waschen mit TBSW folgte eine 30-minütige Inkubation mit 1% SDS. Bevor die Membran erneut mit Antikörpern behandelt werden konnte, musste sie eine weitere Stunde mit Milchpulver-„Blocking Solution“, bzw. BSA-„Blocking Solution“ (je nach Ansatz: siehe Abschnitt 3.2.4.8.1) geblockt werden.

#### 3.2.4.8.1 Ansatz: Zoledronat-Einfluss auf die Proteine Paxillin, FAK, deren aktivierte Formen sowie die kleinen GTPasen RhoA und RhoB

Die Bestimmung des Einflusses der getesteten Substanzen (Zol, FOH, GGOH, Zol+GGOH, Zol+FOH) auf die Expression der beiden nicht-membranständigen Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen FAK und Paxillin wie auch auf die Expression der drei kleinen GTPasen RhoA und RhoB erfolgte mittels Western Blot und anschließender immunologischer Detektion. In gleicher Weise wurde auch der Substanzeinfluss auf den Phosphorylierungsgrad der Tyrosinkinasen FAK (an Tyrosinrest 925) und Paxillin (an Tyrosinrest 118) untersucht.

24h nach dem Aussähen der gingivalen Fibroblasten (1 000 000 Zellen in 10ml Medium) folgte eine 72-stündige Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen (50µM Zol, 10µM GGOH bzw. 10µM FOH) sowie die Kultivierung einer unbehandelten Kontrolle bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine kamen jeweils 20µg des Gesamtproteinlysats der einzelnen Proben zum Einsatz. Die im Western Blot-Verfahren auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurden schließlich mittels spezifischer Antikörper detektiert. Mit Ausnahme des Nachweises der beiden phosphorylierten Tyrosinkinasen konnten die unspezifischen Bindungsstellen aller Membranen mit Milchpulver „Blocking Solution“ geblockt werden. Um eine starke Hintergrund-Färbung durch die Wechselwirkung der phosphospezifischen Antikörper Anti-Phospho-FAK (Tyr925) und Anti-Phospho-Paxillin (Tyr118) mit dem in der Milch enthaltenen Phosphoprotein Casein zu vermeiden, wurde in diesen Fällen eine BSA „Blocking Solution“ eingesetzt. Die Quantifizierung der Protein-Banden erfolgte densitometrisch mit Hilfe der ImageJ-Software. Um mögliche Beladungsfehler infolge von Ungenauigkeiten beim Auftragen der Proteine auf das Gel auszugleichen, wurden die einzelnen Banden jeweils in Bezug zur GapDH- Kontrolle gesetzt, deren Expression keine Beeinflussung durch die getesteten Substanzen zeigte. Die ermittelte Bandendichte wurde anschließend ins Verhältnis zur Dichte der jeweiligen unbehandelten Kontrolle gesetzt. Es erfolgten jeweils drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen.

#### 3.2.4.8.2 Ansatz: Zoledronat-Einfluss auf durch Cycloheximid gehemmte Rho-A-Neusynthese

Um die Hypothese zu überprüfen, dass der durch Zoledronat induzierte Anstieg der zellulären Konzentration der Rho-GTPasen auf deren Neusynthese zurückzuführen ist, fand ein weiterer Versuch statt, bei dem der Translationshemmer Cycloheximid zum Einsatz kam. 24h nach dem Aussähen der gingivalen Fibroblasten (1 000 000 Zellen in 10ml Medium) wurden diese mit 50µM Zoledronat, 5µg/ml Cycloheximid oder mit einer Kombination der beiden Substanzen versetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte über 24h, da der Proteinsynthesehemmer über diesen Zeitraum in der gewählten Konzentration nachweislich keinen toxischen Einfluss auf humane Fibroblasten besitzt (Santiago et al., 2004). Die weitere Vorgehensweise entsprach exakt der in Abschnitt 3.2.4.8.1 beschriebenen.

#### 3.2.5 Immunologischer Nachweis von aktivem RhoA mittels G-LISA™

Zur quantitativen Erfassung der GTP-gebundenen Form RhoAs in Fibroblasten wurde der G-LISA™ RhoA Activation Assay herangezogen. Versuchsvorbereitend erfolgte 24h nach Aussaat der Zellen in T75- Zellkulturflächen (100 000 Zellen/ ml) die 72-stündige Inkubation mit den zu testenden Substanzen (Zol, GGOH, FOH, Zol+GGOH, Zol+FOH). Parallel wurden die Zellen einer unbehandelten Kontrolle unter den gleichen Bedingungen kultiviert mit der Absicht im weiteren Versuchsverlauf den Einfluss der Testsubstanzen auf den zellulären Gehalt aktiven RhoAs zu zeigen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 500µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers, dem zuvor die vorgeschriebene Menge Protease-Inhibitor-Cocktail zugesetzt wurde, auf Eis lysiert und in 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt. Um den aktiven Zustand der zu bestimmenden Proteine zu bewahren, wurden alle weiteren Schritte zügig und auf Eis durchgeführt. Während 60µl des jeweiligen Lysats zur Bestimmung der Proteinkonzentration dienten, wurden die restlichen Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Beginn des Assays bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Proben erfolgte mit Hilfe des im Kit enthaltenen Precision Red™ Advanced Protein Assay Reagent. Das Fünffache der jeweils bei 600nm gemessenen Absorption stellte die jeweilige Proteinkonzentration in mg/ml dar. Das Lysepuffer-Volumen, welches zugesetzt werden musste, um alle

Lysate auf eine einheitliche Konzentration einzustellen, berechnet sich nach folgender Formel:

$$X = \frac{(A - B)}{B} V_A$$

A entsprach hierbei der Konzentration des jeweiligen Lysats (mg/ml), dessen Volumenzusatz berechnet werden sollte und B entsprach der Konzentration des verdünntesten Lysats (mg/ml). Nachdem sich das Puder in den Wells der im Kit enthaltenen 96-Well-Platte mit Hilfe eiskalten Wassers gelöst hatte, konnten sowohl die einzelnen Proben als auch die Negativ (Lysepuffer)- und Positiv (aktives RhoA)-Kontrolle (jeweils verdünnt mit „Binding Buffer“) in die Wells pipettiert werden. Die Inkubation erfolgte dreißig Minuten auf dem Mikroplattenshaker (400rpm) bei 4°C. Währenddessen hatte ausschließlich aktives, GTP-gebundenes Rho an die vom Hersteller mit „Rho-GTP-binding protein“ beschichtete Platte gebunden. Die GDP-gebundene, inaktive Form des Proteins wurde schließlich mit Waschpuffer entfernt. Die weiteren Schritte des Versuchs wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Einer zweiminütigen Inkubation mit „Antigen Presenting Buffer“ folgte erneutes Waschen. Anschließend wurde der im Kit enthaltene primäre Antikörper gegen RhoA im Verhältnis 1:500 verdünnt und in die einzelnen Wells pipettiert. Die Inkubationsdauer auf dem Mikroplattenshaker (400rpm) betrug 45min. Nach mehrmaligem Waschen kam der im Verhältnis 1:2000 verdünnte HPR-gekoppelte sekundäre Antikörper zum Einsatz, der ebenfalls 45min unter den erwähnten Bedingungen auf die einzelnen Proben einwirkte. Es folgten weitere Waschschritte und schließlich die Zugabe des im Kit enthaltenen, unmittelbar vorher rekonstruierten Detektionsreagenzes. Innerhalb weniger Minuten erfolgte die luminometrische Detektion unter Verwendung des Microplattenreaders Synergy HT bei 430nm.

### **3.2.6 Statistische Auswertung**

Für die statische Auswertung und die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse wurde neben der Statistik- und Analysesoftware SPSS 17.0 für Windows das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2007 verwendet. Nach der Testung auf Normalverteilung wurden die detektierten Daten einer Varianzanalyse (ANOVA, post hoc Test: Tukey) unterzogen. Wurden zwei Gruppen direkt miteinander verglichen, kam zudem der Student's t-Test zum Einsatz.

P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant, während p-Werten < 0,1 eine statistische Tendenz zugeordnet wurde. In den meisten Fällen erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse in Form von Boxplot-Diagrammen. Die beiden Quartile oberhalb und unterhalb des Medians begrenzen eine Box, in der insgesamt die Hälfte der gemessenen Daten liegen. Die Werte, die außerhalb der Box liegen, jedoch nicht als Ausreißer definiert sind, sind durch Antennen (Whiskers) dargestellt. Kreise symbolisieren Ausreißer, die weiter als das 1,5-Fache der Boxlänge unterhalb der 25- oder oberhalb der 75-Perzentile liegen. Sternchen hingegen stellen Ausreißer dar, die weiter als das 3-Fache der Boxlänge unterhalb der 25- oder oberhalb der 75-Perzentile liegen.

Des Weiteren dienten Linien- und Balkendiagramme der graphischen Anschauung. Hier wurden jeweils das arithmetische Mittel der Einzelwerte sowie deren Standardabweichung dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen

#### 4.1.1 Bisphosphonat-Einfluss auf neutrophile Granulozyten

##### 4.1.1.1 Chemotaxis

Die Chemotaxis fMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten wurde im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle durch die Inkubation mit 50µM Ibandronat auf durchschnittlich 57,94% ( $p=0,008$ ) und mit 50µM Zoledronat auf 60,95% ( $p=0,015$ ) reduziert. Sowohl die Reduktion durch Clodronat als auch durch Pamidronat waren nicht signifikant (Abbildung 4.1).

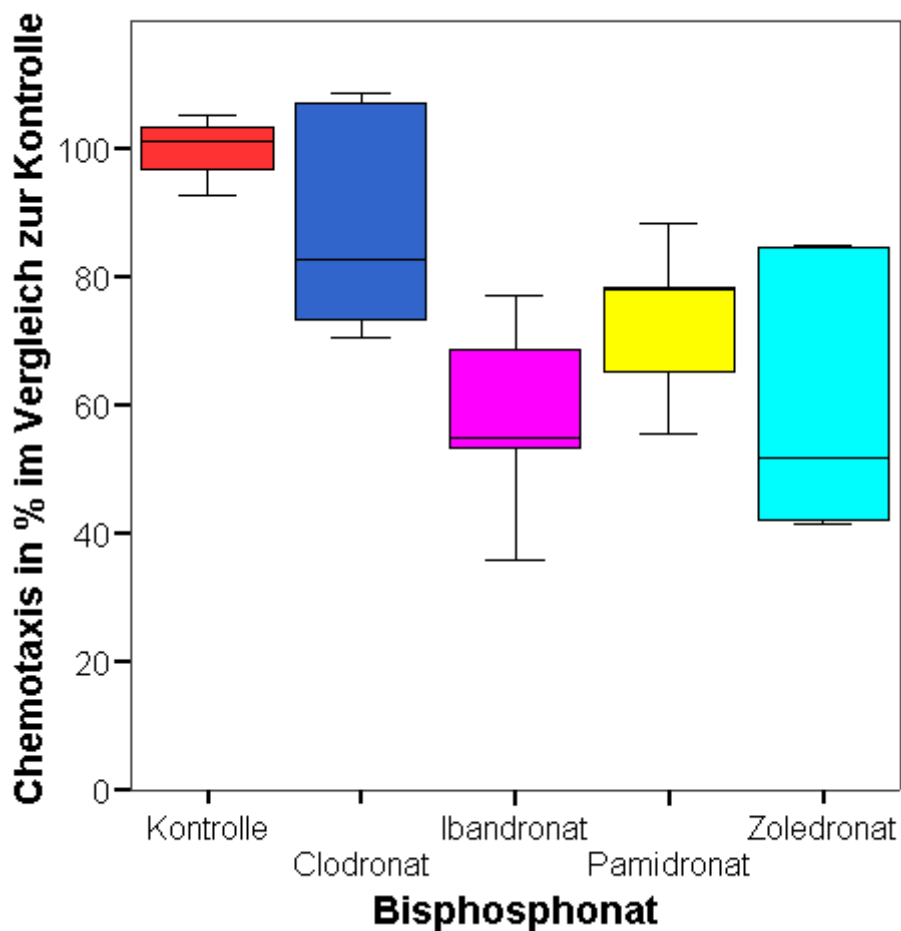


Abbildung 4.1 fMLP-stimulierte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate.

#### 4.1.1.2 Phagozytose

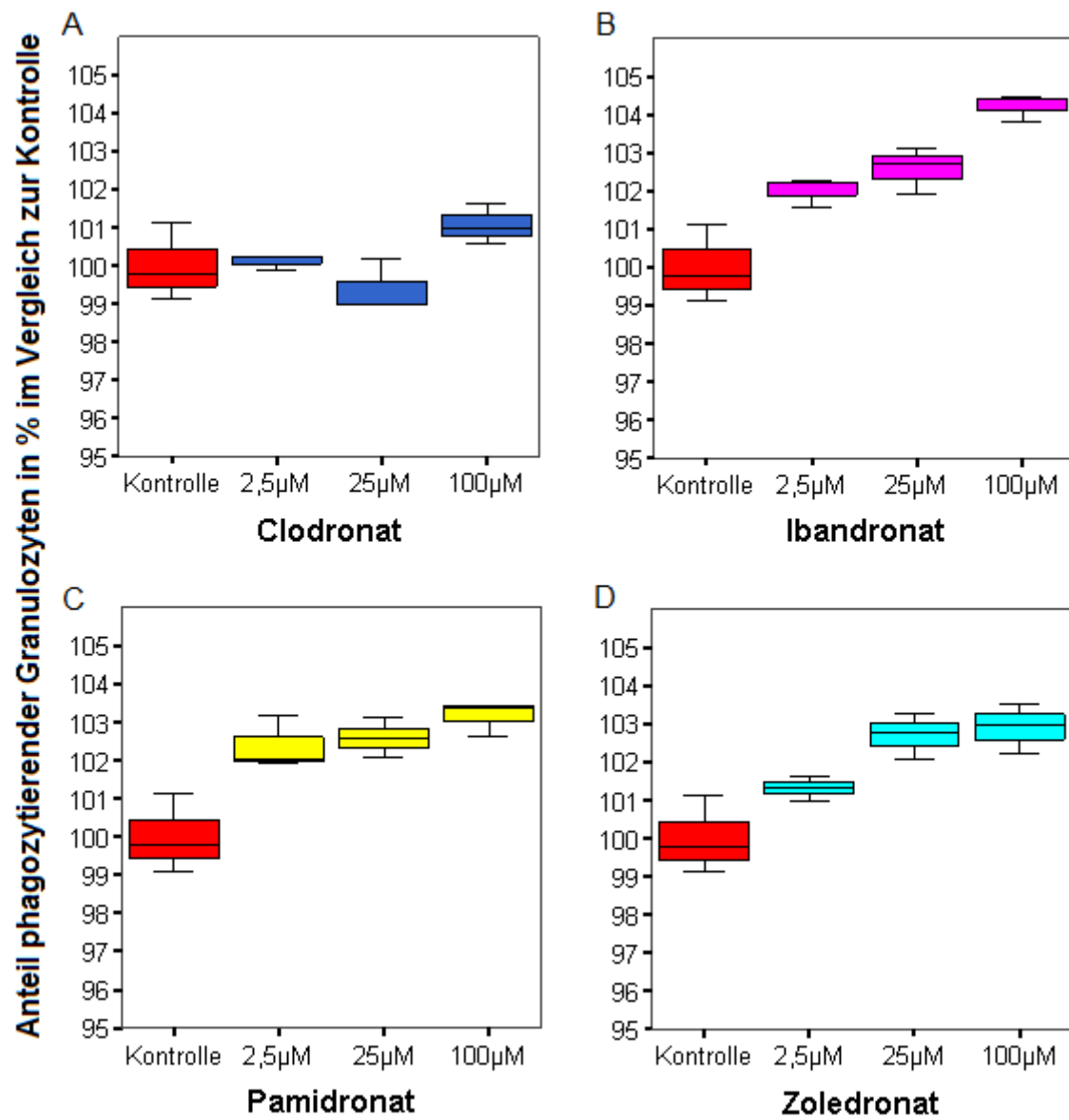
##### 4.1.1.2.1 Anteil phagozytischer Granulozyten-Konzentrationsabhängigkeit

Die Inkubation mit den N-BP Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat führte zu einem signifikanten Anstieg der Aufnahme FITC-markierter Bakterien durch neutrophile Granulozyten, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, deren Phagozytoseaktivität gleich 100% gesetzt wurde (Abbildung 4.2). Clodronat zeigte in keiner der getesteten Konzentrationen einen Effekt. Der Unterschied zu Clodronat erwies sich bei allen untersuchten stickstoffhaltigen Substanzen als signifikant. In der jeweils gleichen Konzentration gab es zwischen den einzelnen N-BP keinen Unterschied. Ibandronat wies einen statistisch signifikanten Anstieg zwischen 2,5µM und 100µM (von 102,58% auf 104,21%,  $p=0,014$ ) und einen statistischen Trend zwischen 25µM und 100µM (von 102,58% auf 104,21%,  $p=0,060$ ) auf. Die konzentrationsabhängigen Unterschiede der Phagozytoseaktivität durch Zoledronat unterlagen ebenfalls einem statistischen Trend zwischen 2,5µM und 100µM (von 101,32% auf 102,90%,  $p=0,090$ ).

##### 4.1.1.2.2 Anteil phagozytischer Granulozyten-Zeitabhängigkeit

Die Inkubation mit Clodronat zeigte, nach einem anfänglichen Anstieg, nach 24h einen leichten Abfall der Phagozytoseaktivität im Vergleich zur Kontrolle. Diese Effekte waren jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant. Alle getesteten N-BP bewirkten hingegen signifikante Unterschiede sowohl zur Kontrolle als auch zu Clodronat (Abbildung 4.3). Während im Falle von Ibandronat der Anstieg ausschließlich nach 16h statistische Signifikanz aufwies (+2,68%,  $p=0,025$ ), zeigten Pamidronat (Maximalwert nach 16h: +2,41%,  $p=0,001$ ) und Zoledronat (Maximalwert nach 16h: +2,09%,  $p=0,011$ ) nach allen untersuchten Inkubationszeiten signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.





**Abbildung 4.2** Anteil phagozytischer neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate abhängig von deren Konzentration.

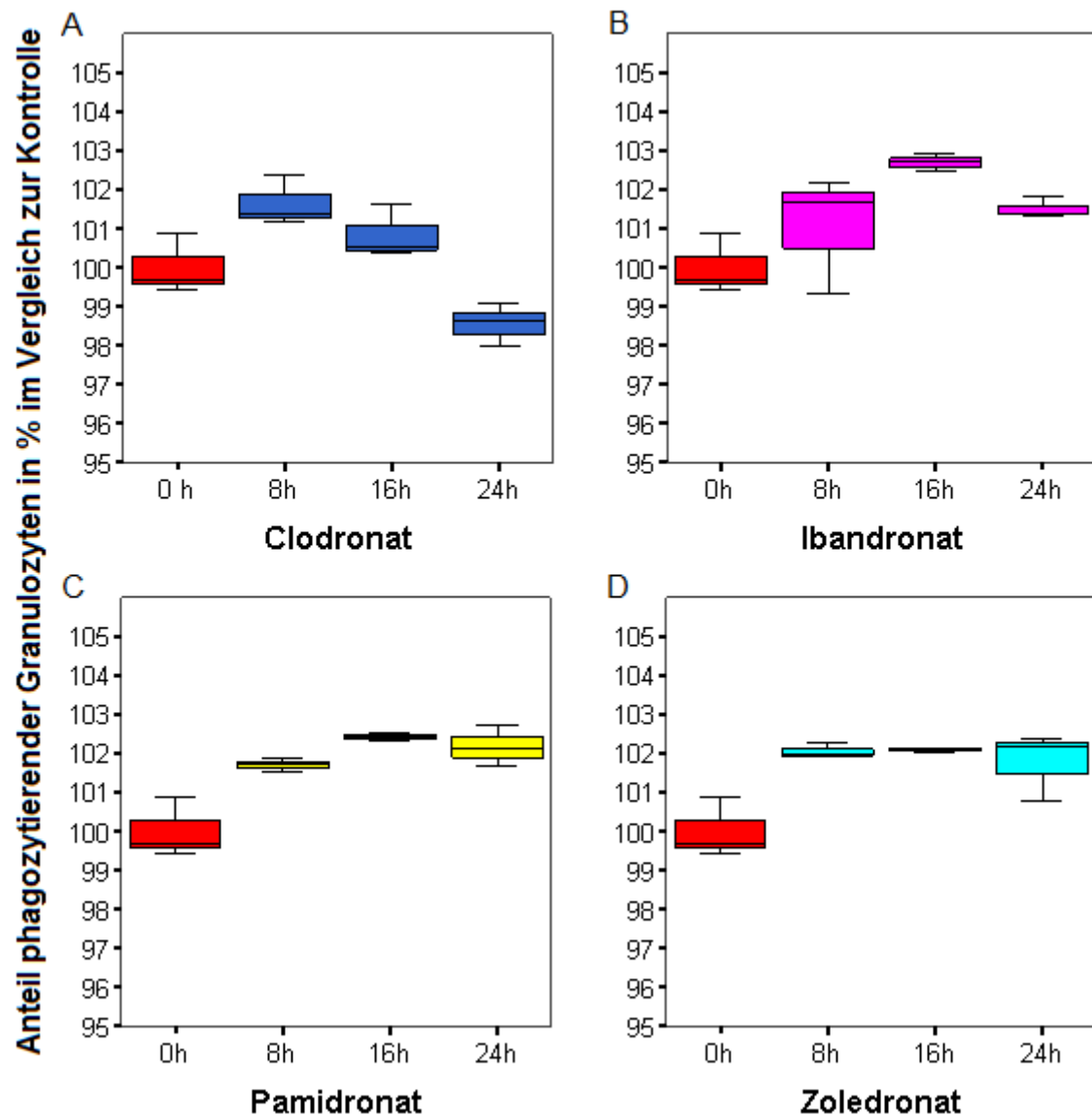


Abbildung 4.3 Anteil phagozytischer neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate abhängig von deren Inkubationszeit.

#### 4.1.1.3 Oxidativer Burst

##### 4.1.1.3.1 Anteil oxidierender Granulozyten

Die Inkubation mit Clodronat führte zu keiner signifikanten Beeinflussung des prozentualen Anteils oxidierender Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkten die N-BP Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle und den mit Clodronat behandelten Proben (Abbildung 4.4). Die 16-stündige Inkubation mit 2,5µM Zoledronat bewirkte eine knappe Verfünffachung (Anstieg auf 471,45%,  $p=0,001$ ) der Zahl der Burst-aktiven Granulozyten, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Dieser Effekt ließ sich durch eine Konzentrationserhöhung nicht weiter steigern. Sowohl 2,5µM als auch 5µM Zoledronat übten einen signifikant stärkeren Einfluss (mit Ausnahme einer statistischen Tendenz bei 2,5µM Ibandronat) auf den Anteil oxidierender Zellen aus als Ibandronat (2,5µM: Anstieg auf 326,50 % des Kontrollwertes,  $p=0,071$  und 5µM: 299,37% des Kontrollwertes,  $p=0,019$ ) und Pamidronat (2,5µM: Anstieg auf 257,74% des Kontrollwertes,  $p=0,010$  und 5µM: auf 306,34% des Kontrollwertes,  $p=0,025$ ) in den entsprechenden Konzentrationen. Ab 25µM waren keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Zoledronat und den beiden anderen N-BP vorhanden. Pamidronat wies als einzige der getesteten Substanzen konzentrationsabhängige Unterschiede mit statistischer Tendenz auf (2,5µM → 25µM:  $p=0,077$ ; 2,5µM → 50µM:  $p=0,050$ ).

##### 4.1.1.3.2 Oxidativer Burst pro Zelle

Im Vergleich zu Clodronat bewirkte jedes der untersuchten N-BP in allen getesteten Konzentrationen einen Anstieg der Burstaktivität neutrophiler Granulozyten (mittlere Anzahl reaktiver Sauerstoffmetabolite pro Zelle) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4.5). Die jeweiligen Unterschiede zu den mit Clodronat behandelten Zellen wiesen ebenfalls Signifikanz auf. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen äquivalenten Konzentrationen der einzelnen N-BP. Im Gegensatz zu Zoledronat hing der Einfluss von Ibandronat und Pamidronat von deren Konzentration ab. Im Falle Ibandronats erwies sich der Anstieg des oxidativen Bursts pro Zelle zwischen 2,5µM und 25µM ( $p=0,017$ ) und zwischen 2,5µM und 50µM ( $p=0,029$ ) als statistisch signifikant. Auch 25µM ( $p=0,039$ ) und 50µM ( $p=0,01$ ) Pamidronat zeigten einen signifikant stärkeren Einfluss als 2,5µM.

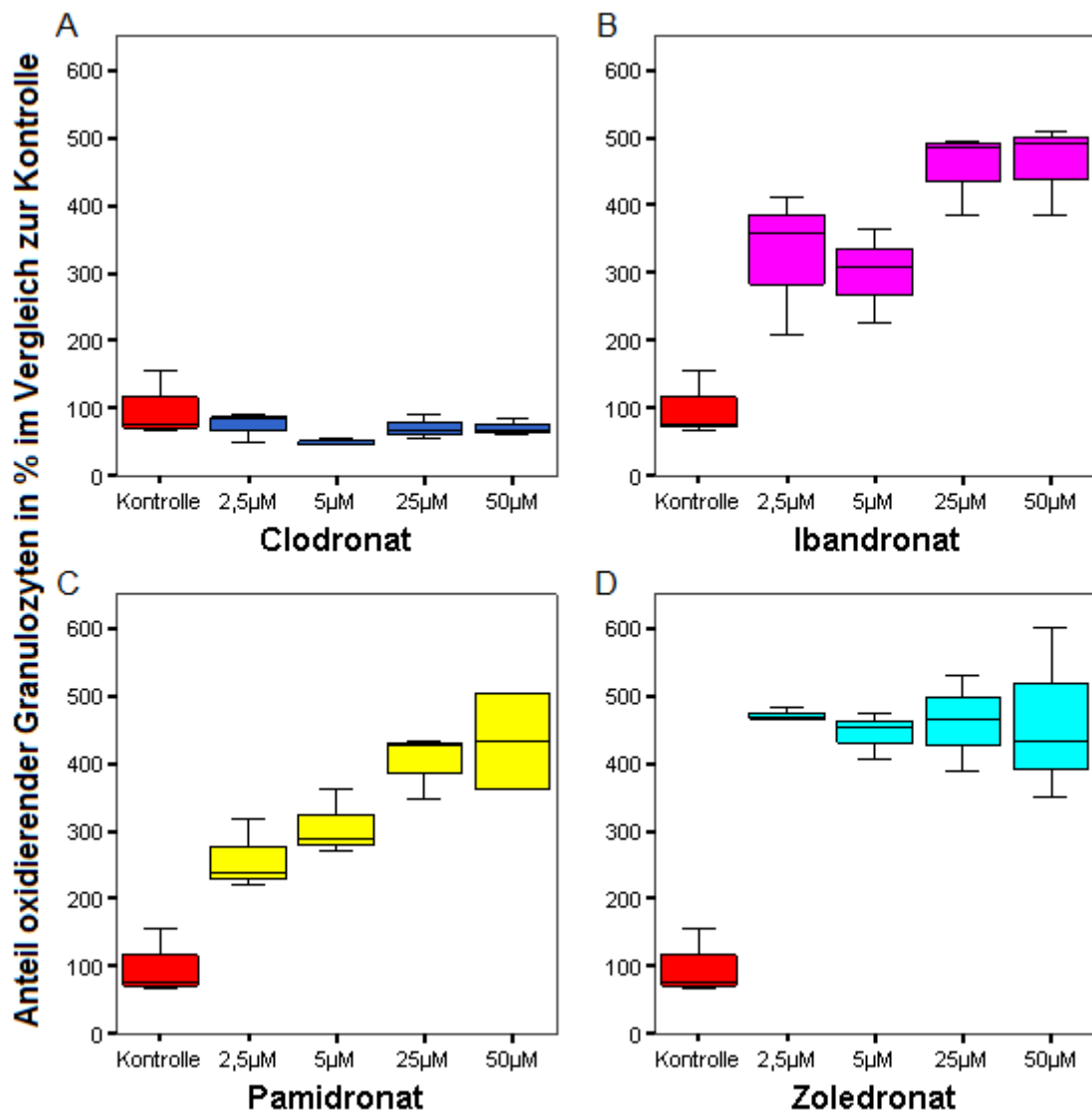


Abbildung 4.4 Anteil oxidierender neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate.

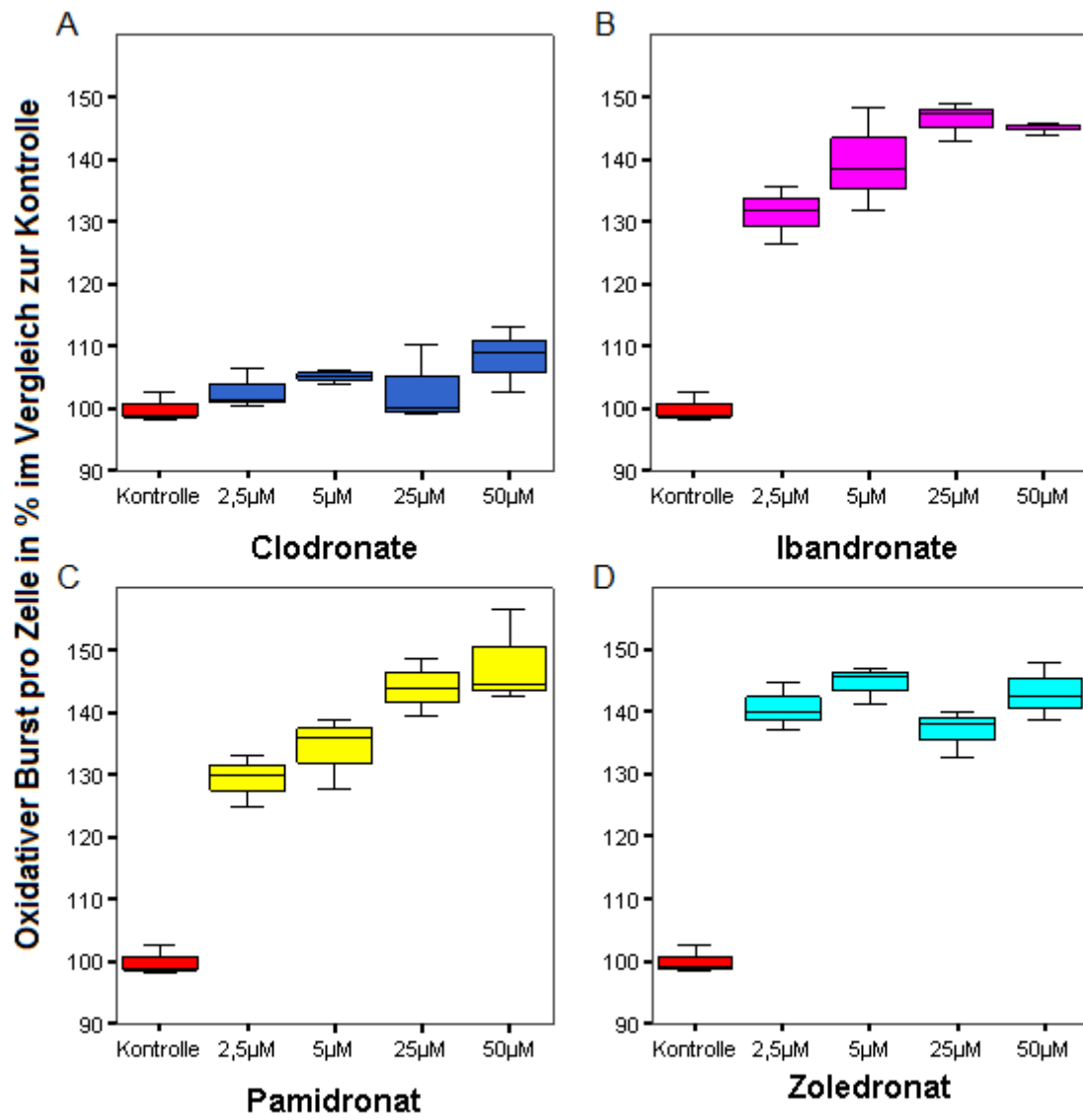


Abbildung 4.5 Oxidativer Burst pro Granulozyt unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate.

## 4.2 Zellversuche

### 4.2.1 Isoprenoid-Einfluss auf die Zoledronat-Wirkung

#### 4.2.1.1 MTT Assay

##### 4.2.1.1.1 Fibroblasten

Die 72-stündige Inkubation der Fibroblasten mit 50µM Zoledronat führte zu einer Reduktion der Vitalität auf 5,65% ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Vitalität=100%). GGOH bewirkte in jeder der getesteten Konzentrationen einen signifikanten Vitalitätsanstieg der mit Zoledronat behandelten Zellen ( $p < 0,001$ ). Während durch die Zugabe von 10µM und 25µM GGOH bereits das Kontrollniveau erreicht wurde, stieg die Vitalität durch die Zugabe von 50µM und 100µM GGOH signifikant über die der unbehandelten Kontrolle (+36,38%,  $p < 0,001$  und +27,30%,  $p = 0,011$ ). Im Gegensatz zu GGOH übte keines der anderen untersuchten Isoprenoide einen positiven Einfluss auf die durch Zoledronat beeinträchtigten Fibroblasten aus (Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7).

*Isoprenoid-Effekte ohne Zoledronat:* Die Inkubation mit 10µM GGOH zeigte einen Abfall der Zellvitalität (von 100% auf 69,04%,  $p = 0,003$ ). Höhere Konzentrationen wiesen keinen Einfluss auf die Viabilität auf. 25µM Eugenol ließ die Zellvitalität steigen (+39%,  $p < 0,001$ ). Farnesol dagegen übte in jeder der getesteten Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Fibroblasten aus. Ein Anstieg des Metabolismus war durch die Zugabe von 50µM Limonene zu verzeichnen (+29,78%,  $p = 0,004$ ). Sowohl Menthol als auch Squalene reduzierten die Vitalität in Konzentrationen von 25µM und mehr (MOH 25µM: von 100% auf 76%,  $p = 0,021$ ; Sq 25µM: von 100% auf 65,95%,  $p < 0,001$ ) (Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7).

##### 4.2.1.1.2 HUVEC

Die Zellvitalität wurde durch die Inkubation mit 50µM Zoledronat im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (von 100% auf 25,07%,  $p < 0,001$ ). Die zusätzliche Behandlung mit 10µM GGOH bewirkte einen signifikanten Anstieg (von 25,07% auf 86,75%,  $p < 0,001$ ). Das Vitalitätsniveau, welches somit erreicht wurde, stellte keinen statistisch signifikanten Unterschied mehr zur Kontrolle dar. Durch die zusätzliche Inkubation mit höheren GGOH Konzentrationen konnte keine Verbesserung der Viabilität der durch Zoledronat geschädigten Endothelzellen beobachtet werden. Das

gleiche gilt für die anderen getesteten Isoprenoide, von denen keines einen positiven Effekt auf den beeinträchtigten Zellmetabolismus aufwies (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9).

*Isoprenoid-Effekte ohne Zoledronat:* Während 10µM und 25µM GGOH keinen Einfluss ausübten, bewirkten höhere Konzentration einen Abfall der Endothelzellvitalität (50µM: von 100% auf 21,05%,  $p < 0.001$  und 100µM: von 100% auf 1,38%,  $p < 0.001$ ). Eine Reduktion der Viabilität verursachte auch Eugenol ab einer Konzentration von 50µM (50µM: von 100 % auf 56,44%,  $p < 0,001$ ). Eine signifikante Schädigung des Zellmetabolismus erfolgte auch durch 100µM Limonene (von 100% auf 5,16%,  $p < 0,001$ ). Menthol zeigte keine signifikante Beeinflussung. Erwähnenswert ist jedoch, dass es durch die Zugabe von 10µM des Isoprenoids zu einer Vitalitätssteigerung kam, die einen statistischen Trend aufwies (von 100% auf 126.99%,  $p = 0,062$ ). Squalene zeigte hingegen keinen Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ab einer Konzentration von 25µM Farnesol wurde die Zellvitalität hingegen signifikant beeinträchtigt (25µM: von 100% auf 57,24%,  $p < 0,001$ , 50µM: von 100% auf 16,91%,  $p < 0,001$ , 100µM: von 100% auf 0,99%,  $p < 0.001$ ) (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9).

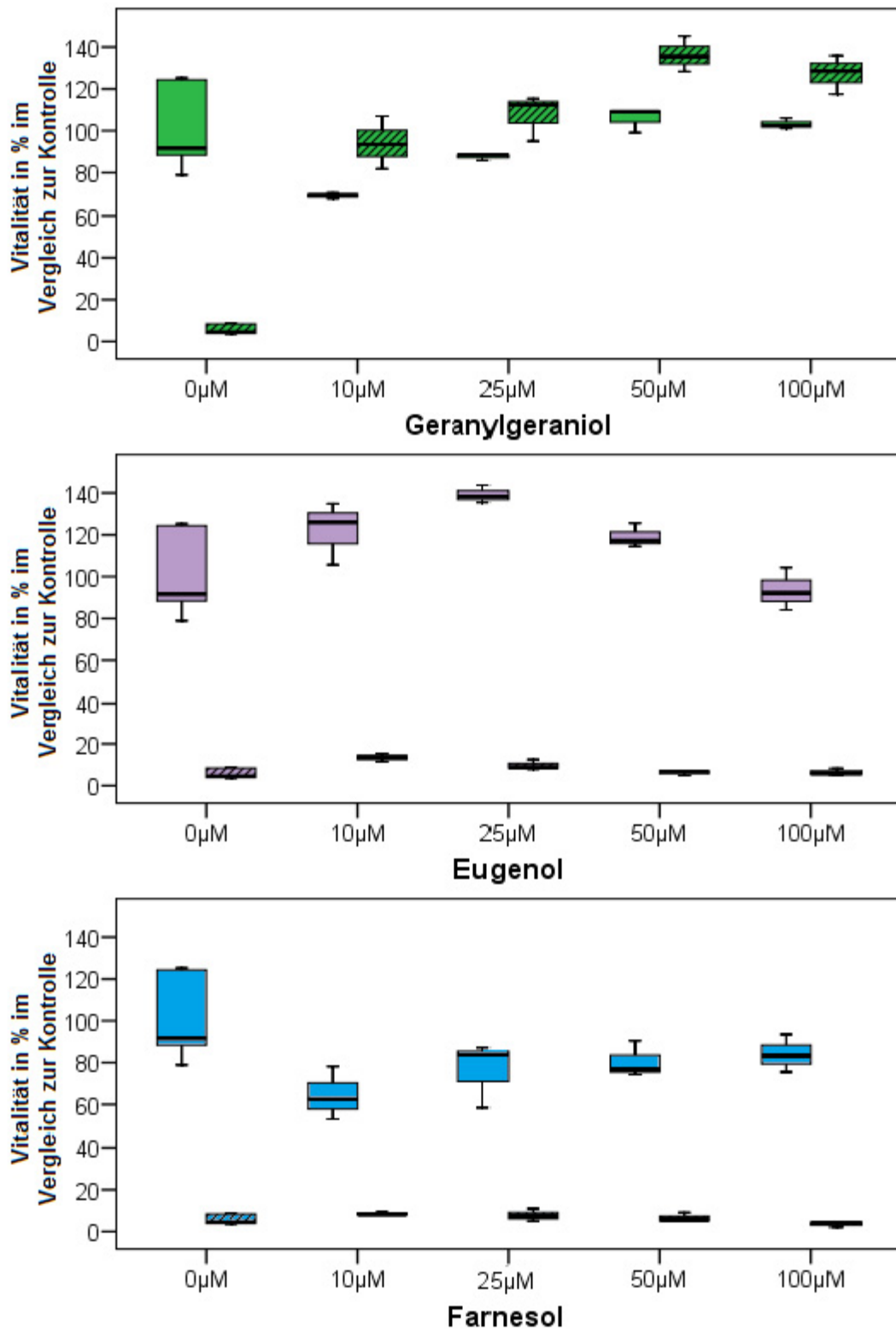
#### 4.2.1.1.3 Osteoblasten

50µM Zoledronat reduzierten die Osteoblastenvitalität signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (von 100% auf 32,33%,  $p < 0,001$ ). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit GGOH bewirkte einen Anstieg der Viabilität, der im Falle von 10µM (von 32,33% auf 64,6%,  $p = 0,002$ ), 25µM (von 32,33% auf 63,74%,  $p = 0,002$ ) und 100µM (von 32,33% auf 58,64%,  $p = 0,018$ ) statistische Signifikanz aufwies. Alle anderen getesteten Isoprenoide konnten die verminderte Vitalität der parallel mit Zoledronat behandelten Zellen nicht verbessern (Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11).

*Isoprenoid-Effekte ohne Zoledronat:* Sowohl 50µM als auch 100µM GGOH beeinflussten die Zellvitalität negativ (50µM: von 100% auf 73,6%,  $p < 0,001$  und 100µM: von 100% auf 74,52%,  $p < 0,001$ ). Die Inkubation mit Farnesol führte zu einer Reduktion der Viabilität in jeder der getesteten Konzentrationen. Ab 25µM hatte auch Limonene einen negativen Effekt auf den Zellstoffwechsel (25µM: von 100% auf 64,89%,  $p = 0,001$ ; 50µM: von 100% auf 65,81%,  $p = 0,001$ ; 100µM: von 100% auf

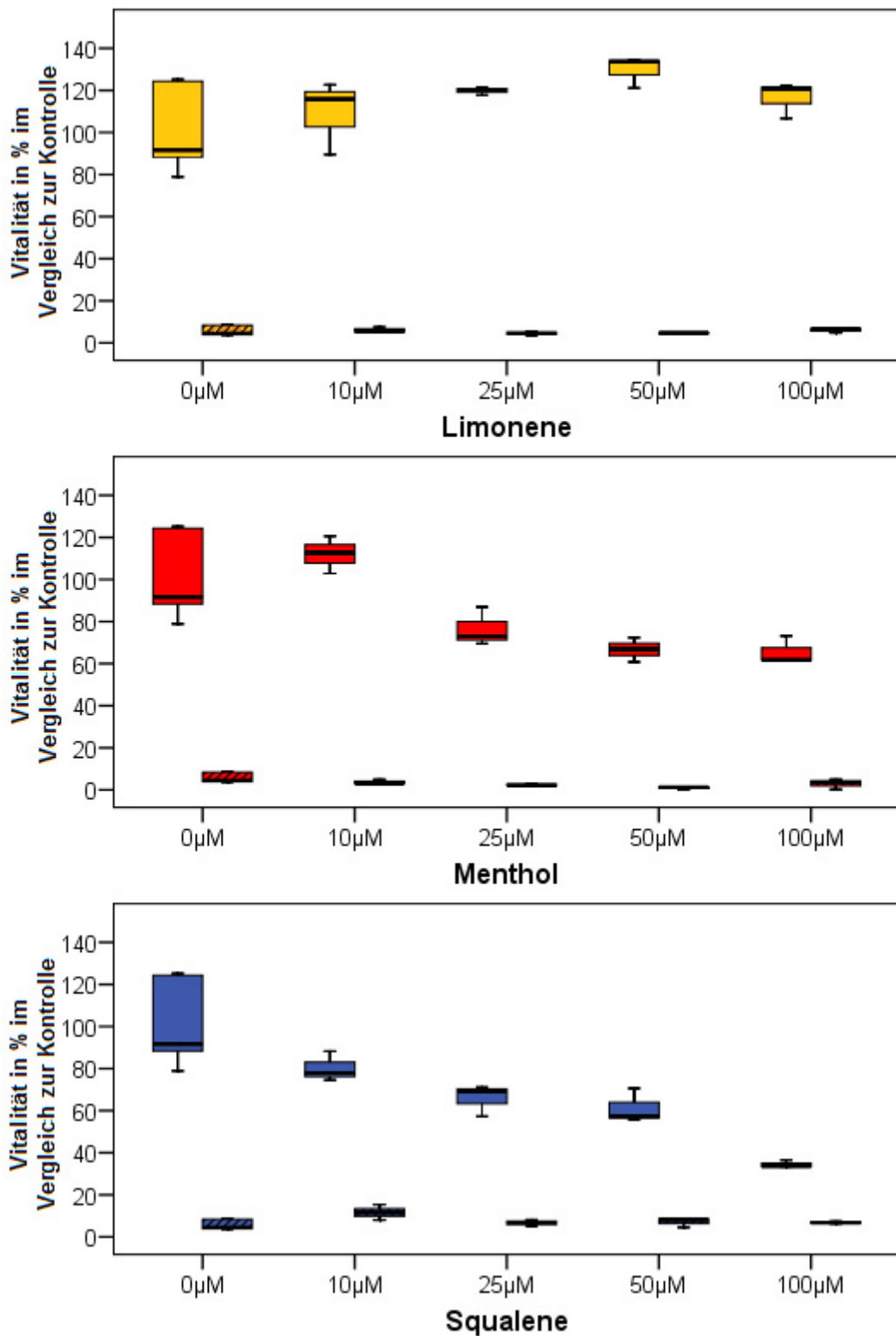
67,79%,  $p=0,003$ ). Die Inkubation mit Eugenol, Menthol und Squalene beeinflusste die Vitalität der Zellen nicht im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11).





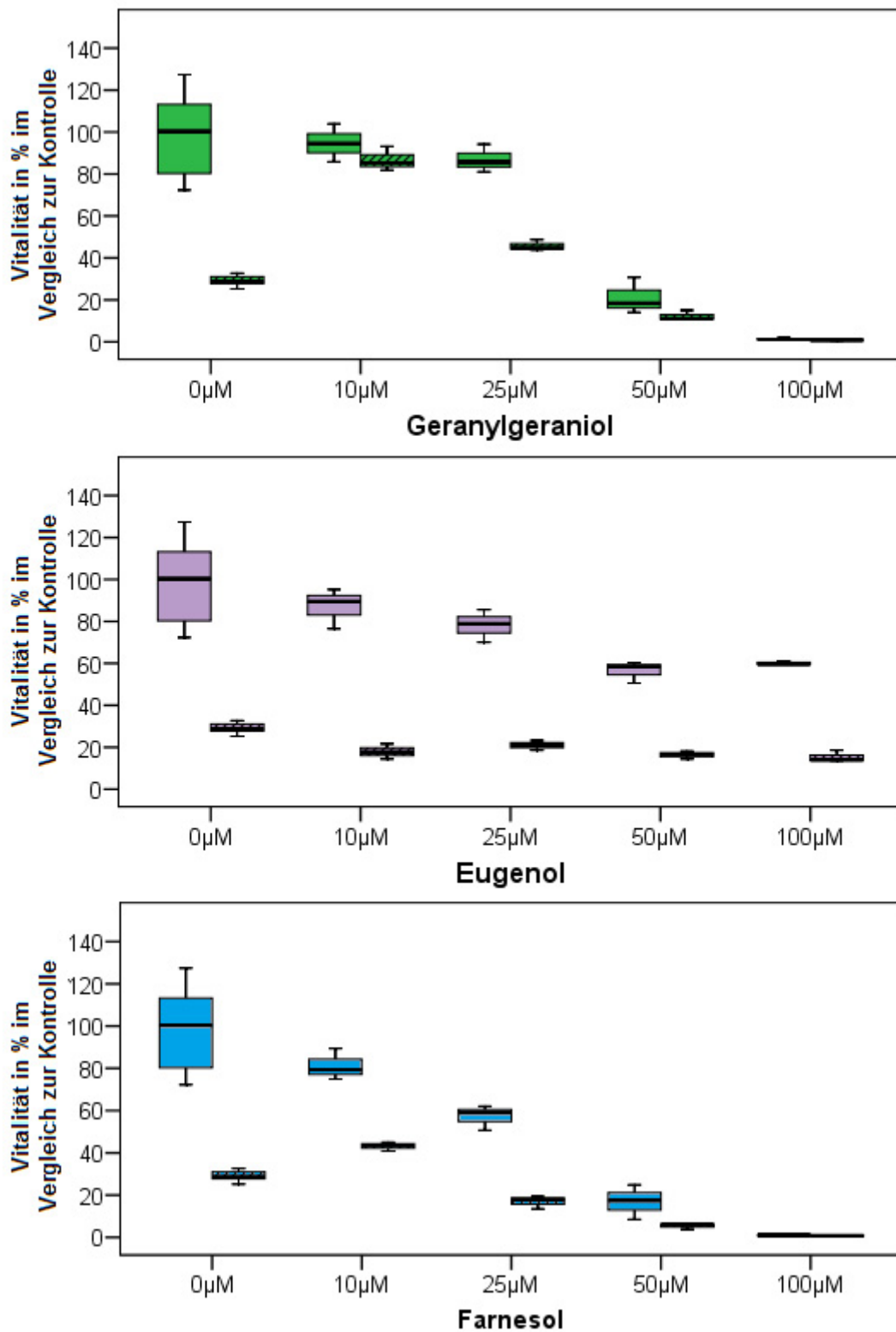
**Abbildung 4.6 MTT Assay an gingivalen Fibroblasten.**

Getestet wurde der Einfluss der verschiedenen Isoprenoide (Geranylgeraniol, Eugenol, Farnesol) in unterschiedlichen Konzentrationen allein und in Kombination mit Zoledronat. Der Zoledronat-Zusatz (jeweils 50µM) ist durch eine Schraffierung der Boxplots dargestellt.



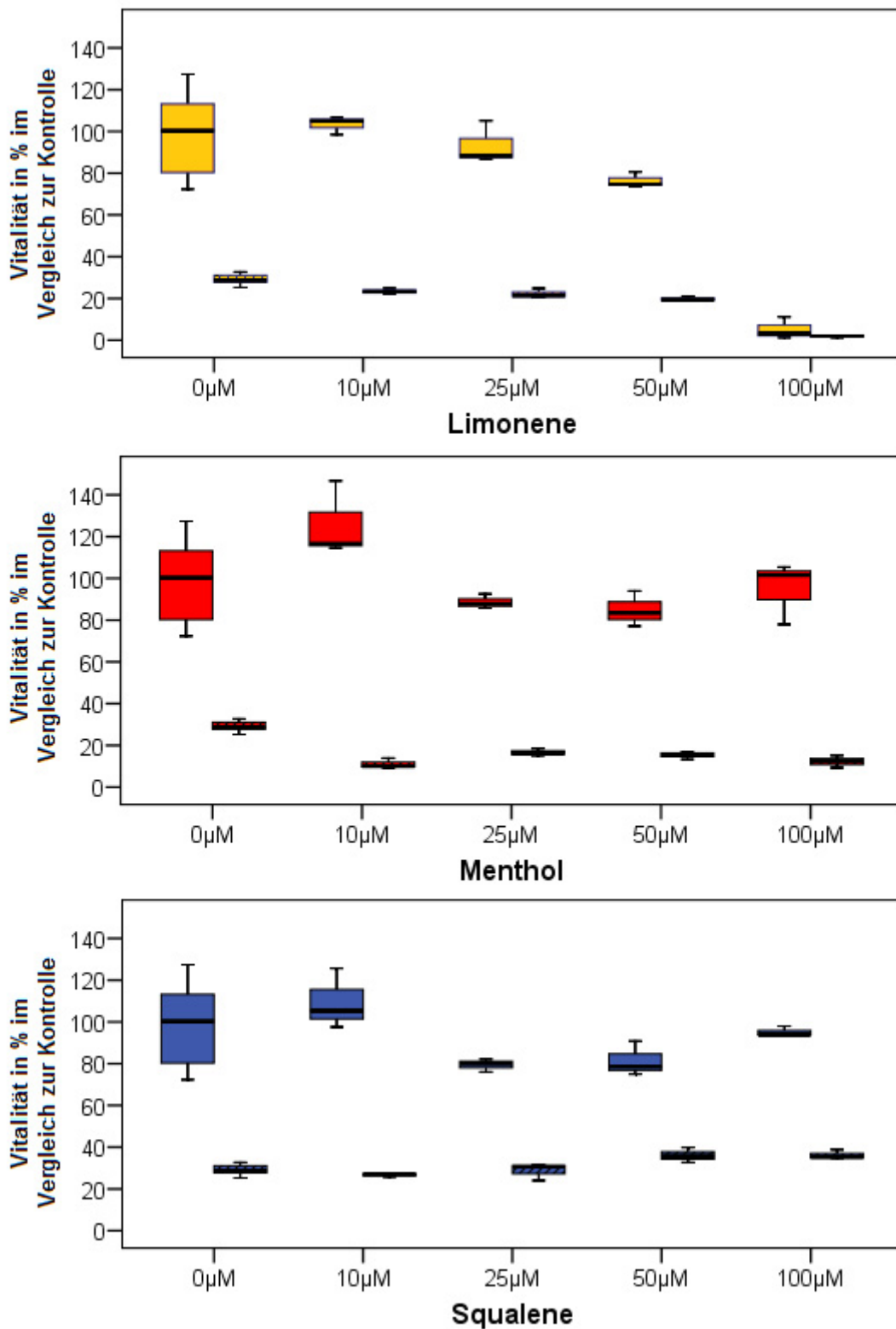
**Abbildung 4.7 MTT Assay an gingivalen Fibroblasten.**

Getestet wurde der Einfluss der verschiedenen Isoprenoide (Limonene, Menthol, Squalene) in unterschiedlichen Konzentrationen allein und in Kombination mit Zoledronat. Der Zoledronat-Zusatz (jeweils 50µM) ist durch eine Schraffierung der Boxplots dargestellt.



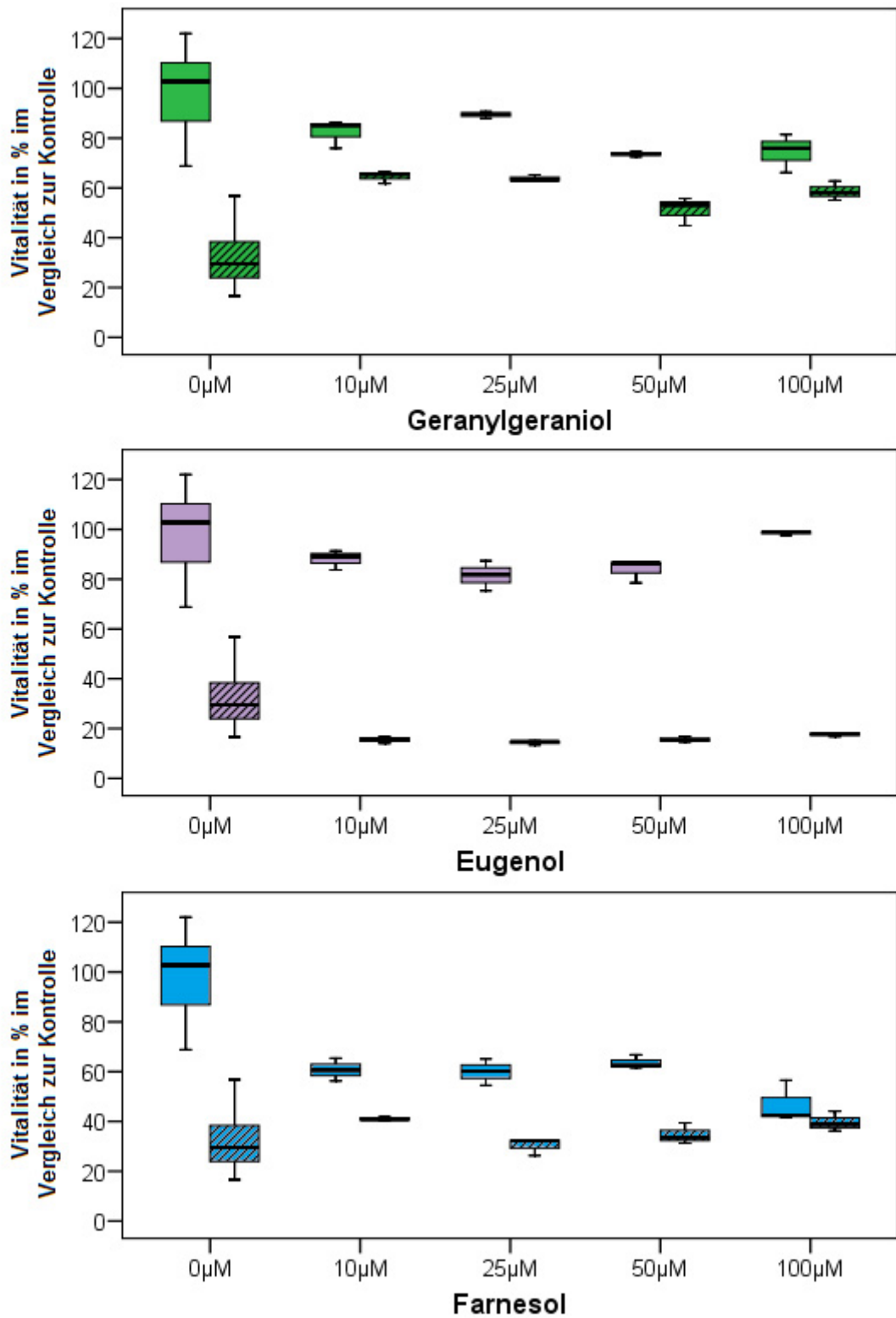
**Abbildung 4.8 MTT Assay an HUVEC.**

Getestet wurde der Einfluss der verschiedenen Isoprenoide (Geranylgeraniol, Eugenol, Farnesol) in unterschiedlichen Konzentrationen allein und in Kombination mit Zoledronat. Der Zoledronat-Zusatz (jeweils 50 μM) ist durch eine Schraffierung der Boxplots dargestellt.



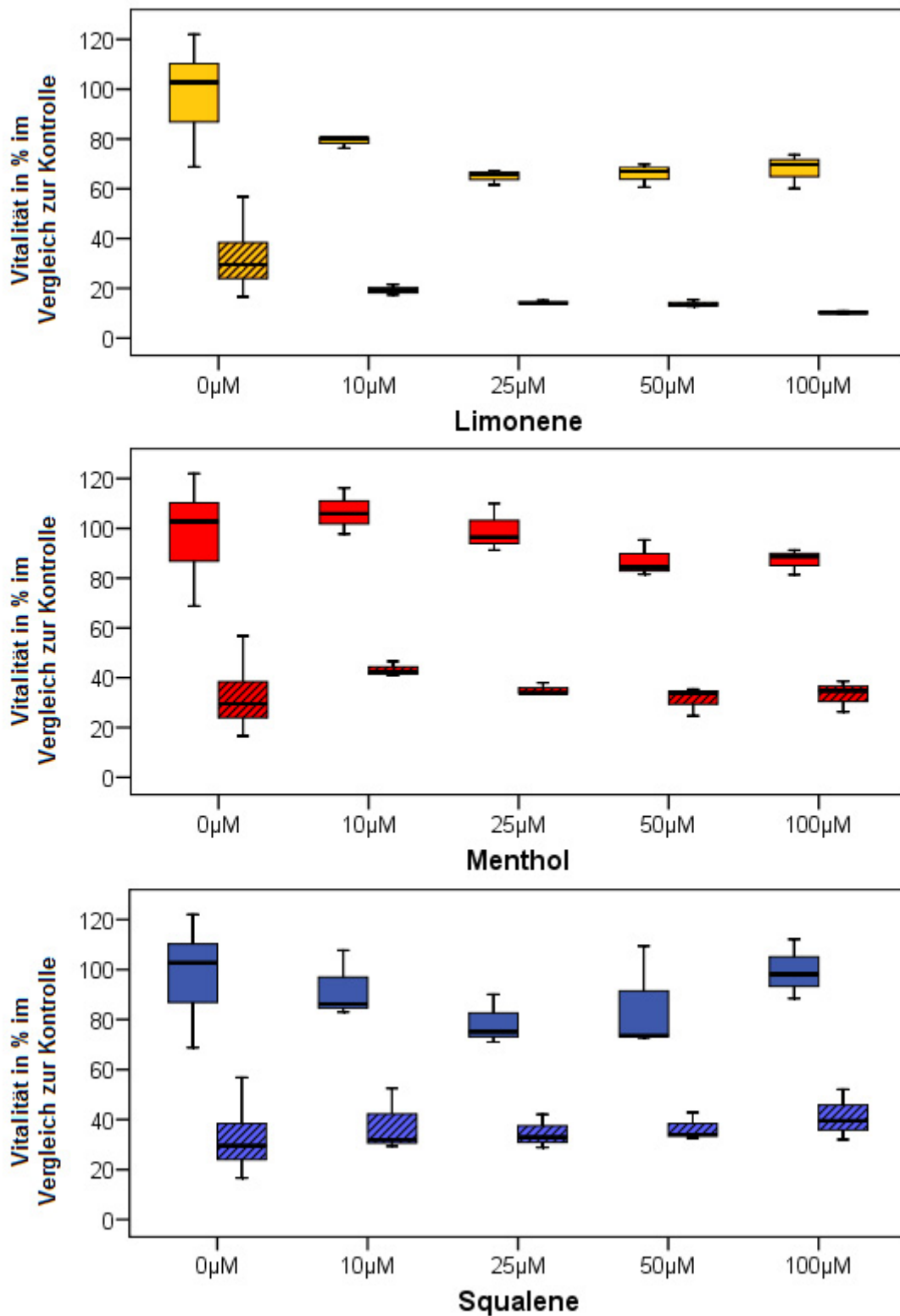
**Abbildung 4.9 MTT Assay an HUVEC.**

Getestet wurde der Einfluss der verschiedenen Isoprenoide (Limonene, Menthol, Squalene) in unterschiedlichen Konzentrationen allein und in Kombination mit Zoledronat. Der Zoledronat-Zusatz (jeweils 50 μM) ist durch eine Schraffierung der Boxplots dargestellt.



**Abbildung 4.10 MTT Assay an Osteoblasten.**

Getestet wurde der Einfluss der verschiedenen Isoprenoide (Geranylgeraniol, Eugenol, Farnesol) in unterschiedlichen Konzentrationen allein und in Kombination mit Zoledronat. Der Zoledronat-Zusatz (jeweils 50µM) ist durch eine Schraffierung der Boxplots dargestellt.



**Abbildung 4.11 MTT Assay an Osteoblasten.**

Getestet wurde der Einfluss der verschiedenen Isoprenoide (Limonene, Menthol, Squalene) in unterschiedlichen Konzentrationen allein und in Kombination mit Zoledronat. Der Zoledronat-Zusatz (jeweils 50 µM) ist durch eine Schraffierung der Boxplots dargestellt.

#### 4.2.1.2 Scratch Wound Assay

##### 4.2.1.2.1 Fibroblasten

Bei unbehandelten Fibroblasten war die Breite der künstlich geschaffenen Wunde nach 8h von 100% auf 54,73% reduziert. Nach 24h war sie mit 0,42% bereits fast vollständig geschlossen. Die Inkubation mit Zoledronat verursachte eine Reduktion der Wundheilungskapazität, die nach 24h statistische Signifikanz zur Kontrolle aufwies ( $P=0,001$ ). Während die Größe der Lücke im Zellrasen zu diesem Zeitpunkt bei 43,68% lag, betrug sie nach 48h immer noch 22,71% der Ausgangsgröße. Die gleichzeitige Behandlung mit GGOH verbesserte die Fähigkeit der Zellen in die künstliche Wunde zu wandern ab 24h signifikant verglichen mit der Einzelinkubation mit dem Bisphosphonat ( $p<0,001$ ). Die Größe der Lücke betrug zu diesem Zeitpunkt nur noch 6,54% und war nach 48h vollständig geschlossen. Die zusätzliche Behandlung mit Eugenol ließ sowohl nach 24h (22,69%) als auch nach 48h (10,53%) einen positiven Effekt auf die durch Zoledronat geschädigten Zellen erkennen, dieser war jedoch nur nach 24h signifikant ( $p<0,001$ ). Der Einfluss von Eugenol war dennoch signifikant niedriger als der von GGOH ( $p<0,001$ ). Alle anderen der getesteten Isoprenoide zeigten keinen Effekt auf die beeinträchtigte Wundheilungskapazität der Fibroblasten (Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13).

##### 4.2.1.2.2 HUVEC

Die künstlich erzeugte Wunde im Endothelzellrasen war im Falle der Kontrolle nach 8h von 100% auf 51,54% und nach 24h auf 9,91% reduziert. Nach 48h war die Lücke komplett geschlossen. Die Inkubation mit Zoledronat bewirkte bereits nach 8h eine signifikante Verschlechterung der Wundheilungskapazität ( $p=0,019$ ). Die Größe der Lücke betrug zu diesem Zeitpunkt noch 69,87%. Die zusätzliche Behandlung mit GGOH bewirkte eine Reduktion der Wunde auf 50,00% der Ausgangsgröße, was eine signifikante Verbesserung zur Zoledronat-Einzelinkubation darstellte ( $p=0,006$ ). Nach 24h erreichte die Wunde, durch Zoledronat beeinflusst eine Größe von 53,14% ( $p<0,001$  im Vergleich zur Kontrolle). Zu diesem Zeitpunkt war die Größe der Lücke der zusätzlich mit GGOH behandelten Endothelzellen bereits auf 8,72% reduziert ( $p<0,001$  im Vergleich zur Zoledronat-Einzelbehandlung), somit bestand kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Während die Größe der Wunde im Zellrasen nach 48-stündiger Zoledronat-Einwirkung noch 36,82% der

Ursprungsgröße betrug, sorgte die zusätzliche Inkubation mit GGOH über den gleichen Zeitraum für einen kompletten Wundverschluss, der sich nicht von dem der unbehandelten Kontrolle unterschied. Keines der anderen untersuchten Isoprenoide übte einen positiven Effekt auf die Fähigkeit der geschädigten Endothelzellen, die künstliche Wunde zu schließen, aus. Stattdessen kam es durch die alleinige Inkubation mit Eugenol, Farnesol, Menthol und Limonene zu einer Reduktion der Wundheilungskapazität im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15).

#### 4.2.1.2.3 Osteoblasten

Die künstliche Wunde im Zellrasen der unbehandelten Osteoblasten war nach 8h auf 86,43% und nach 24h auf 26,25% reduziert und nach 48h komplett geschlossen. Zoledronat bewirkte eine signifikante Reduktion der Wundheilung nach 24h. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Größe der Lücke noch 53,33% und nach 48h noch 25,00% (beide  $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) ihres Ursprungs. Die zusätzliche Inkubation mit GGOH bewirkte, dass die Wunde nach 24h auf 27,61% reduziert und nach 48h vollständig geschlossen war (beide  $p < 0,001$  im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Zoledronat). Nach 24h zeigten die zusätzlich mit Limonene inkubierten Zellen eine positive Tendenz ( $p = 0,054$ ) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Zoledronat. Die anderen Isoprenoide bewirkten keine Verbesserung der durch Zoledronat geschädigten Fähigkeit die künstliche Wunde im Zellrasen zu schließen. Stattdessen beeinflussten sowohl Farnesol als auch Menthol alleine die Osteoblasten negativ (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17).



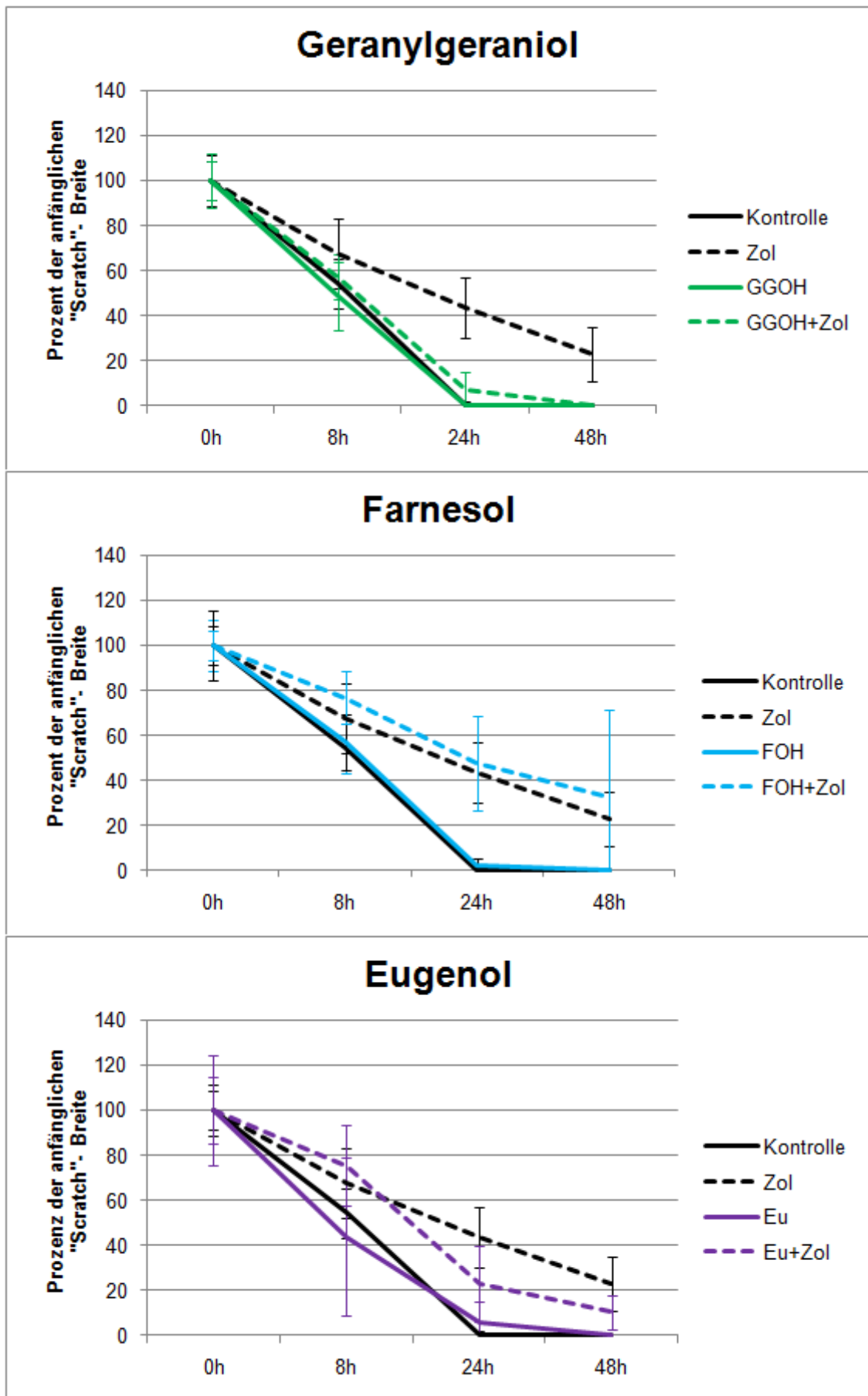


Abbildung 4.12 Scratch Wound Assay- Fibroblasten: Geranylgeranyl, Farnesol, Eugenol.

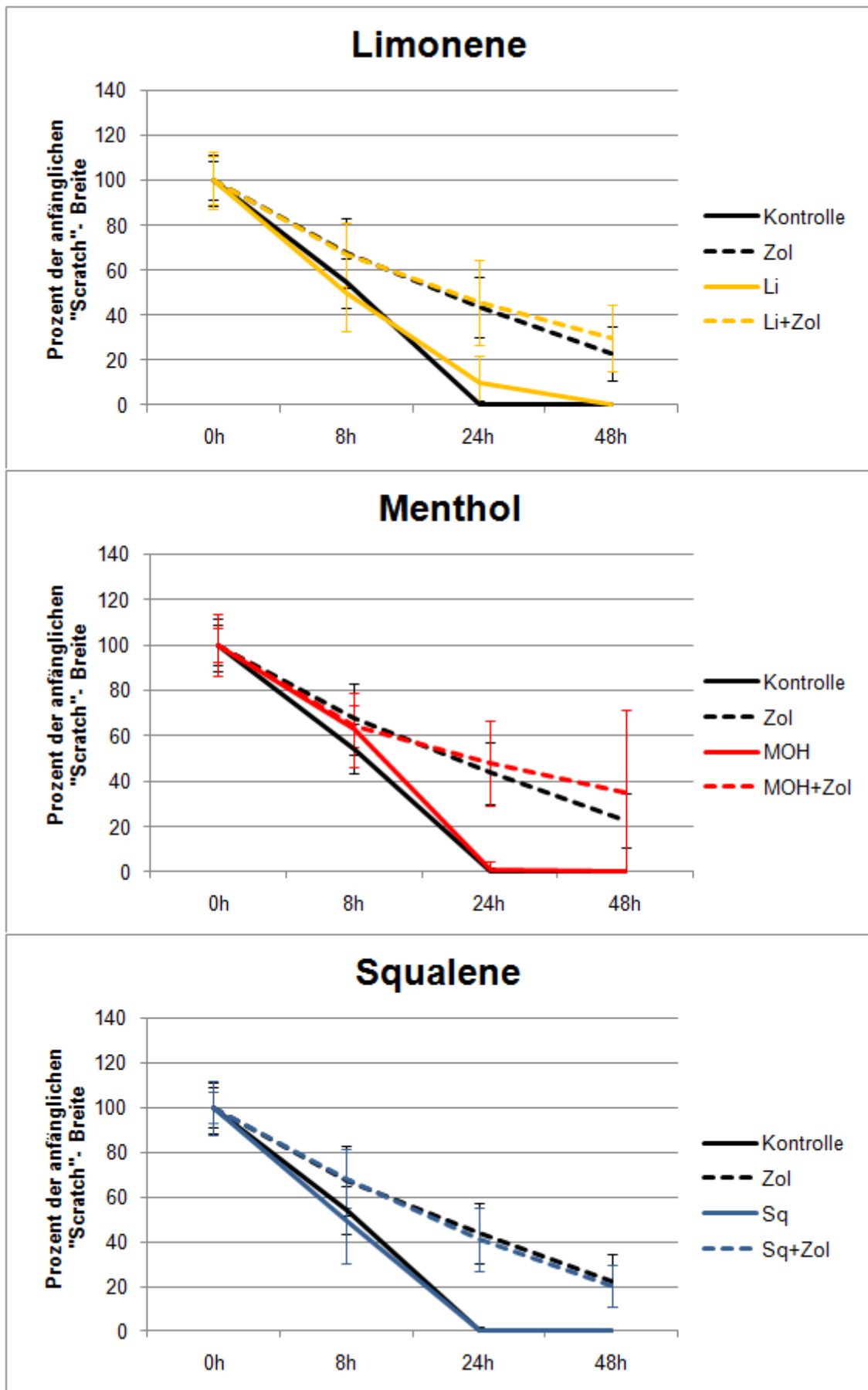


Abbildung 4.13 Scratch Wound Assay- Fibroblasten: Limonene, Menthol, Squalene.

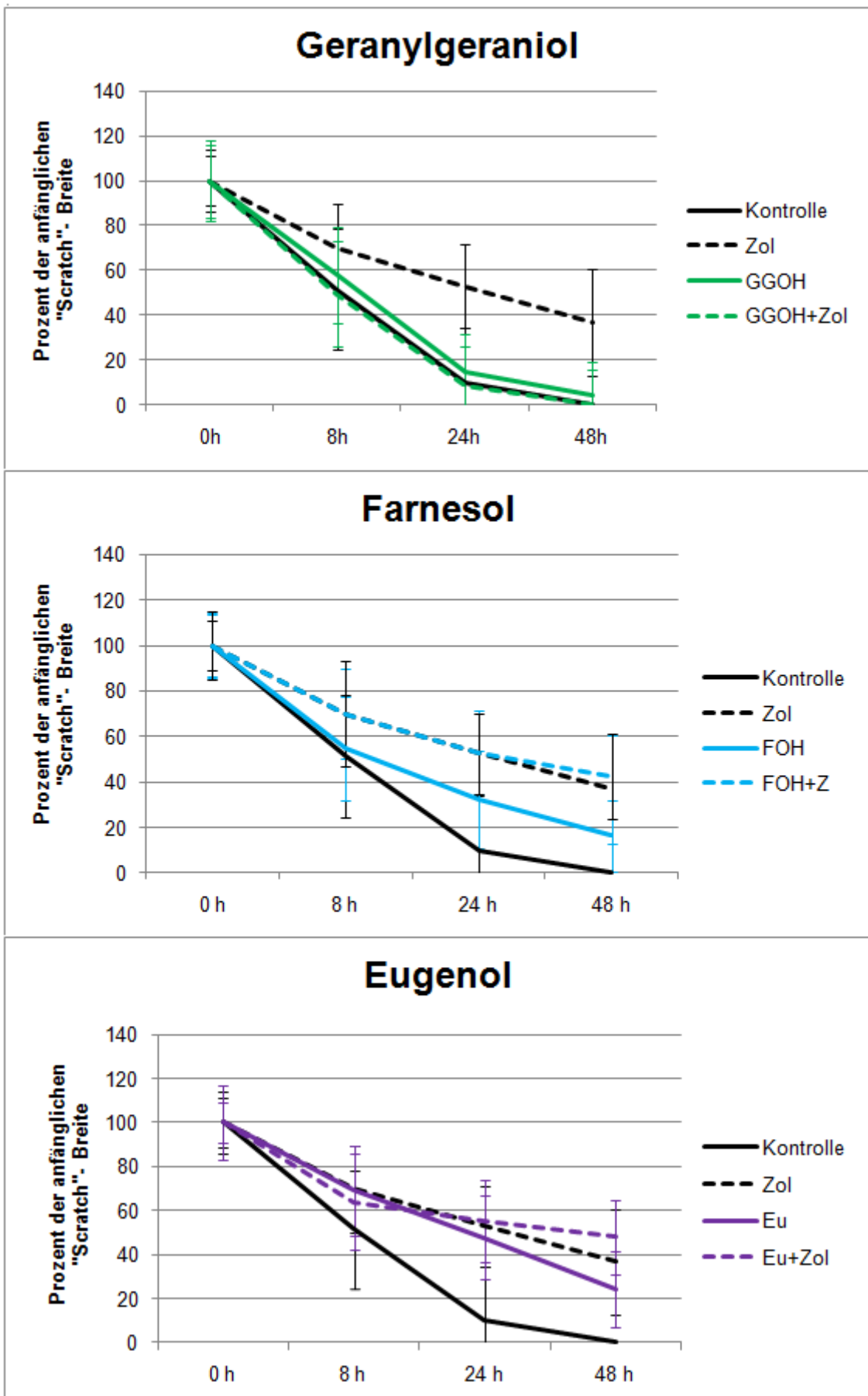


Abbildung 4.14 Scratch Wound Assay- HUVEC: Geranylgeranyl, Farnesol, Eugenol.

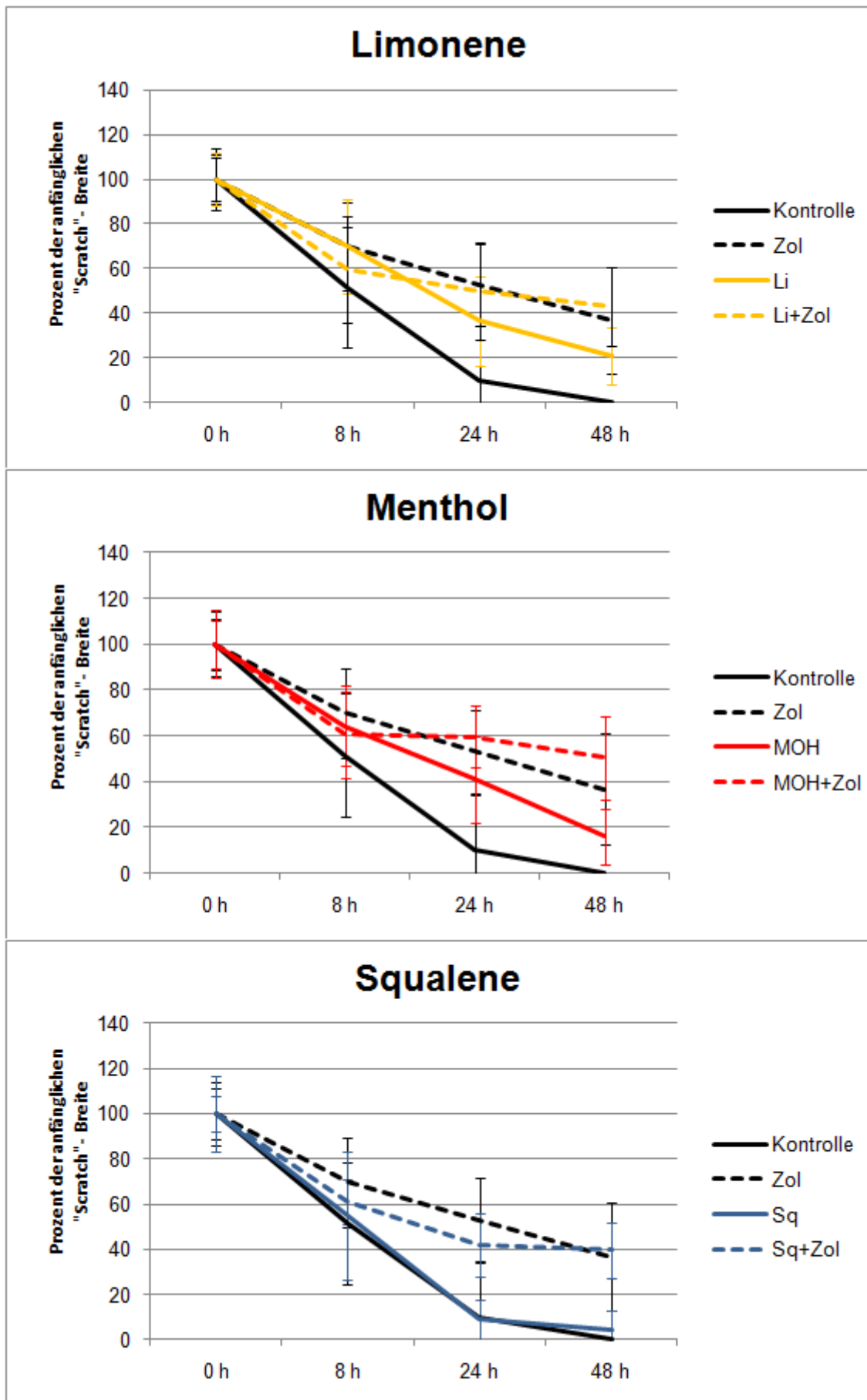


Abbildung 4.15 Scratch Wound Assay- HUVEC: Limonene, Menthol, Squalene.

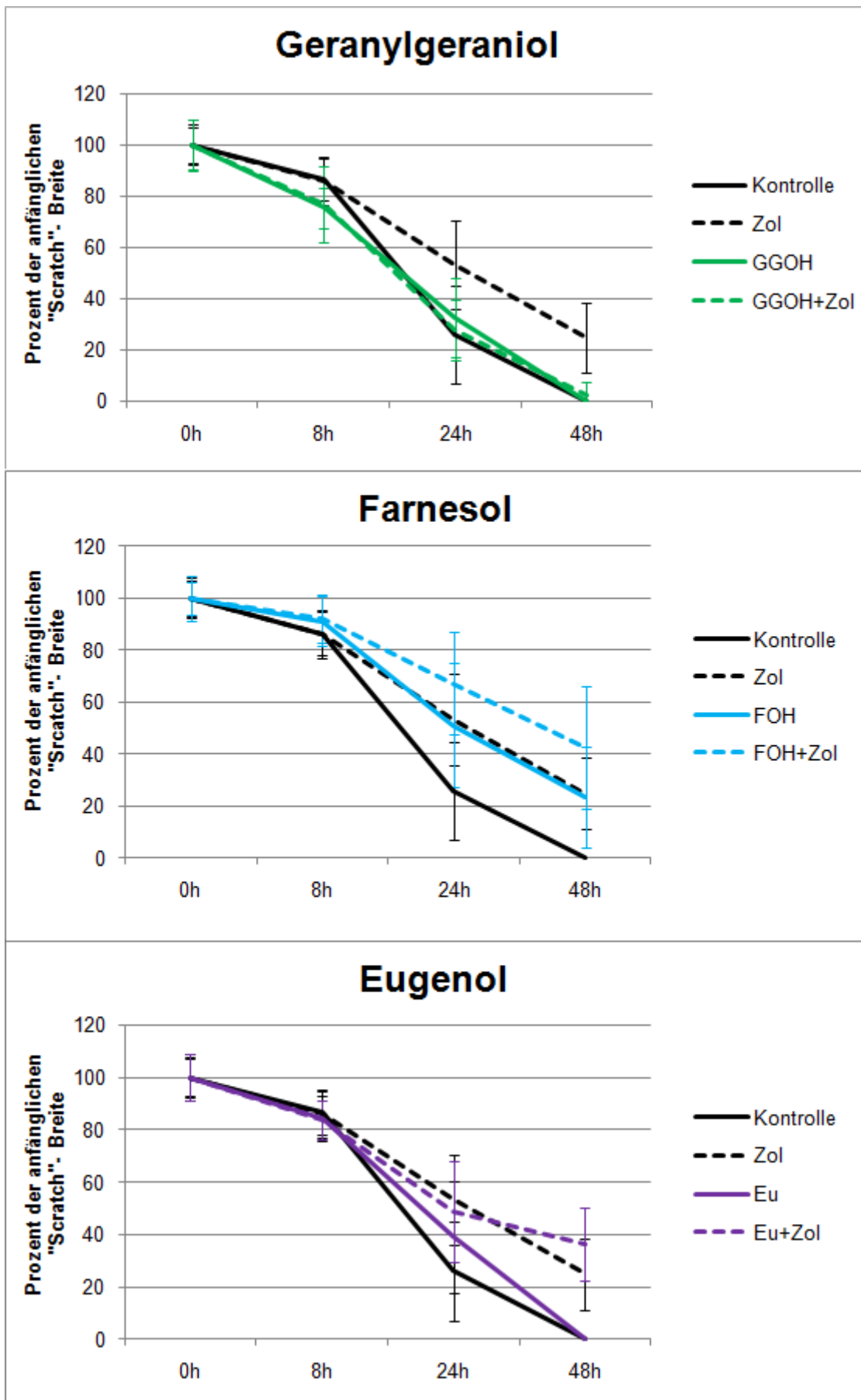


Abbildung 4.16 Scratch Wound Assay- Osteoblasten: Geranylgeranyl, Farnesol, Eugenol.

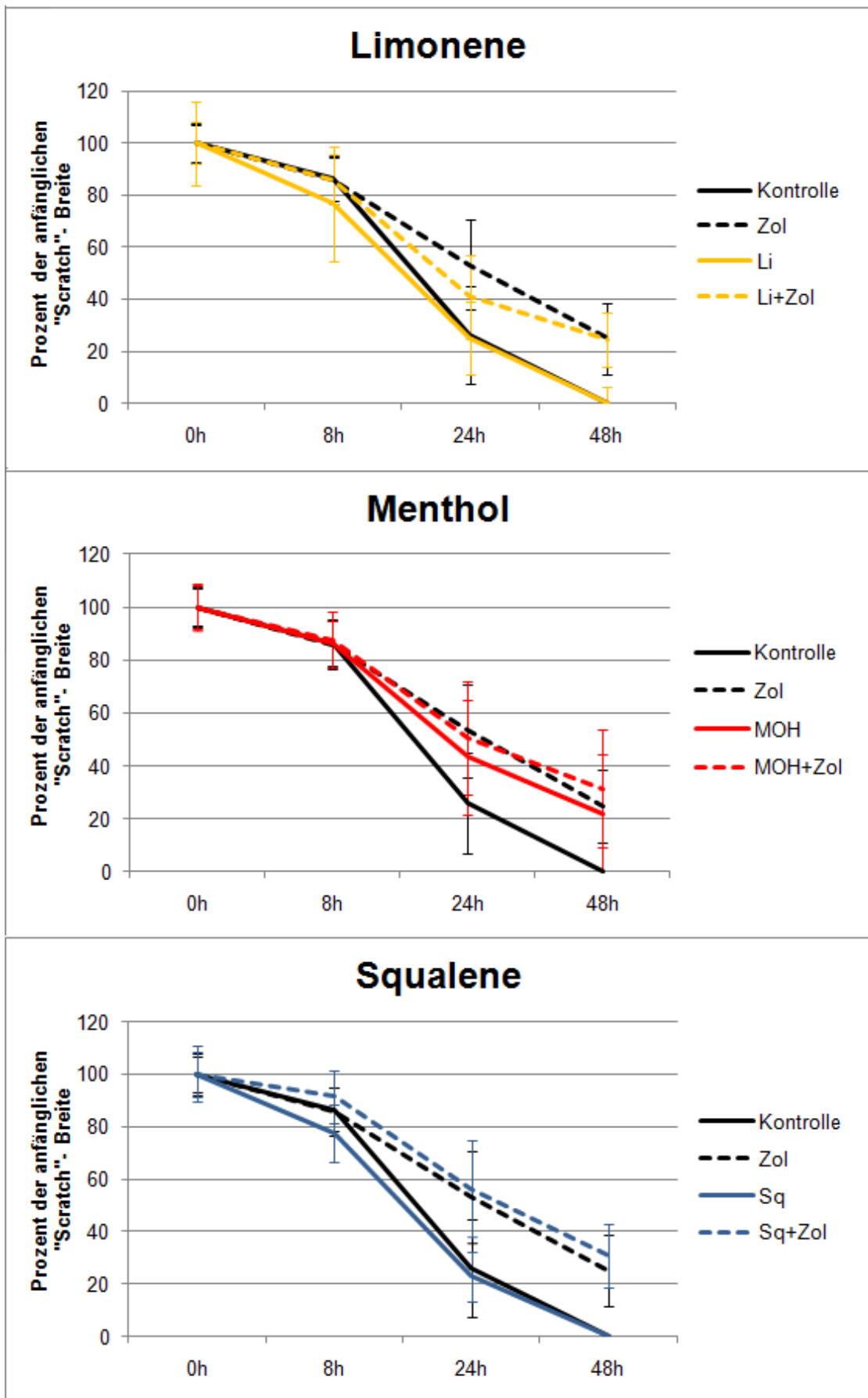


Abbildung 4.17 Scratch Wound Assay- Osteoblasten: Limonene, Menthol, Squalene.

#### 4.2.1.3 Phalloidin-Färbung

Durch die Phalloidin-Färbung konnte die für die jeweilige Zellart charakteristische Morphologie des Cytoskeletts dargestellt werden. Zoledronat schädigte die Zellorganisation sowohl von gingivalen Fibroblasten als auch die von HUVEC und Osteoblasten in erheblichem Maße. Ebenso kam es zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. Aufgrund der stark verminderten Zelldichte, ließen sich nur noch wenige Kontaktpunkte zwischen den einzelnen Zellen erkennen.

Das Erscheinungsbild der sonst langgestreckten gingivalen Fibroblasten veränderte sich unter Zoledronat-Einfluss markant. Die Zellen waren wesentlich kleiner und kantiger und wiesen nur noch wenige cytoplasmatische Fortsätze auf (Abbildung 4.18). Auch die Zellarchitektur der HUVEC und Osteoblasten zeigte sich stark atrophiert. Bei zahlreichen Zellen erschien das Zytoplasma wie um den Zellkern „gespannt“ und die Ausläufer strahlten wie feinste Härchen von diesem ab (Abbildung 4.19 und Abbildung 4.20).

Bei allen drei Zelllinien gelang es ausnahmslos GGOH die durch Zoledronat geschädigte Architektur des Aktinskeletts wiederherzustellen. Die anderen getesteten Isoprenoide zeigten keinen protektiven Effekt, führten jedoch auch nicht zu einer Beeinträchtigung, wenn man die Zellen mit ihnen allein behandelte.

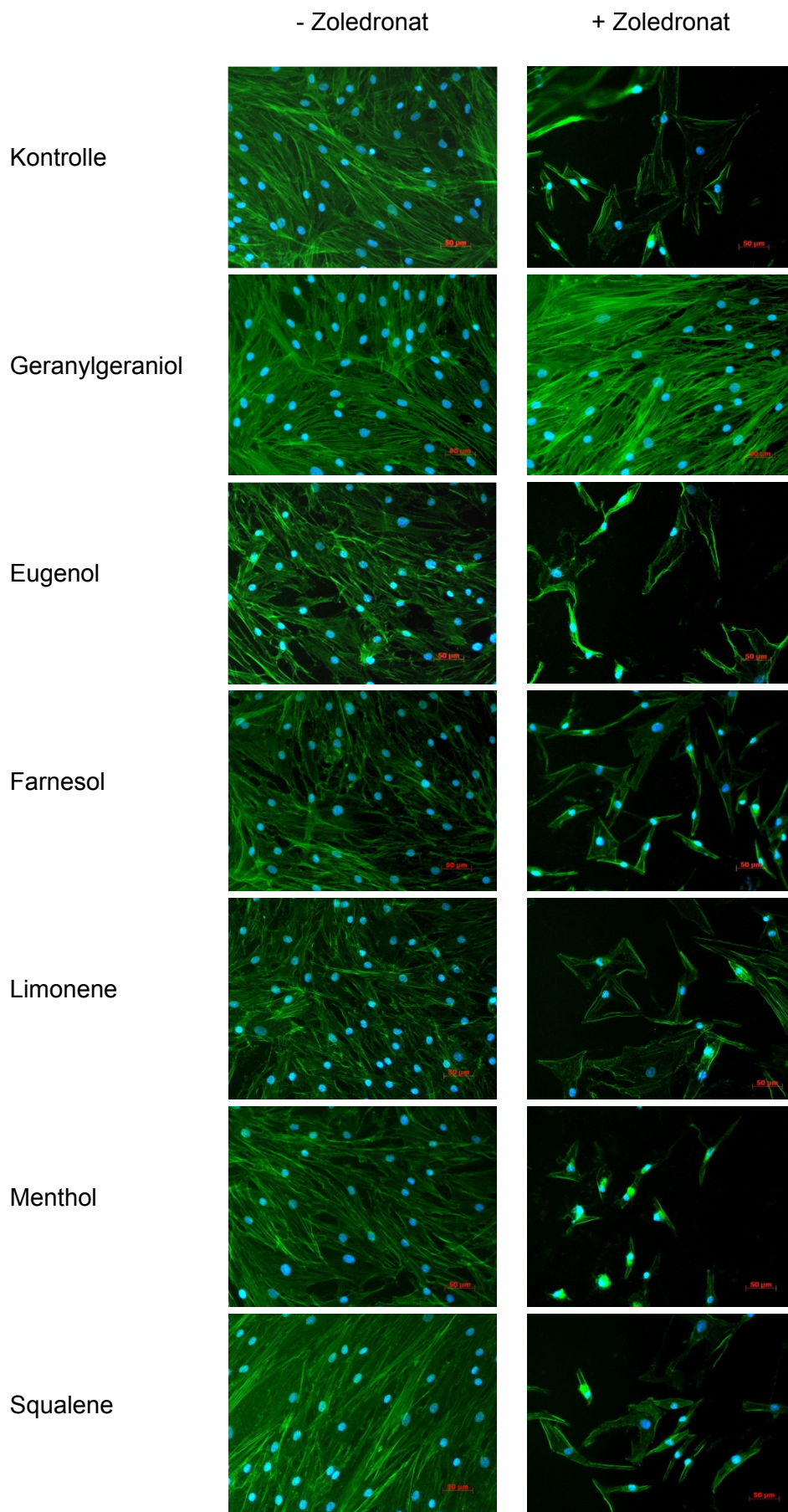


Abbildung 4.18 Zellarchitektur von Fibroblasten nach Phalloidin/Bisbenzimid-Färbung.



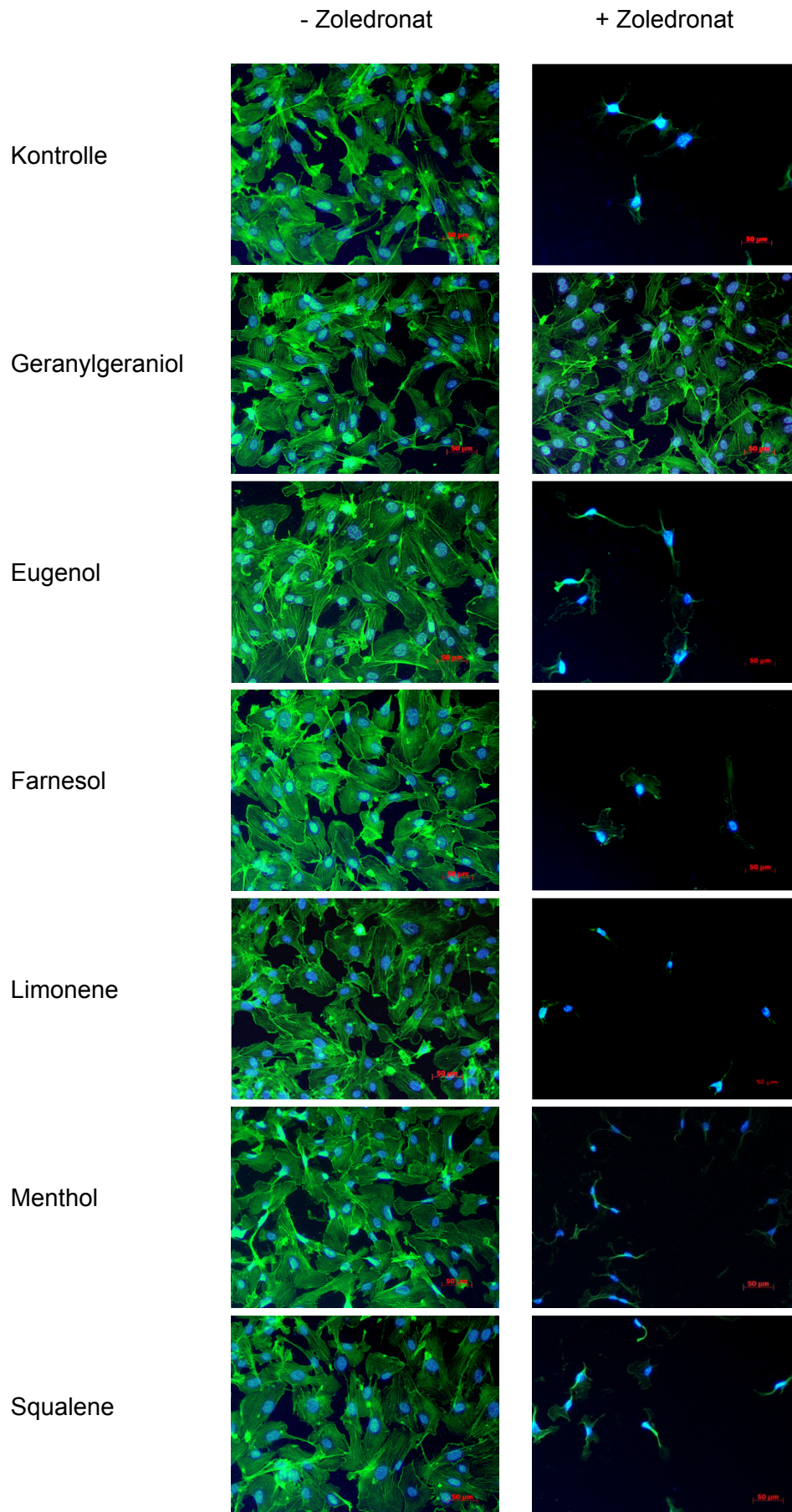


Abbildung 4.19 Zellarchitektur von HUVEC nach Phalloidin/ Bisbenzimid-Färbung.

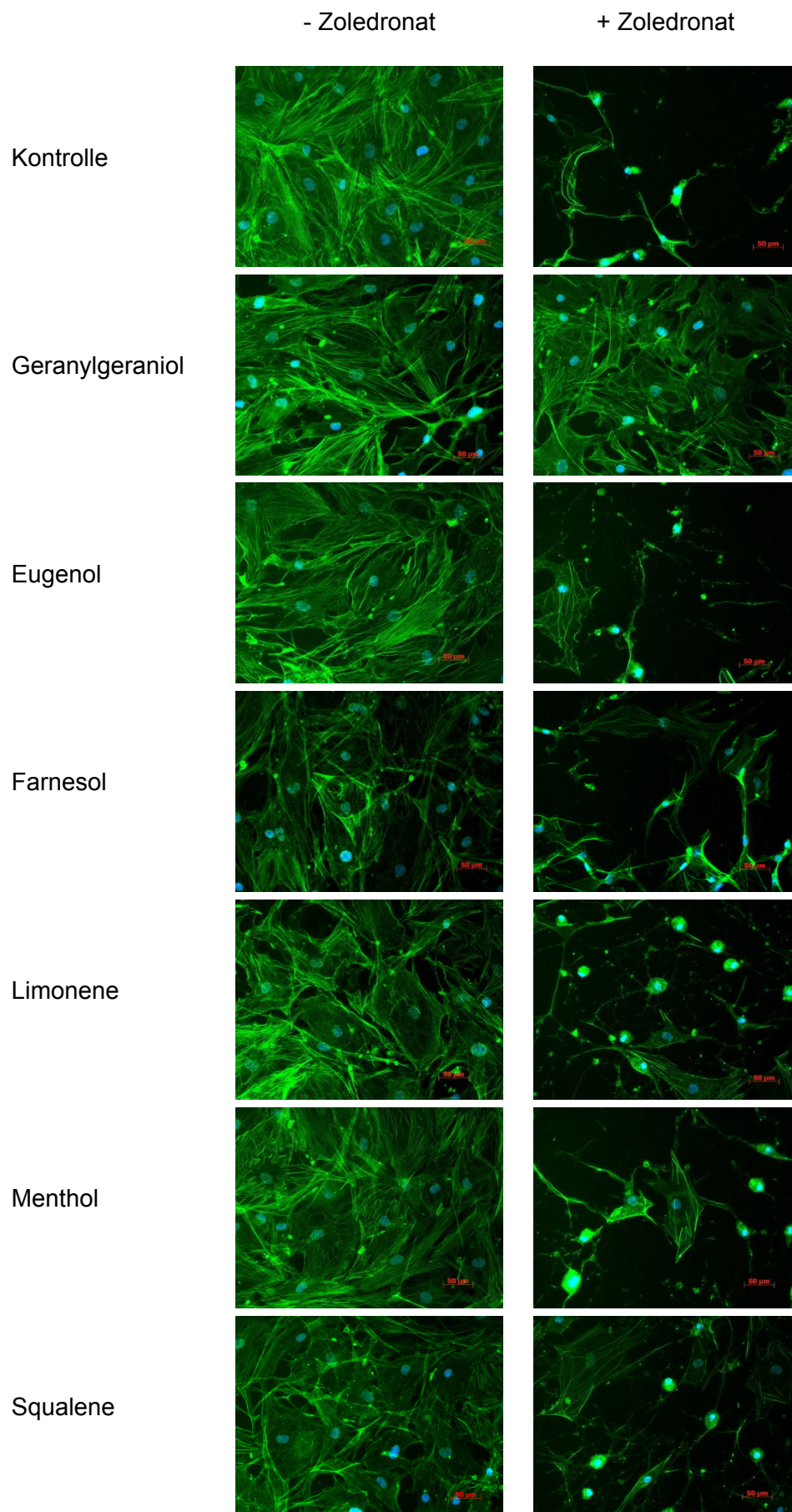


Abbildung 4.20 Zellarchitektur von Osteoblasten nach Phalloidin/ Bisbenzimid-Färbung.

## 4.2.2 Clodronat-Einfluss auf die Zoledronat-Wirkung

### 4.2.2.1 MTT Assay

#### 4.2.2.1.1 Fibroblasten

Eine signifikante Reduktion der Zellvitalität konnte ab einer Konzentration von 50µM Zoledronat nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Während 50µM des stickstoffhaltigen Bisphosphonats die Vitalität auf 44,08% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle senkte, bewirkten 100µM eine Reduktion auf 19,93%. Das stickstofffreie Bisphosphonat Clodronat zeigte hingegen in den gewählten Konzentrationen von 100µM und 1000µM keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der gingivalen Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle. Wurden die Zellen parallel mit 5µM Zoledronat und 100µM Clodronat behandelt, fiel die Vitalität auf 71,23%, ein signifikanter Unterschied zur Einzelbehandlung mit Zoledronat ( $p < 0,001$ ), der in der Kombination mit 1000µM Clodronat nicht mehr zu beobachten war.

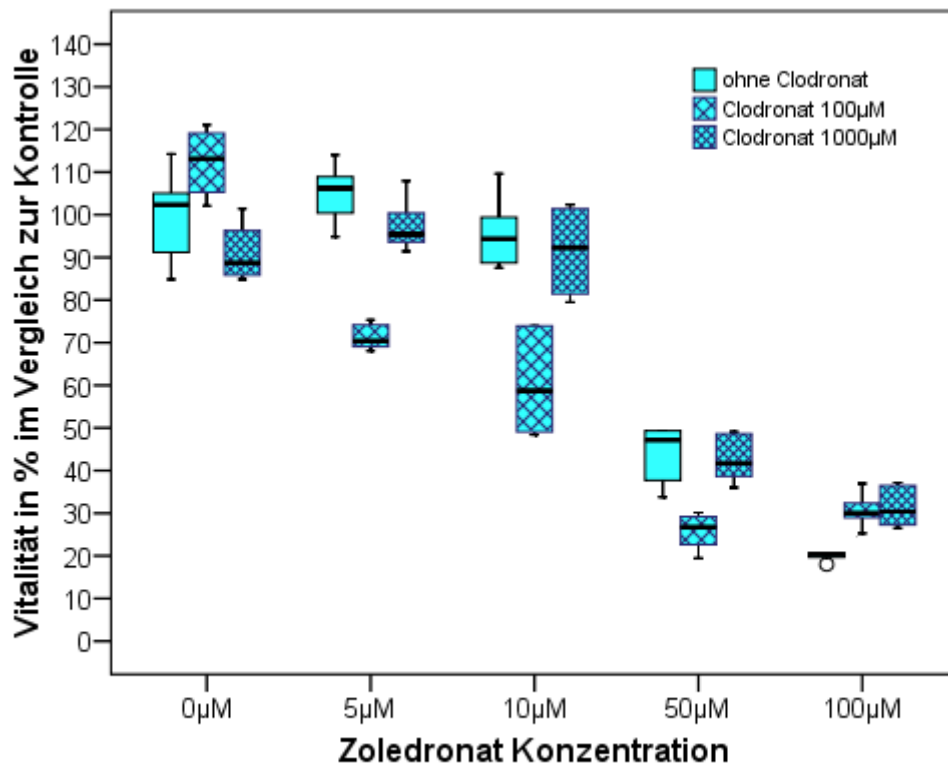


Abbildung 4.21 MTT Assay Fibroblasten.

Ein ähnlicher Effekt zeigte sich, wenn die Zellen außer mit 10µM Zoledronat parallel mit 100µM Clodronat inkubiert wurden (Vitalitätsabfall von 95,66% auf 60,45%,  $p < 0,001$ ). Die Kombination mit 1000µM Clodronat beeinflusste die mit 10µM Zoledronat behandelten Zellen nicht. Der negative Effekt, den 50µM Zoledronat verursachten, konnte durch Zugabe von 100µM Clodronat signifikant verstärkt werden (44,08% → 25,81%,  $p = 0,003$ ), wohingegen jedoch die Kombination mit 1000µM Clodronat das Vitalitätsniveau der Einzelinkubation mit Zoledronat hielt. Im Falle der höchsten getesteten Konzentration des N-BP (100µM) zeigte die Koinkubation mit Clodronat keinen Effekt.

#### 4.2.2.1.2 HUVEC

Während es bei einer 5µM Zoledronat-Konzentration zu einem Anstieg der Zellvitalität um 24,23 % ( $p = 0,001$ ) kam und 10µM keinen Effekt im Vergleich zur Kontrolle zeigten, bewirkten 50µM eine Reduktion auf 50,84% und 100µM einen Abfall der HUVEC-Vitalität auf 43,42% (bei beiden  $p < 0,001$ ).

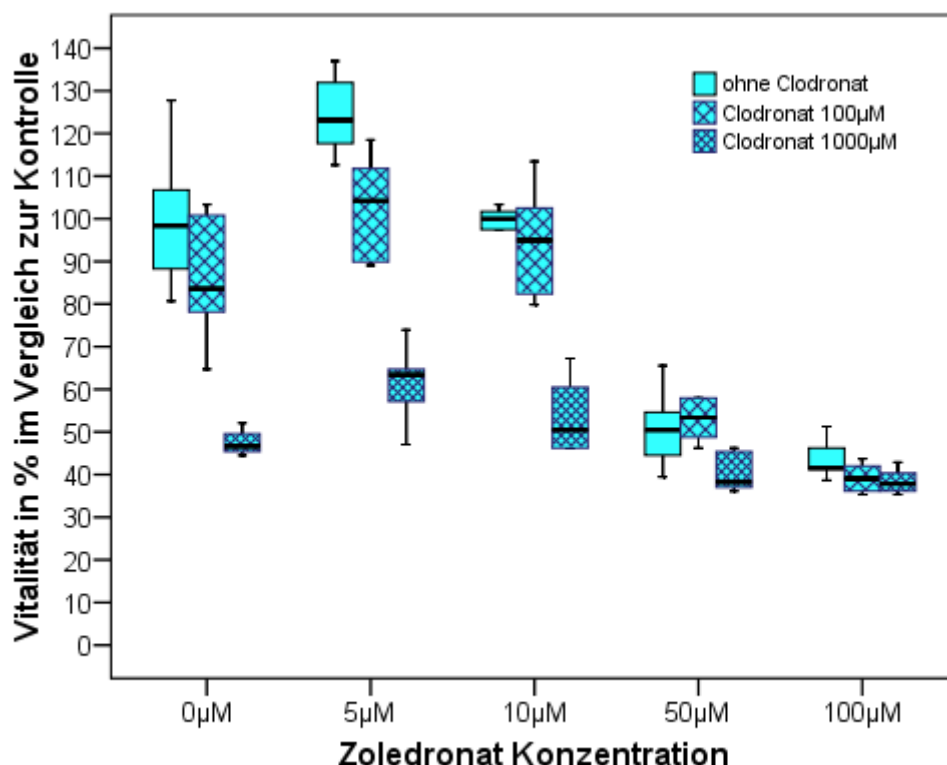


Abbildung 4.22 MTT Assay HUVEC.

Die Einzelbehandlung mit 100µM Clodronat hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Diese wurden im Gegensatz dazu durch 1000µM des stickstofffreien Bisphosphonats auf 47,48% ( $p < 0,001$ ) reduziert. Die Kombination von 5µM Zoledronat und 100µM Clodronat führte zu einer Verringerung der Vitalität, verglichen mit der Einzelinkubation der stickstoffhaltigen Substanz, von 124,23% auf 102,94% ( $p = 0,008$ ). Hiermit war kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle gegeben. Die Kombination mit 1000µM ließ den Zellstoffwechsel auf 61,62% abfallen ( $p < 0,001$ ). 10µM Zoledronat zeigten auch zusammen mit 100µM Clodronat keine Veränderung zur Kontrolle, hingegen kam es durch die Zugabe von 1000µM zu einer Reduktion der Viabilität auf 53,50% ( $p < 0,001$ ). Wurde die 50µM Zoledronat-Inkubation mit 100µM Clodronat beziehungsweise 1000µM Clodronat kombiniert, kam es in keinem der beiden Fälle zu einer signifikanten Veränderung verglichen zur Einzelbehandlung mit dem N-BP. Ebenfalls keinen Einfluss hatte die Zugabe der beiden Clodronat Konzentrationen zu 100µM Zoledronat.

#### 4.2.2.1.3 Osteoblasten

Ab einer Konzentration von 50µM Zoledronat kam es zu einer signifikanten Reduktion der Osteoblasten-Viabilität ( $p < 0,001$ ). Diese fiel bei einer Zugabe von 50µM des stickstoffhaltigen Bisphosphonats auf 70,10% und bei 100µM auf 56,12% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Während 100µM Clodronat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität hatte, wurde diese durch 1000µM auf 74,82% gesenkt ( $p = 0,001$ ). Während die Kombination von 5µM Zoledronat mit 100µM Clodronat keinen Unterschied zur Einzelbehandlung mit dem stickstoffhaltigen Agens aufwies, zeigte die Kombination mit 1000µM Clodronat eine statistisch signifikante Viabilitätserniedrigung von 92,70% auf 65,49% ( $p < 0,001$ ). Auch im Falle einer Zoledronat-Konzentration von 10µM zeigte erst die Kombination mit 1000µM des stickstofffreien Bisphosphonats einen signifikanten Unterschied zur Einzelbehandlung mit der stickstoffhaltigen Substanz. Es kam zu einem Abfall der osteoblastären Viabilität von 84,26% auf 62,64% ( $p = 0,010$ ). Die Kombination mit Clodronat zeigte in keiner der getesteten Konzentrationen einen signifikanten Unterschied zur Einzelbehandlung mit 50µM sowie mit 100µM Zoledronat.

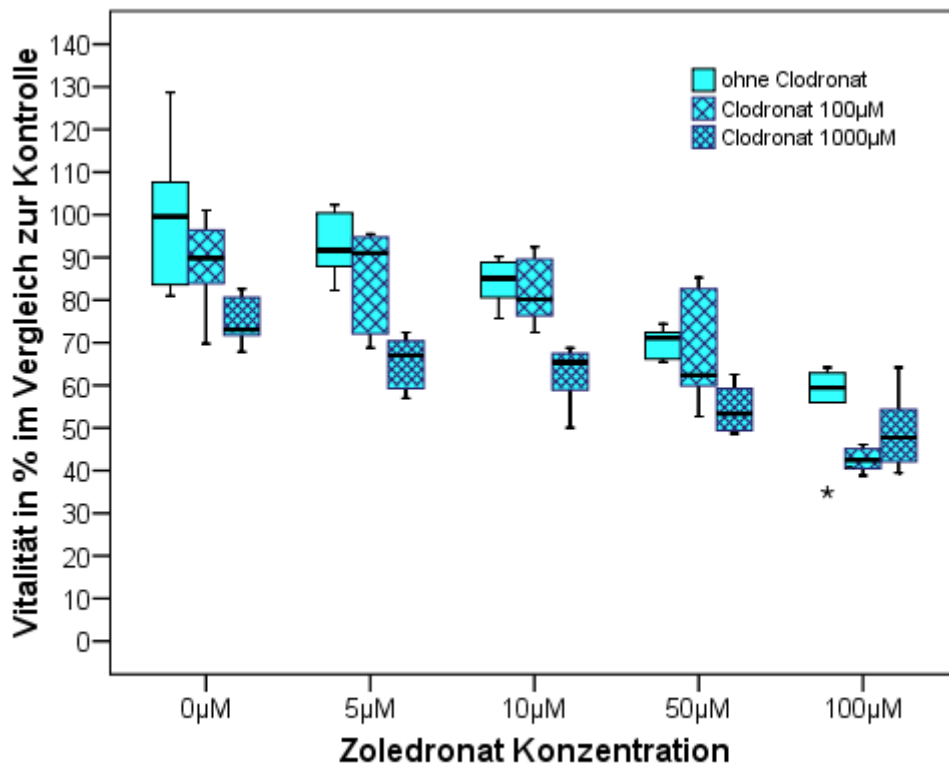


Abbildung 4.23 MTT Assay Osteoblasten.

#### 4.2.2.1.4 Keratinozyten

5µM Zoledronat bewirkten einen Anstieg der Zellviabilität der Keratinozyten von 100% auf 111,39% ( $p=0,005$ ). 10µM beeinflussten die Zellen nicht signifikant, hingegen führte die Inkubation mit 50µM zu einer Reduktion der zellulären Stoffwechselaktivität auf 35,96% und mit 100µM auf 26,09% (beide  $p<0,001$ ). Signifikant geschädigt wurden die Keratinozyten auch durch Clodronat in den getesteten Konzentrationen. 100µM Clodronat bewirkten einen Abfall auf 82,48% und 1000µM senkten die Vitalität auf 67,74% (beide  $p<0,001$ ). Die Kombinationsbehandlung aus 5µM Zoledronat und 100µM Clodronat senkte die Viabilität von 111,39% der Einzelbehandlung mit dem N-BP auf 83,24%, wurde parallel mit 1000µM Clodronat inkubiert fiel der Wert auf 62,81% (beide  $p<,001$ ). Eine weitere Viabilitätsreduktion durch die Wirkstoffkombination erfolgte auch im Falle der Behandlung mit 10µM Zoledronat. 100µM Clodronat reduzierten die Zellaktivität der Einzelinkubation mit Zoledronat von 94,63% auf 69,99%, 1000µM reduzierten diese auf 52,18% (beide  $p<0,001$ ). Die durch 50µM verursachte Einschränkung der

Keratinocyten-Viabilität konnte hingegen durch Zugabe von 100µM Clodronat signifikant verbessert werden (von 35,96% auf 46,48%,  $p=0,013$ ). Dieser positive Effekt konnte jedoch bei einer Clodronat-Konzentration von 1000µM nicht mehr gezeigt werden. Die Stoffwechselaktivität der Zellen stieg ebenfalls mit einer statistischen Tendenz, wenn 100µM Zoledronat mit 100µM Clodronat kombiniert wurden von 26,09% auf 35,16% ( $p=0,066$ ). Auch in diesem Fall war kein Unterschied zur Einzelbehandlung mit dem N-BP mehr zu erkennen, wenn die Kombination mit 1000µM Clodronat erfolgte.

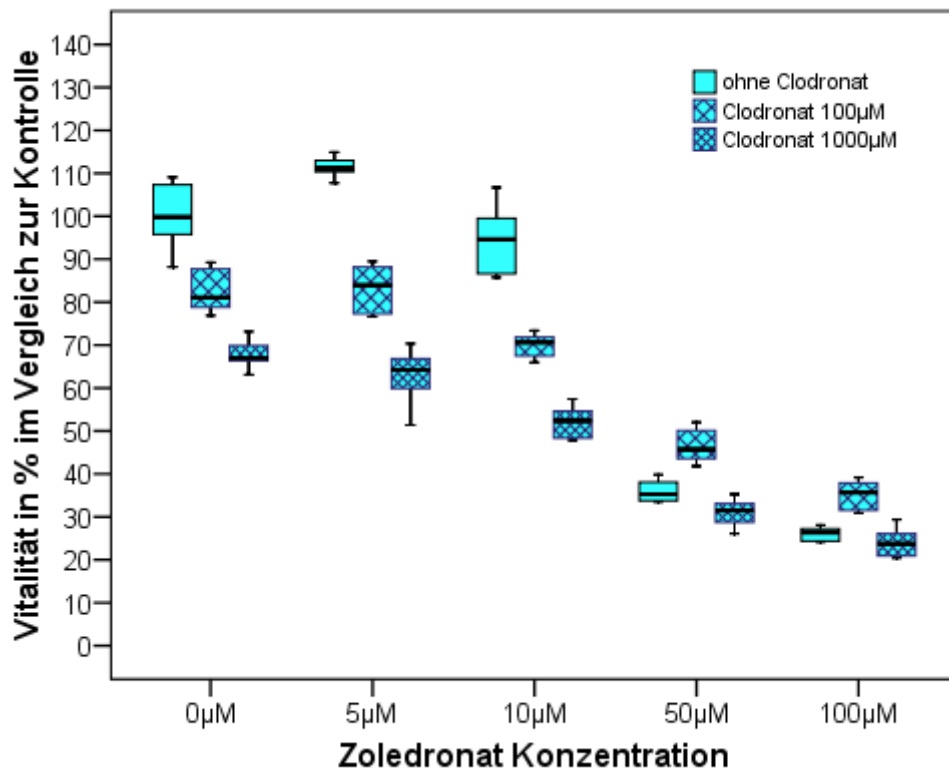
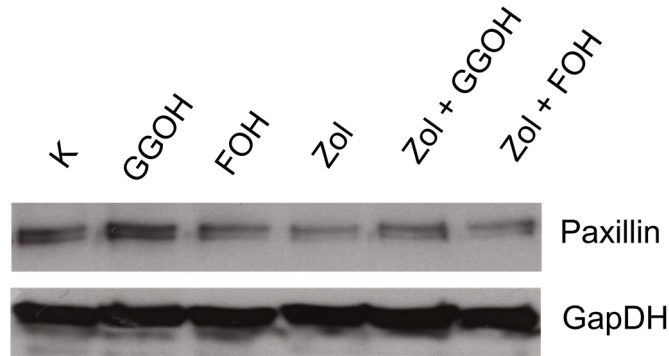


Abbildung 4.24 MTT Assay Keratinozyten.

## 4.3 Untersuchungen auf Proteinebene

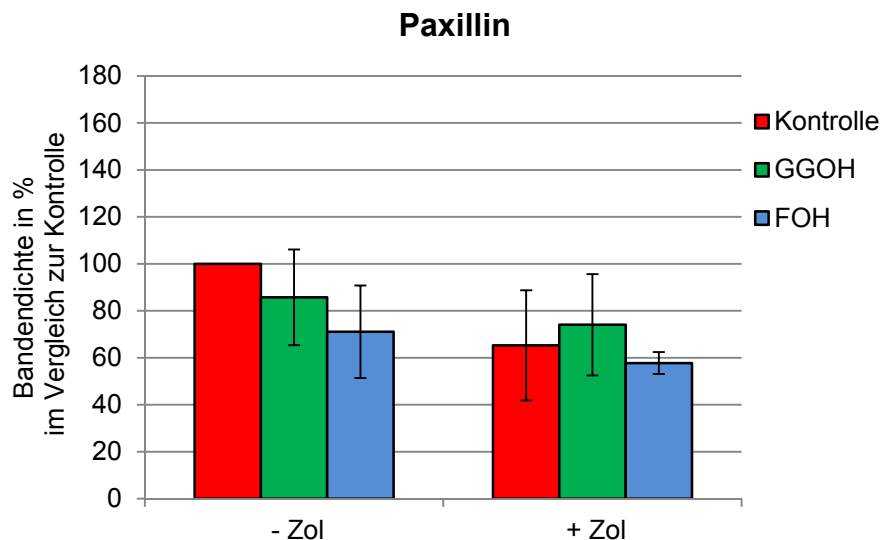
### 4.3.1 Zoledronat-Einfluss (mit und ohne GGOH bzw. FOH) auf die Proteine Paxillin, FAK, deren phosphorylierte Formen Paxillin (Tyr118) und FAK (Tyr925) sowie auf die GTPasen RhoA und RhoB gingivaler Fibroblasten

#### 4.3.1.1 Paxillin



**Abbildung 4.25** Western Blot auf Paxillin (65kDa).

Die Dichte der einzelnen Banden signalisiert die jeweilige mittels Anti-Paxillin detektierte Proteinmenge aus dem Gesamtzelllysat gingivaler Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Als Ladekontrolle diente das mittels Anti-GapDH detektierte GapDH (37kDa).



**Abbildung 4.26** Dichte der densitometrisch ausgewerteten Paxillin-Banden.

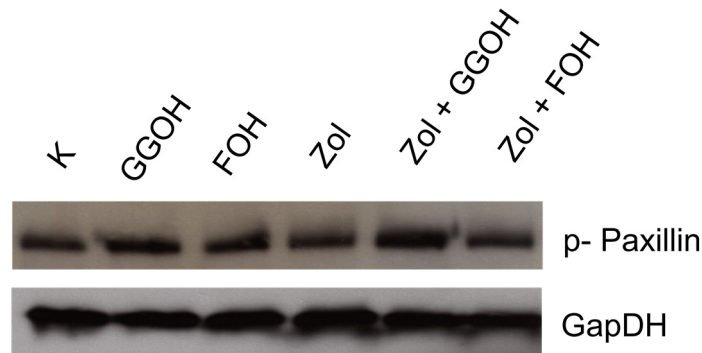
Die Dichte wurde mittels GapDH-Ladekontrolle normalisiert und ins Verhältnis gesetzt zur jeweiligen Paxillin-Kontroll-Bande.

Die Zoledronat-Inkubation bewirkte eine Reduktion der mittleren Intensität der Paxillin-Bande auf 65,3%. Diese wies jedoch, genau wie der durch die Kombinationsbehandlung mit GGOH bedingte leichte Intensitätsanstieg auf 74,07%,



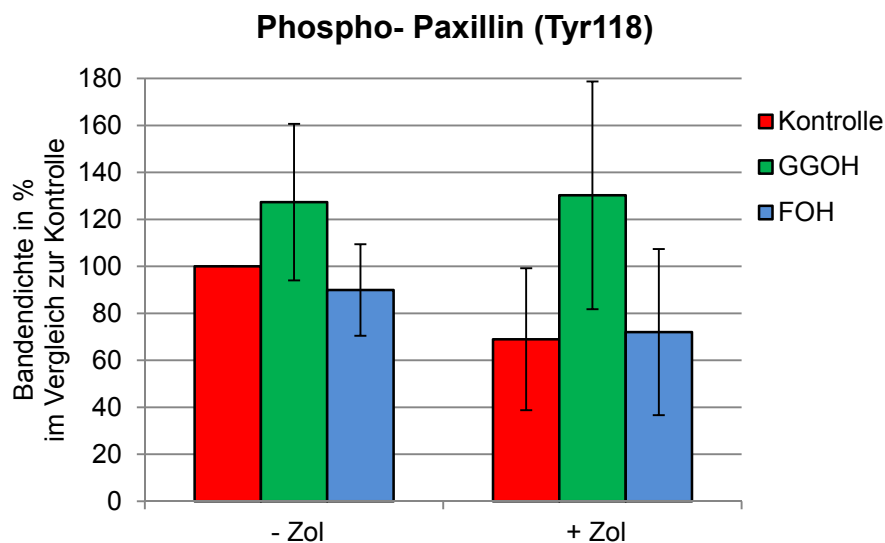
keine statistische Signifikanz auf. Die statistische Tendenz einer Reduktion der Paxillin-Expression im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich nur im Fall einer Kombinationsbehandlung aus Zoledronat und Farnesol (57,78,  $p=0,098$ ).

#### 4.3.1.2 Phospho-Paxillin (Tyr118)



**Abbildung 4.27 Western Blot auf Phospho-Paxillin (Tyr118) (65kDa).**

Die Dichte der einzelnen Banden signalisiert die jeweilige mittels Anti-Phospho-Paxillin (Tyr118) detektierte Proteinmenge aus dem Gesamtzelllysate gingivaler Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Als Ladekontrolle diente das mittels Anti-GapDH detektierte GapDH (37kDa).



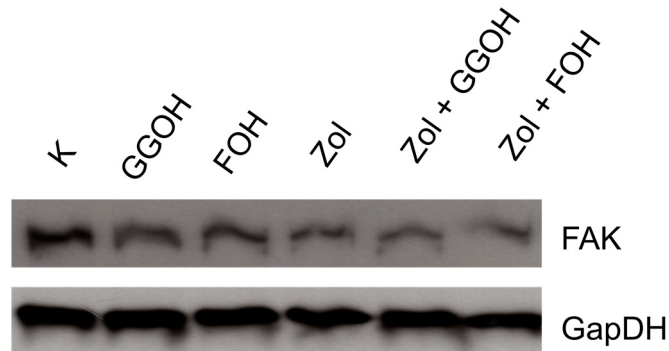
**Abbildung 4.28 Dichte der densitometrisch ausgewerteten Phospho-Paxillin (Tyr118)-Banden.**

Die Banden wurden normalisiert mittels GapDH-Ladekontrolle und ins Verhältnis gesetzt zur jeweiligen Phospho-Paxillin (Tyr118)-Kontroll-Bande.

Statistisch signifikante Unterschiede gingen ebenso nicht aus der Untersuchung des am Tyrosinrest 118 phosphorylierten Paxillins hervor. Hier waren dennoch sowohl der Anstieg der mittleren Bandenintensität durch GGOH alleine (127,32%) als auch

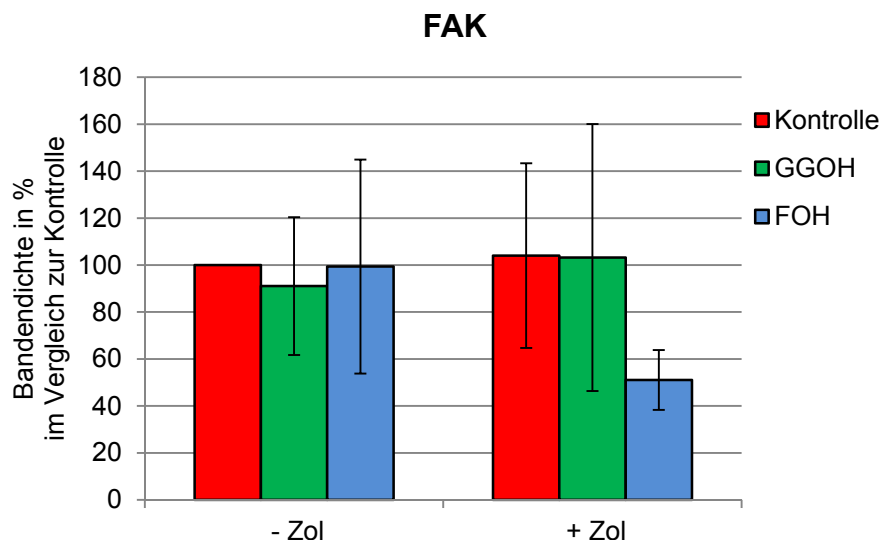
der Anstieg der, durch Zoledronat auf 68,95% geschwächten, mittleren Bandenintensität nach Kombinationsbehandlung mit GGOH auf 130,25% auffällig.

#### 4.3.1.3 FAK (Fokale Adhäsionskinase)



**Abbildung 4.29 Western Blot auf FAK (125kDa).**

Die Dichte der einzelnen Banden signalisiert die jeweilige mittels Anti-FAK detektierte Proteinmenge aus dem Gesamtzelllysat gingivaler Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Als Ladekontrolle diente das mittels Anti-GapDH detektierte GapDH (37kDa).



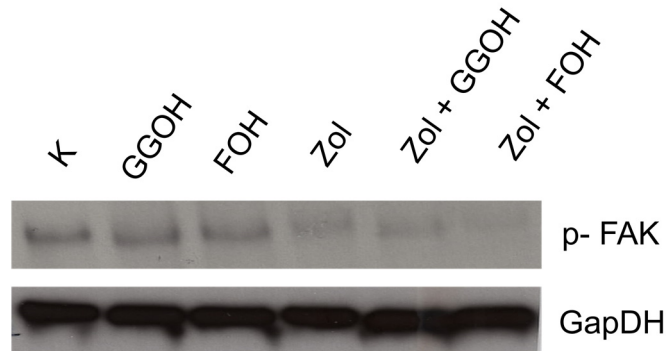
**Abbildung 4.30 Dichte der densitometrisch ausgewerteten FAK-Banden.**

Die Banden wurden normalisiert mittels GapDH-Ladekontrolle und ins Verhältnis gesetzt zur jeweiligen FAK-Kontroll-Bande.

Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der fibroblastären Expression der Tyrosinkinase FAK erkennen. Auffällig war ausschließlich die Reduktion der mittleren Bandenintensität im Falle einer aus

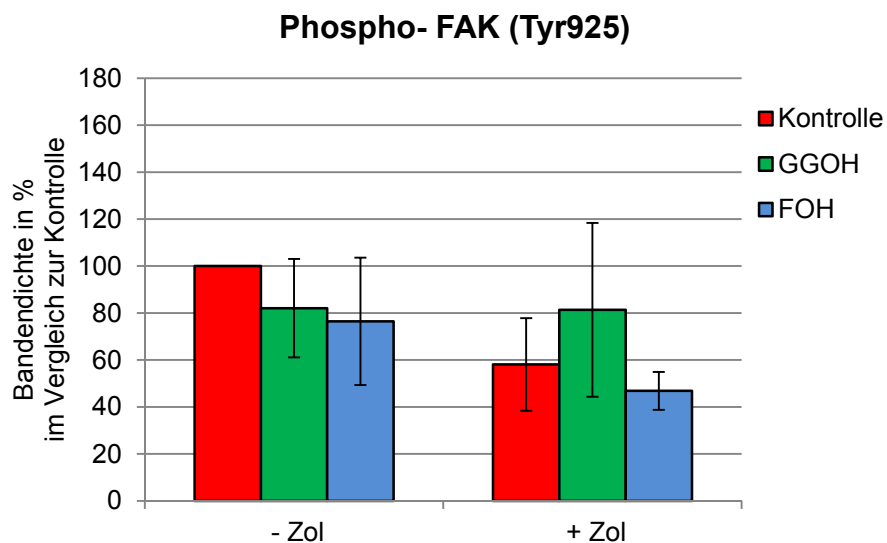
Zoledronat und Farnesol bestehenden Kombinationsbehandlung (51,09%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

#### 4.3.1.4 Phospho-FAK (Tyr925)



**Abbildung 4.31 Western Blot auf Phospho-FAK (Tyr925) (125kDa).**

Die Dichte der einzelnen Banden signalisiert die jeweilige mittels Anti-Phospho-FAK (Tyr925) detektierte Proteinmenge aus dem Gesamtzelllysat gingivaler Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Als Ladekontrolle diente das mittels Anti-GapDH detektierte GapDH (37kDa).



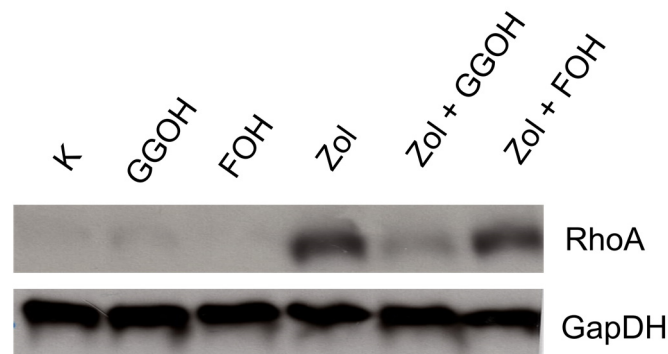
**Abbildung 4.32 Dichte der densitometrisch ausgewerteten Phospho-FAK (Tyr925)-Banden.**

Die Banden wurden normalisiert mittels GapDH-Ladekontrolle und ins Verhältnis gesetzt zur jeweiligen Phospho-FAK (Tyr925)-Kontroll-Bande.

Die Intensitätsunterschiede der Banden, die sich durch einen Antikörper detektieren ließen, der ausschließlich an Phospho-FAK (Tyr925) bindet, wiesen ebenfalls keine Signifikanzen auf. Im Falle des phosphorylierten Proteins gab es dennoch deutliche Abweichungen der mittleren Bandenintensitäten. Während die Intensitäten nach

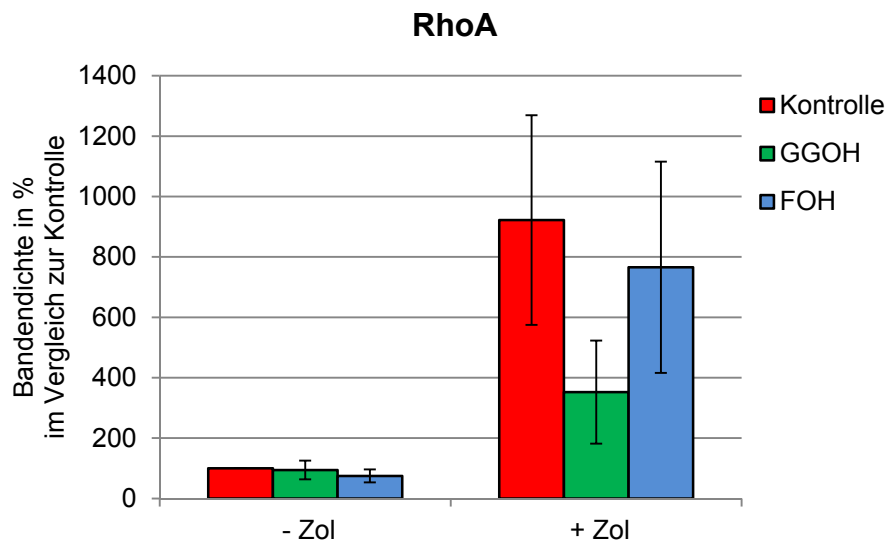
GGOH bzw. FOH Behandlung auf 82,08% bzw. 76,47% reduziert waren, bewirkte Zoledronat eine mittlere Schwächung auf 58,10%, die durch die Kombination mit GGOH auf 81,34% gemildert wurde. Die Kombination mit FOH zeigte hingegen eine Verstärkung des durch Zoledronat hervorgerufenen Effekts auf 46,85%.

#### 4.3.1.5 Die GTPase RhoA



**Abbildung 4.33 Western Blot auf RhoA (21kDa).**

Die Dichte der einzelnen Banden signalisiert die jeweilige mittels Anti-RhoA detektierte Proteinmenge aus dem Gesamtzelllysate gingivaler Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Als Ladekontrolle diente das mittels Anti-GapDH detektierte GapDH (37kDa).

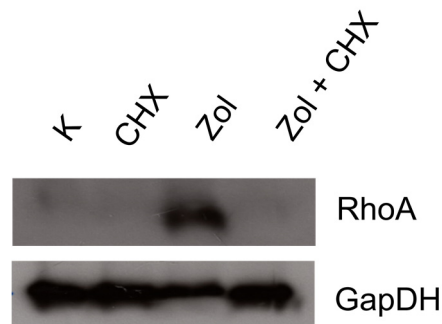


**Abbildung 4.34 Dichte der densitometrisch ausgewerteten RhoA-Banden.**

Die Banden wurden normalisiert mittels GapDH-Ladekontrolle und ins Verhältnis gesetzt zur jeweiligen RhoA-Kontroll-Bande.

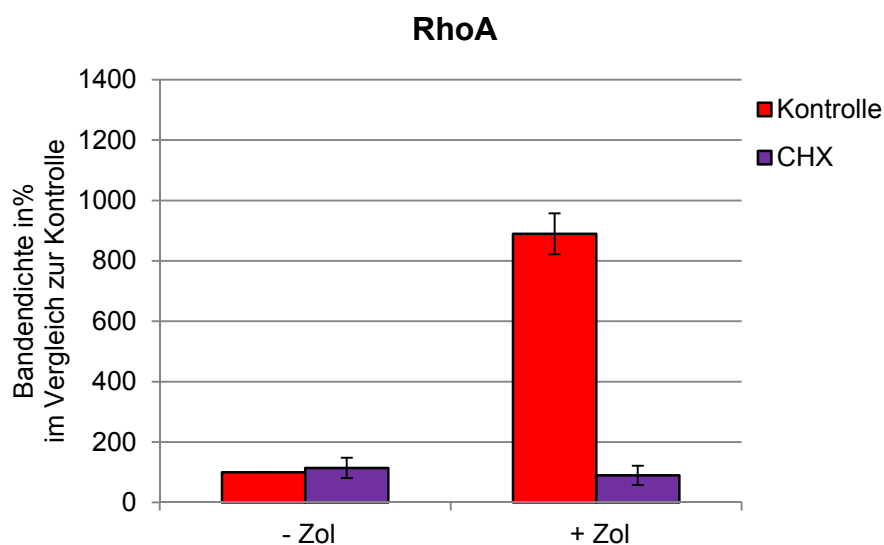
Während die zelluläre RhoA-Expression weder durch die Inkubation mit GGOH noch mit FOH beeinflusst wurde, bewirkte Zoledronat einen signifikanten Anstieg der Bandenintensität auf 922,04% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p=0,005$ ). Die Kombinationsbehandlung aus Zoledronat und GGOH ließ die Expression auf 352,33% sinken. Diese Reduktion besaß eine statistische Tendenz ( $p=0,058$ ). Dagegen bestand zwischen der aus dieser Kombinationsbehandlung resultierenden Intensität der RhoA-Bande und der der Kontrolle kein signifikanter Unterschied mehr. Im Gegensatz zu GGOH bewirkte die Kombination mit FOH keine signifikante Schwächung der durch Zoledronat intensivierten Bandendichte.

#### 4.3.1.5.1 Cycloheximid-Versuch



**Abbildung 4.35 Western Blot auf RhoA (21kDa) des Cycloheximid-Versuchs.**

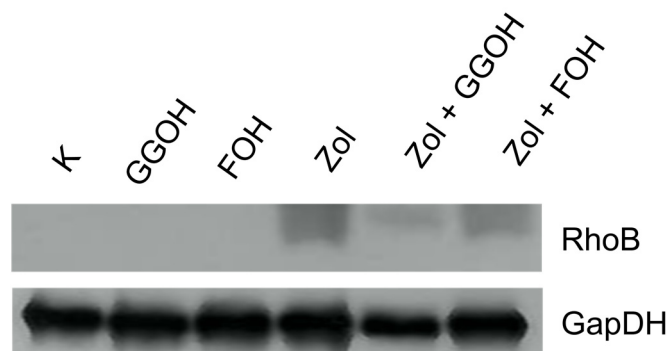
Die Dichte der einzelnen Banden signalisiert die jeweilige mittels Anti-RhoA detektierte Proteinmenge aus dem Gesamtzelllysat gingivaler Fibroblasten nach 24stündiger Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Als Ladekontrolle diente das mittels Anti-GapDH detektierte GapDH.



**Abbildung 4.36 Dichte der densitometrisch ausgewerteten RhoA-Banden des Cycloheximid-Versuchs.**

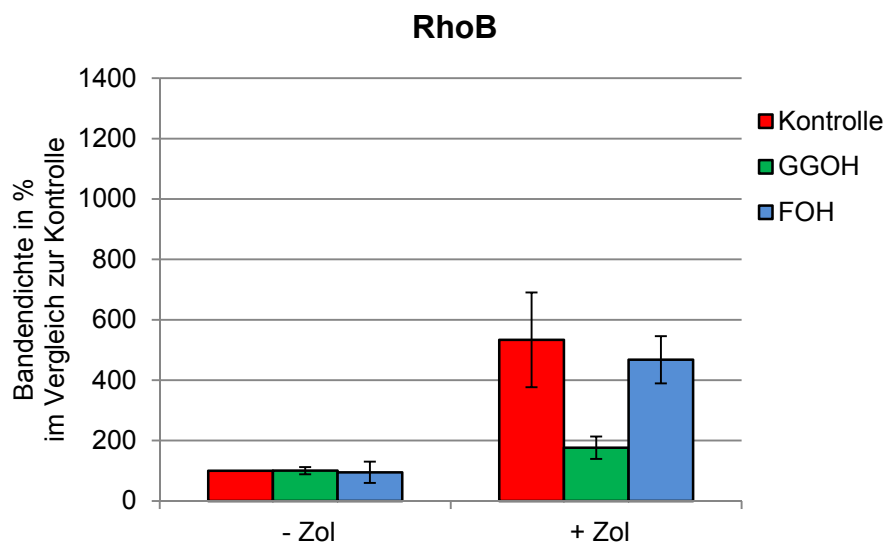
Während die Bandenintensität durch die 24-stündige Inkubation mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid (CHX) keine Veränderung erfuhr, bewirkte Zoledronat über den gleichen Zeitraum einen Expressionsanstieg RhoAs auf 889,62% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Die parallele Inkubation mit CHX reduzierte die durch Zoledronat induzierte RhoA-Expression signifikant ( $p < 0,001$ ), so dass mit einer Bandenintensität von 89,87% kein Unterschied mehr zur unbehandelten Kontrolle bestand.

#### 4.3.1.6 Die GTPase RhoB



**Abbildung 4.37 Western Blot auf RhoB (21kDa).**

Die Dichte der einzelnen Banden signalisiert die jeweilige mittels Anti-RhoB detektierte Proteinmenge aus dem Gesamtzelllysat gingivaler Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Als Ladekontrolle diente das mittels Anti-GapDH detektierte GapDH (37kDa).



**Abbildung 4.38 Dichte der densitometrisch ausgewerteten RhoB-Banden.**

Die Banden wurden normalisiert mittels GapDH-Ladekontrolle und ins Verhältnis gesetzt zur jeweiligen RhoB-Kontroll-Bande.

GGOH sowie FOH zeigten keinen Einfluss auf die Intensität der RhoB-Bande. Im Gegensatz dazu bewirkte Zoledronat einen statistisch signifikanten Anstieg der Proteinexpression auf 533,77% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p=0,001$ ). Die Abschwächung der Bandenintensität auf 176,42% infolge der Kombinationsbehandlung mit GGOH wies statistische Signifikanz auf ( $p=0,005$ ). Es bestand kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung aus Zoledronat und FOH bewirkte keine signifikante Reduktion des Intensitätsniveaus der RhoB-Bande, die durch alleinige Zoledronat-Inkubation sichtbar wurde.

#### 4.3.2 Zoledronat-Einfluss (mit und ohne GGOH bzw. FOH) auf aktives RhoA gingivaler Fibroblasten

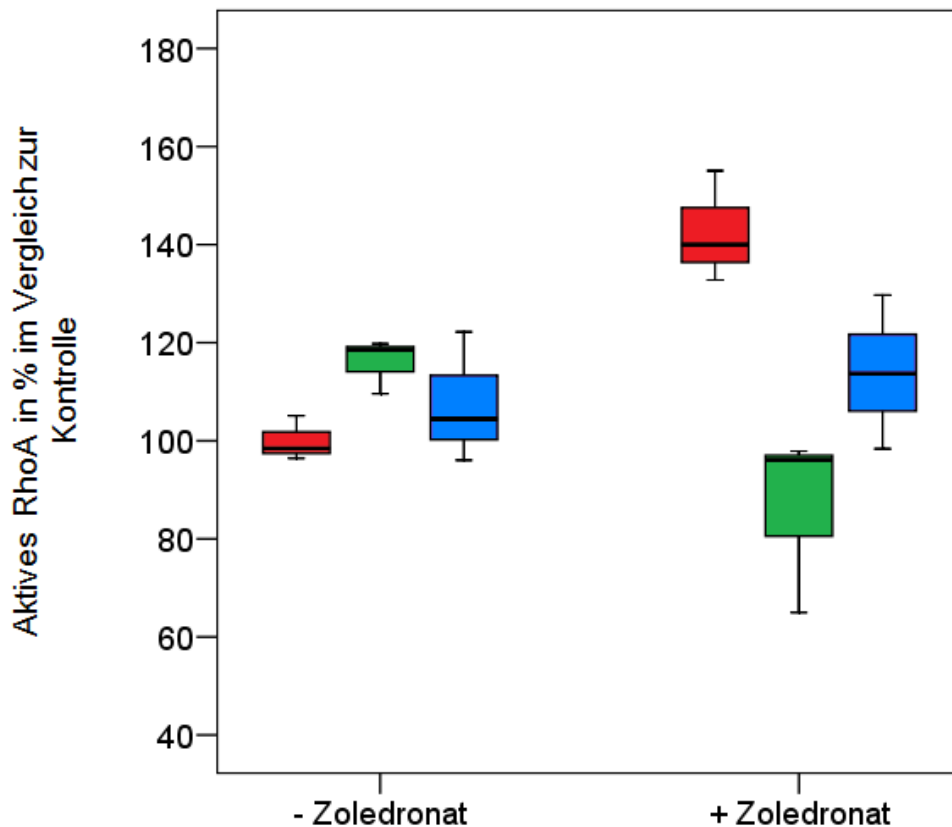


Abbildung 4.39 Aktives GTP-gebundenes RhoA.

Kontrolle (rot), GGOH (grün), FOH (blau).

Während weder die 72-stündige Inkubation mit 10 $\mu$ M GGOH noch die mit 10 $\mu$ M Farnesol einen signifikanten Einfluss auf die GTP-gebundene Form des

fibroblastären RhoAs ausübte, bewirkte die Inkubation mit 50µM Zoledronat einen signifikanten Anstieg ( $p= 0,013$ ) des aktiven Proteins um 42,16% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wurden die Zellen zusätzlich zur Bisphosphonat-Inkubation mit GGOH behandelt, sank der Anteil des GTP-gebundenen RhoAs auf Kontrollniveau. Der Unterschied zwischen der Zoledronat-Einzelbehandlung und der Kombination mit GGOH erwies sich als statistisch signifikant ( $p=0.002$ ). Dem gegenüber wies der Gehaltsunterschied an aktivem RhoA zwischen Bisphosphonat-Einzelbehandlung und der Kombinationsbehandlung mit Farnesol keine statistische Signifikanz auf.



## **5 Diskussion**

### **5.1 Chemotaxis, Phagozytose und oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten unter Bisphosphonat-Einfluss**

Neben den zahlreichen hemmenden Effekten der Bisphosphonate auf essentielle Funktionen verschiedenster Zellarten, scheinen entzündliche Prozesse an der Pathogenese der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose eine wichtige Rolle zu spielen (Lesclous et al., 2009). Maxilla (Oberkiefer) und Mandibular (Unterkiefer) sind die einzigen Knochen, die beispielsweise im Rahmen von Zahnextraktionen oder bei kieferchirurgischen Eingriffen in direktem Kontakt zur mikrobiell kontaminierten Umwelt stehen. Durch damit einhergehende Infektionen und lokale Entzündungsprozesse kommt es zur Erniedrigung des pH-Wertes im umliegenden Gewebe. Als Folge dieser lokalen Azidose können die im Knochen eingelagerten Bisphosphonate vermehrt protoniert werden. Hierdurch gehen die an Hydroxylapatit gebundenen Salze in ihre freie Säureform über und werden ins umliegende Gewebe freigesetzt. Als Konsequenz steigt die Bisphosphonat-Konzentration im knochennahen Gewebe (Otto et al., 2010), was wiederum zu einer Verstärkung der zellschädigenden Effekte führen kann. Hierin liegt möglicherweise, neben der vermehrten Bisphosphonat-Akkumulation, bedingt durch die hohe Remodelling-Rate im Alveolarknochen, eine weitere Ursache für die Exklusivität der Osteonekrose im Kiefer (Otto et al., 2010). Durch die bakterielle Kontamination mit den Folgen einer Infektion wird ein Teufelskreis in Gang gesetzt. Die Entzündung verursacht die pH-Wert Erniedrigung im Gewebe und als Konsequenz steigt die lokale Bisphosphonat-Konzentration. Dies wiederum kann neben einer vermehrten Gewebsschädigung zu verstärkten Immunreaktionen führen.

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurden in der vorliegenden Arbeit die Bisphosphonat-bedingten Veränderungen der granulozytären Immunantwort, welche eine wichtige Rolle im Rahmen der unspezifischen Abwehr spielt, untersucht. Anstelle isolierter Granulozyten fanden die Versuche unter Verwendung von Vollblut statt, um die Komplexität der im Blut ablaufenden Mechanismen wie Zell-Zell-Interaktionen und Wechselwirkungen mit nichtzellulären Blutbestandteilen zu berücksichtigen. Untersucht wurden die drei wichtigen Schritte der

Erregervernichtung durch neutrophile Granulozyten: Chemotaxis, Phagozytose und oxidativer Burst.

Die **Chemotaxis** beschreibt die zielgerichtete Anlockung der Zellen aus dem zirkulierenden Blut zum Ort der Entzündung. Chemokine dienen hierbei als Locksubstanzen, denen die Neutrophilen folgen. Dieser Prozess wurde durch eine modifizierte Boyden Kammer simuliert. Als Locksubstanz diente das Chemokin fMLP. Die Wanderung der Zellen durch die Poren der inneren in die äußere Kammer wurde durch die Locksubstanz deutlich angeregt. Sowohl Zoledronat als auch Ibandronat senkten die fMLP-vermittelte Migration signifikant. Den nächsten Schritt der granulozytären Abwehr beschreibt der Prozess der **Phagozytose**, bei dem die Erreger endozytotisch ins Zellinnere aufgenommen werden. Um die Erkennung der Erreger durch die Granulozyten zu erleichtern, wurden im Rahmen dieses Versuches ausschließlich die im Testkit enthaltenen opsonierten *E.coli*-Bakterien verwendet. Die Analyse unterschiedlicher Inkubationszeiten der verschiedenen Bisphosphonate zeigte eine maximale Veränderung der Phagozytoseaktivität nachdem die Substanzen 16h auf das Vollblut eingewirkt hatten. Zu diesem Zeitpunkt wiesen alle getesteten stickstoffhaltigen Substanzen einen leichten, dennoch signifikanten Anstieg des prozentualen Granulozytenanteils, der Bakterien endozytiert hatte, auf. Auch die konzentrationsbedingten Unterschiede stellten sich mit nur wenigen Prozent als relativ gering dar. N-BP bewirkten dennoch stets einen Anstieg, im Gegensatz zum stickstofffreien Clodronat. Wesentlich deutlicher war hingegen der immunmodulierende Effekt der N-BP bei der Analyse des fMLP-stimulierten **oxidativen Bursts**. Zoledronat trat hier deutlich als potenteste Substanz in den Vordergrund. Bereits eine Konzentration von 2,5µM führte zu einer knappen Verfünffachung der Granulozytenzahl, die reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS) bildete. Dieses Niveau ließ sich durch eine Konzentrationserhöhung nicht weiter steigern. Ibandronat und Pamidronat hingegen zeigten erst ab 25µM einen vergleichbar starken Effekt. Ab dieser Konzentration waren schließlich keine Unterschiede mehr zwischen den einzelnen N-BP zu erkennen. Diese Beobachtung lässt eine maximale Steigerung des Anteils oxidierender Granulozyten vermuten, die im Falle Zoledronats bereits in geringen Konzentrationen erreicht war. Neben dem prozentualen Anteil der Granulozyten, die reaktive Sauerstoffmetabolite bildeten, stieg auch der oxidative Burst pro Zelle (Enzym-Aktivität der NADPH-Oxidase) unter dem Einfluss der N-BP. Zoledronat erwies sich hier ebenfalls als potenteste

Substanz in geringer Konzentration (2,5µM). Die Burstaktivität pro Zelle erreichte jedoch nur etwa das Eineinhalbfache des Kontroll-Niveaus womit die N-BP-induzierte Steigerung der Enzymaktivität pro Zelle deutlich unter dem N-BP-induzierten Anstieg des prozentualen Anteils oxidierender Zellen lag. Erwähnenswert ist, dass die Wahl des Chemokins fMLP als schwaches Stimulans von großer Bedeutung für die Durchführung der Burst-Versuche war. Der Einsatz von *E.coli*-Bakterien in Vorversuchen führte dazu, dass sowohl im Kontrollansatz als auch bei den Testansätzen nahezu 100% (im Einklang mit den im Versuchsprotokoll angegebenen Erwartungswerten: 97-100%) der Zellen zur oxidativen Aktivität stimuliert wurden und damit auch kein Bisphosphonat-Effekt erkennbar war. FMLP stimulierte im Gegensatz dazu nur 1-10% (entspricht den im Versuchsprotokoll angegebenen Erwartungswerten) der Zellen. Diese schwache Stimulation ließ die Beobachtung des Burst-Anstiegs unter Bisphosphonat-Einfluss zu.

Die Tatsache, dass sich Clodronat in den durchgeführten Untersuchungen von den N-BP unterschied, indem es keinen Einfluss auf die getesteten Granulozytenfunktionen zeigte, korreliert mit der geringen bis fehlenden Assoziation zwischen der Einnahme stickstofffreier Bisphosphonate und dem Auftreten von Kiefernekrosen, die sich auf wenige Fallberichte beschränkt (Montazeri et al., 2007). Interessanterweise konnten im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen bezüglich der stickstoffhaltigen Substanzen zwei gegenteilige Effekte beobachtet werden. Einerseits wurde die Rekrutierung der Neutrophilen (im Falle von Ibandronat und Zoledronat) verringert, andererseits wurden die Fähigkeit zur Erregeraufnahme leicht und die zur intrazellulären Erregervernichtung durch oxidative Mechanismen sogar um ein Vielfaches gesteigert. Möglicherweise ist jedoch der hemmende Einfluss auf die Chemotaxis, im Falle der Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe des Kiefers, von untergeordneter Bedeutung, da die Schleimhaut hier reich an Granulozyten (Bosshardt and Lang, 2005) ist und unmittelbare Nähe zu den Bakterien der Mundflora besteht. Vor diesem Hintergrund könnte man spekulieren, dass die granulozytäre Immunantwort durch N-BP am Ort der Entzündung insgesamt eher gesteigert wird und dies zu der Entwicklung beziehungsweise zur Aufrechterhaltung der BP-ONJ beiträgt.

Der kontroverse Effekt auf unterschiedliche Funktionen der Neutrophilen lässt verschiedene komplexe Wirkmechanismen der Arzneistoffe vermuten. Der Angriffspunkt der N-BP im Mevalonatstoffwechsel ist die Farnesylpyrophosphat

(FPP) Synthese, die durch die Arzneistoffe gehemmt wird. Eine Verarmung an Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), das für die posttranslationale Modifikation zahlreicher GTPasen notwendig ist, wird meist als Ursache für die zellulären Effekte beschrieben (Oades et al., 2003; Virtanen et al., 2002; Walker and Olson, 2005). Die Folgen reichen vom Verlust essentieller Zellfunktionen bis hin zum programmierten Zelltod. Auf diesen hemmenden Effekten, die N-BP auf die verschiedensten Zellen ausüben, basieren die meisten Theorien zur Pathogenese der BP-ONJ. Hierzu gehören die negative Beeinflussung des Bone remodellings, die antiangiogenetische Wirkung sowie die Störung der Wundheilung. Daneben sind auch hemmende Effekte auf Zellen des Immunsystems bekannt. Ein Beispiel ist die Apoptose-induzierende Wirkung auf Makrophagen-ähnliche Zellen der Linie J774 (Rogers et al., 1996). Des Weiteren gibt es eine Untersuchung an Neutrophilen der Maus, die einen negativen Einfluss der stickstoffhaltigen Verbindungen sowohl auf die Chemotaxis als auch auf den oxidativen Burst beschreibt (Kuiper et al., 2012). Die Erklärung für die Abweichungen der Burst-Ergebnisse dieser Studie von denen der hier vorliegenden Arbeit, könnte in der Tatsache begründet sein, dass neutrophile Granulozyten unterschiedlicher Spezies getestet wurden. Es gibt signifikante Unterschiede zwischen murinen und humanen Neutrophilen (Coughlan et al., 2012). Interessant ist, dass einer dieser Unterschiede im PI 3-K (Phosphoinositid 3-Kinase) System liegt. Hierbei handelt es sich um einen Signalweg, der eine wichtige Rolle bei der Regulation des respiratorischen Bursts spielt. Anders als bei murinen Neutrophilen scheinen in den humanen Zellen Klasse 1A und 1B Kinasen bei der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt zu sein. Man hat festgestellt, dass humane Neutrophile (vorbehandelt mit TNF- $\alpha$ ) fMLP-stimuliert deutlich mehr ROS produzieren als die entsprechenden Zellen von Mäusen unter gleichen Bedingungen (Condliffe et al., 2005). Des Weiteren besteht die Möglichkeit dass 100 $\mu$ M Bisphosphonat, die in der Studie von Kuiper et al. eingesetzt wurden, zytotoxisch auf die Granulozyten wirken und die Bildung oxidativer Metabolite auf diese Weise negativ beeinflusst wird. Kuipers Untersuchung an murinen Neutrophilen zur Chemotaxis bekräftigen dagegen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Bisphosphonat-induzierten Abschwächung der Chemotaxis und einer Verminderung des zellulären Spiegels der aktiven RhoA-GTPase, ein für die neutrophile Migration bedeutendes G-Protein, beschrieben (Kuiper et al., 2012).

Neben diesen destruktiven Effekten der N-BP auf Zellen des Immunsystems, gibt es zahlreiche Studien, die stimulierende Einflüsse auf die Mechanismen der Abwehr belegen. So ist die intravenöse Applikation der stickstoffhaltigen Vertreter der Arzneistoffgruppe mit dem Auftreten von Akute-Phase-Reaktionen mit grippeähnlichen Symptomen assoziiert. Hierbei kommt es zur Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen, einem T-Lymphozyten Subtyp, der bei der Erregerabwehr eine wichtige Rolle spielt (Lesclous et al., 2009; Yao et al., 2010). In Kulturen peripher mononuklearer Zellen (*peripher blood mononuclear cells*= PBMC) konnte ein signifikanter Anstieg der besagten T-Lymphozyten nach Inkubation mit N-BP nachgewiesen werden (Kunzmann et al., 2000). Als Ursache für diesen Effekt gilt die zelluläre Anreicherung von Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) sowie dessen Stereoisomer Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP), beides Intermediate des Mevalonatweges. Hierbei handelt es sich um die Substrate der Farnesylpyrophosphat Synthase, des molekularen Angriffspunktes der N-BP. Die Akkumulation von IPP und DMAPP stellen somit eine Konsequenz der Hemmung dieses Enzyms dar (Gober et al., 2003; Hewitt et al., 2005; Thompson and Rogers, 2004; Thompson et al., 2006). Dieser Zusammenhang zwischen den Wirkstoffen und der T-Zell-Aktivierung wird zusätzlich durch die Tatsache bestärkt, dass Statine, die durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase die Akkumulation von IPP und DMAPP verhindern, auch den N-BP-induzierten Anstieg der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen hemmen (Thompson and Rogers, 2004). Die Aktivierung dieser T-Zellen erfolgt über die Erkennung kleiner Pyrophosphate (sogenannter Phosphoantigene), die normalerweise bakteriellen oder parasitären Ursprungs sind. Ebenso werden die Pyrophosphate IPP und DMAPP humanen Ursprungs erkannt und tragen somit zur V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zell-Stimulation bei (Kabelitz, 2008). Besonders mit N-BP behandelte PBMC scheinen die Aktivierung und Proliferation des T-Zell-Subtyps zu triggern. Erklärt wird dies durch deren ausgeprägte Fähigkeit zur Endozytose, wodurch eine große N-BP-Menge aufgenommen werden kann mit der Folge eines signifikanten intrazellulären IPP/DMAPP-Anstiegs. Zell-Zellkontakt-abhängige Mechanismen führen schließlich zur V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zell-Stimulation (Roelofs et al., 2009).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen eine verstärkte N-BP-induzierte Antwort neutrophiler Granulozyten bezüglich der Phagozytose und besonders des oxidativen Bursts. Um die Gegebenheiten im menschlichen Körper möglichst realistisch zu simulieren, fanden die Tests an Vollblut statt. Deshalb ist unklar, ob es

eine direkte Beeinflussung der Neutrophilen gibt oder ob andere Zellen an deren Stimulation beteiligt sind im Sinne eines „Bystander Mechanismus“. Über eine Beteiligung der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen lässt sich in diesem Zusammenhang spekulieren, da diese bekannterweise in der Lage sind Granulozyten zu aktivieren. Zunächst führt die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zell-Aktivierung zur Freisetzung zahlreicher inflammatorischer Zytokine und  $\beta$ -Chemokine (Cipriani et al., 2000; Garcia et al., 1997; Poccia et al., 2005). Dieses Zytokinmuster entspricht dem der durch N-BP induzierten Akute-Phase Reaktion (Dicuonzo et al., 2003; Thiebaud et al., 1997). Pico- bis nanomolare Konzentrationen an CC-Chemokinen (Agrati et al., 2009; Jan et al., 2006), die durch V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen freigesetzt werden, reichen bereits aus, um die Granulozyten-Aktivität zu stimulieren (Cipriani et al., 2000). Dies stellt eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Phagozytose- und Burstkapazität der Neutrophilen durch die N-BPs dar. Wahrscheinlich sind jedoch zahlreiche komplexe Mechanismen zwischen den einzelnen Blutbestandteilen beteiligt, die es noch zu erforschen gilt.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte eindeutig ein Einfluss der N-BP auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten festgestellt werden. Vor dem Hintergrund, dass die BP-ONJ mit dem Auftreten lokaler Entzündungsreaktionen assoziiert ist und die stickstoffhaltigen Vertreter der Arzneistoffgruppe wichtige Immunprozesse beeinflussen, scheint die orale Hygiene und lokale (in besonderen Fällen auch systemische) antibakterielle Behandlung für BP-ONJ-Patienten und Personen, die Bisphosphonate einnehmen, von besonderer Bedeutung. Auch wenn die Reihenfolge und Priorität der einzelnen pathologischen Ereignisse noch nicht geklärt sind, könnte durch diese Maßnahmen ein bestehender Teufelskreis zwischen einer sich entwickelnden Nekrose und einer Entzündungsreaktion, die möglicherweise als Triggerfaktor die Entwicklung und Aufrechterhaltung der BP-ONJ begünstigt, unterbrochen werden.

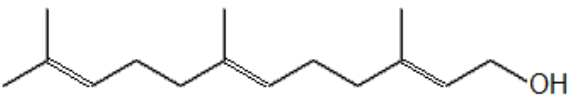
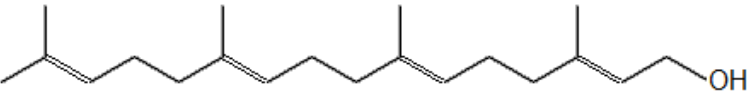

## **5.2 Einfluss verschiedener Isoprenoide auf Vitalität, Migration und Architektur von Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten**

Die Behandlung der BP-ONJ basiert sowohl auf konservativen Maßnahmen (siehe Abschnitt 1.1.3) als auch auf chirurgischen Interventionen. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es jedoch keine Möglichkeit die unerwünschte Arzneimittelwirkung kausal zu therapieren bzw. deren Entwicklung zu verhindern. Ein Grund dafür ist sicher, dass eine Vielzahl von Faktoren an der Entstehung beteiligt zu sein scheint und der zugrundeliegende Pathomechanismus noch immer nicht vollständig geklärt ist. Einen interessanten Ansatz stellt die Antagonisierung der N-BP-Wirkung durch externes Geranylgeraniol (GGOH) dar. Die meisten zellschädigenden Effekte der Bisphosphonate werden durch eine Minimierung der posttranslationalen Prenylierung kleiner G-Proteine infolge verminderter GGOH-Speicher erklärt. Der Erhalt essentieller Funktionen mit N-BP behandelter Zellen durch die Substitution GGOHs ist bereits nachgewiesen (Ziebart et al., 2011). Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene andere Isoprenoide untersucht, mit der Absicht weitere potentielle Substanzen zu finden, die die Bisphosphonatbedingte Blockade im Mevalonatstoffwechsel umgehen können.

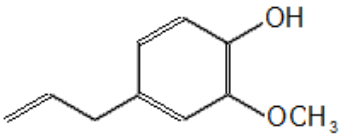
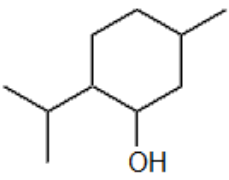
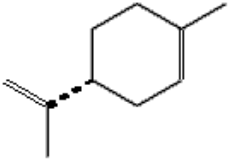
Neben dem Sesquiterpen Farnesol (FOH) und dem Triterpen Squalene (Sq), beides Intermediate des Mevalonatstoffwechsels (Tabelle 5.1) wurden weitere natürliche Isoprenoide mit Monoterpenstruktur untersucht (Tabelle 5.2) und mit dem Diterpen GGOH (Tabelle 5.1) verglichen.

Monoterpene sind als Hauptbestandteil ätherischer Öle fast überall im Pflanzenreich vertreten (Dolder et al., 2006). Getestet wurde R-Limonene (Li), eines der weitverbreitetsten Terpene in der Natur, das in vielen Zitrusölen enthalten ist und einen charakteristischen Geruch besitzt (Matura et al., 2002). Darüber hinaus wurde Eugenol (Eu), der Hauptbestandteil des Nelkenöls untersucht, das wegen seiner entzündungshemmenden, analgetischen und lokalanästhetischen Wirkung in der Zahnmedizin ein breites Einsatzgebiet findet (Pramod et al., 2010). Bei der dritten Testsubstanz mit Monoterpenstruktur handelt es sich um Menthol (MOH), das aufgrund seiner antiseptischen, analgetischen und kühlenden Effekte ebenfalls eine Vielzahl medizinischer Indikationen aufweist (Patel et al., 2007).

**Tabelle 5.1 Struktur der Isoprenoide des Mevalonatstoffwechsels.**

C <sub>15</sub>	Farnesol	
C <sub>20</sub>	Geranylgeraniol	
C <sub>30</sub>	Squalene	

**Tabelle 5.2 Natürliche Isoprenoide mit Monoterpenstruktur.**

C <sub>10</sub>	Eugenol	
C <sub>10</sub>	(±) Menthol	
C <sub>10</sub>	R-(+) Limonene	

Die Versuche erfolgten an Zellen (gingivale Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten), deren Funktionsbeeinträchtigung durch N-BP mit der Entstehung der BP-ONJ assoziiert ist.

Die Kombinationsbehandlung der Zellen mit Zoledronat und den verschiedenen Isoprenoiden brachte jedoch nicht die gewünschten Effekte. Eugenol erwies sich als einzige Verbindung, die überhaupt einen positiven Einfluss auf die mit dem N-BP behandelten Zellen ausübte. Dieser Effekt beschränkte sich jedoch auf die Wundheilungskapazität der Fibroblasten nach 24h. Zu diesem Zeitpunkt zeigte GGOH im Vergleich jedoch einen signifikant stärkeren protektiven Einfluss als Eugenol ( $p < 0,001$ ). Außerdem erbrachte die Koinkubation mit Eugenol weder eine



Verbesserung der Vitalität noch einen sichtbaren Effekt auf die Architektur des fibroblastären Zytoskeletts. Die anderen beiden untersuchten Zelltypen ließen sich in keiner Weise durch Eugenol vor den schädigenden Einflüssen des N-BP schützen. In der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse fällt der eine positive Eugenol-Effekt kaum ins Gewicht und ist somit eher zu vernachlässigen. Unter den anderen getesteten Isoprenoiden zeigte keines eine antagonisierende Wirkung gegenüber Zoledronat, noch nicht einmal in hohen Konzentrationen von 100µM. Das Diterpen GGOH scheint demnach die einzige der untersuchten Verbindungen mit Isoprenoid-Struktur zu sein, die sowohl die Migrationsfähigkeit und die Vitalität als auch die Architektur der Aktinfilamente gingivaler Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten vor der schädigenden Wirkung Zoledronats bewahren kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass bei der Bisphosphonat-induzierten Unterdrückung essentieller Funktionen der getesteten Zelllinien hauptsächlich die verminderte Geranylgeranylierung und nicht die Farnesylierung der entsprechenden G-Proteine eine Rolle spielt. Bewiesen ist, dass nur ein geringer Teil des Farnesyl Pyrophosphats (FPP), welches das Phosphorylierungs-Produkt des Farnesols darstellt, weiter zu Geranylgeranyl Pyrophosphat (GGPP) metabolisiert wird (Crick et al., 1997; Shipman et al., 1998). Während Ras-Proteine und Lamin B farnesyliert werden, ist für die meisten GTPasen die posttranslationale Modifizierung durch GGPP essentiell (Casey, 1992). Auch scheinen im Gegensatz zu farnesylierten Proteinen, geranylgeranylierte Proteine für den Übergang der G1 zur S Phase im Zellzyklus von besonderer Bedeutung (Vogt et al., 1996). Mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit im Einklang, wurde bereits der vor der N-BP-Wirkung schützende Effekt GGOHs auf die Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption nachgewiesen. FOH hingegen bewirkte keine Antagonisierung der antiresorptiven N-BP-Wirkung (Van Beek et al., 2002). Eine Studie an Prostatakrebszellen stellt ein anderes Beispiel für die Fähigkeit von externem GGOH im Gegensatz zu FOH dar, die Zoledronat-induzierte Blockade im Mevalonatstoffwechsel zu umgehen. Außerdem wurde die Theorie der Unabhängigkeit der Ras-GTPasen an dem zugrundeliegenden Wirkmechanismus Zoledronats auf die Zellen dieser Krebszelllinie bestätigt (Nogawa et al., 2005). Es gibt allerdings ebenso Untersuchungen, die neben GGOH die protektive Wirkung weiterer Substanzen mit Isoprenoidstruktur belegen. Nachgewiesen ist beispielsweise, dass verschiedene natürliche Isoprenoide (Geranylgeraniol, Geraniol,

Farnesol und Menthol) in der Lage sind, proinflammatorische Effekte Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierter Monozyten, die gleichzeitig mit N-BP behandelt wurden zu reduzieren (Marcuzzi et al., 2010). Des Weiteren wurde von einer kompletten Prävention vor den Effekten des HMG-CoA Reduktase-Hemmers Lovastatin (Angriff der Statine im Mevalonatstoffwechsel siehe Abbildung 1.5) auf Mesangiumzellen sowohl durch GGOH als auch durch FOH berichtet. Die Tatsache, dass FOH einmal zur Antagonisierung der Effekte einer Mevalonatweg-Blockade in der Lage ist und ein anderes Mal nicht, könnte daran liegen, dass es zellspezifische Unterschiede bezüglich der Relevanz der beiden Prenylierungsformen (Farnesylierung und Geranylgeranylierung) gibt (Van Beek et al., 2002). Es wäre folglich möglich, dass bestimmte Funktionen von Zellarten, für die die Protein-Farnesylierung von besonderer Bedeutung ist, durch eine Auffüllung der Farnesol-Speicher wiederhergestellt würden.

Das Sesquiterpen Squalene (Tabelle 5.1) stellt ein weiteres Intermediat des Mevalonatstoffwechsels (Abbildung 1.5) dar, dessen Synthese infolge der FPP-Hemmung durch N-BP eingeschränkt ist. Die Hypothese, dass durch eine Wiederauffüllung der Squalene-Speicher die Zoledronat-induzierte Blockade umgangen werden kann, bestätigte sich im Falle der getesteten Zellfunktionen von HUVEC, Fibroblasten und Osteoblasten nicht. Es ist zwar belegt, dass N-BP den Spiegel des Serumcholesterins senken können (Guney et al., 2008), jedoch scheint eine verminderte De-Novo-Steroid-Synthese bedingt durch einen Mangel an dem Cholesterin-Vorläufer Squalene nicht den Einfluss auf die Zoledronat-bedingte Einschränkung der untersuchten Zellfunktionen zu haben wie die gestörte Protein-Prenylierung.

Wie bereits erwähnt, zeigte sich auch keines der untersuchten Monoterpene (abgesehen von der zu vernachlässigenden Wirkung Eugenols auf die Wundheilungskapazität gingivaler Fibroblasten) in der Lage, die getesteten Zellen vor der schädigenden Wirkung Zoledronats zu bewahren.

In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse ist interessant, dass es zahlreiche Studien gibt, die das chemotherapeutische Potential verschiedener Monoterpene untersucht haben. Der Tumorzell-schädigende Effekt wird durch die Hemmung des Mevalonatweges erklärt. Zu dem genauen Wirkmechanismus gibt es verschiedene Theorien. Zunächst hielt man die Isoprenyltransferasen, Farnesyltransferase sowie

Geranylgeranyltransferase (Abbildung 1.5) für den Hauptangriffspunkt der Monoterpene. Die verminderte posttranslationale Modifizierung der kleinen G-Proteine wurde auf die Hemmung dieser die Prenylgruppen übertragenden Enzyme zurückgeführt und für die zellulären Funktionsverluste verantwortlich gemacht (Crowell et al., 1991). Doch wurde in weiteren Untersuchungen festgestellt, dass für die Hemmung der Proteinprenylierung sehr hohe Monoterpen-Konzentrationen von 1,5mM bis zu 10mM notwendig sind (Hardcastle et al., 1999). Um die folgenden Erkenntnisse nachvollziehen zu können, soll an dieser Stelle kurz auf Effekte, des HMG-CoA Reduktase-Hemmers Lovastatin eingegangen werden. Es ist bekannt, dass Lovastatin die Proteinprenylierung aufgrund einer verminderten GGPP- bzw. FPP-Synthese reduziert (Wang et al., 2000). Als Folge kommt es zu einer Hochregulation unprenylierter Proteine der Ras Superfamilie (Holstein et al., 2002b). Es konnte gezeigt werden, dass Monoterpene in einem Konzentrationsbereich von 0,25mM bis 0,75mM die Lovastatin induzierte Hochregulation der unprenylierten G-Proteine inhibieren. Dies bekräftigt die Theorie, dass die Isoprenoidverbindungen eine regulatorische Funktion bei der Expression der kleinen GTPasen besitzen unabhängig von deren Prenylierung (Peffley and Gayen, 2003).

Des Weiteren wird von einer Isoprenoid bedingten „Downregulation“ des Enzyms HMG-CoA Reduktase berichtet (Peffley and Gayen, 2003). Tumorzellen scheinen jedoch empfindlicher gegenüber dem Einfluss externer Isoprenoide als Körperzellen. Die Ursache hierfür wird darin gesehen, dass die Regulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität „normaler“ Zellen in erster Linie von einem komplexen Cholesterol-abhängigen Feedbackmechanismus abhängt. Während Tumorzellen diesem Regulationsmechanismus gegenüber resistent sind, scheinen sie doch wesentlich empfindlicher gegenüber einer Isoprenoid-bedingten „Downregulation“ des Enzyms als Körperzellen (Mo and Elson, 2004).

Außer diesen chemotherapeutischen Ansätzen wurde beobachtet, dass Monoterpene antiresorptive Effekte auf den Knochen ausüben (Muhlbauer et al., 2003). Die Tatsache, dass weder GGOH noch FOH in der Lage sind die Monoterpen bedingten Effekte auf die Osteoklasten-Entwicklung in-vitro zu verhindern, ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Monoterpene ihre Wirkung auf die Zelle unabhängig von der Isoprenoidsynthese entfalten (Dolder et al., 2006).

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Studien und den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in-vitro Untersuchung an gingivalen Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten scheinen die untersuchten Isoprenoide nicht fähig, die Zoledronat induzierten zellulären Funktionseinschränkungen zu mindern. Die Hypothese, andere Verbindungen mit struktureller Ähnlichkeit zum Geranylgeraniol hätten das Potential in der Prävention oder Behandlung der BP-ONJ eingesetzt zu werden, kann somit nicht bestätigt werden. Zum heutigen Zeitpunkt scheint GGOH das einzige natürliche Isoprenoid, das in der Lage ist gingivale Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten vor den Zoledronat-Effekten zu bewahren und möglicherweise die Entwicklung einer BP-ONJ bei Bisphosphonat-Patienten zu verhindern sowie den Behandlungserfolg bei Patienten mit manifester Osteonekrose positiv beeinflussen kann.

### **5.3 Clodronat-Einfluss (nicht-N-BP) auf die vitalitätsschädigende Wirkung Zoledronats (N-BP) auf gingivale Fibroblasten, HUVEC, Osteoblasten und Keratinozyten**

Clodronat und Etidronat stellen die Vertreter der nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonate (nicht-N-BP) dar. Ihr Wirkmechanismus unterscheidet sich von dem der stickstoffhaltigen Vertreter der Arzneistoffgruppe, indem sie anders als diese nicht die Farnesylpyrophosphat Synthase des Mevalonatstoffwechsels hemmen, sondern zytotoxische ATP-Analoga (Abbildung 1.4) bilden (Roelofs et al., 2006). Verglichen mit den N-BP besitzen sie eine deutlich geringere antiresorptiven Potenz und sind auch nur in Einzelfällen mit der BP-ONJ assoziiert (Pazianas et al., 2007; Ruggiero et al., 2004). Außerdem gibt es keinen Evidenz-basierten Zusammenhang zwischen der Einnahme stickstofffreier BPs und dem Auftreten von Nekrosen sowie Entzündungsreaktionen (Crepin et al., 2010). Die Ergebnisse zahlreicher in-vitro Studien belegen die Zytotoxizität der N-BP im Gegensatz zu den nicht-N-BP auf die verschiedensten Zelllinien bereits in einem Konzentrationsbereich von 10µM bis 100µM. Dies spiegelt deren ausgeprägte Gewebstoxizität in Kiefernähe wieder, die im Fall einer lokalen Wirkstoffakkumulation zum Tragen kommt. Die Ursache einer solchen Anreicherung kann eine vermehrte Freisetzung der Bisphosphonate aus dem Knochen sein wie beispielweise im Rahmen dentalchirurgischer Eingriffe, Zahnextraktionen oder entzündungsbedingter pH-Werterniedrigungen.

Interessanterweise hat man festgestellt, dass die gleichzeitige Injektion des nicht-N-BP Clodronat in Kombination mit einem N-BP in die Ohrmuschel von Mäusen sowohl Entzündungsreaktionen als auch Nekrosen, wie sie durch die Einzelbehandlung mit N-BP hervorgerufen werden, verringert (Oizumi et al., 2009). In einer Folgestudie wurde diese hemmende Wirkung auf die durch N-BP hervorgerufenen Effekte auch für Etidronat bestätigt. In diesem Fall zeigte sich zusätzlich eine Verminderung der antiresorptiven Aktivität des potentesten N-BP Zoledronat. Außerdem konnten sowohl dessen Bindung an Hydroxylapatit durch die Kombinationsbehandlung mit dem nicht-N-BP gehemmt als auch bereits gebundene Substanz wieder aus dem Knochen gelöst werden (Oizumi et al., 2010). Die protektive Wirkung der Kombination mit Etidronat gegenüber der Zoledronat-Einzelbehandlung wurde auch in Zellversuchen nachgewiesen, wobei sich zellspezifische Unterschiede zeigten (Tanaka et al., 2012). Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus weitgehend unklar ist, vermutet man, dass die nicht-N-BP die potenteren N-BP am Eintritt in die Zelle hindern und auf diese Weise ihre cytoprotektive Wirkung entfalten. In diesem Zusammenhang wird über spezifische Transporter diskutiert, über die große Mengen der N-BP in die Zelle eindringen können. Im Gegensatz dazu gelangt nur wenig der nicht-N-BP ins Zellinnere, da die hochpolaren Substanzen nur schwer die lipophile Membran passieren können. Dies stellt eine Erklärung für die stark unterschiedlich ausgeprägte Zytotoxizität der beiden Bisphosphonat-Untergruppen dar. Der toxische Effekt der stickstoffhaltigen Vertreter könnte somit möglicherweise durch eine Blockade der spezifischen N-BP Transporter durch nicht-N-BP gemildert werden (Oizumi et al., 2010).

In Anlehnung an diese vielversprechenden Ergebnisse, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss des nicht-N-BP Clodronat auf die toxischen Effekte Zoledronats auf verschiedene Zelllinien getestet. Ausgewählt wurden Zellen, deren Schädigung durch N-BP mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung der BP-ONJ assoziiert ist. Eine Reduktion bzw. der Schutz vor diesen zytotoxischen Effekten durch eine Kombinationsbehandlung aus N-BP und nicht-N-BP könnte das Risiko der Osteonekrose-Entwicklung minimieren oder auch deren Fortschreiten verhindern. Dies ist jedoch rein spekulativ, da es sich nach dem aktuellen Stand der Forschung um einen multifaktoriellen Prozess handelt und der exakte Pathomechanismus sowie die Reihenfolge und Bedeutung der einzelnen Ereignisse noch immer nicht vollständig geklärt sind.

Die in-vitro Untersuchungen dieser Arbeit lieferten je nach Zelllinie unterschiedliche Ergebnisse. Während 1000µM Clodronat die Vitalität gingivaler Fibroblasten nicht beeinflusste, schädigte die gleiche Konzentration hingegen sowohl Osteoblasten als auch HUVEC. Im Falle der Keratinozyten wiesen schon 100µM des nicht-N-BP zytotoxische Effekte auf. Eine signifikante Schädigung durch Zoledronat wird bei allen getesteten Zelllinien ab 50µM erreicht. Die gewünschte protektive Wirkung des nicht-N-BP in der Kombinationsbehandlung ist im Falle der gingivalen Fibroblasten, der Endothelzellen sowie der Osteoblasten nicht zu erkennen. Interessanterweise bewirkt die zusätzliche Behandlung mit 100µM Clodronat einen Anstieg der durch 50µM sowie durch 100µM Zoledronat reduzierten Keratinozyten-Stoffwechselaktivität. Hierbei handelt es sich um eine leichte Verbesserung der Zellvitalität um jeweils etwa 10%. Bemerkenswert ist, dass dieser protektive Effekt Clodronats erst zu erkennen ist, wenn die Keratinozyten-Aktivität signifikant durch das N-BP minimiert ist. Im Falle niedriger Zoledronat-Konzentrationen kommt es hingegen zu einer Vitalitätsreduktion, wenn man dies mit Clodronat kombiniert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich die schädigenden Effekte der beiden Bisphosphonate zunächst addieren, da geringe Mengen Zoledronat durch die nicht-besetzten N-BP-Transporter ungehindert in die Zelle eindringen können. Es könnte sein, dass aufgrund der Clodronat-bedingten Blockade der N-BP-Transporter für größere Mengen des N-BP (50µM und 100µM) nicht die volle Aufnahmekapazität gewährleistet ist. Folglich wäre die tatsächliche Konzentration in der Zelle in der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu der Einzelbehandlung erniedrigt. Dies ist allerdings eine rein spekulative Interpretation der Ergebnisse und müsste in Form weiterer Studien hinterfragt werden. Der beobachtete Vorteil, den die Kombination der beiden Wirkstoffe gegenüber der Einzelbehandlung mit Zoledronat aufweist, besitzt wahrscheinlich keine Praxisrelevanz, da er relativ gering ist und sich auf eine der getesteten Zelllinien beschränkt. Auch wenn die Untersuchung der humanen Zelllinien nicht die erhofften Resultate gezeigt hat, stellt die Tatsache, dass die simultane Behandlung im Mausmodell sowohl eine Reduktion der Nekrosen als auch der Entzündungsreaktion bewirkte, dennoch einen vielversprechenden Ausgangspunkt zur Erforschung neuer therapeutischer Strategien gegen die BP-ONJ dar. Die divergierenden Ergebnisse lassen auch in diesem Zusammenhang ausgeprägte zellart- sowie speziesspezifische Unterschiede vermuten.

## **5.4 Zoledronat-Einfluss (mit und ohne GGOH bzw. FOH) auf die Proteine FAK, Phospho-FAK (Tyr925), Paxillin, phospho-Paxillin (Tyr118), RhoA, GTP-gebundenes RhoAs sowie RhoB gingivaler Fibroblasten**

Da die Entwicklung der BP-ONJ in den meisten Fällen mit einer gestörten Wundheilung wie beispielsweise nach Zahnextraktionen oder kieferchirurgischen Eingriffen assoziiert ist (Hoff et al., 2008), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die an der Wundheilung beteiligten gingivalen Fibroblasten nicht nur auf zellulärer sondern zusätzlich auch auf Proteinebene untersucht. Ermittelt wurde der Einfluss, den eine 72-stündige Zoledronat-Inkubation (50 $\mu$ M) auf die Expression der kleinen G-Proteine RhoA und RhoB sowie auf die bei der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beteiligten Proteine Fokale Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin dieser Zelllinie ausübt. Außerdem wurden sowohl die Effekte der Einzelinkubationen mit 10 $\mu$ M GGOH bzw. mit 10 $\mu$ M FOH auf die genannten Proteine wie auch die einer Kombinationsbehandlung des jeweiligen Isoprenoids mit Zoledronat untersucht.

Vor dem Hintergrund, dass sich die beiden Isoprenoide GGOH und FOH in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie bezüglich der Fähigkeit, den schädigenden Einfluss Zoledronats auf Viabilität, Migrationsfähigkeit und die Architektur des Cytoskeletts gingivaler Fibroblasten, HUVEC und Osteoblasten zu antagonisieren, deutlich unterschieden, wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht, inwiefern sich die Inkubation der Substanzen auf verschiedene fibroblastäre Proteine auswirkt, die maßgeblich an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen beteiligt sind. Hierbei galt es zum Einen zu überprüfen; welche Effekte das N-BP auf die Proteine dieser Zelllinie hat und zum Anderen, ob sich diese durch die Koinkubation mit 10 $\mu$ M GGOH verhindern lassen, wie es auf zellulärer Ebene der Fall ist. Außerdem sollte ermittelt werden, ob Farnesol, welches die getesteten Fibroblastenfunktionen in der durchgeführten in-vitro Studie nicht vor dem Einfluss Zoledronats schützen konnte, eventuell trotzdem antagonisierende Effekte gegenüber dem N-BP auf der Ebene der Proteine zeigt.

#### 5.4.1 Die Tyrosinkinase FAK und Paxillin

Neben den kleinen GTPasen RhoA und RhoB wurden deren Effektorproteine, die Fokale Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin untersucht. Als Bestandteil fokaler Adhäsionskomplexe spielen die beiden nicht-membranständigen Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase eine Schlüsselrolle bei der Regulation der zellulären Fortbewegung, der Proliferation sowie dem Überleben der Zelle. Unter fokalen Adhäsionen versteht man Multiproteinkomplexe, die Stressfasern des Aktinzytoskeletts mit der Extrazellulären Matrix (EZM) verankern. Neben der Ausbildung stabiler Adhäsionen finden hier zahlreiche komplexe Integrin-vermittelte Signaltransduktionsprozesse statt, über die Informationen aus der EZM ins Zellinnere geleitet werden. Der Kontakt zu den Proteinen der EZM wird durch die extrazelluläre Domäne heterodimerer Integrinrezeptoren vermittelt, die sich bei Aktivierung zu großen Proteinclustern zusammenlagern. An der Bildung des Proteinkomplexes, der mit der intrazellulären Integrinrezeptordomäne assoziiert ist, sind neben Proteinen des Zytoskeletts zahlreiche cytoplasmatische Tyrosinkinase beteiligt. Zu diesen zählen auch die hier untersuchte Proteine FAK und Paxillin (Parsons et al., 2000). Die Bildung der Integrincluster bewirkt die rasche Rekrutierung der FAK zum fokalen Adhäsionskomplex sowie die Autophosphorylierung des Enzyms am Tyrosinrest 397 (Tyr397). Dies wiederum setzt die Phosphorylierung weiterer Tyrosinreste der Kinase in Gang (Schlaepfer et al., 1994). Exemplarisch wurde im Rahmen der vorliegenden Studie der jeweils alleinige Einfluss Zoledronats, GGOHs und FOHs wie auch der Einfluss einer Kombinationsbehandlung aus N-BP und Isoprenoid auf die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 925 (Tyr925) der FAK untersucht. Die Phosphorylierung an dieser Position des Enzyms erfolgt anders als an anderen Tyrosinresten der FAK Src-Kinase-abhängig (Brunton et al., 2005). Sie spielt eine bedeutende Rolle bei der Funktionalität der FAK. Es hat sich gezeigt, dass es für die Auflösung fokaler Adhäsionen und für die Fähigkeit zur Zellprotrusion die Phosphorylierung des Tyr925 Restes bedarf. Diese Eigenschaft der Adhäsionsdynamik ist wiederum ganz entscheidend für die Ausdehnungs-, Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Zelle. Denn nur, wenn sich bereits bestehende fokale Adhäsionen mit der EZM am der Bewegung endgegengesetzten Ende der Zelle wieder lösen, kann sich diese fortbewegen (Chen et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine statistisch signifikante Beeinflussung der fibroblastären FAK-Expression durch die getesteten Substanzen nachgewiesen



werden. Auffällig ist allein die Kombinationsbehandlung aus Zoledronat und FOH, die zu einer um knapp die Hälfte reduzierten mittleren Intensität der FAK-Bande im Western-Blot führt. Die Untersuchung des Phosphorylierungsgrades am Tyrosinrest 925 der FAK lieferte dagegen deutlichere Unterschiede der mittleren Bandenintensität, die jedoch ebenfalls keiner statistischen Signifikanz unterliegen. Erwähnenswert ist hier die durch Zoledronat induzierte Reduktion der mittleren Intensität der Phospho-FAK (Tyr952)-Bande (58,10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), die durch die Kombination mit GGOH (83,34%), jedoch nicht durch die Kombination mit FOH gemildert wird. Trotz fehlender statistischer Signifikanz korrelieren diese Beobachtungen mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie, die die durch Zoledronat induzierte Beeinträchtigung von Viabilität und Migrationsfähigkeit gingivaler Fibroblasten sowie die Wiederherstellung der Zellfunktionalität durch die Kombination mit GGOH (im Gegensatz zu FOH) belegt.

Um eine eindeutige Aussage treffen zu können und die Hypothese zu verifizieren, dass Zoledronat die Expression der FAK nicht, stattdessen aber möglicherweise deren Tyr925-Phosphorylierung auf eine mit GGOH antagonisierbare Weise beeinflusst, bedarf es weiterer Untersuchungen, die über die im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit hinausgehen.

Deramaudt et al. haben 2011 ihre Studien über die regulatorische Bedeutung der Phosphorylierung der FAK an Tyr925 auf den Phosphorylierungsgrad Paxillins, welches ebenfalls Bestandteil des fokalen Adhäsionskomplexes ist, publiziert. Es konnte gezeigt werden, dass es bei ausbleibender Phosphorylierung dieser Aminosäure zu einer verstärkten Wechselwirkung der FAK mit dem unphosphorylierten Paxillin kommt, was zu einer Stabilisierung der fokalen Adhäsion führt und in der Folge die Migrationsfähigkeit der Zelle herabsetzt. Im Umkehrschluss wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung der FAK an Tyr925 einen 2,3 fachen Anstieg der Paxillin-Phosphorylierung an dessen Tyrosinrest 118 bewirkt (Deramaudt et al., 2011). In der genannten Studie wird auch die Theorie von Dixon et al. widerlegt, die die Tyr925-Phosphorylierung für eine Bindungsblockade der FAK an den fokalen Adhäsionskomplex verantwortlich macht (Dixon et al., 2004). Stattdessen wird ein Model zur regulatorischen Rolle der FAK bei der Zellmigration favorisiert, bei dem die Tyr925 Phosphorylierung die Dynamik neu gebildeter Adhäsionen erhöht und diese mit einer gesteigerten Zellprotrusion verbindet

(Deramaudt et al., 2011). Im Hinblick auf die beschriebene Abhängigkeit der Tyr118-Phosphorylierung der Kinase Paxillin von der Tyr925-Phosphorylierung der FAK wurde auch Paxillin im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bezüglich Expression und Phosphorylierungsgrad untersucht. Die durchgeführten Western-Blot-Versuche lassen keinen statistisch signifikanten Einfluss der getesteten Substanzen auf die fibroblastäre Paxillin-Expression erkennen. Auffällig ist jedoch, dass die mittleren Bandenintensitäten der zuvor mit den unterschiedlichen Substanzen behandelten Proben stärker zu variieren scheinen als im Falle der FAK-Expression. Die Zoledronat-Inkubation bewirkt eine Reduktion der mittleren Intensität der Paxillin-Bande auf 65,3%. Während die Kombinationsbehandlung mit GGOH die mittlere Bandenintensität auf 74,07% zu steigern vermag, bewirkt die Kombination aus Zoledronat und FOH einen Abfall der mittleren Intensität auf 57,78%, der somit über die durch Zoledronat induzierte Intensitätsreduktion hinausgeht. Dieser Abfall lässt sogar eine statistische Tendenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennen ( $p=0,098$ ). Der Substanzeinfluss zeigt sich im Falle des Paxillins, wie auch bei der FAK, deutlicher im Grad der Protein-Phosphorylierung als auf der Ebene der Proteinexpression. Die sich im Western-Blot darstellenden Unterschiede des Phosphorylierungsgrades Paxillins weisen jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz auf. Die durch Zoledronat auf 68,95% reduzierte mittlere Intensität der Phospho-Paxillin (Tyr118)-Bande steigt durch die Kombination mit GGOH auf 130,25% der unbehandelten Kontrolle. Die Antagonisierung des Zoledronat-Effektes durch die Kombination mit GGOH (und nicht mit FOH) konnte somit sowohl am Phosphorylierungsgrad des Tyrosinrestes 925 der FAK als auch am Phosphorylierungsgrad des Tyrosinrestes 118 der Kinase Paxillin beobachtet werden. Diese Korrelation kann möglicherweise Folge der von Deramaudt et al. beschriebenen Abhängigkeit der Paxillin (Tyr118)-Phosphorylierung von der FAK (Tyr925)-Phosphorylierung sein. Diese Daten korrelieren ebenfalls mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen essentieller Fibroblasten-Funktionen unter dem Einfluss der verschiedenen Testsubstanzen. Die Tatsache, dass die Phosphorylierung der Aminosäure Tyr118 Paxillins für wichtige Zellfunktionen wie Migrationsfähigkeit und Adhäsionsfähigkeit von essentieller Bedeutung ist (Huang et al., 2008; Zaidel-Bar et al., 2007), steht im Einklang zu der hier beobachteten Korrelation zwischen dem Einfluss der getesteten Substanzen auf den Grad der Proteinphosphorylierung und deren Einfluss auf

essentielle Funktionen der Fibroblasten wie Migrationsfähigkeit und Viabilität. Aufgrund fehlender statistischer Signifikanz sind jedoch auch in diesem Fall weitere Untersuchungen erforderlich um die Zusammenhänge eindeutig zu belegen.

#### 5.4.2 GTPasen der RhoA-Familie

Im Rahmen dieser Studie wurden des Weiteren Proteine der Rho-Familie untersucht, die an der Regulation essentieller Zellfunktionen wie Migration, Proliferation und Differenzierung beteiligt sind. Bekannt ist auch, dass Rho-GTPasen eine wichtige regulatorische Rolle bei der Ausbildung der im vorherigen Abschnitt beschriebenen fokalen Adhäsionen spielen. Wie in Abbildung 5.1 dargestellt handelt es sich bei den Rho-GTPasen um eine Untergruppe der Ras-Superfamilie, die über 170 Proteine umfasst (Colicelli, 2004).

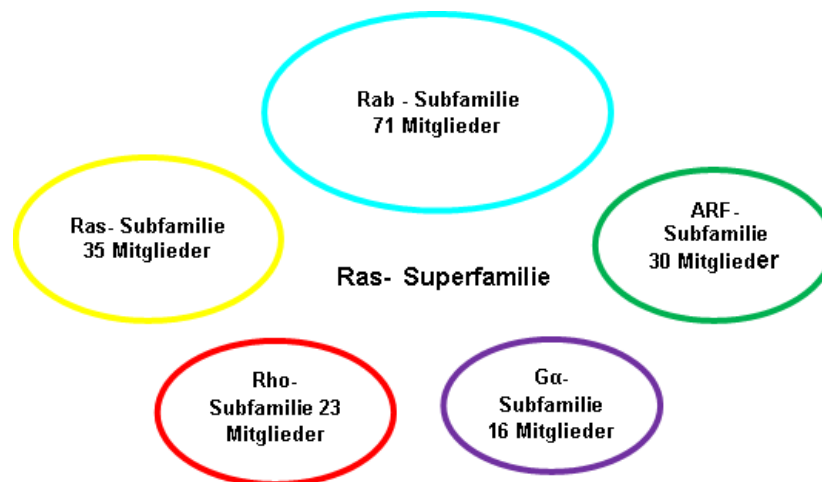


Abbildung 5.1 Humane Ras-Superfamilie, modifiziert nach (Colicelli, 2004).

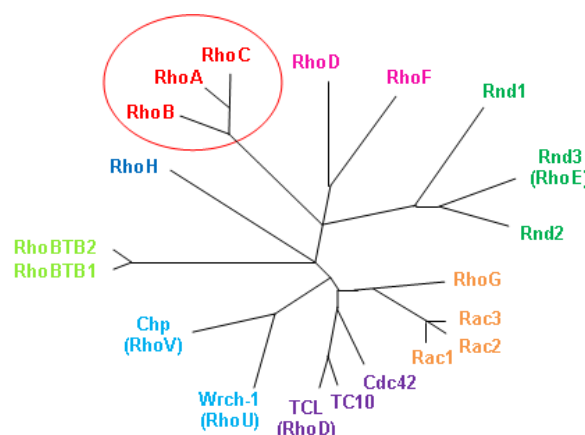
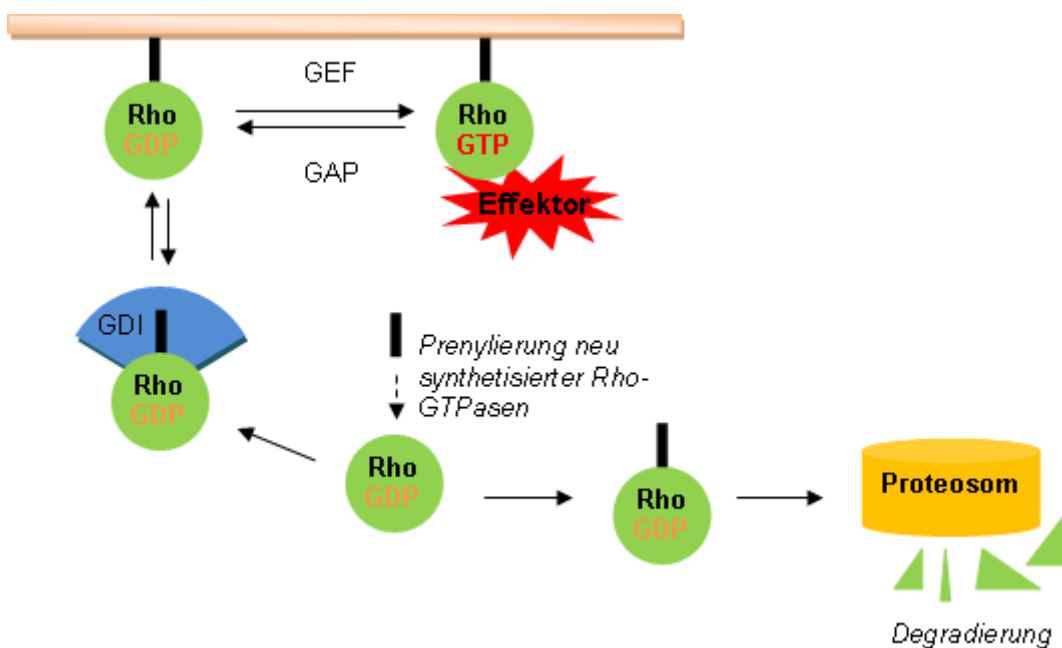


Abbildung 5.2 Humane Rho-Subfamilie, modifiziert nach (Cox and Der, 2010).

Basierend auf ihrer Sequenzähnlichkeit gliedert man die Mitglieder der Rho-Subfamilie in weitere Untergruppen. Eine davon ist die Unterfamilie RhoA-verwandter GTPasen (RhoA related subfamily, in Abbildung 5.2 rot umkreist), zu der auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine RhoA und RhoB gehören.

Die komplexe Regulation der Rho-Proteine erfolgt auf verschiedenen Ebenen (Abbildung 5.3). Sie können entweder in ihrer inaktiven (GDP-gebunden) oder in ihrer aktiven (GTP-gebundenen) Form vorliegen. Während *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) das an Rho-Proteine gebundene GDP durch GTP ersetzen und dadurch deren Aktivierung bewirken, erfolgt die Inaktivierung durch *GTPase-activating proteins* (GAPs). Damit Rho-GTPasen stabile Verbindungen zu Membranen eingehen können, um mit ihren Effektorproteinen zu interagieren und diese zu aktivieren, bedarf es ihrer posttranslationalen Prenylierung (Bishop and Hall, 2000).



**Abbildung 5.3 Regulation der Rho-GTPasen.**

Nach der posttranslationalen Prenylierung neu synthetisierter Rho-GTPasen erfolgt deren Bindung an Rho-spezifische *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (RhoGDIs). Hierdurch werden sie stabilisiert und vor der proteosomalen Degradierung bewahrt. Eine übermäßige Anreicherung der Rho-GTPasen im Cytosol führt dagegen zum proteosomalen Abbau. An der Membran gebunden können *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) die GDP-gebundenen Rho-GTPasen aktivieren. Hierdurch wird die Wechselwirkung Rhos mit spezifischen Effektoren ermöglicht. *GTPase-activating proteins* (GAPs) katalysieren die Abspaltung eines Phosphatrestes, wodurch die Rho-GTPase wieder inaktiviert wird und erneut von RhoGDI gebunden werden kann. Darstellung modifiziert nach (Garcia-Mata et al., 2012).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Regulation der kleinen G-Proteine spielen *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs), die sowohl die Aktivierung der Rho-Proteine hemmen, da sie die Abspaltung des gebundenen GDPs verhindern, als auch membrangebundene Rho-GTPasen aus deren Verankerung befreien und in ihre gelöste Form überführen. Es konnte nachgewiesen werden, dass GDIs nur die prenylierten Proteine binden und mit diesen wechselwirken (Dovas and Couchman, 2005). Des Weiteren wurde am Beispiel der RhoB gezeigt, dass GDI einerseits nur die GDP-gebundene Form der GTPase an deren Membranassoziation hindert und andererseits auch nur diese inaktive Form des Proteins wieder aus der Membranbindung löst (Isomura et al., 1991). Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass im Cytosol hauptsächlich Rho-GDP mit GDI assoziiert vorliegt, welches prenyliert ist, aber wegen des GDIs nicht an die Membran binden kann. Unprenyliertes Rho-GDP kann dagegen leichter aktiviert werden, da es nicht an GDI gebunden ist. Findet die Aktivierung der gebundenen Form statt, wird die nicht mehr durch GDI gelöst.

Obwohl die drei Subtypen der RhoA-verwandten GTPasen eine zu etwa 85-prozentige Homologie ihrer Aminosäuresequenzen aufweisen, mit den gleichen GEFs interagieren, die gleichen Effektormoleküle aktivieren und auch alle die Aktin-Myosin-Kontraktilität stimulieren, sind Abweichungen bezüglich ihrer biologische Funktionen nachgewiesen. Hierfür werden in erster Linie strukturelle Unterschiede der C-terminalen Aminosäuresequenz verantwortlich gemacht, die eine ungleichartige Verteilung der einzelnen GTPasen innerhalb der Zelle bewirken (Wennerberg and Der, 2004). Studien haben gezeigt, dass RhoA und RhoC hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind, während RhoB bevorzugt membrangebunden vorliegt. Trotzdem wird die subzelluläre Verteilung der Rho-Proteine ständig den Gegebenheiten angepasst und unterliegt einer permanenten Dynamik (Adamson et al., 1992b; Michaelson et al., 2001).

Das am besten untersuchte Mitglied der Subfamilie RhoA-verwandter GTPasen ist RhoA selbst. Sie spielt eine regulatorische Schlüsselrolle bei der Bildung von Aktinstressfasern und der Integrin-vermittelten Signalverarbeitung (Hall, 1998; Ridley and Hall, 1992). Ein wichtiges Effektorprotein der RhoA stellt die Rho-Kinase (p160Rock) dar, die als Myosin-Leichtketten-Kinase (*myosin light chain kinase*, MLCK) Myosin-Leichtketten (myosin light chain, MLC) phosphoryliert (Amano et al., 1996). Die aktive Form der MLC ist wiederum an der Bildung von F-Aktinfilamenten

beteiligt, zu denen auch die mit fokalen Adhäsionen assoziierten Stressfasern gehören (Sinnott-Smith et al., 2001).

Innerhalb der Unterfamilie RhoA-verwandter GTPasen scheint sich RhoB am deutlichsten hinsichtlich der Struktur und der subzellulären Lokalisation sowie auch funktionell von den anderen beiden Mitgliedern abzugrenzen (Prendergast, 2001). Anders als RhoA und RhoC, die hinsichtlich der für die Membranassoziation essentiellen posttranslationalen Prenylierung auf GGOH angewiesen sind, kann RhoB sowohl durch GGOH als auch durch FOH und Palmitinsäure modifiziert werden (Adamson et al., 1992a). Ein weiterer Unterschied besteht in der Regulation des kurzlebigen RhoBs, die über Wachstumsfaktoren und Stresssignale sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranskriptionaler Ebene verläuft (Engel et al., 1998; Fritz and Kaina, 1997). Ebenfalls hervorzuheben ist deren Lokalisation an früh-endosomalen und nukleären Membranen sowie deren wichtige Funktion bei der Steuerung des Transportes von Zytokinrezeptoren (Liu et al., 2000).

In Fibroblasten sowie in Tumorzellen sind wachstumshemmende und pro-apoptotische Effekte RhoBs nachgewiesen worden, die der Wirkung der anderen beiden Mitglieder der RhoA-verwandten Proteine entgegenstehen (Sahai and Marshall, 2002). Bewiesen ist, dass RhoB antineoplastische Eigenschaften besitzt und in Tumorzellen herab reguliert ist (Adnane et al., 2002). Außerdem sieht man in dem G-Protein einen Mediator der antitumoralen Effekte von Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI). Diese wurden ursprünglich entwickelt um die Farnesylierung und die damit verbundene Funktionalisierung onkogener Ras-Proteine zu verhindern (Kato et al., 1992). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass die antiapoptotische und antineoplastische Wirkung der FTIs auch durch die Änderung der posttranslationalen RhoB Prenylierung zustande kommt. Da die GTPase nur eine kurze Halbwertszeit besitzt, kommt es durch die Hemmung des Farnesyl-übertragenden Enzyms zu einem raschen Konzentrationsabfall der farnesylierten Form. In der Konsequenz steht mehr neu synthetisiertes RhoB für die Geranylgeranylierung zur Verfügung, was den Konzentrationsanstieg des GGOH gebundenen RhoBs erklärt (Liu et al., 2000). Grundlage dieser Überlegung ist, dass es funktionelle Unterschiede zwischen den beiden prenylierten Formen gibt. Die Verschiebung des Prenylierungsverhältnisses zugunsten der geranylgeranylierten Isoform, bewirkt eine Veränderung der subzellulären Lokalisation RhoBs. Hierdurch kommt es zu Funktionsänderung

der GTPase, die mit der Reduktion eines verstärkten zellulären Wachstums assoziiert sind (Lebowitz et al., 1997a).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden der Einfluss des Prenylierungshemmers Zoledronat, der beiden natürlichen Isoprenoide GGOH und FOH, sowie der Einfluss der Kombination aus Zoledronat und Isoprenoid auf den Gehalt der beiden RhoA-verwandten GTPasen RhoA und RhoB in gingivalen Fibroblasten untersucht.

Im Falle RhoAs konnte eine durch Zoledronat induzierte signifikante Steigerung des zellulären Proteingehaltes nachgewiesen werden. Dieser erreichte mehr als das Neunfache des RhoA-Gehaltes unbehandelter Fibroblasten. Die Kombination aus Zoledronat und GGOH reduzierte diesen starken Anstieg, womit kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle bestand. FOH dagegen schwächte den durch Zoledronat induzierten Anstieg der GTPase nicht. Dieses Resultat lässt sich dadurch begründen, dass RhoA ausschließlich geranylgeranyliert und nicht farnesyliert wird (Adamson et al., 1992a) und FPP schließlich nur in geringem Maße zu GGPP metabolisiert wird (Crick et al., 1997; Shipman et al., 1998).

Auch der Gesamtgehalt des fibroblastären RhoBs wies unter Zoledronat-Einfluss einen signifikanten Anstieg auf. Hier konnte eine Verfünffachung der mittleren Bandenintensität im Western-Blot nachgewiesen werden. Trotz der Tatsache, dass RhoB anders als RhoA und RhoC sowohl durch Geranylgeranylierung als auch durch Farnesylierung posttranskriptional modifiziert wird, antagonisierte ausschließlich GGOH den Zoledronat-induzierten Anstieg des zellulären Gehaltes der kleinen GTPase. Hierauf wird weiter unten genauer eingegangen.

Um die Hypothese, dass die Zoledronat-bedingte Akkumulation der kleinen GTPasen auf deren De-Novo-Synthese zurückzuführen ist, zu bestätigen, wurde in einem weiteren Versuch der Translationshemmer Cycloheximid eingesetzt und exemplarisch der fibroblastäre RhoA-Gehalt bestimmt. Unter Cycloheximid-Zusatz blieb der Zoledronat-induzierte zelluläre Konzentrationsanstieg der GTPase vollständig aus. Diese Tatsache lässt den Rückschluss zu, dass das stickstoffhaltige Bisphosphonat die Neusynthese der getesteten GTPasen in gingivalen Fibroblasten anregt.

Während mittels der beschriebenen Experimente jeweils der Gesamtgehalt der fibroblastären GTPasen (sowohl die inaktive, GDP-gebundene als auch die aktive, GTP-gebundene Form) untersucht wurde, erfolgte zusätzlich eine Studie über den

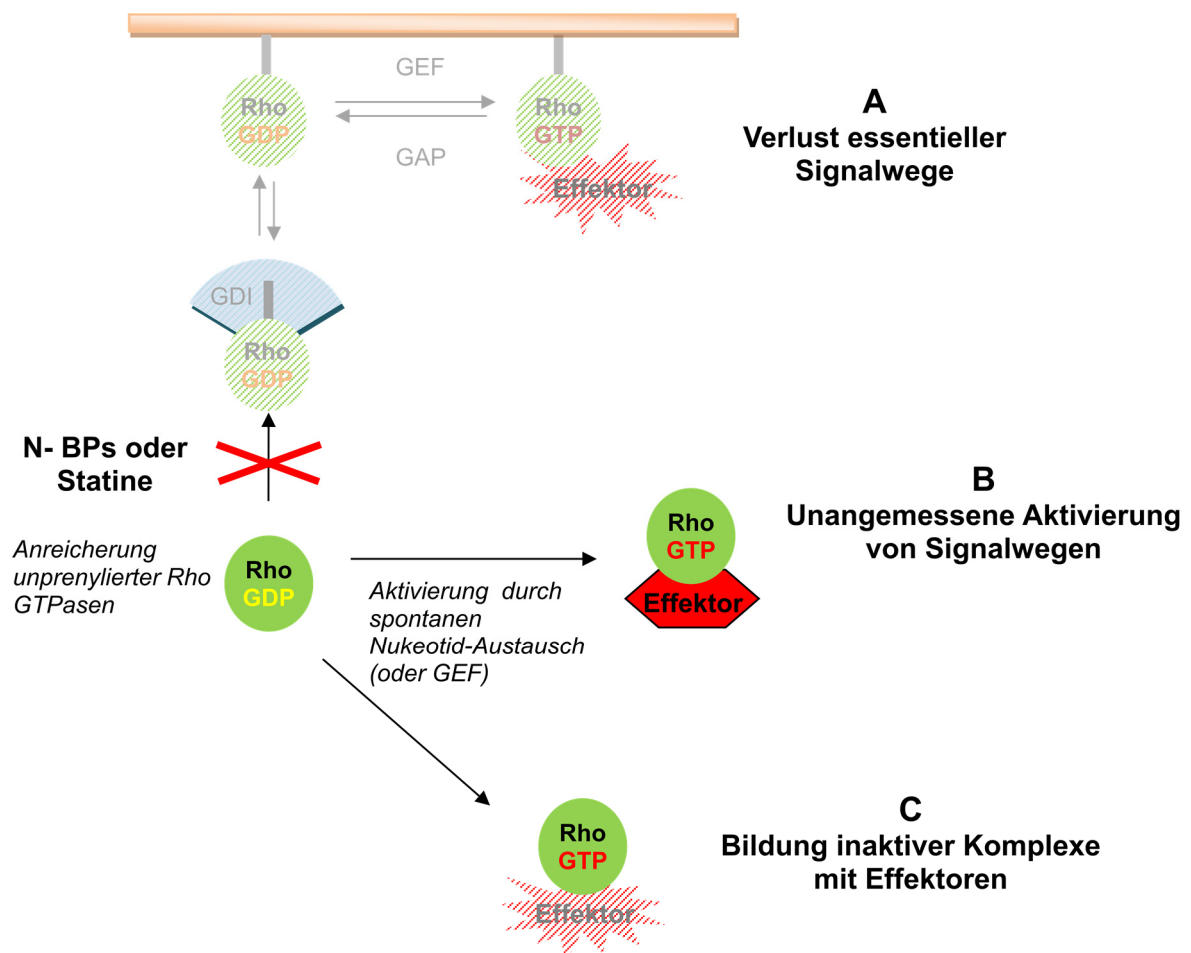
Einfluss der verschiedenen Substanzen auf den zellulären Gehalt der aktiven Form RhoAs. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der GTP-gebundenen Form des Proteins durch eine 72-stündige Zoledronat-Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Anders als die Kombinationsbehandlung mit FOH stellte sich die zusätzliche Inkubation mit GGOH als geeignet dar, die Fibroblasten vor dem Zoledronat-bedingten Anstieg des aktiven RhoAs zu bewahren. Wie im Falle der Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes, besaß GGOH auch hier einen protektiven Effekt, der darauf schließen lässt, dass die Ursache für eine gesteigerte Akkumulation der aktiven Form des Proteins durch Zoledronat ebenfalls im Verlust der Geranylgeranylierung der kleinen GTPase liegt. Das N-BP bewirkt somit sowohl eine gesteigerte Neusynthese RhoAs als auch dessen zelluläre Anreicherung in der aktiven, GTP-gebundenen Form. Eine mögliche Ursache für die Akkumulation der aktiven Form könnte in der Tatsache liegen, dass die posttranslationale Modifizierung der Rho-GTPasen nicht nur deren subzelluläre Lokalisation beeinflusst, sondern auch deren Interaktion mit den regulatorischen Proteinen GEF, GAP und GDI. Es ist belegt, dass die Protein-Prenylierung eine wichtige Rolle beim GDP/GTP Austausch spielt und somit bedeutend für die Rho-Aktivierung ist, ebenso wird auch deren Notwendigkeit bei der Inaktivierung der kleinen GTPasen unter der Kontrolle der Regulatorproteine GAP und GDI beschrieben (Hori, 1992; Molnar et al., 2001). Eine Blockade des Mevalonatstoffwechselweges durch N-BP oder auch durch Statine bewirkt eine Synthesereduktion der für die Protein-Prenylierung essentiellen Isoprenoide. Der Mangel an FPP (bzw. im Falle der RhoA ausschließlich der GGPP-Mangel) mindert die posttranslationale Modifizierung der kleinen GTPasen und verhindert somit nicht nur deren Membranassoziation, sondern auch die Wechselwirkung mit den jeweiligen Regulatorproteinen. Die Hemmung der Isoprenoidsynthese bewirkt folglich, dass die Regulation der kleinen GTPasen, wie sie für die physiologische Funktion der Zellen von essentieller Bedeutung ist, aus dem Gleichgewicht gebracht wird. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie im Einklang haben Untersuchungen an Makrophagen und Osteoklasten gezeigt, dass die Inkubation mit N-BP zu einer Anreicherung unprenylierter Rac, Cdc42 und Rho-GTPasen in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form führt (Dunford et al., 2006). Möglicherweise handelt es sich bei dem auch hier beobachteten Anstieg der Expression der kleinen G-Proteine um eine Art Feedbackmechanismus. Da die Effektoraktivierung und damit die Signaltransduktion durch die membrangebundenen



GTPasen aufgrund der fehlenden Prenylierung ausbleiben, versucht die Zelle diesen Verlust durch eine gesteigerte Neusynthese der kleinen G-Proteine auszugleichen. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Theorie ist jedoch noch ungeklärt. Turner et al. führen den Anstieg der GTP-gebundenen Form der unprenylierten Rho-Proteine unter anderem darauf zurück, dass diese kaum in der Lage sind mit dem RhoGDI zu interagieren (Turner et al., 2008). Denn um eine Bindung mit der hydrophoben Tasche des RhoGDIs eingehen zu können, bedarf es der Prenylierung der kleinen G-Proteine (Scheffzek et al., 2000). Es wird angenommen, dass die Komplexierung mit RhoGDI das prenylierte GDP-gebundene Rho stabilisiert und vor der Proteolyse bewahren soll. Die unprenylierten GTPasen scheinen dagegen eine höhere Stabilität aufzuweisen als die jeweilige posttranslational-modifizierte Form. Dies konnte sowohl für RhoA als auch für RhoB nachgewiesen werden (Holstein et al., 2002a). Die Tatsache, dass es zur Anreicherung der aktiven Form der unprenylierten G-Proteine kommt, ist vermutlich weniger auf die Interaktion zwischen den GDP-gebundenen Rho-GTPasen und den entsprechenden GEFs, sondern vielmehr auf einen spontanen Nukleotidaustausch zurückzuführen (Turner et al., 2008). Dies scheint möglich, da die intrazellulären Spiegel des GTPs die des GDPs deutlich übersteigen (Carlucci et al., 1997) mit der Folge, dass die kleinen unprenylierten Proteine vermehrt GTP binden. Unter der Voraussetzung, dass dieser Nukleotidaustausch die spontane Hydrolyse des gebundenen GTPs übersteigt, kommt es zur intrazellulären Akkumulation der aktivierten Proteine (Dunford et al., 2006). Entgegen der verbreiteten Annahme, dass die Prenylierung der Rho Proteine eine Notwendigkeit für deren biologische Aktivität darstellt (Solski et al., 2002), scheinen auch die unprenylierten GTPasen mit Effektorproteinen zu interagieren und dadurch Signalkaskaden zu beeinflussen. Bereits 1997 konnte nachgewiesen werden, dass RhoB, unabhängig von dessen Prenylierung, in der Lage ist, die *serum response element* (SRE)-abhängige Transkription zu aktivieren (Lebowitz et al., 1997b). Ebenfalls dokumentiert ist die transkriptionale Aktivität unprenylierter Rho-Proteine am Beispiel humaner Erythroleukemia Zellen, die allerdings signifikant unter der der jeweiligen prenylierten Form liegt (Turner et al., 2008). In der 2006 veröffentlichten Publikation von Dunford et al. wurde unter anderem die durch N-BP induzierte Anreicherung neu synthetisierter Rac-GTPase dargestellt. An Makrophagen der Linie J774 konnte die Rac1-vermittelte Aktivierung des in den Prozess der Apoptose involvierten Proteins p38 durch den Einfluss potenter

Prenylierungshemmer nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Akkumulation der unprenylierten kleinen GTPasen zumindest teilweise an der Funktionalität der Arzneistoffe beteiligt ist und es zur unangemessenen Aktivierung nachgeschalteter Signalwege kommen kann. Wie ausgeprägt solche Effekte sind, scheint jedoch in entscheidendem Maße vom Zelltyp abhängig zu sein. Während N-BP in Osteoklasten-ähnlichen Zellen ebenfalls die Anreicherung des unprenylierten aktiven Rac-Proteins induzieren, kommt es bei diesem Zelltyp nicht zur p38-Aktivierung. Dies legt wiederum die Vermutung nahe, dass die Aktivierung p38s in Osteoklasten nicht über Rac vermittelt wird (Dunford et al., 2006).

Außer der Möglichkeit, dass potente Prenylierungshemmer durch die Akkumulation unprenylierten GTPasen die unangemessene Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden bewirken, könnte die Anreicherung der kleinen G-Proteine die Bildung inaktiver cytoplasmatischer Komplexe mit wichtigen Effektorproteinen der prenylierten Form der GTPasen begünstigen, die folglich für die Weiterleitung essentieller Signalkaskaden nicht mehr zur Verfügung stehen (Rogers et al., 2011) (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4** Potentielle Mechanismen, über die N-BP sowie Statine durch eine Reduktion der Rho-Prenylierung in zelluläre Signalkaskaden eingreifen.

Darstellung ist modifiziert nach (Rogers et al., 2011).

In diesem Zusammenhang sind auch die 2011 publizierten Ergebnisse einer Studie von Stubbs et al. interessant, in der der regulatorische Einfluss der posttranskriptionalen Prenylierung auf den Lebenszyklus der Rho-Proteine humaner Trabekel-Maschenwerk-Zellen (TMC) untersucht wurde. Neben einer deutlichen Steigerung der RhoA- und RhoB-Neusynthese, konnte eine Verlängerung der Halbwertszeit der beiden Proteine unter dem Einfluss des Isoprenoid-Synthesehemmers Lovastatin nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache hierfür wurde eine reduzierte proteosomale Degeneration der GTPasen beschrieben (Stubbs and Von Zee, 2012). Studien an humanen Erythroleukemiezellen von Holstein et. al legen die Vermutung nahe, dass Isoprenoidpyrophosphate eine direkte inhibitorische Wirkung auf die Expression der Rho-GTPasen besitzen (Holstein et al., 2002b). Die Tatsache, dass sich die Statin-induzierte Hochregulation der G-Proteine in anderen Untersuchungen durch Prenyltransferasehemmer imitieren lässt, zeigt

jedoch, dass auch die Prenylierung der GTPasen in erheblichem Maße an deren Regulation beteiligt sein muss. Auch die Ergebnisse dieser 2002 durchgeführten Studie zeigen, dass neben einem negativen Feedback auf der Ebene der mRNA-Expression, eine verminderten Proteindegeneration und somit eine Stabilisierung der Rho-GTPasen eine entscheidende Rolle spielt. Die Hochregulation der unprenylierten Proteine ist dennoch auf deren Neusynthese angewiesen, was sich darin zeigt, dass Cycloheximid den Statin-induzierten Effekt aufhebt (Stamatakis et al., 2002). Des Weiteren wurde bereits die Notwendigkeit der Prenylierung der Rho-Proteine zur Komplexierung mit RhoGDI angesprochen, die GDP-gebundenes Rho stabilisiert (Holstein et al., 2002a). Dies verdeutlicht die Komplexität der Rho-Protein-Regulation. Denn sowohl die Degradierung der GTPasen als auch deren Stabilisierung über RhoGDI ist abhängig von der posttranskriptionalen Prenylierung. Stubbs et al. stellen in der Veröffentlichung ihrer Untersuchungen die Exklusivität der Geranylgeranylierung bei der Regulation von RhoA und RhoB dar. Im Einklang mit den Ergebnissen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie ist ausschließlich GGOH und nicht FOH in der Lage die Effekte des Isoprenoid-Synthesehemmers Lovastatin zu antagonisieren. Nachgewiesen werden konnte, dass für die Degradierung (über das untersuchte 20S Proteosom) von neu-synthetisiertem RhoA- sowie RhoB-Protein deren Geranylgeranylierung erforderlich ist (Stubbs and Von Zee, 2012). Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass RhoB für dessen Membranassoziation sowohl geranylgeranyliert als auch farnesyliert werden kann, ist es möglich, dass der Zoledronat-bedingte Anstieg des fibroblastären RhoA- und RhoB-Levels in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung nicht nur auf deren verminderte Fähigkeit an Membranen zu binden (mit der Folge ausbleibender Effektor-Interaktionen) zurückzuführen sondern auch das Resultat einer stark reduzierten Proteindegradation ist. Bekannt ist, dass Unterschiede bezüglich der subzelluläre Lokalisation sowie der Funktionalisierung RhoBs bestehen, die von der Art der posttranskriptionalen Modifizierung abhängen (Lebowitz et al., 1997a). So ist es möglich, dass die beiden Prenylierungsformen in weiteren Eigenschaften divergieren und unterschiedlichen Einfluss auf die komplexen Regulationsmechanismen der Rho-Proteine nehmen.

Unabhängig von den zugrundeliegenden Regulationsmechanismen, verdeutlichen die Ergebnisse der Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit, dass sich GGOH auch auf der Ebene der getesteten Proteine gingivaler Fibroblasten als potent

erweist, die durch Zoledronat hervorgerufenen Effekte zu antagonisieren. Im Einklang mit den Resultaten der durchgeführten Zellversuche zeigt sich FOH demgegenüber nicht in der Lage, die Wirkung des N-BP abzuschwächen. Die Tatsache, dass auch eine posttranslationale Farnesylierung die Membranassoziation RhoBs ermöglicht, FOH die Zoledronat-induzierte Hochregulation des Proteins jedoch nicht verhindert, bekräftigt die Vermutung, dass die N-BP-induzierten Effekte nicht allein auf die reduzierte Fähigkeit der kleinen GTPasen an Membranen zu binden zurückzuführen sein kann.

## 6 Zusammenfassung

Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose (BP-ONJ) der Kiefer stellt eine ernstzunehmende Nebenwirkung der Therapie mit stickstoffhaltigen Bisphosphonaten (N-BP) dar, deren Ätiologie bisher noch nicht vollständig geklärt ist. Da entzündliche Prozesse eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit der Einfluss verschiedener Bisphosphonate auf die Mechanismen der granulozytären Erregerabwehr untersucht. Während die N-BP Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat den prozentualen Anteil phagozytierender Granulozyten leicht steigerten, wurde deren oxidativer Burst in weit höherem Maße beeinflusst. Bereits 2,5µM Zoledronats bewirkten eine knappe Verfünffachung der Zahl neutrophiler Granulozyten, die reaktive Sauerstoffmetabolite produzierte. Unter Ibandronat und Pamidronat wurde dieses Niveau erst in zehnmal höheren Konzentrationen erreicht. Die Burstaktivität pro Zelle konnte hingegen auf knapp 150% gesteigert werden. Auch hier erwies sich Zoledronat bereits in niedrigen Konzentrationen als potentestes Bisphosphonat. Interessanterweise wurde die durch das Chemokin fMLP stimulierte Chemotaxis der Granulozyten durch Ibandronat und Zoledronat um fast die Hälfte reduziert. Das stickstofffreie Bisphosphonat Clodronat zeigte in keiner der in-vitro Untersuchungen einen Effekt auf die Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten, was mit der fehlenden Assoziation zwischen stickstofffreien Bisphosphonaten und der BP-ONJ korreliert. Die Ergebnisse machen deutlich, dass N-BP die neutrophile Erregerabwehr beeinflussen, wobei der Effekt der reduzierten Chemotaxis aufgrund der hohen Neutrophilen-Dichte in den Weichteilregionen, die in Kontakt zum Kieferknochen stehen, wohl eher zu vernachlässigen ist. Auch wenn die Frequenz der Ereignisse im pathologischen Geschehen noch unklar ist, scheint es einen Zusammenhang zwischen einer lokalen Entzündungsreaktion und der Nekrose-Entwicklung zu geben. Dies spricht für die Notwendigkeit keimreduzierender Maßnahmen sowohl bei Patienten, die mit N-BP therapiert werden, als auch bei Patienten, die bereits eine BP-ONJ entwickelt haben. Diese können von antibakteriellen Mundspülungen bis zur systemischen Antibiose reichen.

Den zweiten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellt die Suche nach Möglichkeiten dar, kausal in die Entwicklung und das Fortschreiten der BP-ONJ einzugreifen. Neben ihrer Wirkung auf den Knochenstoffwechsel beeinflussen N-BP

zahlreiche andere Zellarten, deren Funktionsbeeinträchtigungen mit der Pathogenese der BP-ONJ assoziiert sind. Ein Ansatz besteht deshalb darin, die Wirkung der N-BP gezielt zu inhibieren, um die entsprechenden Zellen vor der Schädigung zu bewahren. Den zellulären Angriffspunkt der N-BP stellt die Farnesylpyrophosphat Synthase, ein Enzym des Mevalonatstoffwechsels, dar. Durch dessen Blockade wird die Synthese der Isoprenoide Farnesyl Pyrophosphat (FPP) und Geranylgeranyl Pyrophosphat (GGPP), die zur posttranslationale Prenylierung kleiner GTPasen benötigt werden, gehindert. Die Hemmung der Isoprenoidsynthese hat eine mangelnde Membranassoziation der kleinen GTPasen und den Verlust essentieller Signalwege zur Folge. Durch die Substitution externen Geranylgeraniols (GGOH) gelingt es bisher in-vitro die N-BP-Wirkung zu antagonisieren.

Mit der Absicht weitere potentielle Substanzen zu finden, die die N-BP-induzierte Blockade umgehen können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit andere Verbindungen mit Isoprenoidstruktur untersucht. Getestet wurden Farnesol (FOH) und Squalene, beides Intermediate des Mevalonatstoffwechsels sowie die natürlichen Isoprenoide Eugenol, R-Limonene und Menthol, jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen. Gegenstand der Studie war die Untersuchung von Vitalität, Migrationsfähigkeit und Architektur des Zytoskeletts gingivaler Fibroblasten, HUVEC (*Human umbilicord vein endothelial cells*) und Osteoblasten. Außer GGOH zeigte sich keine der getesteten Verbindungen in der Lage die untersuchten Zellen vor der schädigenden Wirkung Zoledronats zu bewahren.

Eine weitere Untersuchung basierte auf der Theorie, dass stickstofffreie Bisphosphonate (nicht-N-BP) möglicherweise spezifische N-BP-Transporter auf der Oberfläche von Zellen blockieren und dadurch die intrazelluläre Anreicherung der zytotoxischen N-BP verhindern. In der durchgeführten in-vitro Studie wurde der Einfluss des nicht-N-BP Clodronat auf die vitalitätsschädigende Wirkung des N-BP Zoledronat auf gingivale Fibroblasten, HUVEC, Osteoblasten und Keratinozyten getestet. Jedoch profitierte einzig die Keratinozytenvitalität von der Kombinationsbehandlung, wenn auch nur in geringem Maße.

Um die Vorgänge, die möglicherweise an der Pathogenese der BP-ONJ beteiligt sind, auf Protein-Ebene zu analysieren, wurde der Einfluss Zoledronats auf die Tyrosinkinasen Paxillin und FAK (Fokale Adhäsionskinase), auf deren phosphorylierte Formen Phospho-Paxillin (Tyr118) und Phospho-FAK (Tyr925) sowie

auf die beiden kleinen GTPasen RhoA und RhoB gingivaler Fibroblasten untersucht. Gegenstand der Studie war darüber hinaus der Einfluss einer Kombinationsbehandlung aus Zoledronat und GGOH bzw. Zoledronat und Farnesol auf die genannten Proteine. Während mittels Western-Blot und anschließender immunologischer Detektion kaum ein Einfluss der getesteten Substanzen auf den zellulären Paxillin- bzw. FAK-Gehalt nachgewiesen werden konnte, war eine Reduktion der jeweiligen phosphorylierten Form der beiden Proteine durch Zoledronat zu erkennen. Diese beobachteten Effekte wiesen zwar keine statistische Signifikanz auf, konnten allerdings mit GGOH, nicht jedoch mit Farnesol, antagonisiert werden. Statistische Signifikanz besaß dagegen der Zoledronat-induzierte Anstieg der fibroblastären RhoA- und RhoB-Expression. Da RhoA ausschließlich durch Geranylgeranylierung posttranslational modifiziert wird, ist die Exklusivität der Antagonisierung der Zoledronat-bedingten Hochregulation leicht zu erklären. Erstaunlich ist jedoch, dass auch der Anstieg der Zoledronat-induzierten RhoB-Expression ausschließlich durch GGOH verhindert wurde, obwohl RhoB ebenfalls durch Farnesylierung posttranslational modifiziert werden kann.

Auf die Western-Blot-Versuche aufbauend, konnte mittels modifiziertem ELISA festgestellt werden, dass es unter Zoledronat (auf durch mit GGOH und nicht mit Farnesol antagonisierbare Weise) zu einer Anreicherung der biologisch aktiven Form RhoAs in gingivalen Fibroblasten kommt. Dies unterstützt die Theorie, dass nicht allein der durch die mangelnde Prenylierung kleiner GTPasen bedingte Verlust essentieller Membran-assoziiierter Signalkaskaden für die Wirkung der N-BP verantwortlich ist. Durch die intrazelluläre Akkumulation der aktiven Form unprenylierter GTPasen könnte es zur unangemessenen Aktivierung von Signalwegen kommen, die bisher noch unbekannt, möglicherweise an der Entwicklung der BP-ONJ beteiligte Effekte auf die untersuchten Zellen ausüben.

Sowohl die durchgeführten Zellversuche als auch die Untersuchungen auf Proteinebene verdeutlichen das bisher exklusive Potential GGOHs, die N-BP-induzierten Effekte zu antagonisieren. Damit stellt das natürliche Isoprenoid den vielversprechendsten Ansatzpunkt dar, das pathologische Geschehen der BP-ONJ kausal zu beeinflussen und deren Entwicklung möglicherweise gezielt zu verhindern.



## 7 Literatur

AAMOS, 2007. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 369-376.

Aapro, M., Abrahamsson, P.A., Body, J.J., Coleman, R.E., Colomer, R., Costa, L., Crino, L., Dirix, L., Gnant, M., Gralow, J., Hadji, P., Hortobagyi, G.N., Jonat, W., Lipton, A., Monnier, A., Paterson, A.H., Rizzoli, R., Saad, F., Thurlimann, B., 2008. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol* 19, 420-432.

Aarden, E.M., Burger, E.H., Nijweide, P.J., 1994. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55, 287-299.

Abe, Y., Kawakami, A., Nakashima, T., Ejima, E., Fujiyama, K., Kiriya, T., Ide, A., Sera, N., Usa, T., Tominaga, T., Ashizawa, K., Yokoyama, N., Eguchi, K., 2000. Etidronate inhibits human osteoblast apoptosis by inhibition of pro-apoptotic factor(s) produced by activated T cells. *J Lab Clin Med* 136, 344-354.

Abu-Id, M.H., Acil, Y., Gottschalk, J., Kreuzsch, T., 2006. [Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10, 73-81.

Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A., Tilbrook, P.A., 1992a. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267, 20033-20038.

Adamson, P., Paterson, H.F., Hall, A., 1992b. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* 119, 617-627.

Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S.M., Munoz-Antonia, T., 2002. Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 8, 2225-2232.

Adornato, M.C., Morcos, I., Rozanski, J., 2007. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. *J Am Dent Assoc* 138, 971-977.

Agrati, C., Cimini, E., Sacchi, A., Bordoni, V., Gioia, C., Casetti, R., Turchi, F., Tripodi, M., Martini, F., 2009. Activated V gamma 9V delta 2 T cells trigger granulocyte functions via MCP-2 release. *J Immunol* 182, 522-529.

Allen, M.R., Burr, D.B., 2009. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 61-70.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K., 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271, 20246-20249.

Amling, M., Dellling, G., 1996. [Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption]. *Pathologe* 17, 358-367.

- Aparicio, A., Gardner, A., Tu, Y., Savage, A., Berenson, J., Lichtenstein, A., 1998. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 12, 220-229.
- Assouline-Dayana, Y., Chang, C., Greenspan, A., Shoenfeld, Y., Gershwin, M.E., 2002. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum* 32, 94-124.
- Bagan, J.V., Jimenez, Y., Murillo, J., Hernandez, S., Poveda, R., Sanchis, J.M., Diaz, J.M., Scully, C., 2006. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol* 42, 327-329.
- Bamias, A., Kastiritis, E., Bamia, C., Moulopoulos, L.A., Melakopoulos, I., Bozas, G., Koutsoukou, V., Gika, D., Anagnostopoulos, A., Papadimitriou, C., Terpos, E., Dimopoulos, M.A., 2005. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 23, 8580-8587.
- Bartl, R., 2008. Osteoporose. Prävention- Diagnostik- Therapie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Bartl, R., von Tresckow, E., Bartl, C. , 2006. Bisphosphonat-Manual. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Battmann, A., Jundt, G., Schulz, A., 1997. Endosteal human bone cells (EBC) show age-related activity in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105, 98-102.
- Berenson, J., Hirschberg, R., 2004. Safety and convenience of a 15-minute infusion of zoledronic acid. *Oncologist* 9, 319-329.
- Berenson, J.R., Hillner, B.E., Kyle, R.A., Anderson, K., Lipton, A., Yee, G.C., Biermann, J.S., 2002. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 20, 3719-3736.
- Bishop, A.L., Hall, A., 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255.
- Boonyapakorn, T., Schirmer, I., Reichart, P.A., Sturm, I., Massenkeil, G., 2008. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 44, 857-869.
- Bosshardt, D.D., Lang, N.P., 2005. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res* 84, 9-20.
- Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., Lifton, R.P., 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346, 1513-1521.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.

Brunton, V.G., Avizienyte, E., Fincham, V.J., Serrels, B., Metcalf, C.A., 3rd, Sawyer, T.K., Frame, M.C., 2005. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res* 65, 1335-1342.

Campisi, G., Di Fede, O., Musciotto, A., Lo Casto, A., Lo Muzio, L., Fulfaro, F., Badalamenti, G., Russo, A., Gebbia, N., 2007. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): run dental management designs and issues in diagnosis. *Ann Oncol* 18 Suppl 6, vi168-172.

Canalis, E., Delany, A.M., 2002. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann N Y Acad Sci* 966, 73-81.

Cao, X., Chen, D., 2005. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 357, 1-8.

Carlucci, F., Rosi, F., Di Pietro, C., Marinello, E., Pizzichini, M., Tabucchi, A., 1997. Purine nucleotide metabolism: specific aspects in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1360, 203-210.

Casey, P.J., 1992. Biochemistry of protein prenylation. *J Lipid Res* 33, 1731-1740.

Chen, T.C., Lai, C.H., Chang, J.L., Chang, S.W., 2012. Mitomycin C retardation of corneal fibroblast migration via sustained dephosphorylation of paxillin at tyrosine 118. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 1539-1547.

Cheng, Y.Y., Huang, L., Lee, K.M., Li, K., Kumta, S.M., 2004. Alendronate regulates cell invasion and MMP-2 secretion in human osteosarcoma cell lines. *Pediatr Blood Cancer* 42, 410-415.

Christodoulou, C., Pervena, A., Klouvas, G., Galani, E., Falagas, M.E., Tsakalos, G., Visvikis, A., Nikolakopoulou, A., Acholos, V., Karapanagiotidis, G., Batziou, E., Skarlos, D.V., 2009. Combination of bisphosphonates and antiangiogenic factors induces osteonecrosis of the jaw more frequently than bisphosphonates alone. *Oncology* 76, 209-211.

Cipriani, B., Borsellino, G., Poccia, F., Placido, R., Tramonti, D., Bach, S., Battistini, L., Brosnan, C.F., 2000. Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood* 95, 39-47.

Clohisy, D.R., PF, O.K., Ramnaraine, M.L., 2001. Pamidronate decreases tumor-induced osteoclastogenesis in osteopetrotic mice. *J Orthop Res* 19, 554-558.

Colicelli, J., 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004, RE13.

Condliffe, A.M., Davidson, K., Anderson, K.E., Ellson, C.D., Crabbe, T., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., Turner, M., Webb, L., Wymann, M.P., Hirsch, E., Ruckle, T., Camps, M., Rommel, C., Jackson, S.P., Chilvers, E.R., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., 2005. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* 106, 1432-1440.

- Connor, A.M., Berger, S., Narendran, A., Keystone, E.C., 2006. Inhibition of protein geranylgeranylation induces apoptosis in synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 8, R94.
- Conte, P., Guarneri, V., 2004. Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens. *Oncologist* 9 Suppl 4, 28-37.
- Coughlan, A.M., Freeley, S.J., Robson, M.G., 2012. Humanised mice have functional human neutrophils. *J Immunol Methods* 385, 96-104.
- Cox, A.D., Der, C.J., 2010. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* 1, 2-27.
- Coxon, F.P., Taylor, A., 2008. Vesicular trafficking in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 19, 424-433.
- Crepin, S., Laroche, M.L., Sarry, B., Merle, L., 2010. Osteonecrosis of the jaw induced by clodronate, an alkylbiphosphonate: case report and literature review. *Eur J Clin Pharmacol* 66, 547-554.
- Crick, D.C., Andres, D.A., Waechter, C.J., 1997. Novel salvage pathway utilizing farnesol and geranylgeraniol for protein isoprenylation. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 483-487.
- Crockett, J.C., Mellis, D.J., Scott, D.I., Helfrich, M.H., 2011a. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int* 22, 1-20.
- Crockett, J.C., Rogers, M.J., Coxon, F.P., Hocking, L.J., Helfrich, M.H., 2011b. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124, 991-998.
- Crowell, P.L., Chang, R.R., Ren, Z.B., Elson, C.E., Gould, M.N., 1991. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. *J Biol Chem* 266, 17679-17685.
- Curi, M.M., Cossolin, G.S., Koga, D.H., Araujo, S.R., Feher, O., dos Santos, M.O., Zardetto, C., 2007. Treatment of avascular osteonecrosis of the mandible in cancer patients with a history of bisphosphonate therapy by combining bone resection and autologous platelet-rich plasma: Report of 3 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 349-355.
- de Groen, P.C., Lubbe, D.F., Hirsch, L.J., Daifotis, A., Stephenson, W., Freedholm, D., Pryor-Tillotson, S., Seleznick, M.J., Pinkas, H., Wang, K.K., 1996. Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med* 335, 1016-1021.
- Denoyelle, C., Hong, L., Vannier, J.P., Soria, J., Soria, C., 2003. New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer* 88, 1631-1640.
- Deramautd, T.B., Dujardin, D., Hamadi, A., Noulet, F., Kolli, K., De Mey, J., Takeda, K., Ronde, P., 2011. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol Biol Cell* 22, 964-975.

- Dicuonzo, G., Vincenzi, B., Santini, D., Avvisati, G., Rocci, L., Battistoni, F., Gavasci, M., Borzomati, D., Coppola, R., Tonini, G., 2003. Fever after zoledronic acid administration is due to increase in TNF-alpha and IL-6. *J Interferon Cytokine Res* 23, 649-654.
- Diel, I.J., Fogelman, I., Al-Nawas, B., Hoffmeister, B., Migliorati, C., Gligorov, J., Vaananen, K., Pylkkanen, L., Pecherstorfer, M., Aapro, M.S., 2007. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino- and non-aminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol* 64, 198-207.
- Dixon, R.D., Chen, Y., Ding, F., Khare, S.D., Prutzman, K.C., Schaller, M.D., Campbell, S.L., Dokholyan, N.V., 2004. New insights into FAK signaling and localization based on detection of a FAT domain folding intermediate. *Structure* 12, 2161-2171.
- Dolder, S., Hofstetter, W., Wetterwald, A., Muhlbauer, R.C., Felix, R., 2006. Effect of monoterpenes on the formation and activation of osteoclasts in vitro. *J Bone Miner Res* 21, 647-655.
- Dovas, A., Couchman, J.R., 2005. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 390, 1-9.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G., 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
- Dunford, J.E., Rogers, M.J., Ebetino, F.H., Phipps, R.J., Coxon, F.P., 2006. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *J Bone Miner Res* 21, 684-694.
- Dunford, J.E., Thompson, K., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Hahn, F.M., Poulter, C.D., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2001. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 235-242.
- Engel, M.E., Datta, P.K., Moses, H.L., 1998. RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem* 273, 9921-9926.
- Fisher, J.E., Rogers, M.J., Halasy, J.M., Luckman, S.P., Hughes, D.E., Masarachia, P.J., Wesolowski, G., Russell, R.G., Rodan, G.A., Reszka, A.A., 1999. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 133-138.
- Fleisch, H., 2002. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 4, 30-34.
- Fleisch, H., 2003. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J* 12 Suppl 2, S142-146.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., 2005. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Münschen: Urban & Fischer Verlag.

Fournier, P., Boissier, S., Filleur, S., Guglielmi, J., Cabon, F., Colombel, M., Clezardin, P., 2002. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 62, 6538-6544.

Freiberger, J.J., 2009. Utility of hyperbaric oxygen in treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 96-106.

Frith, J.C., Monkkonen, J., Blackburn, G.M., Russell, R.G., Rogers, M.J., 1997. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 12, 1358-1367.

Fritz, G., Kaina, B., 1997. rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 272, 30637-30644.

Garcia-Mata, R., Boulter, E., Burridge, K., 2012. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 493-504.

Garcia, V.E., Sieling, P.A., Gong, J., Barnes, P.F., Uyemura, K., Tanaka, Y., Bloom, B.R., Morita, C.T., Modlin, R.L., 1997. Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J Immunol* 159, 1328-1335.

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

Glass, D.A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A., Karsenty, G., 2005. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8, 751-764.

Gober, H.J., Kistowska, M., Angman, L., Jeno, P., Mori, L., De Libero, G., 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 197, 163-168.

Goffinet, M., Thoulouzan, M., Pradines, A., Lajoie-Mazenc, I., Weinbaum, C., Faye, J.C., Seronie-Vivien, S., 2006. Zoledronic acid treatment impairs protein geranylgeranylation for biological effects in prostatic cells. *BMC Cancer* 6, 60.

Gomez, B., Jr., Ardakani, S., Ju, J., Jenkins, D., Cerelli, M.J., Daniloff, G.Y., Kung, V.T., 1995. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 41, 1560-1566.

Goodin, S., Rao, K.V., DiPaola, R.S., 2002. State-of-the-art treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Oncologist* 7, 360-370.

Grotz, K.A., Piesold, J.U., Al-Nawas, B., 2012. S3-Leitlinie: Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Stand 4/2012. DGMKG AWMF online

Grotz, K.A., Walter, C., Kuttner, C., Al-Nawas, B., 2007. [Relevance of bisphosphonate long-term therapy in radiation therapy of endosteal jaw metastases]. *Strahlenther Onkol* 183, 190-194.

Guney, E., Kisakol, G., Ozgen, A.G., Yilmaz, C., Kabalak, T., 2008. Effects of bisphosphonates on lipid metabolism. *Neuro Endocrinol Lett* 29, 252-255.

Hall, A., 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.

Hansen, T., Kunkel, M., Springer, E., Walter, C., Weber, A., Siegel, E., Kirkpatrick, C.J., 2007. Actinomycosis of the jaws--histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Arch* 451, 1009-1017.

Hardcastle, I.R., Rowlands, M.G., Barber, A.M., Grimshaw, R.M., Mohan, M.K., Nutley, B.P., Jarman, M., 1999. Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene. *Biochem Pharmacol* 57, 801-809.

Harper, R.P., Fung, E., 2007. Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone [rhPTH(1-34)]. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 573-580.

Herford, A.S., Boyne, P.J., 2008. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg* 66, 616-624.

Hewitt, R.E., Lissina, A., Green, A.E., Slay, E.S., Price, D.A., Sewell, A.K., 2005. The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins. *Clin Exp Immunol* 139, 101-111.

Hinrichs, B., Dreyer, T., Battmann, A., Schulz, A., 1993. Histomorphometry of active osteoblast surface labelled by antibodies against non-collagenous bone matrix proteins. *Bone* 14, 469-472.

Hoff, A.O., Toth, B.B., Altundag, K., Johnson, M.M., Warneke, C.L., Hu, M., Nooka, A., Sayegh, G., Guarneri, V., Desrouleaux, K., Cui, J., Adamus, A., Gagel, R.F., Hortobagyi, G.N., 2008. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 23, 826-836.

Holstein, S.A., Wohlford-Lenane, C.L., Hohl, R.J., 2002a. Consequences of mevalonate depletion. Differential transcriptional, translational, and post-translational up-regulation of Ras, Rap1a, RhoA, AND RhoB. *J Biol Chem* 277, 10678-10682.

Holstein, S.A., Wohlford-Lenane, C.L., Hohl, R.J., 2002b. Isoprenoids influence expression of Ras and Ras-related proteins. *Biochemistry* 41, 13698-13704.

Hori, Y., 1992. Function of the post-translationally modified C-terminal region of rho p21. *Kobe J Med Sci* 38, 79-92.

- Huang, Z., Yan, D.P., Ge, B.X., 2008. JNK regulates cell migration through promotion of tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cell Signal* 20, 2002-2012.
- Hughes, D.E., Wright, K.R., Uy, H.L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Boyce, B.F., 1995. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10, 1478-1487.
- Isomura, M., Kikuchi, A., Ohga, N., Takai, Y., 1991. Regulation of binding of rhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *Oncogene* 6, 119-124.
- Itoh, F., Aoyagi, S., Furihata-Komatsu, H., Aoki, M., Kusama, H., Kojima, M., Kogo, H., 2003. Clodronate stimulates osteoblast differentiation in ST2 and MC3T3-E1 cells and rat organ cultures. *Eur J Pharmacol* 477, 9-16.
- Jadu, F., Lee, L., Pharoah, M., Reece, D., Wang, L., 2007. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Ann Oncol* 18, 2015-2019.
- Jan, M.S., Huang, Y.H., Shieh, B., Teng, R.H., Yan, Y.P., Lee, Y.T., Liao, K.K., Li, C., 2006. CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41, 6-16.
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C., Neefjes, J., 2005. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070-1077.
- Jung, A., Bisaz, S., Fleisch, H., 1973. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif Tissue Res* 11, 269-280.
- Kabelitz, D., 2008. Small molecules for the activation of human gammadelta T cell responses against infection. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 3, 1-9.
- Kato, K., Cox, A.D., Hisaka, M.M., Graham, S.M., Buss, J.E., Der, C.J., 1992. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6403-6407.
- Kimmel, D.B., 2007. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res* 86, 1022-1033.
- Komatsubara, S., Mori, S., Mashiba, T., Li, J., Nonaka, K., Kaji, Y., Akiyama, T., Miyamoto, K., Cao, Y., Kawanishi, J., Norimatsu, H., 2004. Suppressed bone turnover by long-term bisphosphonate treatment accumulates microdamage but maintains intrinsic material properties in cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Res* 19, 999-1005.
- Kos, M., Junka, A., Smutnicka, D., Bartoszewicz, M., Kurzynowski, T., Gluza, K., 2013. Pamidronate Enhances Bacterial Adhesion to Bone Hydroxyapatite. Another Puzzle in the Pathology of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg*.



- Kuiper, J.W., Forster, C., Sun, C., Peel, S., Glogauer, M., 2012. Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. *Br J Pharmacol* 165, 532-539.
- Kunzmann, V., Bauer, E., Feurle, J., Weissinger, F., Tony, H.P., Wilhelm, M., 2000. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96, 384-392.
- Kurth, A.A., Heidenreich, A., Diel, I., 2007. [Bisphosphonates in oncology]. *Orthopade* 36, 131-135.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., Kousteni, S., Sinha, S., Garrett-Sinha, L., Raghavan, S., 2008. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* 66, 839-847.
- Lebowitz, P.F., Casey, P.J., Prendergast, G.C., Thissen, J.A., 1997a. Farnesyltransferase inhibitors alter the prenylation and growth-stimulating function of RhoB. *J Biol Chem* 272, 15591-15594.
- Lebowitz, P.F., Du, W., Prendergast, G.C., 1997b. Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem* 272, 16093-16095.
- Lehrer, S., Montazem, A., Ramanathan, L., Pessin-Minsley, M., Pfail, J., Stock, R.G., Kogan, R., 2009. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws, bone markers, and a hypothesized candidate gene. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 159-161.
- Lesclous, P., Abi Najm, S., Carrel, J.P., Baroukh, B., Lombardi, T., Willi, J.P., Rizzoli, R., Saffar, J.L., Samson, J., 2009. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a key role of inflammation? *Bone* 45, 843-852.
- Lin, J.H., 1996. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18, 75-85.
- Little, R.D., Carulli, J.P., Del Mastro, R.G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S.P., Swain, P.M., Zhao, S.C., Eustace, B., Lappe, M.M., Spitzer, L., Zweier, S., Braunschweiger, K., Benchekroun, Y., Hu, X., Adair, R., Chee, L., FitzGerald, M.G., Tulig, C., Caruso, A., Tzellas, N., Bawa, A., Franklin, B., McGuire, S., Noguez, X., Gong, G., Allen, K.M., Anisowicz, A., Morales, A.J., Lomedico, P.T., Recker, S.M., Van Eerdewegh, P., Recker, R.R., Johnson, M.L., 2002. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 70, 11-19.
- Liu, A., Du, W., Liu, J.P., Jessell, T.M., Prendergast, G.C., 2000. RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors. *Mol Cell Biol* 20, 6105-6113.
- Ljusberg, J., Wang, Y., Lang, P., Norgard, M., Dodds, R., Hultenby, K., Ek-Rylander, B., Andersson, G., 2005. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-

resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J Biol Chem* 280, 28370-28381.

Magnetto, S., Boissier, S., Delmas, P.D., Clezardin, P., 1999. Additive antitumor activities of taxoids in combination with the bisphosphonate ibandronate against invasion and adhesion of human breast carcinoma cells to bone. *Int J Cancer* 83, 263-269.

Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K., Aubin, J.E., 1994. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 158, 555-572.

Marcuzzi, A., Tommasini, A., Crovella, S., Pontillo, A., 2010. Natural isoprenoids inhibit LPS-induced-production of cytokines and nitric oxide in aminobisphosphonate-treated monocytes. *Int Immunopharmacol* 10, 639-642.

Marx, R.E., 2003. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61, 1115-1117.

Marx, R.E., Cillo, J.E., Jr., Ulloa, J.J., 2007. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 2397-2410.

Marx, R.E., Sawatari, Y., Fortin, M., Broumand, V., 2005. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 63, 1567-1575.

Mashiba, T., Mori, S., Burr, D.B., Komatsubara, S., Cao, Y., Manabe, T., Norimatsu, H., 2005. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Metab* 23 Suppl, 36-42.

Matura, M., Goossens, A., Bordalo, O., Garcia-Bravo, B., Magnusson, K., Wrangsjö, K., Karlberg, A.T., 2002. Oxidized citrus oil (R-limonene): a frequent skin sensitizer in Europe. *J Am Acad Dermatol* 47, 709-714.

Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., Philips, M.R., 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 152, 111-126.

Migliaccio, S., Davis, V.L., Gibson, M.K., Gray, T.K., Korach, K.S., 1992. Estrogens modulate the responsiveness of osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) stably transfected with estrogen receptor. *Endocrinology* 130, 2617-2624.

Migliorati, C.A., Siegel, M.A., Elting, L.S., 2006. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol* 7, 508-514.

Miller, S.C., Bowman, B.M., Smith, J.M., Jee, W.S., 1980. Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec* 198, 163-173.

Mo, H., Elson, C.E., 2004. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 567-585.

Molnar, G., Dagher, M.C., Geiszt, M., Settleman, J., Ligeti, E., 2001. Role of prenylation in the interaction of Rho-family small GTPases with GTPase activating proteins. *Biochemistry* 40, 10542-10549.

Montazeri, A.H., Erskine, J.G., McQuaker, I.G., 2007. Oral sodium clodronate induced osteonecrosis of the jaw in a patient with myeloma. *Eur J Haematol* 79, 69-71.

Muhlbauer, R.C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A., Felix, R., 2003. Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. *Bone* 32, 372-380.

Nair, S.P., Meghji, S., Wilson, M., Reddi, K., White, P., Henderson, B., 1996. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* 64, 2371-2380.

Nastro, E., Musolino, C., Allegra, A., Oteri, G., Cicciu, M., Alonci, A., Quartarone, E., Alati, C., De Ponte, F.S., 2007. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast cancer. *Acta Haematol* 117, 181-187.

Neamati, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J., McConkey, D.J., 1995. Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J Immunol* 154, 3788-3795.

Nesbitt, S.A., Horton, M.A., 1997. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 276, 266-269.

Nijweide, P.J., Burger, E.H., Feyen, J.H., 1986. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66, 855-886.

Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Kuroda, J., Segawa, H., Sato, K., Yokota, A., Koizumi, M., Maekawa, T., 2005. Zoledronic acid mediates Ras-independent growth inhibition of prostate cancer cells. *Oncol Res* 15, 1-9.

Oades, G.M., Senaratne, S.G., Clarke, I.A., Kirby, R.S., Colston, K.W., 2003. Nitrogen containing bisphosphonates induce apoptosis and inhibit the mevalonate pathway, impairing Ras membrane localization in prostate cancer cells. *J Urol* 170, 246-252.

Oizumi, T., Funayama, H., Yamaguchi, K., Yokoyama, M., Takahashi, H., Yamamoto, M., Kuroishi, T., Kumamoto, H., Sasaki, K., Kawamura, H., Sugawara, S., Endo, Y., 2010. Inhibition of necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) and their elimination from bone by etidronate (a non-NBP): a proposal for possible utilization of etidronate as a substitution drug for NBPs. *J Oral Maxillofac Surg* 68, 1043-1054.

Oizumi, T., Yamaguchi, K., Funayama, H., Kuroishi, T., Kawamura, H., Sugawara, S., Endo, Y., 2009. Necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates and their inhibition by clodronate, a non-nitrogen-containing bisphosphonate in mice: potential

for utilization of clodronate as a combination drug with a nitrogen-containing bisphosphonate. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104, 384-392.

Ostad, M., Shu, W.P., Kong, L., Liu, B.C., 1996. Ha-ras oncogene expression abrogates a pH dependent endonuclease activity of apoptosis in normal rat kidney cells. *Cancer Lett* 98, 175-182.

Otto, S., Hafner, S., Grotz, K.A., 2009. The role of inferior alveolar nerve involvement in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 589-592.

Otto, S., Pautke, C., Opelz, C., Westphal, I., Drosse, I., Schwager, J., Bauss, F., Ehrenfeld, M., Schieker, M., 2010. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg* 68, 2837-2845.

Pabst, A.M., Ziebart, T., Koch, F.P., Taylor, K.Y., Al-Nawas, B., Walter, C., 2011. The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes--in vitro study. *Clin Oral Investig* 16, 87-93.

Palokangas, H., Mulari, M., Vaananen, H.K., 1997. Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J Cell Sci* 110 ( Pt 15), 1767-1780.

Pan, B., Farrugia, A.N., To, L.B., Findlay, D.M., Green, J., Lynch, K., Zannettino, A.C., 2004. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 19, 147-154.

Parsons, J.T., Martin, K.H., Slack, J.K., Taylor, J.M., Weed, S.A., 2000. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19, 5606-5613.

Patel, T., Ishiujji, Y., Yosipovitch, G., 2007. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *J Am Acad Dermatol* 57, 873-878.

Pavlakakis, N., Schmidt, R., Stockler, M., 2005. Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003474.

Pazianas, M., Miller, P., Blumentals, W.A., Bernal, M., Kothawala, P., 2007. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clin Ther* 29, 1548-1558.

Peffley, D.M., Gayen, A.K., 2003. Plant-derived monoterpenes suppress hamster kidney cell 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase synthesis at the post-transcriptional level. *J Nutr* 133, 38-44.

Pfeilschifter, J., Diel, I., Pilz, U., Brunotte, K., Naumann, A., Ziegler, R., 1993. Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *J Bone Miner Res* 8, 707-717.

- Plotkin, L.I., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Roberson, P.K., Manolagas, S.C., Bellido, T., 1999. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104, 1363-1374.
- Poccia, F., Agrati, C., Martini, F., Mejia, G., Wallace, M., Malkovsky, M., 2005.  $\gamma\delta$  T cell-mediated non-cytolytic antiviral mechanisms and their potential for cell-based therapy. *Immunol Lett* 100, 14-20.
- Pramod, K., Ansari, S.H., Ali, J., 2010. Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. *Nat Prod Commun* 5, 1999-2006.
- Prendergast, G.C., 2001. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1, 162-168.
- Quinn, J.M., Neale, S., Fujikawa, Y., McGee, J.O., Athanasou, N.A., 1998. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int* 62, 527-531.
- Reginster, J.Y., 1992. Calcitonin and bone diseases. *Lancet* 339, 1064-1065.
- Reginster, J.Y., Deroisy, R., Fontaine, M.A., Franchimont, P., 1992. Influence of estrogen replacement therapy on endogenous calcitonin production rates. *Gynecol Endocrinol* 6, 65-71.
- Reid, I.R., 2009. Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone* 44, 4-10.
- Reid, I.R., Bolland, M.J., Grey, A.B., 2007. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone* 41, 318-320.
- Reid, I.R., Cundy, T., 2009. Osteonecrosis of the jaw. *Skeletal Radiol* 38, 5-9.
- Ridley, A.J., Hall, A., 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Riebeling, C., Forsea, A.M., Raisova, M., Orfanos, C.E., Geilen, C.C., 2002. The bisphosphonate pamidronate induces apoptosis in human melanoma cells in vitro. *Br J Cancer* 87, 366-371.
- Rodan, G.A., Fleisch, H.A., 1996. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest* 97, 2692-2696.
- Roelofs, A.J., Jauhainen, M., Monkkonen, H., Rogers, M.J., Monkkonen, J., Thompson, K., 2009. Peripheral blood monocytes are responsible for  $\gamma\delta$  T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol* 144, 245-250.
- Roelofs, A.J., Thompson, K., Gordon, S., Rogers, M.J., 2006. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 12, 6222s-6230s.
- Rogers, M.J., 2003. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 9, 2643-2658.

Rogers, M.J., Chilton, K.M., Coxon, F.P., Lawry, J., Smith, M.O., Suri, S., Russell, R.G., 1996. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res* 11, 1482-1491.

Rogers, M.J., Crockett, J.C., Coxon, F.P., Monkkinen, J., 2011. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 49, 34-41.

Rogers, M.J., Gordon, S., Benford, H.L., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Monkkinen, J., Frith, J.C., 2000. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88, 2961-2978.

Rogers, M.J., Ji, X., Russell, R.G., Blackburn, G.M., Williamson, M.P., Bayless, A.V., Ebetino, F.H., Watts, D.J., 1994. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 303 ( Pt 1), 303-311.

Rosen, L.S., Gordon, D., Tchekmedyan, N.S., Yanagihara, R., Hirsh, V., Krzakowski, M., Pawlicki, M., De Souza, P., Zheng, M., Urbanowitz, G., Reitsma, D., Seaman, J., 2004. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 100, 2613-2621.

Ruggiero, S.L., Dodson, T.B., Assael, L.A., Landesberg, R., Marx, R.E., Mehrotra, B., 2009. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J* 35, 119-130.

Ruggiero, S.L., Mehrotra, B., Rosenberg, T.J., Engroff, S.L., 2004. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 527-534.

Russell, R.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 19, 733-759.

Sahai, E., Marshall, C.J., 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 133-142.

Santiago, B., Galindo, M., Palao, G., Pablos, J.L., 2004. Intracellular regulation of Fas-induced apoptosis in human fibroblasts by extracellular factors and cycloheximide. *J Immunol* 172, 560-566.

Santini, D., Vincenzi, B., Avvisati, G., Dicuonzo, G., Battistoni, F., Gavasci, M., Salerno, A., Denaro, V., Tonini, G., 2002. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 8, 1080-1084.

Sarasquete, M.E., Garcia-Sanz, R., Marin, L., Alcoceba, M., Chillon, M.C., Balanzategui, A., Santamaria, C., Rosinol, L., de la Rubia, J., Hernandez, M.T., Garcia-Navarro, I., Lahuerta, J.J., Gonzalez, M., San Miguel, J.F., 2008. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood* 112, 2709-2712.

Sawada, K., Morishige, K., Tahara, M., Kawagishi, R., Ikebuchi, Y., Tasaka, K., Murata, Y., 2002. Alendronate inhibits lysophosphatidic acid-induced migration of human ovarian cancer cells by attenuating the activation of rho. *Cancer Res* 62, 6015-6020.

Scavelli, C., Di Pietro, G., Cirulli, T., Coluccia, M., Boccarelli, A., Giannini, T., Mangialardi, G., Bertieri, R., Coluccia, A.M., Ribatti, D., Dammacco, F., Vacca, A., 2007. Zoledronic acid affects over-angiogenic phenotype of endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 6, 3256-3262.

Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O.N., Illenberger, D., Gierschik, P., 2000. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol* 7, 122-126.

Schenk, R., Egli, P., Fleisch, H., Rosini, S., 1986. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 38, 342-349.

Scheper, M.A., Badros, A., Chaisuparat, R., Cullen, K.J., Meiller, T.F., 2009. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol* 144, 667-676.

Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., van der Geer, P., 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372, 786-791.

Scoletta, M., Arduino, P.G., Reggio, L., Dalmaso, P., Mozzati, M., 2009. Effect of low-level laser irradiation on bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: preliminary results of a prospective study. *Photomed Laser Surg* 28, 179-184.

Senaratne, S.G., Pirianov, G., Mansi, J.L., Arnett, T.R., Colston, K.W., 2000. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 82, 1459-1468.

Senel, F.C., Saracoglu Tekin, U., Durmus, A., Bagis, B., 2007. Severe osteomyelitis of the mandible associated with the use of non-nitrogen-containing bisphosphonate (disodium clodronate): report of a case. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 562-565.

Shipman, C.M., Croucher, P.I., Russell, R.G., Helfrich, M.H., Rogers, M.J., 1998. The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 58, 5294-5297.

Sietsema, W.K., Ebetino, F.H., Salvagno, A.M., Bevan, J.A., 1989. Antiresorptive dose-response relationships across three generations of bisphosphonates. *Drugs Exp Clin Res* 15, 389-396.

Sinnett-Smith, J., Lunn, J.A., Leopoldt, D., Rozengurt, E., 2001. Y-27632, an inhibitor of Rho-associated kinases, prevents tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin induced by bombesin: dissociation from tyrosine phosphorylation of p130(CAS). *Exp Cell Res* 266, 292-302.

Sobacchi, C., Frattini, A., Guerrini, M.M., Abinun, M., Pangrazio, A., Susani, L., Bredius, R., Mancini, G., Cant, A., Bishop, N., Grabowski, P., Del Fattore, A.,

Messina, C., Errigo, G., Coxon, F.P., Scott, D.I., Teti, A., Rogers, M.J., Vezzoni, P., Villa, A., Helfrich, M.H., 2007. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet* 39, 960-962.

Solski, P.A., Helms, W., Keely, P.J., Su, L., Der, C.J., 2002. RhoA biological activity is dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification. *Cell Growth Differ* 13, 363-373.

Stamatakis, K., Cernuda-Morollon, E., Hernandez-Perera, O., Perez-Sala, D., 2002. Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. *J Biol Chem* 277, 49389-49396.

Steinhilber, D., Schubert- Zsilavec, M., Roth, H.J., 2005. *Medizinische Chemie*. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.

Stepensky, D., Kleinberg, L., Hoffman, A., 2003. Bone as an effect compartment : models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet* 42, 863-881.

Stubbs, E.B., Jr., Von Zee, C.L., 2012. Prenylation of Rho G-proteins: a novel mechanism regulating gene expression and protein stability in human trabecular meshwork cells. *Mol Neurobiol* 46, 28-40.

Talmage, R.V., Elliott, J.R., 1958. Removal of calcium from bone as influenced by the parathyroids. *Endocrinology* 62, 717-722.

Tanaka, Y., Nagai, Y., Dohdoh, M., Oizumi, T., Ohki, A., Kuroishi, T., Sugawara, S., Endo, Y., 2012. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Arch Oral Biol*.

Tarassoff, P., Csermak, K., 2003. Avascular necrosis of the jaws: risk factors in metastatic cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg* 61, 1238-1239.

Teronen, O., Heikkila, P., Konttinen, Y.T., Laitinen, M., Salo, T., Hanemaaijer, R., Teronen, A., Maisi, P., Sorsa, T., 1999. MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. *Ann N Y Acad Sci* 878, 453-465.

Thiebaud, D., Sauty, A., Burckhardt, P., Leuenberger, P., Sitzler, L., Green, J.R., Kandra, A., Zieschang, J., Ibarra de Palacios, P., 1997. An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 61, 386-392.

Thompson, K., Rogers, M.J., 2004. Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J Bone Miner Res* 19, 278-288.

Thompson, K., Rojas-Navea, J., Rogers, M.J., 2006. Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood* 107, 651-654.



- Turner, S.J., Zhuang, S., Zhang, T., Boss, G.R., Pilz, R.B., 2008. Effects of lovastatin on Rho isoform expression, activity, and association with guanine nucleotide dissociation inhibitors. *Biochem Pharmacol* 75, 405-413.
- van Beek, E., Pieterman, E., Cohen, L., Lowik, C., Papapoulos, S., 1999a. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 108-111.
- van Beek, E., Pieterman, E., Cohen, L., Lowik, C., Papapoulos, S., 1999b. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 491-494.
- Van Beek, E.R., Lowik, C.W., Papapoulos, S.E., 2002. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. *Bone* 30, 64-70.
- Van den Wyngaert, T., Claeys, T., Huizing, M.T., Vermorcken, J.B., Fossion, E., 2009. Initial experience with conservative treatment in cancer patients with osteonecrosis of the jaw (ONJ) and predictors of outcome. *Ann Oncol* 20, 331-336.
- Viereck, V., Emons, G., Lauck, V., Frosch, K.H., Blaschke, S., Grundker, C., Hofbauer, L.C., 2002. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 680-686.
- Vignery, A., Baron, R., 1980. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec* 196, 191-200.
- Virtanen, S.S., Vaananen, H.K., Harkonen, P.L., Lakkakorpi, P.T., 2002. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 62, 2708-2714.
- Vogt, A., Qian, Y., McGuire, T.F., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., 1996. Protein geranylgeranylation, not farnesylation, is required for the G1 to S phase transition in mouse fibroblasts. *Oncogene* 13, 1991-1999.
- Walker, K., Olson, M.F., 2005. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr Opin Genet Dev* 15, 62-68.
- Walter, C., Al-Nawas, B., Frickhofen, N., Gamm, H., Beck, J., Reinsch, L., Blum, C., Grotz, K.A., Wagner, W., 2010a. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Head Face Med* 6, 11.
- Walter, C., Grotz, K.A., Kunkel, M., Al-Nawas, B., 2007. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Care Cancer* 15, 197-202.

- Walter, C., Klein, M.O., Pabst, A., Al-Nawas, B., Duschner, H., Ziebart, T., 2010b. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig* 14, 35-41.
- Walter, C., Laux, C., Sagheb, K., 2013. Radiologic bone loss in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a case-control study. *Clin Oral Investig*.
- Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K., 2000. Suppression of invasion and MMP-9 expression in NIH 3T3 and v-H-Ras 3T3 fibroblasts by lovastatin through inhibition of ras isoprenylation. *Oncology* 59, 245-254.
- Wehrhan, F., Stockmann, P., Nkenke, E., Schlegel, K.A., Guentsch, A., Wehrhan, T., Neukam, F.W., Amann, K., 2011. Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112, 216-221.
- Wennerberg, K., Der, C.J., 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117, 1301-1312.
- Yao, S., Huang, D., Chen, C.Y., Halliday, L., Zeng, G., Wang, R.C., Chen, Z.W., 2010. Differentiation, distribution and gammadelta T cell-driven regulation of IL-22-producing T cells in tuberculosis. *PLoS Pathog* 6, e1000789.
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., Geiger, B., 2007. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 120, 137-148.
- Zervas, K., Verrou, E., Teleioudis, Z., Vahtsevanos, K., Banti, A., Mihou, D., Krikelis, D., Terpos, E., 2006. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol* 134, 620-623.
- Ziebart, T., Koch, F., Klein, M.O., Guth, J., Adler, J., Pabst, A., Al-Nawas, B., Walter, C., 2011. Geranylgeraniol - a new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *Oral Oncol* 47, 195-201.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintri-phosphat
BCA	Bicin-chonic acid
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BP	Bisphosphonat
BP-ONJ	Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws
BSA	Bovines serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CHX	Cycloheximid
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DHR	Dihydrorhodamin
DMAPP	Dimethylallyl Pyrophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPC	Endothelial progenitor cells
Eu	Eugenol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fuorescence Activated Cell Sorting
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FOH	Farneol
FPP	Farnesyl Pyrophosphat
FSC	Forward Scatter
GAP	GTPase-activating protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDI	Guanidine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GGOH	Geranylgeraniol
GGPP	Geranylgeranyl Pyrophosphat
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HPR	Horseradish peroxidase
HUVEC	Human umbilicord veib endothelial cells
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Isoprenoid
IPP	Isopentenyl Pyrophosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton
Li	Limonene
LRP	Leukozytereiches Plasma
mA	Milliampere
mAb	monoclonal Antibody
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MMP	Matrix Metallo Proteinase
MOH	Menthol
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

Na <sup>+</sup>	Natrium
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
N-BP	Stickstoffhaltiges Bisphosphonat
nicht-N-BP	Stickstofffreies Bisphosphonat
OPG	Osteoprotegerin
p.o.	peroral
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Plateled derived growth factor
PDP	Probendenaturierungspuffer
PSN	Penicillin/ Streptomycin/ Neomycin
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rest
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sq	Squalene
SSC	Sideward Scatter
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
Tyr	Tyrosin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Zol	Zoledronat

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematische Darstellung eines knochenresorbierenden Osteoklasten, modifiziert nach (Bartl, 2008). ....	3
Abbildung 1.2	RANK/ RANKL/ OPG- System, modifiziert nach (Boyle et al., 2003).....	8
Abbildung 1.3	Chemische Struktur von Pyrophosphat und Bisphosphonaten in ihrer protonierten Form. ....	9
Abbildung 1.4	Bildung toxischer ATP-Analoga durch stickstofffreie Bisphosphonate, dargestellt am Beispiel Clodronats.....	15
Abbildung 1.5	Angriffspunkte von stickstofffreien und stickstoffhaltigen Bisphosphonaten sowie von Statinen im Mevalonatstoffwechsel.....	16
Abbildung 1.6	Strukturformel des Mevalonatstoffwechsel-Intermediates Geranylgeraniol .....	25
Abbildung 1.7	Antagonisierung der N-BP-induzierten Hemmung des Mevalonatstoffwechsels durch Geranylgeraniol (GGOH). ....	26
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. ....	40
Abbildung 3.2	Durchflusszytometrische Signale.....	41
Abbildung 3.3	Schematische Darstellung des Chemotaxis-Versuchsansatzes. ....	42
Abbildung 3.4	Exemplarische Dotplot-Diagramme des Chemotaxis-Versuches.....	43
Abbildung 3.5	Exemplarische Darstellung der Granulozyten-Identifizierung. ....	45
Abbildung 3.6	Exemplarische Darstellung der FL1-Histogramme des Phagozytoseversuchs.....	45
Abbildung 3.7	Intrazelluläre Oxidation des Substrats Dihydrorhodamin 123 zum fluoreszierenden Rhodamin 123 durch reaktive Sauerstoffspezies. ....	46
Abbildung 3.8	Exemplarische Darstellung der FL1-Histogramme des Burstversuchs. ....	46

Abbildung 3.9	Schematische Darstellung der Neubauer-Zählkammer. ....	48
Abbildung 3.10	Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen zum unlöslichen Formazan-Farbstoff. ....	49
Abbildung 3.11	Zusammenwachsen einer „Scratch“- Wunde am Beispiel unbehandelter gingivaler Fibroblasten. ....	51
Abbildung 3.12	Reaktionsabfolge des BCA Protein Assays. ....	54
Abbildung 3.13	Darstellung des Farbergebnisses des BCA Protein Assays. ....	54
Abbildung 3.14	Fotografie einer Elektrophoresekammer. ....	56
Abbildung 3.15	Schematische Darstellung einer Western Blot-Einheit. ....	57
Abbildung 3.16	Schematische Darstellung der Immundetektion. ....	58
Abbildung 4.1	fMLP-stimulierte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate. ....	63
Abbildung 4.2	Anteil phagozytischer neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate abhängig von deren Konzentration. ....	65
Abbildung 4.3	Anteil phagozytischer neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate abhängig von deren Inkubationszeit. ....	66
Abbildung 4.4	Anteil oxidierender neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate. ....	68
Abbildung 4.5	Oxidativer Burst pro Granulozyt unter dem Einfluss verschiedener Bisphosphonate. ....	69
Abbildung 4.6	MTT Assay an gingivalen Fibroblasten. ....	73
Abbildung 4.7	MTT Assay an gingivalen Fibroblasten. ....	74
Abbildung 4.8	MTT Assay an HUVEC. ....	75
Abbildung 4.9	MTT Assay an HUVEC. ....	76
Abbildung 4.10	MTT Assay an Osteoblasten. ....	77

Abbildung 4.11	MTT Assay an Osteoblasten.....	78
Abbildung 4.12	Scratch Wound Assay- Fibroblasten: Geranylgeranyl, Farnesol, Eugenol.....	81
Abbildung 4.13	Scratch Wound Assay- Fibroblasten: Limonene, Menthol, Squalene.....	82
Abbildung 4.14	Scratch Wound Assay- HUVEC: Geranylgeranyl, Farnesol, Eugenol.....	83
Abbildung 4.15	Scratch Wound Assay- HUVEC: Limonene, Menthol, Squalene.....	84
Abbildung 4.16	Scratch Wound Assay- Osteoblasten: Geranylgeranyl, Farnesol, Eugenol.....	85
Abbildung 4.17	Scratch Wound Assay- Osteoblasten: Limonene, Menthol, Squalene.....	86
Abbildung 4.18	Zellarchitektur von Fibroblasten nach Phalloidin/Bisbenzimid-Färbung.....	88
Abbildung 4.19	Zellarchitektur von HUVEC nach Phalloidin/ Bisbenzimid- Färbung. ....	89
Abbildung 4.20	Zellarchitektur von Osteoblasten nach Phalloidin/ Bisbenzimid-Färbung.....	90
Abbildung 4.21	MTT Assay Fibroblasten.....	91
Abbildung 4.22	MTT Assay HUVEC.....	92
Abbildung 4.23	MTT Assay Osteoblasten.....	94
Abbildung 4.24	MTT Assay Keratinozyten.....	95
Abbildung 4.25	Western Blot auf Paxillin (65kDa). ....	96
Abbildung 4.26	Dichte der densitometrisch ausgewerteten Paxillin-Banden. ....	96
Abbildung 4.27	Western Blot auf Phospho-Paxillin (Tyr118) (65kDa). ....	97
Abbildung 4.28	Dichte der densitometrisch ausgewerteten Phospho-Paxillin (Tyr118)-Banden.....	97



Abbildung 4.29	Western Blot auf FAK (125kDa).....	98
Abbildung 4.30	Dichte der densitometrisch ausgewerteten FAK-Banden.....	98
Abbildung 4.31	Western Blot auf Phospho-FAK (Tyr925) (125kDa).....	99
Abbildung 4.32	Dichte der densitometrisch ausgewerteten Phospho-FAK (Tyr925)-Banden.....	99
Abbildung 4.33	Western Blot auf RhoA (21kDa).....	100
Abbildung 4.34	Dichte der densitometrisch ausgewerteten RhoA-Banden.....	100
Abbildung 4.35	Western Blot auf RhoA (21kDa) des Cycloheximid-Versuchs....	101
Abbildung 4.36	Dichte der densitometrisch ausgewerteten RhoA-Banden des Cycloheximid-Versuchs. ....	101
Abbildung 4.37	Western Blot auf RhoB (21kDa).....	102
Abbildung 4.38	Dichte der densitometrisch ausgewerteten RhoB-Banden.....	102
Abbildung 4.39	Aktives GTP-gebundenes RhoA. ....	103
Abbildung 5.1	Humane Ras-Superfamilie, modifiziert nach (Colicelli, 2004). ...	123
Abbildung 5.2	Humane Rho-Subfamilie, modifiziert nach (Cox and Der, 2010).....	123
Abbildung 5.3	Regulation der Rho-GTPasen.....	124
Abbildung 5.4	Potentielle Mechanismen, über die N-BP sowie Statine durch eine Reduktion der Rho-Prenylierung in zelluläre Signalkaskaden eingreifen.....	131

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Einteilung der Bisphosphonate in drei Generationen.....	10
Tabelle 1.2	Pharmakokinetische Daten i.v. applizierter Bisphosphonate, modifiziert nach (Bartl, 2006).....	11
Tabelle 1.3	Einsatzgebiete gängiger Bisphosphonate (Rote Liste, Stand 2014).....	13
Tabelle 3.1	Verbrauchsmaterialien/ Einmalartikel.....	30
Tabelle 3.2	Geräte.....	31
Tabelle 3.3	Bisphosphonate.....	32
Tabelle 3.4	Isoprenoide.....	32
Tabelle 3.5	Chemikalien/ Reagenzien.....	33
Tabelle 3.6	Biochemische Kits.....	36
Tabelle 3.7	Antikörper.....	36
Tabelle 3.8	Zellenlinien.....	37
Tabelle 3.9	Zellkulturmedien.....	37
Tabelle 3.10	Hergestellte Lösungen.....	38
Tabelle 3.11	Versuchsansatz des MTT Assays: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Isoprenoiden.....	50
Tabelle 3.12	Versuchsansatz des MTT Assays: Zoledronat kombiniert mit Clodronat.....	50
Tabelle 3.13	Versuchsansatz des Scratch Wound Assays: Zoledronat kombiniert mit verschiedenen Bisphosphonaten.....	52
Tabelle 5.1	Struktur der Isoprenoide des Mevalonatstoffwechsels.....	112
Tabelle 5.2	Natürliche Isoprenoide mit Monoterpenstruktur.....	112

## 8.4 Lebenslauf

## 8.5 Danksagung