Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie
Direktor: Prof. Dr. T. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg
Standort Marburg

Modulation und funktionelle Relevanz des RANKL/TRAIL/Osteoprotegerin-Systems bei Mammakarzinomzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tilman Daniel Rachner
aus Bremerhaven

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 15.12.2009

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. L. C. Hofbauer
Koreferent: Prof. Dr. P. Hadji

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGEN IV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom 1

1.1.1. Pathogenese 2

1.1.2. Klassifikation 2

1.2. Osteoprotegerin, ein Decoy-Rezeptor für RANKL und TRAIL 7

1.2.1. Osteoprotegerin (OPG) 7

1.2.2. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) 9

1.2.3. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) 12

1.2.4. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANK) 14

1.3. Expression von OPG, TRAIL, RANKL und RANK beim Mammakarzinom 16

1.4. Entstehung und Persistenz osteolytischer Knochenmetastasen 18

2. Fragestellung 21

3. Material und Methoden

3.1. Material 22

3.1.1. Zellen 22

3.1.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterial 22

3.1.3. Lösungen und Puffer 25

3.1.4. Geräte 28

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur 29

3.2.2. Zellteilung 30
3.2.3. Stimulation der Zellen 30
3.2.4. RNA-Isolation 31
3.2.5. Isolierung von Poly-A-mRNA 33
3.2.6. Photometrische Quantifizierung der RNA 33
3.2.7. Northern Blot 34
3.2.8. Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden 36
3.2.9. Reverse Transkription zur cDNA-Synthese 39
3.2.10. Amplifizierung von cDNA mittels RT-PCR 39
3.2.11. Real-time-PCR 40
3.2.12. Western Blot 41
3.2.13. OPG-Proteinanalyse 44
3.2.14. MTT-Assay 45
3.2.15. Apoptose-Assay 46
3.2.16. Annexin V/Propidiumjodid-FACS-Analyse 46
3.2.17. OPG-Knock down 47
3.2.18. Time lapse-Mikroskopie 47
3.2.19. Migrationsassay 48
3.2.20. Statistische Analyse 48

4. Ergebnisse

4.1. Analyse der Osteoprotegerin-Produktion in Brustkrebszellen 49
4.1.1. Regulation von OPG durch Zytokine 49
4.1.2. Regulation von OPG durch Glukokortikoide 53
4.1.3. Regulation durch Androgene und Östrogene 54
4.2. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 61
4.2.1. Expression und Regulation von TRAIL in Brustkrebszelllinien 61

4.2.2. TRAIL-Sensibilität der MCF-7 und MDA-MB-231-Zelllinien 62

4.2.3. TRAIL-Rezeptor-1 und -2 Expression in MCF-7 und MDA-MB-231 64

4.2.4. Einfluss von OPG auf die TRAIL-vermittelte Apoptose 65

4.2.5. Bedeutung der endogenen OPG-Sekretion als Schutz vor TRAIL-induzierter Apoptose 65

4.2.6. Steigerung der Apoptoserate durch den Knock down von OPG 68

4.3. RANKL-Expression und -Regulation in Brustkrebszellen 70

4.4. RANKL-induziert Migration in MDA-MB-231-Zellen 72

4.5. RANK-Expression und -Regulation in Brustkrebszellen 73

4.6. Einfluss von Bisphosphonaten auf Brustkrebszellen 75

4.6.1. Induktion der Apoptose in MDA-MB-231-Zellen durch Zoledronsäure 75

4.6.2. Regulation von OPG und TRAIL durch Zoledronsäure 77

5. Diskussion

5.1. Bedeutung von Osteoprotegerin bei benignen und malignen Erkrankungen 79

5.2. Modulation der OPG-Spiegel im Mammakarzinom 82

5.3. Effekte von Bisphosphonaten auf Mammakarzinomzellen 84

5.4. Bedeutung von TRAIL beim Mammakarzinom 86

5.5. Bedeutung von RANKL beim Mammakarzinom 90

5.6. Denosumab als künftige Therapieoption des Mammakarzinoms 91

6. Zusammenfassung 94

7. Literaturverzeichnis 98

8. Anhang 126

8.1. Lebenslauf 126

8.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer 128

8.3. Danksagung 129

8.4. Ehrenwörtliche Erklärung 130

ABKÜRZUNGEN

ANOVA	Analysis of variance
APAF	Apoptotic protease-activating factor
AR	Androgenrezeptor
BMD	Bone mineral density
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar(e)
BRCA	Breast-Cancer-Gene
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAMS	Cellular adhesion molecules (Zelluläre Adhäsionsmoleküle)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CK	Zytokeratin
DC	Dendritische Zelle
DCIS	Duktales Carcinoma *in situ*
DCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDH	Death domain homologues
DEPC	Diethylpyrokarbonat (Diethyl pyrocarbonate)
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DISC	Death-inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Acid)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Estrogen (Östrogen)-Rezeptor
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (Fluoresence activated cell sorting)
FADD	FAS-associated protein with death domain
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
IGF	Insulin like growth factor
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
JNK	c-jun N-terminal-Kinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilo Dalton
MM	Multiples Myelom

MOPS	3-(N-morpholino) Propansulfonsäure
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
NB	Northern Blot
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Nuclear factor-κB
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
ODAR	Osteoclast differentiation and activation receptor
ODF	Osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PARPi	PARP-Inhibitor
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PI	Propidiumjodid
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid hormone-related peptide
PBS	Phosphate buffered saline
PLC	Phospholipase C
PR	Progesteronrezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor activator of NF-κB
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecylsulphate
SERMs	Selektive Estrogen (Östrogen) Rezeptor Modulatoren
SSC	Standard sodium citrate
TACE	TNF-α-converting enzyme-like protease
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF-receptor
TRAF	TNF-associated factors
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
uNTX	Urinary N-telopeptide

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

		Seite
Abb. 1:	Brustkrebsklassifizierung nach molekularen Subtypen	6
Abb. 2:	Aktivierung apoptotischer Signalwege durch TRAIL	10
Abb. 3:	RANKL/RANK-Signaltransduktion	12
Abb. 4:	Proteinstrukturen von RANK, RANKL und OPG	15
Abb. 5:	Modulation der Dreiecksbeziehung aus Tumorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten durch das RANKL/RANK/OPG-System	20
Abb. 6:	Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion durch IL-1β	50
Abb. 7:	Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion durch TNF-α	52
Abb. 8:	Hemmung der OPG-mRNA-Expression und –Proteinsekretion durch Dexamethason	54
Abb. 9:	MCF-7 exprimieren den Östrogenrezptor-α (ER-α)	55
Abb. 10:	Einfluss von Sexualhormonen auf die OPG-mRNA-Spiegel in MDA-MB-231	56
Abb. 11:	Hemmung der OPG-Spiegel durch 17β-Estradiol und Testosteron	57
Abb. 12:	Hemmung der OPG-Spiegel durch 17β-Estradiol	58
Abb. 13:	Umkehr der durch 17β-Estradiol und Testosteron induzierten Suppression der OPG-Spiegel durch das Antiöstrogen Fulvestrant und einen Aromataseinhibitor	60
Abb. 14:	TRAIL-Expression und -Regulation in MDA-MB-231-Zellen	62
Abb. 15:	MDA-MB-231-Zellen sind TRAIL-sensitiv	63
Abb. 16:	TRAIL-Rezeptor-Expression in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen	64
Abb. 17:	Blockade der TRAIL-vermittelten Apoptose durch exogenes OPG	66

Abb. 18: Inverse Korrelation zwischen endogenem OPG und TRAIL induzierter Apoptose 67

Abb. 19: OPG-Knock down reduziert die Zellvitalität und induziert Apoptose in den MDA-MB-231-Zellen 69

Abb. 20: RANKL-Expression und -Regulation durch IL-1β und 17β-Estradiol 70

Abb. 21: Einfluss diverser Stimulantien auf die OPG-, RANKL- und TRAIL-mRNA-Spiegel von MDA-MB-231-Zellen 71

Abb. 22: Regulation der Migration in MDA-MB-231-Zellen durch RANKL 72

Abb. 23: IL-1β induziert RANK mRNA-Spiegel in MDA-MB-231-Zellen und fördert deren Migration in Kombination mit RANKL 74

Abb. 24: Zoledronsäure induziert die Apoptose in MDA-MB-231-Zellen 76

Abb. 25: Zoledronsäure moduliert den TRAIL/OPG-Quotienten in MDA-MB-231-Zellen 78

Abb. 26: Einfluss von Tumorzellen auf das RANKL/OPG-System 81

Abb. 27: Bedeutung der OPG/TRAIL-Interaktion im Mammakarzinom 90

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit ca. 26% aller Krebserkrankungen der häufigste Tumor der Frau. Die Lebenszeitprävalenz wird derzeit in westlichen Industrieländern auf ca. 10% geschätzt. Nur ca. 1% aller Mammakarzinome treten bei Männern auf. Definitionsgemäß handelt es sich beim Mammakarzinom um eine maligne Erkrankung der Brustdrüse, die ihren Ursprung in den Milchgängen (duktales Karzinom) oder den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom) hat. Seit 1990 ist die Zahl der brustkrebsbedingten Todesfälle in den USA und Europa kontinuierlich gesunken. So wurden 2007 25% weniger Todesfälle verzeichnet als 1990 (Heron, 2007). Diese Verbesserung wird zur einen Hälfte einer verbesserten Früherkennung und zur anderen Hälfte einer verbesserten adjuvanten Therapie zugeschrieben (Calvocoressi et al., 2008). Trotz vielfältiger Fortschritte in der Behandlung von Brustkrebs bleibt seine Tendenz zur ossären Metastasierung ein klinisch relevantes Problem. Bis zu 75% aller Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung Knochenmetastasen (Coleman, 2001). Während sich die Prognose des nicht metastasierten Mammakarzinoms deutlich verbessert hat, blieb die Überlebensrate des metastasierten Mammakarzinoms praktisch unverändert (Minino et al., 2006). Klinisch geht eine Knochenmetastasierung häufig mit einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität durch vermehrte Schmerzen, pathologische Frakturen und Hyperkalzämie einher (Coleman, 2001; Healey und Brown, 2000). Die große klinische und ökonomische Bedeutung der ossären Metastasierung des Brust- und Prostatakarzinoms hat sie zum Gegenstand intensiver Forschung gemacht.

Die Entdeckung der molekularen Triade bestehend aus RANKL/RANK und OPG vor 10 Jahren brachte einen immensen Fortschritt über das Verständnis der Regulation des Knochenstoffwechsels (Hofbauer und Schoppet, 2004). Während die herausragende Bedeutung der RANKL-RANK-Interaktion und ihre Regulation durch OPG für die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten in vielfältigen Studien belegt werden konnte, gibt es zunehmend Hinweise, dass RANKL zudem eine bedeutende Rolle bei der Migration von Tumorzellen (Jones et al., 2006) als auch bei der Entstehung und Persistenz osteolytischer Metastasen (Roodman et al., 2008) haben könnte.

1.1.1. Pathogenese

Das klassische Brustkrebsmodell unterscheidet zwischen spontan („sporadisch“) entstehenden Mammakarzinomen und den selteneren (ca. 5%) hereditären Karzinomen, bei welchen eine familiäre Genveränderung Ursache des Karzinoms ist. Das hereditäre Mammakarzinom zeichnet sich durch ein früheres Erkrankungsalter, eine höhere Prävalenz bilateraler Mammakarzinome sowie einer Häufung assoziierter Krebserkrankungen (Ovarien, Magen, Lunge, Pankreas, Niere) in der Familie aus (Kiechle, 2007). Etwa die Hälfte aller Frauen mit hereditärem Mammakarzinom sind Träger einer Mutation in einem der beiden *Breast cancer gene* (BRCA1 oder BRCA2). Trägerinnen einer BRCA1-Gen-Mutation haben ein 80%iges Risiko, im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom zu entwickeln (van Garderen und Schalken, 2002). Erste Phase-1 Studien mit PARP-Inhibitoren bei Patientinnen mit BRCA-assoziierten Tumoren zeigen gute Verträglichkeit und könnten eine neue Behandlungsmöglichkeit für diese Patientengruppe darstellen (Fong et al., 2009). Beim sporadischen Mammakarzinom sind Risikofaktoren wie hormonelle Faktoren, Parität, Lebensstil und Familienanamnese bekannt.

Das Mammakarzinom ist eine sehr heterogene und molekular komplexe Erkrankung, was die Entwicklung von effektiven Präventions- und Behandlungskonzepten erschwert. Es gibt zunehmende Hinweise für die sogenannte Stammzell-Hypothese *(Cancer stem cell hypothesis)*. Während das klassische stochastische Modell der Karzinogenese davon ausgeht, dass jede Zelle eines Organs durch die richtige Kombination an Mutationen transformiert werden kann (Martinez-Climent et al., 2006), geht die Stammzell-Hypothese davon aus, dass Tumore aus Stamm- oder Vorläuferzellen durch eine Fehlregulation der Selbsterneuerung entstehen (Graziano et al., 2008). Nach diesem Konzept würden Tumorverbände einen Teil an Zellen mit Stammzelleigenschaften beinhalten, welche zu der zellulären Heterogenität der Tumore beitragen und individuelle Therapieansätze erfordern (Wicha et al., 2006).

1.1.2. Klassifikation des Mammakarzinoms

Die Unterteilung von Brusttumoren in Subtypen erfolgt mit dem Ziel, Vorhersagen über die Prognose oder die Sensitivität verschiedener Therapien machen zu können. Lange

Zeit wurden invasive Mammakarzinome nur anhand ihres histologischen Typs (invasiv duktal, ca. 70-80% und invasiv-lobulär, ca. 10%), Differenzierungsgrades und Hormonrezeptorstatus eingeteilt (Lacroix et al., 2004; Simpson et al., 2005). Technische Fortschritte erlauben heute die Unterteilung anhand von konventioneller Histopathologie, molekularer Pathologie, genetischer Analyse und Genexpressions-Profiling.

Durch den Erfolg des HER2-Antikörpers Trastuzumab in klinischen Studien ist die Charakterisierung der HER2-Expression mittlerweile zum integralen Bestandteil der pathologischen Routinebestimmung bei Brustkrebspatientinnen geworden. Anhand des Hormon- und HER2-Rezeptorstatus ergeben sich unterschiedliche Therapieoptionen. Während für die Behandlung von Hormonrezeptor-positiven Tumoren eine Vielzahl an endokrinen und chemotherapeutischen Therapieoptionen zur Verfügung stehen, können HER2-positive Tumore zusätzlich mit gegen Wachstumsfaktoren gerichteten Therapien (Trastuzumab, Lapatinib) behandelt werde. Dagegen sind die Behandlungsoptionen von Hormon- und HER2-negativen Tumoren auf eine alleinige Chemotherapie beschränkt.

Die Genom umfassenden Microarray-Analysen der Forschungsgruppen um Perou und Sorlie zeigten, dass man die morphologisch heterogenen Brusttumore auf Transkriptionsebene systematisch klassifizieren kann (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). Sie identifizierten fünf molekulare Subtypen des Mammakarzinoms. Zwei von ihnen (Luminal A und B) exprimieren den Östrogenrezeptor (ER), während die anderen drei Subgruppen ER-negativ sind (*normal breast like*, ERBB2 (HER2) und *basal-like*) (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). Sorlie et al. konnten zudem nachweisen, dass die verschiedenen Subtypen mit einem unterschiedlichen prognostischen Outcome verbunden sind (Sorlie at al., 2003). Allerdings besteht noch immer keine abschließende Klarheit über die Vollständigkeit der von Perou et al. beschriebenen Subtypen. So wurde in einer anderen Studie ein ERBB2-positiver aber ER-negativer und Androgen-Rezeptor (AR)-positiver Subtyp als molekularer apopkriner Tumor beschrieben und einer neben den basalen und luminalen Subtypen existierenden dritten Hauptgruppe zugeteilt (Farmer et al., 2005). Zudem herrscht Unklarheit darüber, ob die von Perrou et al. als *normal-like* Subtyp beschriebene Gruppe wirklich Karzinomgewebe enthält. So zeigte die histopathologische Begutachtung von als *normal-like* klassifiziertem Tumorgewebe eine Kontamination mit gesundem Gewebe (Hu et al., 2006).

Mittels Genexpressionsanalyse konnten histologische Subtypen auf molekularer Ebene charakterisiert werden. So zeigt das medulläre Mammakarzinom (ca. 5% der Karzinome) einen basalen Subtyp (Bertucci et al., 2006). Das inflammatorische Mammakarzinom hingegen kann jedem der fünf Subtypen angehören, allerdings sind die Mehrzahl ER-negativ (Nguyen et al. 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass die histologische Trennung zwischen lobulärem und duktalem Mammakarzinom auf Genexpressions-Ebene nicht klar abgrenzbar ist (Korkola et al., 2003; Zhao et al., 2004).

In Ergänzung zur Typisierung anhand der Genexpressions-Analyse konnten genetische Unterschiede zwischen Mammakarzinom-Subtypen beschrieben werden. So wurde gezeigt, dass 65% der Grad-1-Tumore eine Deletion auf dem Chromosom 16 aufwiesen, während diese nur bei 16% der Untersuchten Grad-3-Tumore nachweisbar war (Roylance et al., 1999). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass in der Mehrzahl der Fälle keine Progression von Grad-1-Tumoren zu Grad-3-Tumoren stattfindet, da dies den Wiedereinbau von verlorenem genetischen Material notwendig machen würde. Im Gegensatz dazu ist ein häufiger Erwerb an genetischem Material auf dem Chromosom 6 (6p21-p25) speziell bei ER-negativen und *basal-like* Tumoren nachzuweisen (Bergamaschi et al., 2006).

Studien, welche die Entwicklung von gesundem Mammagewebe über *in situ*-Karzinome hin zum invasiven Mammakarzinom untersuchten, haben zwei Hauptwege identifiziert, die zu zwei diametral unterschiedlichen Mammakarzinom-Typen führen. Der eine Entwicklungsweg beinhaltet gut differenzierte duktale oder lobuläre Carcinoma *in situ*, die sich zu invasiven duktalen oder lobulären Karzinomen 1. Grades entwickeln. Diese Karzinome sind häufig ER/PR-positiv und HER2-negativ, besitzen eine genetische Stabilität und die oben beschriebene Chromosom 16q-Deletion. Andererseits gibt es schlecht differenzierte duktale carcinoma *in situ* (DCIS), welche sich zu Grad-3 invasiven duktalen Karzinomen entwickeln. Diese Tumortypen weisen in der Regel eine hohe Zahl an Zellkernatypien und eine häufige ER/PR-Negativität auf. Zudem sind sie oft HER2-positiv und genetisch instabil (Simpson et al., 2005; Kronenwett et al., 2006).

Ein spezieller Mammakarzinom-Typ, welchem großes Interesse gewidmet wird, ist das sogenannte *triple-negative* Mammakarzinom. Diese Tumore sind zum einen schwer zu

behandeln, da es für sie keine maßgeschneiderte Therapie gibt, zum anderen zeigt sich eine unverkennbare Profil-Überlappung mit den *basal-like* Tumoren. *Basal-like* Mammakarzinome erhielten ihren Namen aufgrund ihrer beständigen Expression von Genen, welche gewöhnlich in normalen basalen oder myoepithelialen Zellen der Brust exprimiert werden. Dies sind unter anderem die Zytokeratine CK5, CK6 und CK14 (Abb. 1). Anhand von Microarray-Analysen können ungefähr 15% aller Mammakarzinome dem *basal-like* Typ zugeteilt werden. Sie betreffen häufiger junge Patientinnen und sind sowohl Hormonrezeptor- als auch HER2-negativ. Sie exprimieren hohe Spiegel an proliferationsassoziierten Genen und in > 60% der Fälle den *Epidermal growth factor* (EGFR) (Nielsen et al., 2004). Klinisch zeigen sie ein aggressiveres Verhalten als andere Tumortypen (Fan et al., 2006).

Triple-negative Mammakarzinome betreffen, ähnlich wie *basal-like* Karzinome häufiger junge Frauen, sind häufiger bei afro-amerikanischen Frauen und deutlich aggressiver als andere Mammakarzinome (Tischkowitz et al., 2007; Haffty et al. 2006; Bauer et al., 2007). Während es eine große Überlappung der beiden Gruppen gibt scheinen sie jedoch nicht identisch zu sein. So konnte mittels Microarray-basierter Expressionsanalyse in 15-54% der *basal-like* Karzinome die Expression von mindestens einem Hormon-Rezeptor oder HER2 nachgewiesen werden (Sotiriou et al. 2003; Calza et al. 2006; Nielson et al. 2004). Auf der anderen Seite zeigten nur 56-84% der *triple-negative* Tumore eine Expression der *basal-like* Marker CKs und EGFR (Rakha et al., 2007; Tischkowitz et al., 2007). Trotz dieser neuen Erkenntnisse und Theorien über die Pathogenese und Klassifizierung von Mammakarzinomen sind Therapiekonzepte besonders für *triple-negative* Tumorzellen wie die in dieser Arbeit verwendeten MDA-MB-231-Zellen immer noch sehr limitiert. Daher sind neue Therapiemodalitäten und die Vervollständigung unseres zell- und tumorbiologischen Verständnisses über diesen schwer angreifbaren Tumorsubtyp notwendig.

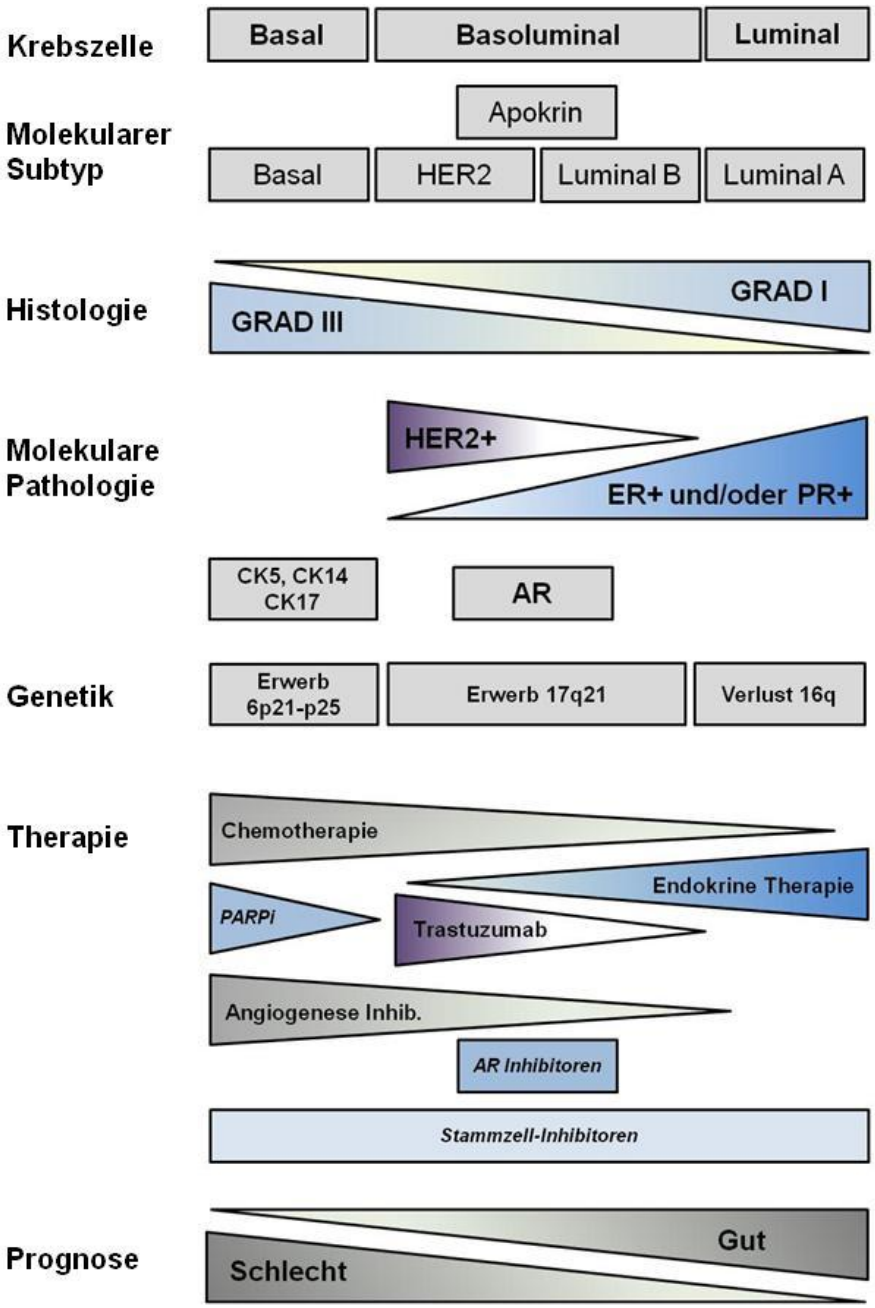

Abb. 1: Brustkrebsklassifizierung nach molekularen Subtypen

Einteilung und Eigenschaften des Mammakarzinoms nach molekularen Subtypen. Verwendete Abkürzungen: ER, Östrogenrezeptor; PR, Progesteronrezeptor; AR, Androgenrezeptor, CK, Zytokeratin; PARPi, poly(ADP-ribose)polymerase Inhibitoren. In kursiv geschriebene Therapie ist in klinischer Erprobung (blau) oder ist als mögliche zukünftige Therapieform in der Erforschung (hellblau) (Adaptiert von Sims et al., 2007).

1.2. Osteoprotegerin – ein Decoy-Rezeptor für RANKL und TRAIL

Osteoprotegerin (OPG), ein sezerniertes Glykoprotein und Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie agiert als neutralisierender *„Decoy-Rezeptor“* für den Apoptose induzierenden *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) (Emery et al., 1998). TRAIL hat die spezifische Fähigkeit, Apoptose fast ausschließlich in entarteten Zellen zu induzieren, während gesunde Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben (Almasan und Ashkenazi, 2003). Gleichzeitig besitzt OPG durch seine Bindung und Inhibition des *Receptor activator of NF-κB ligand* (RANKL) eine herausragende Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels (Simonet et al., 1997). Einige Tumortypen scheinen das Verhältnis von OPG und RANKL zu verschieben. Es konnte gezeigt werden, dass das dadurch resultierende Ungleichgewicht zu einer gesteigerten Osteoklasten-Aktivität und als Folge zu der Entwicklung von osteolytischen Läsionen führt (Mundy, 1997). Kürzlich wurde RANKL zudem als Promotor der ossären Migration von Brust- und Prostatakarzinomzellen beschrieben (Jones et al., 2006; Armstrong et al., 2008). Die Fähigkeit, sowohl TRAIL als auch RANKL zu inhibieren, platziert OPG in die besondere Position, Einfluss auf zwei verschiedene, aber bedeutende Aspekte in der Tumorbiologie zu nehmen: Apoptose und Migration.

1.2.1. Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin (OPG) wurde 1997 erstmalig von zwei unabhängigen Gruppen beschrieben. Simonet et al. überexprimierten full-length Ratten-OPG in Mäusen und zeigten, dass diese Mäuse mit einer hohen Knochenmasse und einer deutlich verringerten Zahl an Osteoklasten geboren wurden. Beruhend auf der Fähigkeit Knochen zu schützen, wurde diesem Protein der Name Osteoprotegerin zugeteilt (Simonet et al., 1997). Zur selben Zeit wurde von Tsuda et al. ein sezerniertes Protein aus humanen Fibroblasten isoliert, welches sich als identisch zu OPG erwies und aufgrund seiner Fähigkeit die Osteoklastogenese zu hemmen als *Osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF) bezeichnet wurde (Tsuda et al., 1997). In Folge wurde dieses Protein von weiteren Gruppen beschrieben und Namen wie *TNF receptor-related molecule-1* (TR1) bzw. *Follicular dendritic cell-receptor-1* (FDCR-1) vorgeschlagen

(Kwon et al., 1998, Tan et al., 1997, Yun et al., 1998). Eine revidierte Nomenklatur im Jahre 2000 legte die Bezeichnung OPG für das Protein fest (ASBMR Presidents Comitte on Nomenclature 2000).

Das humane OPG-Gen befindet sich auf dem Chromosom 8q23-24. Es umfasst 5 Exons, die sich über 25 kb verteilen (Hilton et al., 2001). Das OPG-Gen der Maus und des Menschen wurden 1998 kloniert (Mizuno et al., 1998, Morinaga et al., 1998). Humane OPG-mRNA wird hauptsächlich als 2,9 kb lange Form exprimiert. Es existieren zwei seltener exprimierte Formen, die durch eine partielle oder komplette Duplikation des Introns 2 entstehen und Längen von 4,2 bzw. 6,5 kb aufweisen (Morinaga et al., 1998). Auf dem OPG-Promotor konnten Bindungsstellen für den *Transforming growth factor-β* (TGF-β) (Thirunavakkurasu et al., 2001) und den Osteoblasten spezifischen Transkriptionsfaktor *cbfa-1* nachgewiesen werden (Thirunavakkurasu et al., 2000).

OPG ist als sezerniertes Protein ohne transmembrane Domäne ein atypisches Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie. Zwar konnte die Existenz einer zellgebundenen OPG-Form von Yun et al. nachgewiesen werden, allerdings fehlt auch dieser Form eine typisch hydrophobe Transmembranregion (Yun et al., 1998). Das OPG-Protein weist Sequenzhomologien zu anderen TNF-Rezeptoren wie TNFR-2 und CD40 auf (Simonet et al., 1997). Die Sekretion von OPG wird über ein 21-Aminosäuren-langes Signalpeptid vermittelt. OPG weist 7 strukturelle Domänen auf, bestehend aus 4 Cystein-reichen Domänen, einer Heparin-bindenden Domäne sowie 2 *Death domain homologues* (DDH). Die funktionelle Rolle der DDH-Regionen ist noch nicht abschließend geklärt, allerdings konnte ein Mitwirken dieser Regionen an der Homodimerisierung belegt werden (Schneeweis et al., 2005). Die für TNFR-Mitglieder charakteristischen Cystein-reichen Domänen, werden in den N-terminalen Domänen 1 bis 4 gefunden (Baker und Reddy, 1998) und vermitteln die hemmende Wirkung des OPG auf die Osteoklastogenese durch die Bindung von RANKL (Schneeweis et al., 2005, Simonet et al., 1997, Yamaguchi et al., 1998). Die C-terminale Heparin-bindende Domäne bestimmt unter Umständen die Zirkulationsdauer von OPG in Mäusen (Irie et al., 2007). Zudem ist die Heparin-bindende Domäne für die mögliche Homodimerisierung der OPG-Monomere verantwortlich (Merewther et al., 2000, Schneeweis et al., 2005). Allerdings hatte die Deletion dieser Region keinen Einfluss auf die Fähigkeit von OPG die Osteoklastogenese zu inhibieren (Yamaguchi et al.,

1998). Über die Potenz der monomeren und homodimeren OPG-Form herrscht noch Unklarheit. Während in einer Studie beide OPG-Formen gleich potent die Osteoklastogenese *in vitro* hemmten, zeigte eine neuere Studie, dass OPG-Homodimere eine 1000-fach höhere Affinität für RANKL als die monomere Form aufwiesen (Schneeweis et al., 2005). Durch kompetitive Bindung an sämtliche RANKL-Formen antagonisiert OPG die RANKL-RANK vermittelten Wirkungen (Lacey et al., 1998, Yasuda et al., 1998, Nakamichi et al., 2007). Die Bindung eines OPG-Homodimers an ein RANKL-Homotrimer führt zur Bildung eines stabilen 1:1 Dimer/Trimer-Komplexes. Das OPG-Dimer bindet dabei an zwei RANKL-Moleküle. Die Bindung eines weiteren, allerdings weniger affinen, OPG-Dimers an das dritte RANKL-Molekül ist möglich (2:1-Komplex) (Lacey et al., 1998). Neben RANKL hat OPG die Fähigkeit, als löslicher Rezeptorantagonist für TRAIL zu agieren. Eine frühere Studie beschrieb eine deutlich geringere Affinität von OPG für TRAIL als für RANKL und stellte die biologische Relevanz der TRAIL-OPG-Interaktion in Frage (Emery et al., 1998). Hingegen konnte eine jüngere Studie mit sensitiveren Methoden und unter physiologischeren Bedingungen eine vergleichbare Affinität von OPG für TRAIL und RANKL zeigen (Vitovski et al., 2007).

Der Nachweis einer OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion gelang in einer Vielzahl an normalen und entarteten Geweben (Fiumara et al., 2001, Pettersen et al., 2005). Im Rahmen des Knochenstoffwechsels wird OPG besonders von Zellen der osteoblastären Zellreihe, aber auch von Stromazellen und von Chondrozyten produziert (Kwon et al., 1998, Horwood et al., 1998, Hofbauer et al., 1998). Auch das Gewebe des Zahnhalteapparats weist eine hohe OPG-Expression auf (Rani et al., 2000). OPG wird zudem von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert (Collin-Osdoby et al., 2001, Olesen et al., 2005).

1.2.2. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gehört wie RANKL zur Familie der TNF-Liganden. TRAIL wurde ursprünglich aufgrund seiner Sequenzhomologie zur extrazellulären Domäne des CD95-Liganden und des *Tumor necrosis factors* (TNF) identifiziert (Piti et al., 1996; Wiley et al., 1995). TRAIL hat die besondere Fähigkeit, in entarteten Geweben gezielt die Apoptose zu induzieren,

während gesundes Gewebe nicht beeinträchtigt wird. Dies ist eine zentrale Voraussetzung für einen potenziellen Einsatz in der Krebstherapie (Zhang et al., 2000; Almasan und Ashkenazi, 2003).

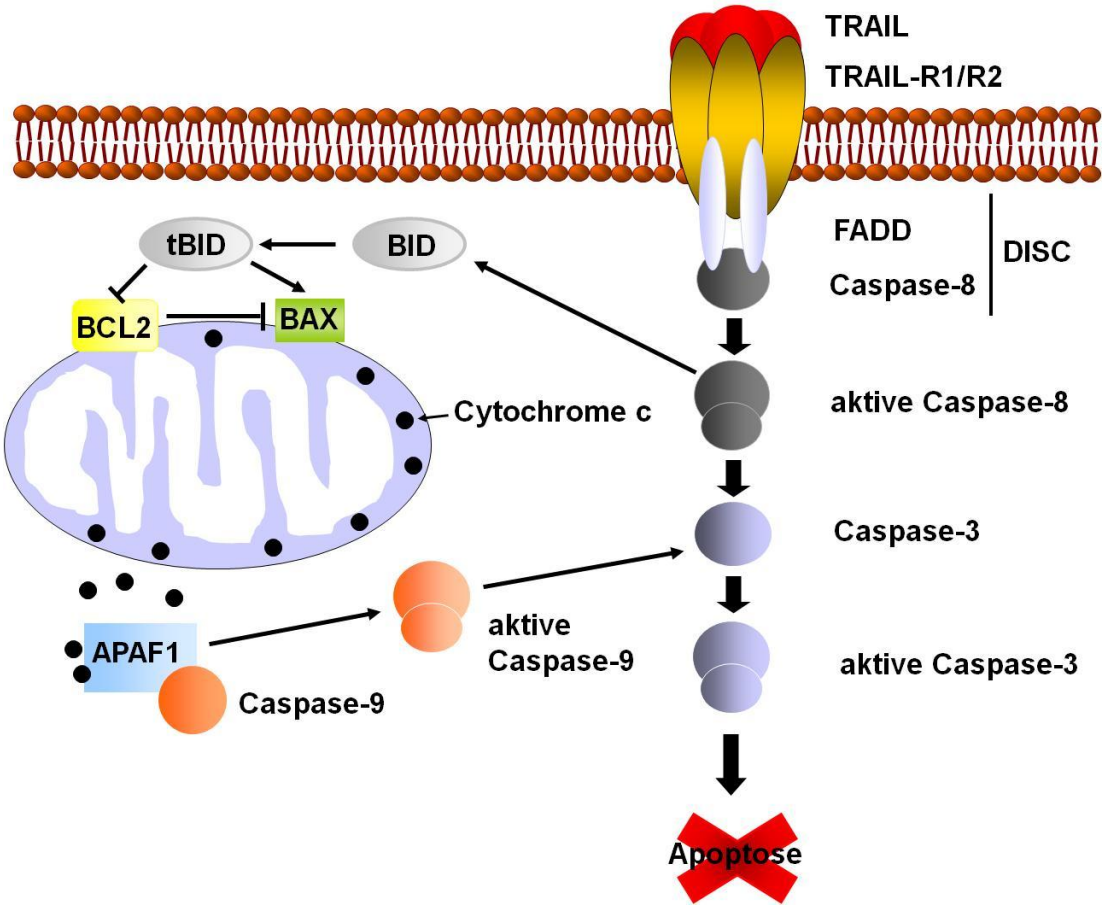

Abb. 2: Aktivierung apoptotischer Signalwege durch TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Bindung von TRAIL an TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 führt zu Formung eines death-inducing signalling complex (DISC), bestehend aus Fas-associated protein with death domain (FADD) und Caspase-8 und dem TRAIL Rezeptor. Dieser aktiviert Caspase-8 welche in Folge Caspase-3 und BID aktivieren kann. Aktiviertes BID (tBID) kann zum einen pro-apoptotisches BAX und BAK binden, was zur Freisetzung von mitochondrialem Cytochrome c führt. Zusätzlich hemmt tBID den Überlebensfaktor BCL2. Cytochrome c bildet mit dem apoptotic protease-activating factor 1 (APAF-1), Caspase-9 und ATP einen Komplex, welcher Caspase-9 aktiviert. Aktivierte Caspase-9 kann wiederum Caspase-3 aktivieren. Aktivierte Caspase-3 führt zur Aktivierung einer Vielzahl nachgeschalteter Caspasen, welche zur Spaltung von PARP führen. Zudem kann Caspase-3 Caspase-8 aktivieren und daher zu einer Amplifikation apoptotischer Signale führen (Angelehnt an Ricky et al., 2008).

Bisher konnten fünf Rezeptoren für TRAIL identifiziert werden (Griffith und Lynch, 1998). Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. TRAIL-Rezeptor-1 (TRAIL-R1) und TRAIL-Rezeptor-2 (TRAIL-R2) sind membrangebunde Rezeptoren mit „Todesdomäne“, welche intrazelluläre apoptotische Signalwege aktivieren (Pan et al., 1997; Walczak et al., 1997). TRAIL-Rezeptor-3 (TRAIL-R3) und TRAIL-Rezeptor-4 (TRAIL-R4) sind membrangebundene Decoy-Rezeptoren mit nicht funktionellen- (TRAIL-R4) oder fehlenden- (TRAIL-R3) „Todesdomänen“ (LeBlanc und Ashkenazi, 2003). Des weiteren agiert OPG als löslicher Decoy-Rezeptor für TRAIL (Emery et al., 1998). Die Bindung von TRAIL an TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 resultiert in einer Rekrutierung des *Fas-associated protein with death domain* (FADD). In Folge rekrutiert FADD Caspase-8 oder -10 durch seine *Death effector domain* (DED). Dieser Komplex wird als *Death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet und erlaubt die Autoaktivierung der rekrutierten Caspasen. Es folgt eine Aktivierung sowohl des intrinsischen (mitochondrial) als auch des extrinsischen (Effektor-Caspasen) Signalwegs, welche letztendlich zum Untergang der Zelle führen (LeBlanc und Ashkenazi, 2003). Im extrinsischen Signalweg wird zuerst Caspase-8 und -10 und dann Caspase-3 aktiviert, welche wiederum eine Vielzahl weiterer Caspasen aktiviert. Der mitochondriale intrinsische Signalweg wird durch Spaltung des *Bcl2 homology domain death agonist* (BID) aktiviert. Aktiviertes BID (tBID) bindet und aktiviert die pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK. Gleichzeitig hemmt es überlebensfördernde Proteine der Bcl_2-Familie. Dies führt zu einer Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c. Cytochrom c bildet mit dem *Apoptotic protease-activating factor 1* (APAF1) und Caspase-9 einen Komplex der zur Aktivierung von Caspase-9 führt, welche wiederum Caspase-3 aktivieren kann (Abb. 2). Die relative Bedeutung der beiden Signalwege variiert abhängig vom Zelltyp. Zudem gibt es eine Vielzahl an Modulatoren, die zur Verstärkung oder Abschwächung der Signalwege führen und damit auch die Sensitivität der Zelle für TRAIL bestimmen. Beispielsweise führt die post-translationale O-Glykosylation zu einer TRAIL-Sensibilisierung von Tumorzellen *in vitro* (Wagner et al. 2007).

1.2.3 Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)

Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) wurde 1998 zeitgleich von zwei unterschiedlichen Forschergruppen (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998) als Ligand von OPG beschrieben. Bereits ein Jahr vorher wurde es von Anderson et al. und Wong et al. als wichtiges immunologisches Zytokin beschrieben. Bei fehlender einheitlicher Nomenklatur wurde RANKL anfangs auch als *Osteoprotegerin ligand* (OPGL), *Osteoclast differentiation factor* (ODF) und *TNF-related activation-induced cytokine* (TRANCE) bezeichnet.

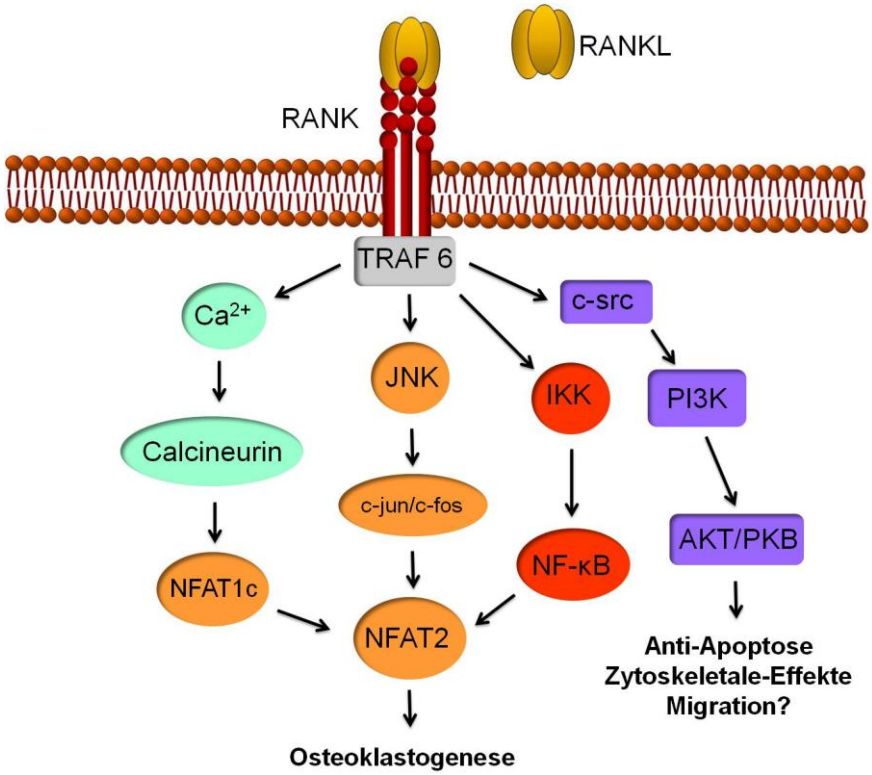

Abb. 3: RANKL/RANK-Signaltransduktion

Die durch die RANKL-Bindung initiierte Rezeptortrimerisierung führt zur Rekrutierung von Adaptermolekülen wie TRAF6. Die für die Osteoklastendifferenzierung essentielle Signaltransduktion wird über die Aktivierung von NFAT2 mittels Calcineurin, der JNK/c-fos/c-jun-Kaskade und der Aktivierung von NF-κB vermittelt. Über eine gemeinsame Rekrutierung von TRAF6 und c-src wird die PI3K/Akt/PKB-Signaltransduktionskaskade aktiviert, die antiapoptotische, zytoskeletale und möglicherweise migrationsfördernde Effekte vermittelt.

Im Jahre 2000 wurde die einheitliche Bezeichnung RANKL von der American Society of Bone and Mineral Research festgelegt (ASBMR President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das humane RANKL-Gen ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert. RANKL-mRNA kann aufgrund verschiedener Polyadenylierungssignale eine Länge von 2,2 bis 2,4 kb haben (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997). Das murine RANKL-Gen besteht aus 5 Exons, die sich über 40 kb des Genoms erstrecken (Kodaira et al., 1999). Auf dem RANKL-Promotor wurden Bindungsstellen für Vitamin D und Glukokortikoide nachgewiesen (Kitazawa et al., 1999; Kodaira et al., 1999).

Es sind drei verschiedene murine Isoformen des RANKL-Proteins bekannt. RANKL-1 ist die klassische membrangebundene RANKL-Variante, welche 316 Aminosäuren umfasst und ein Molekulargewicht von 38 kDA hat (Abb. 4). Es besteht eine hohe Sequenzhomologie zu anderen TNF-Liganden wie TRAIL, CD-40-Ligand und Fas-Ligand (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997). Diese RANKL-Variante wird im Rahmen posttranslationaler Prozessierung durch die *TNF-α-converting enzyme-like protease* (TACE) an den Aminosäuren 140 oder 145 in Formen mit kürzerer Ektodomänvariante gespalten (Lum et al., 1999). RANKL-2 ist eine kürzere RANKL-Variante mit einer Länge von 287 Aminosäuren, welche vor allem innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates lokalisiert ist. Sowohl RANKL-1 als auch RANKL-2 besitzen eine sogenannte „*Stalk region*" mit proteolytischer Fähigkeit, um RANKL von der Zellmembranoberfläche zu lösen (Lum et al., 1999). RANKL-3 ist eine lösliche Variante mit 199 Aminosäuren, welche auch als sRANKL beschrieben wurde (Ikeda et al., 2001; Kong et al., 1999).

Die höchsten Konzentrationen an RANKL finden sich im Knochen und Knochenmark. Hier wird es von einer Vielzahl skeletaler Zellen exprimiert (Nakamichi et al., 2007). Zudem wird RANKL von lymphatischem Gewebe exprimiert (Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998; Horwood et al., 1998; Wong et al., 1997; Yasuda et al., 1998; Xu et al., 2000; Zhang et al., 2001). Eine Reihe anderer Zelltypen die RANKL exprimieren sind T-Lymphozyten (Josien et al., 1999; Kong et al., 1999), synoviale Fibroblasten (Nakano et al., 2004) und unterschiedliche Tumorzellen (Zhang et al., 2001; Fimura et al., 2001).

1.2.4 Receptor activator of nuclear factor-κB (RANK)

Der Rezeptor, welcher alle bekannten Effekte von RANKL vermittelt, ist RANK *(Receptor activator of nuclear factor-κB)*. RANK wurde erstmalig 1997 von Anderson et al. als Mitglied der TNF-Rezeptor Familie und verantwortlicher Rezeptor für das durch RANKL geförderte Überleben von kultivierten dendritischen Zellen beschrieben (Anderson et al., 1997). Die Nomenklatur orientierte sich hierbei an einem seiner intrazellulären Transkriptionsfaktoren NF-κB. Seine Bedeutung für die Osteoklastogenese wurde ein Jahr später durch Nakagawa et al. erstmalig dokumentiert (Nakagawa et al., 1998), welcher in Zusammenarbeit mit einer anderen Arbeitsgruppe (Hsu et al.) die Bezeichnung *Osteoclast differentiation and activation receptor* (ODAR) prägte. Seine essentielle Bedeutung für den Knochenstoffwechsel wurde kurz darauf dadurch belegt, dass RANK-Knock out-Mäuse ein fast vollständiges Fehlen von Osteoklasten und eine extrem hohe Knochenmasse zeigen (Dougall et al., 1999; Li et al., 2000). RANK- und RANKL-Knock out Mäuse zeigten einen fast identischen Phänotyp, was die Bedeutung ihrer gemeinsamen Funktion im Rahmen des Knochenstoffwechsels weiter belegte. Eine Revision der Nomenklatur ergab im Jahr 2000 die einheitliche Bezeichnung RANK (American Society of bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das menschliche Gen von RANK befindet sich auf dem Chromosom 18q22.1. Die Hauptform der menschlichen RANK-mRNA ist 4,5 kb lang, aufgrund unterschiedlicher Polyadenylierungssignale existieren weitere Formen von 3,0-, 3,5- und 5,5- kb Länge (Anderson et al., 1997; Nagawaka et al., 1998). Das humane membranständige RANK-Polypeptid umfasst 616 Aminosäuren, bestehend aus einem Signalpeptid (28 Aminosäuren), einer für TNF-Rezeptoren charakteristischen, Cystein-reichen extrazellulären Domäne (184 Aminosäuren), einer Transmembranregion (21 Aminosäuren) und einer für die Signaltransduktion wichtigen C-terminalen intrazellulären Domäne (383 Aminosäuren). Es besteht eine hohe Sequenzhomologie zu CD27 und CD40 (Anderson et al., 1997; Simonet et al., 1997). Während eine konstitutive Aktvierung des RANK-Gens durch Insertionsmutationen im Exon 1 mit hereditären Osteopathien assoziiert werden (Hughes et al., 2000), wurden zwei Polymorphismen des RANK-Gens (+34863G > A und +35928insdelC) als prädisponierende genetische Faktoren für eine geringe postmenopausale Knochendichte beschrieben (Koh et al., 2007).

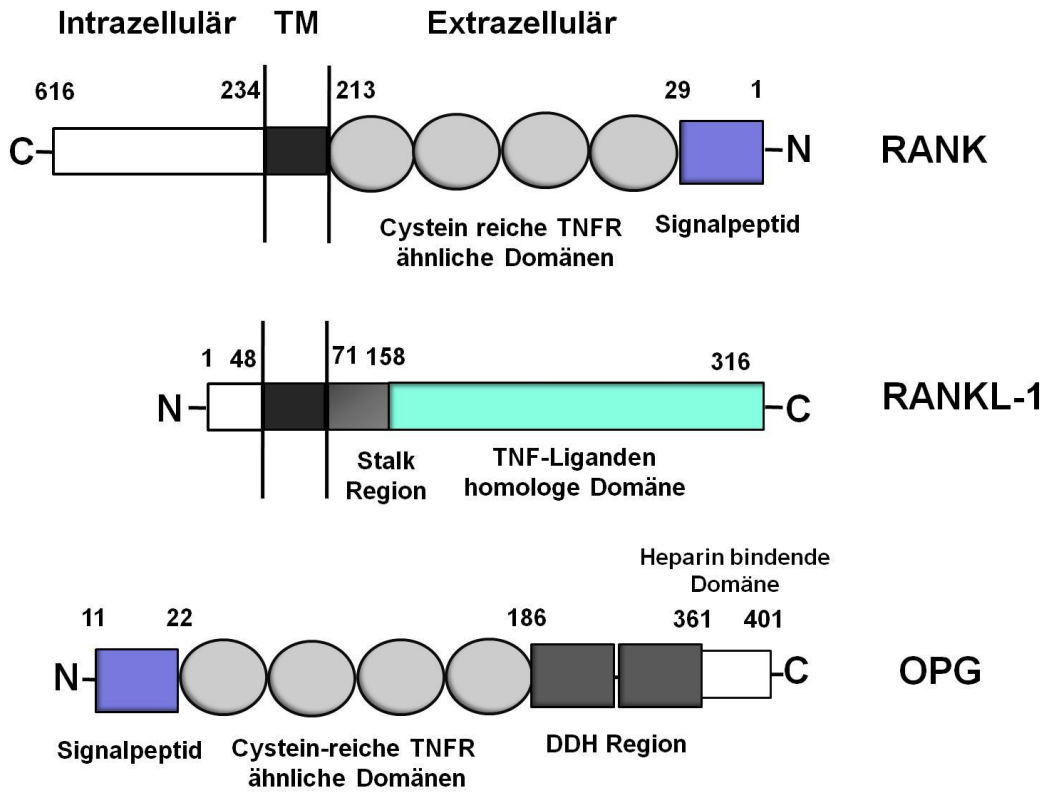

Abb.4: Proteinstrukturen von RANK, RANKL und OPG.

RANK ist ein transmembranes Protein mit langer C-terminaler intrazellulärer Domaine und extrazellulärer N-terminaler Region. RANKL-1 besitzt eine Transmembranregion (TM) und eine Stalk-Region mit proteolytischer Fähigkeit, welche die Lösung von der Membranoberfläche ermöglicht. Als lösliches Protein fehlt bei OPG die Transmembranregion. Sowohl RANK als auch OPG besitzen Cystein-reiche TNFR ähnliche Domänen welche RANKL binden. Die Funktion der DDH-Regionen des OPG ist ungeklärt. Die Heparin-bindende Domäne am C-Terminus des OPG limitiert seine Halbwertszeit (Adaptiert von Kearns et al., 2008).

Die stärkste RANK-Expression findet sich im Knochengewebe und im lymphatischen Gewebe. Dort wird funktionell aktives RANK-Protein vor allem auf Osteoklasten, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten und Fibroblasten exprimiert (Anderson et al., 1997; Green und Flavel, 1999; Hsu et al., 1999; Myers et al., 1999; Nakagawa et al., 1998). Zudem konnte eine RANK-Expression auf Endothelzellen (Min et al., 2003), glatten Muskelzellen (Zhang et al., 2002) und einer Vielzahl maligner Zellen (Fiumara et al., 2001) nachgewiesen werden.

Wie in Abb. 3 dargestellt, erfolgt die Bindung und Aktivierung von RANK über eine direkte Bindung der extrazellulären Cystein-reichen Domäne von RANKL und der extrazellulären Bindungsdomäne des trimerischen RANK (Lam et al., 2001). Diese Bindung führt zu einer Oligomerisierung von RANK und der Rekrutierung von Adaptermolekülen wie der Tyrosinkinase c-src und *TNF-receptor associated factors* (TRAFs). Von den sechs bekannten Formen von TRAF spielt TRAF6 eine entscheidende Rolle in der RANK/RANKL-Signaltransduktion. TRAF6 agiert als *Second messenger* und aktiviert unterschiedliche Proteinkinasen. So erfolgt die Induktion von Genen, welche die Differenzierung von Osteoklastenvorläufern zu aktiv resorbierenden Osteokloasten bewirken über die Aktivierung von NF-κB und über den *Nuclear factor of activated T-cells 2* (NFAT2). Der Transkriptionsfaktor NF-κB wird durch den *IκB-Kinase-Komplex* (IKK) aktiviert, was zu seiner Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus führt. Die Aktivierung von NFAT2 erfolgt unter anderem durch die TRAF6-abhängige Aktivierung der c-jun N-terminalen Kinase (JNK), welche die Expression von c-jun und c-fos steigert. C-fos interagiert mit dem *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT)-c1, der durch Calcineurin aktiviert wird und beeinflusst NFAT2. Die Steigerung des intrazellulären Kalziums, das Calcineurin aktiviert, wurde als eine der wichtigsten intrazellulären Effekte der RANKL/RANK-Interaktion beschrieben (Teitelbaum et al., 2005). Anti-apoptotische sowie zytoskeletale Effekte, vermutlich auch die durch RANKL-induzierte Migration einiger Krebszelllinien, werden über die TRAF6/c-src-abhängige Induktion der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K)/AKT/PKB-Signaltransduktionskaskade vermittelt (Wong et al., 1998; Chaisson et al., 2004; Matsubara et al., 2006; Wang et al., 2004; Harvey et al., 2007; Jones et al., 2006; Armstrong et al., 2008).

1.3 Expression von OPG, TRAIL, RANK und RANKL beim Mammakarzinom

Eine Reihe von Studien hat die Expression von OPG, TRAIL, RANK und RANKL sowohl in Brustkrebszelllinien als auch in Primärtumoren in Bezug auf Tumorstadium, Metastasierungstendenz und Östrogenrezeptor-Status untersucht. Während normales Brustgewebe kein RANKL exprimiert, wird dieses während der Schwangerschaft durch ein verändertes Hormonprofil induziert (Fata et al., 2000). In derselben Studie wurde

gezeigt, dass RANKL sowie RANK eine essenzielle Rolle für die Entwicklung der laktierenden Brust spielen. Die Datenlage zur Expression von RANKL in malignem Brustgewebe ist uneinheitlich. Während frühere Studien keine RANKL-Expression in gängigen Brustkrebszelllinien nachweisen konnten (Thomas et al., 1999), zeigten neuere Studien eine solide basale RANKL-Expression (van Poznkak et al., 2006; Cross et al., 2006; Bhatia et al., 2005; Reinholz et al., 2002). Es konnte auch eine RANKL-Expression in einem Teil der untersuchten primären Brusttumoren nachgewiesen werden. Eine weitere Arbeit zeigte zudem eine negative Korrelation zwischen der RANKL-Expression und dem metastasierenden Phänotyp (Bhatia et al., 2005).

Eine RANK-Expression konnte hingegen sowohl in gesundem Brustgewebe als auch im Mammakarzinom auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Fata et al., 2000).

Während die meisten Studien, welche die Interaktionen zwischen TRAIL und Brustkrebs untersuchen, in Tumore eingewanderte Monozyten als den primären Entstehungsort für TRAIL sehen, konnte auch eine deutliche TRAIL-Expression in einer Vielzahl der untersuchten primären Mammakarzinome gezeigt werden (van Poznkak et al., 2006; Cross et al., 2006).

Die meisten Studien wiesen eine basale OPG-Expression sowohl in gesundem als auch entartetem Brustgewebe nach (van Poznak et al., 2006; Cross et al., 2006). Obwohl OPG in gesundem Brustgewebe exprimiert wird, scheint es im Gegensatz zu RANK und RANKL keine besondere Bedeutung in der Entwicklung der Brustdrüsen zu haben. So zeigten OPG-Knock out Mäuse keine Störung in der Entwicklung oder Funktion ihrer Brustdrüsen (Mizuni et al., 1998). Die Bedeutung der OPG-Expression im Mamakarzinom ist hingegen kontrovers. Während Van Poznak et al. eine positive Korrelation zwischen Östrogenrezeptor und OPG-Expression nachwies, konnte eine andere Gruppe eine negative Korrelation zwischen OPG-Expression und Tumorgrad demonstrieren (Holen et al., 2005). Hingegen hatte eine frühere Studie keinen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Tumorstadien (duktales Carcinoma *in situ*, invasives duktales Karzinom und ossär metastasiertes Mammakarzinom) und OPG-Expression belegen können (Reinholz et al., 2002).

1.4 Entstehung und Persistenz von Knochenmetastasen

Neben der Leber und der Lunge ist das Skelettsystem am häufigsten von Metastasen betroffen. Hierbei sind Mamma- und Prostatakarzinome diejenigen Tumore, welche mit 60-80% den größten Anteil der Knochenmetastasen ausmachen (Rubens, 1998). Zwei unterschiedliche Theorien versuchen die bevorzugte Entstehung von Knochenmetastasen zu erklären. Während die hämodynamische Theorie von Ewing (1926), welche die Tendenz der Metastasierung von der organspezifischen Durchblutungsmenge abhängig macht, die knochenspezifische Metastasierung von Prostata- und Mammakarzinom nur ungenügend erklärt, erscheint die *„seed and soil"* Theorie von Paget (1889) zur Erklärung dieser Vorgänge geeigneter (Ewing, 1928; Paget, 1889). Diese postuliert, dass das spezielle Milieu des Knochens die Festsetzung metastasierter Mamma- und Prostatakarzinomzellen begünstigt. Die Knochenmatrix enthält eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren wie *Transforming growth factor-β* sowie *Insulin-like growth factor-1* und *-2* (Roodman, 2004a). Diese sind unter physiologischen Umständen in der Knochenmatrix gebunden, können aber durch osteoklastären Knochenabbau freigesetzt werden und begünstigen die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen durch Hemmung der Apoptose (Roodman, 2004a). Andererseits können auch Tumorzellen selbst durch Expression von RANKL und PTHrP (*Parathyroid hormone-related peptide*) die Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten fördern. Diese wechselseitigen, sich verstärkenden Effekte zwischen Tumorzellen und Osteoklasten im Rahmen der Pathogenese osteolytischer Knochenmetastasen werden als „*Circulus vitiosus*" beschrieben.

Zur erfolgreichen Metastasierung müssen eine Reihe an essentiellen Schritten durchlaufen werden (Mundy, 1997). Potentiell könnte die Inhibition jedes dieser Schritte eine wirksame Form der Therapie darstellen. Daher ist das genauere Verständnis der molekularen Grundlagen des Metastasierungsprozesses für die Entwicklung innovativer und präventiver Therapiestrategien von großer Bedeutung.

Im ersten Schritt der Metastasierung müssen sich Krebszellen aus ihrem Zellverband lösen. Hierfür werden vermehrt proteolytische Enzyme exprimiert, zusätzlich muss die Zahl an zellulären Adhäsionsmolekülen (CAMs) vermindert sein. Nach der Invasion in anliegende Blutgefäße zirkulieren die Tumorzellen und verlassen diese wieder im Bereich der Sinusoide des Knochenmarks. Die Adhäsion der Tumorzellen an der

Basalmembran erfolgt mittels Laminin und E-Cadherin (Albelda, 1994). Außerdem findet sich hier eine erhöhte Expression an CAMs, welche das Andocken an die extrazelluläre Matrix ermöglichen (Hynes, 1992). Ergänzend ist der Osteotropismus von Brustkrebszellen möglicherweise durch Organ-spezifische chemotaktische Substanzen begründet. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 eine hohe Expression in Mammakarzinom-Zellen aufweist, während sein Ligand SDF-1α in bevorzugt von Metastasen betroffenen Organen exprimiert wird (Muller et al., 2001). Allerdings führt eine Inhibition der Chemokinrezeptoren nur zu einer partiellen Hemmung der Metastasierung. In einer aufwändigen Arbeit konnten Jones et al. zeigen, dass die Aktivierung des RANK/RANKL-Signalwegs die Migration von Brustkrebszellen zum Knochen fördert (Jones et al., 2006). Als wesentlicher Grund für die bevorzugte skeletale Metastasierung RANK-positiver Tumorzellen wird das lokale Milieu des Knochengewebes mit seiner hohen RANKL-Expression angenommen. Dieser Mechanismus scheint auch von anderen Tumorzellen genutzt zu werden. So konnten ähnliche Effekte auch bei Melanom- und Prostatakarzinomzellen beobachtet werden (Armstrong et al., 2008). Die Blockade von RANKL konnte diesen Prozess effektiv verhindern, so ließen sich die Zahl und Komplikationen der Knochenmetastasen in einem Mausmodell durch die Gabe eines OPG-Fusionsproteins deutlich reduzieren (Jones et al., 2006).

Nach erfolgreicher Anlagerung am Knochen erfolgt im nächsten und klinisch relevantesten Schritt die Destruktion der Knochenstruktur. Tumorzellen können einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Knochenstruktur nehmen. Direkte Effekte werden mittels Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und osteolytischen Enzymen wie Cathepsin K vermittelt, welche unter anderem Kollagen I abbauen und prozessieren können (Nemeth et al., 2002; John und Tuszynski, 2001). Indirekte Effekte werden durch Aktivierung von Osteoklasten vermittelt. Hier spielt das PTHrP eine wesentliche Rolle. PTHrP agiert ähnlich wie PTH über die Bindung an den PTH-Rezeptor und führt zu einem gesteigerten Knochenabbau. Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass 69% aller primären Mammakarzinome PTHrP exprimieren. Möglicherweise ist die Expression im Bereich der Metastase noch wesentlich höher als im Primärtumor (Southby et al., 1990). Während es unklar bleibt, ob Mammakarzinomzellen suffiziente Mengen an RANKL sezernieren können, um Osteoklasten direkt zu aktivieren, können sie über eine Sekretion von PTHrP die RANKL-Produktion von Osteoblasten deutlich

steigern (Thomas et al., 1999). In der intakten Knochenmatrix sind vielzählige Wachstumsfaktoren gespeichert. Während des Knochenabbaus werden diese freigesetzt und interagieren mit den Tumorzellen. So konnte nachgewiesen werden, dass freigesetztes TGF-β die Produktion von PTHrP in Karzinomzelllen fördert (Thomas et al., 1999).

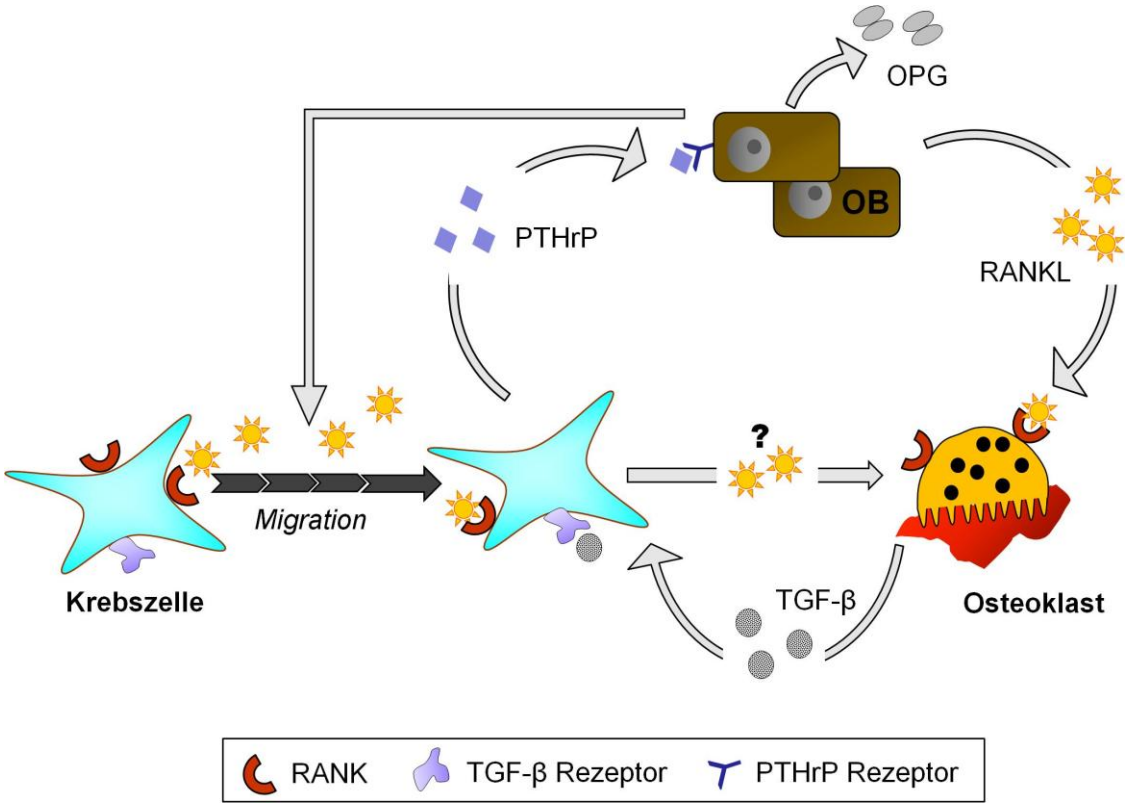

Abb. 5: Modulation der Interaktionen zwischen Tumorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten durch das RANKL/RANK/OPG-System

Die hohe Expression von RANKL durch Osteoblasten (OB), fördert die ossäre Migration RANK-exprimierender Mammakarzinomzellen. Krebszellen sezernieren Parathyroid hormone related peptide (PTHrP), welches die osteoblastäre RANKL-Sekretion fördert. Gleichzeitig wird die OPG-Produktion gehemmt. Das veränderte RANKL/OPG-Verhältnis führt zur verstärkten Aktivierung der Osteoklasten. Das durch die Osteolyse freigesetzte TGF-β wirkt wiederum stimulierend auf die Krebszellen. Inwieweit von den Tumorzellen produziertes RANKL direkten Einfluss auf die Osteoklastenaktivität nimmt ist unklar.

2. Fragestellung

Auf Basis der bisherigen Befunde zur Rolle von TRAIL und RANKL in der Pathogenese des Brustkrebs war es das Ziel des hier vorgestellten Projektes, das RANKL/TRAIL/OPG-System in Brustkrebszellen zu analysieren und funktionell zu charakterisieren.

Die zentrale Hypothese der Arbeit war, dass die Modulation der OPG-Spiegel in Mammakarzinomzellen durch proinflammatorische Zytokine, Steroidhormone und pharmakologische Substanzen einen Einfluss auf ihre Fähigkeit hat, der apoptotischen Wirkung von TRAIL zu entgehen.

Um diese Hypothese zu testen, wurden folgende Fragen gestellt:

I. **Unterliegen die OPG-, TRAIL- und RANKL-Spiegel in Mammakarzinomzellen einer Regulation durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α, Sexualhormone, Dexamethason und Bisphosphonate?**

II. **Induziert TRAIL die Apoptose in Brustkrebszellen?**

III. **Kann exogenes OPG die Wirkung von TRAIL blockieren?**

IV. **Sezernieren die Mammakarzinomzellen ausreichende Mengen an OPG um die TRAIL-Wirkung zu hemmen und lässt sich diese durch Modulation der OPG-Spiegel beeinflussen?**

V. **Welche Bedeutung hat RANKL als die Migration-förderndes Zytokin?**

VI. **Welche direkten Einflüsse haben Bisphosphonate auf den Zellzyklus, die Proliferation und Apoptose von Brustkrebszelllinien?**

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellen

Für die Versuche wurden zwei adhärente Brustkrebslinien benutzt. Die Östrogen-Rezeptor-positiven MCF-7-Zellen wurden aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Mammakarzinompatientin gewonnen und 1973 erstmalig beschrieben (Soule et al., 1973). MCF-7-Zellen weisen einen epithelialen Phänotyp auf und haben die Fähigkeit, Östradiol durch Bindung an zytoplasmatische Östrogen-Rezeptoren zu prozessieren (Brooks et al., 1973). Die MDA-MB-231-Zellen hingegen sind Östrogenrezeptor-negativ und wurden aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin isoliert. Sie wurden erstmalig 1974 beschrieben und haben einen epithelialen Phänotyp (Cailleau et al., 1974). MDA-MB-231 metastasieren im murinen Tumormodell und sind eine der am häufigsten verwendeten Brustkrebszelllinien überhaupt.

3.1.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien

Bezogen wurden sterile Abdecktücher als Arbeitsunterlage und sterile Tupfer von der Paul-Hartmann AG (Heidenheim), 10 ml-Spritzen von der B. Braun-Melsungen AG (Melsungen), die Desinfektionsmittel Gigasept FF und Terralin Liquid von der Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt) und Einmal-Latex-Handschuhe von der NOBA-Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG (Wetter).

Zellkultur

Die Zellkulturflaschen (75 cm^2 oder 25 cm^2), 6, 12 und 24 Loch-Zellkulturplatten, Cryo-Gefäße, Zentrifugenröhrchen, Glaspipetten und Einmalzellschaber waren von Greiner Bio-One (Frickenhausen), die Petrischalen von Becton Dickinson (Plymouth, U.K.), die Medien McCoy's 5A und RPMI 1640 von BioWest (Nuaillé France). Trypsin EDTA (1x) PAA, bovines Serum-Albumin (BSA), DMSO sowie die als Stimulanzien eingesetzten Hormone Testosteron, 17β-Östradiol, DHEA, 5α-

Dihydrotestosteron, Dexamethason, das Anti-Östrogen Fulvestrant (ICI 182,780) und der Aromataseinhibitor waren von Sigma (Steinheim). TRAIL, RANKL und IL-8 wurden von Peprotech (Hamburg) bezogen und Penicillin (10,000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml), fetales Kälberserum (FCS) und Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS) (mit Ca^{++}, Mg^{++}) von PAA Laboratories (Linz, Österreich). Die Zytokine IL-1β und TNFα wurden von R&D (Wiesbaden-Nordenstadt), Zoledronsäure von Novartis (Nürnberg), absoluter Äthanol als Lösungs- und Verdünnungsmittel einiger Stimulanzien von Riedel-de-Haen (Seelzen) bezogen.

RNA-Isolierung

Das RNeasy-Mini Kit und der QIA-shredder wurden von Qiagen (Hilden) erworben und β-Mercaptoethanol von Sigma (Steinheim).

Northern Blot

Agarose war von Gibco BRL (Paisley, Schottland), Formamid, Formaldehyd-Lösung, Methylenblau, MOPS, Bromphenolblau, Xylencyanol, NaCl, Natrium-Citrat und Glyzerin, Natriumazetat, Eisessig, Natriumhydroxid und EDTA von Sigma (Steinheim), Chromatographiepapier von Whatman (Maidstone, England), Nylonmembranen von Amersham (Little Chalfont, England) und Saugpapier von Kimberly-Clark (Reigate, England).

Radioaktive Markierung von cDNA und Northern Blot-Hybridisierung

Das Wizard-DNA-purification Kit war von Promega (Madison, USA), das Restriktionsenzym *Eco*RI von Boehringer-Mannheim (Mannheim), das DECAprime-II DNA-Labelling Kit von Ambion (Austin, USA), die [α^{32}P]-dCTP-Nukleotide und Senzacon von Amersham (Little Chalfont, England), Strahlenschutzvorrichtungen und Reinigungssäulen für radioaktive Sonden von Stratagene (La Jolla, USA), Express-Hybridisierungslösung von Clontech (Palo Alto, USA), humane β-Aktin-cDNA von BD Biosciences (Erembodegem, Belgien), Hybridisierungsbeutel von Gibco BRL (Paisley, Schottland), Kassetten mit Verstärkerfilmen in der Größe 20 cm × 25 cm von Rego (Augsburg). Die Röntgenfilme wurden von Kodak (Rochester, USA) bezogen.

Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA für die qRT-PCR wurde mit dem Omniscript® RT KIT von Qiagen (Hilden) durchgeführt.

RT-PCR

Es wurde ein 5 x First Strand Puffer, 0,1 M Dithiothreitl (DTT) und Super Script von Gibco BRL (Paisley, Schottland) benutzt. Der PCR-Reaktionspuffer und die Taq-DNA-Polymerase lieferte Roche (Mannheim). Der Längenstandard Gene 100 bp DNA Ladder Plus, der 10 mM dNTP Mix und der 6 x Farbstoff wurden bei Fermentas (St. Leon-Roth) bestellt.

Real-time-PCR

Es wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix von Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen, ebenso wurden 96 Loch-Platten und Abklebefolien für die qRT-PCR von Applied Biosystems bezogen.

Western Blot

Die Bradford-Lösung zur Proteinkonzentrationsbestimmung, der Marker SDS-PAGE Standard Broad Range und Nitrozellulose-Membranen kamen von Bio Rad (Hercules, USA), Röntgenfilme (Hyperfilm) von Amersham (Little Chalfont, England), TEMED, Tween 20, Tris und Ammoniumperoxiddisulfat von Sigma (Steinheim), Milchpulver und Rotiphorese von Roth (Karlsruhe), die Substanzen KCl, Na_2HPO_4, K_2HPO_4 und HCl von Merck (Darmstadt), Glyzin von Riedl-de-Häen (Seelzen), Towbin-Puffer und Dithiothreitol (DTT) von der Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), die verwendeten Antikörper gegen cleaved Caspase-3 (Asp 175), cleaved Caspase-7 und Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) und der Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte anti-Kaninchen IgG-Antikörper von Cell Signaling Technology (Frankfurt) sowie das zur Detektion verwendete SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate von Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, Irland).

OPG-Protein-Quantifizierung

Bezogen wurde das Osteoprotegerinprotein-ELISA von Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland). Die Präzision und Reproduzierbarkeit dieses ELISAs beträgt 8 - 10%

(Intraassayvariationskoeffizient) und < 10% (Interassayvariationskoeffizient). Die untere Nachweisgrenze für OPG liegt bei einer Konzentration von 0,14 pmol/l OPG in der Probe.

MTT-Assay

Die 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Reagenz wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Dimethylsulfoxid (DMSO) von Sigma (Steinheim) wurde zum Lysieren der Zellen verwendet.

SiRNA

Ein OPG-Knock down wurde mit zwei unterschiedlichen siRNA Sequenzen von Qiagen (Hilden)getestet (Hs_TNFRSF11B_2 HP siRNA und Hs_TNFRSF11B_4 HP siRNA). Als Transfektionreagenz wurde Lipofectamine 2000 von Invitrogen (Carlsbad, USA) eingesetzt.

Apoptose Assay

Zur Analyse der Apoptose wurde der kommerzielle Cell Death Detection Elisa^{PLUS} von Roche (Mannheim) verwendet.

Annexin V/Propidiumjodid

Der humane Annexin V-FITC-Assay wurde von Bender MedSystems GmBH (Wien) bezogen.

Migrationsassay

Für die Migrationsanalyse wurde ein 2 Kammer-Boyden-Migrationssystem von Becton Dickinson (Heidelberg) benutzt. Cell titer glow wurde von Promega (Mannheim) bezogen.

3.1.3. Lösungen und Puffer

BSA in PBS

1 × PBS (Phosphate buffered saline); 0, 1% BSA (Bovine serum albumin)

DEPC-behandeltes Wasser

Destilliertes Wasser mit 0,1% DEPC; nach 24 h Inkubation für 30 min autoklavieren

Northern Blot

Farbstoffpuffer für RNA-Gele

50% Glyzerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 1 mM EDTA pH 8,0

Methylenblau-Lösung

0,04% Methylenblau; 0,8 M Natriumacetat pH 4,0

10 × MOPS

20 mM MOPS (3-(N-morpholino) Propansulfonsäure); 5 mM Natriumacetat; 0,1 mM EDTA; mit NaOH pH-Wert 7,0 einstellen

20 × SSC (Standard sodium citrate)

3 M Natriumchlorid; 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

Hybridisierung

Waschlösung 1

2 × SSC; 0,05% SDS (Sodium dodecylsulphate)

Waschlösung 2

0,1 × SSC; 0,1% SDS (Sodium dodecylsulphate)

Western Blot

10x PBS-Puffer

80 g/l NaCl (136 mM); 2 g/l KCl (2,7 mM); 11,5 g/l Na_2HPO_4 (12,1 mM); 2 g/l K_2HPO_4 (1,5 mM); mit 1 M HCl pH-Wert 7,4 einstellen

Lysepuffer

62 mM Tris/HCl (pH 6,8); 2% v/w SDS; 10% Glyzerin; 50 mM DTT; 0,01% Bromphenolblau

5 x Laemmli-Probenpuffer

310 mM Tris/HCl (pH 6,8); 50% Glycerol (w/v); 10% SDS; 0,5% Bromphenolblau; Vor Verwendung β-Mercaptoethanol zusetzen (Endkonzentration 3,5% (v/v)) und gut mischen.

Trenngel-Puffer

1,5 M Tris Base (36,34 g/200 ml); 0,4 % SDS (4 ml, 20%ig); pH = 8,8

Trenngel-Lösung (12%)

2,5 ml Trenngelpuffer; 3 ml aqua dest; 4 ml Acrylamidlösung; 0,5 ml Glycerol; 20µl APS (10%), 20 µl Temed)

Trenngel-Lösung (10%)

2,5 ml Trenngelpuffer; 3,67 ml aqua dest; 3,33 ml Acrylamidlösung; 0,5ml Glycerol; 20 µl APS (10%), 20 µl Temed)

Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris Base (12,11 g /200 ml); 0,4 % SDS (4 ml/ 20%ig); pH= 6,8

Sammelgel-Lösung (12%)

25 ml Sammelgelpuffer; 59 ml aqua dest; 16 ml Acrylamid

10 x Laufpuffer

250 Mm Tris Base (30 g/L); 1,92 M Glyzin (144 g/L); 1% SDS (10g/L)

Transfer-Puffer

100 ml Towbin-Puffer; 900 ml aqua dest; 200 µl Tween 20

10 x Tris Buffered Saline (TBS)

auf 1 L aqua dest: 24,2 g Tris Base; 80 g NaCl; mit HCl pH 7,6 einstellen

Blockierungspuffer (Milch-TBS/T)

40 ml 1 x TBS; 0,1% Tween-20; 2 g Milchpulver (5% w/v)

Wasch-Puffer (TBS/T)

1 x TBS; 0,1% Tween-20

1. Antikörper Lösungspuffer (BSA-TBS/T)

1 x TBS; 0,1% Tween-20; 5% BSA

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und andere physikalische Angaben wurden SI- oder gesetzliche Einheiten verwendet.

3.1.4. Geräte

In der Zellkultur wurde ein Sterilflow Modell Lamin Air HB 2448 von Heraeus Instruments (Hanau) verwendet. Ebenfalls von Heraeus Instruments (Hanau) waren ein CO_2-begaster Brutschrank und eine Zentrifuge. Die Zellen wurden mit einem Mikroskop von Olympus (Japan) analysiert. Time lapse-Analysen wurden mit einem Axiovert inverted microscope von Carl Zeiss (Jena) durchgeführt. Die RNA-Isolierung wurde in einer Zentrifuge von Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg) durchgeführt. Zum Trocknen der RNA-Proben im Rahmen des Northern Blot wurde eine Kühlfalle Alpha I-5 von Christ (Osterode) mit angeschlossener Zentrifuge von Bachofer (Reutlingen) und Vakuumpumpe von Pfeiffer (Asslar) eingesetzt. Zum Erhitzen der Proben zur Denaturierung wurde ein Thermomixer von KOBE (Wetter) eingesetzt. Die horizontale Gelelektrophorese lief in einer Kammer mit passendem Netzgerät Power Pac 200 von Bio Rad Laboratories (Richmond, USA). Die RNA wurde mit Hilfe des UV Stratalinker™ 2400 von Stratagene (La Jolla, USA) auf der Nylonmembran fixiert. Ein Hybridisierungsofen von Bachofer (Reutlingen) wurden zum Hybridisieren verwendet. Die Röntgenfilme wurden in einem Filmautomat Curix 60 von Agfa (Köln) entwickelt.

Die Zelllysat-Proben wurden im Rahmen des Western Blot mit einem Ultraschallgerät von B. Braun-Melsungen AG (Melsungen) sonifiziert und in einem Thermoblock DriBlock DB 2A von Techne AG (Burkhardtsdorf) gekocht. Zur Gelelektrophorese wurde das Thermo EC-Mini Vertical Gel System von Techtum (Umea, Schweden) mit passendem Netzgerät Power 300 von Fisher Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, Frankreich) verwendet, der Blot erfolgte in Blotkammern von Bio Rad Laboratories (Richmond, USA) mit einem Netzgerät von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA). Die zur Proteinmessung eingesetzten Mikrotiterplatten wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer MRX von Dynatech Laboratories (Guernsey, UK) gelesen. Es wurden Pipetten von Eppendorf (Hamburg; Multipette plus) und von Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt; Pipetus-Akku) verwendet. Die Tischzentrifuge war von Stratagene (La Jolla, USA) und der Autoklav war von Fritz Gössner (Hamburg). Zur Fluoreszenz-Messung wurde das Fluoreszenz-Fluorimeter BMG FluoStar Galaxy von BMG Labtechnologies (Offenburg) verwendet, die Software kam von der ReTiSoft Inc. (Toronto, Kanada). Die reverse Transkription und die PCR fanden in einem Thermocycler Genius der Firma Labtech International (Burkhardtsdorf) statt. Die quantitative Real-time-PCR wurde in einer 7500 Fast-Real-time-PCR von Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt. Die FACS-Analyse wurde an einem FACScan-cytofluorometer von Becton Dickinson (Mountain View, CA) durchgeführt und mittels Cell Quest Software von Becton Dickinson ausgewertet.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

MCF-7 und MDA-MB-231 wurden unter gleichen äußeren Bedingungen bei 37°C und einem CO2-Anteil von 5% inkubiert. Das Kulturmedium setzte sich aus basalem Medium (Mac-Coy’s 5A für MCF-7 und RPMI 1640 für MDA-MB-231) und einem 10% Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml) zusammen. Alle 48 h wurde das Medium erneuert. Beim Erreichen einer 70-80% Konfluenz der Zellen wurden die Zellen geteilt. Dies erfolgte etwa 1-2 Mal pro Woche.

3.2.2. Zellteilung

Zum Passagieren wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Kultur mit PBS zweimal gespült. Anschließend wurden 3 ml Trypsin-EDTA hinzugefügt und 3-4 min zur Inkubation im Brutschrank gelagert. Nach dieser Zeit wurde leicht gegen den Flaschenboden geklopft und ein erfolgreiches Ablösen unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Reaktion wurde dann mit 10 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde entsorgt und das Zellpellet wurde mit 10 ml Medium resuspendiert. Für die weitere Kultivierung wurde in der Regel eine 1:5-Teilung durchgeführt.

Für die Durchführung von Experimenten folgte die Entnahme von 10 µl dieser Suspension zur Zellzählung mit der Hofbauer-Zählkammer (Gezählte Zellen x 10.000 = Gesamtzellzahl in der Suspension).

Bei Neuaussaat der Zellen wurden in 6 Loch-Kulturplatten à 2 ml/Loch 120.000 Zellen je Loch überführt. Die Kontrolle der gleichmäßigen Aussaat erfolgte mikroskopisch.

Das Passagieren der Zellkultur und deren Mediumwechsel wurden unter einem Sterilflow durchgeführt, um die Kontamination der Zellen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden.

Die Langzeitlagerung der Zellen fand in flüssigem Stickstoff statt. Die Zellen wurden dazu in Kryogefässen mit 70% Medium, 20% FCS und 10% DMSO bei -196°C eingefroren. Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C in einem Wärmebad. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert, um Zellschäden durch DMSO zu verhindern.

3.2.3. Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden ca. 72 h vor der Stimulation in 6 Loch-Kulturplatten bzw. 12 Loch-Kulturplatten (MTT-Assay) ausgesät. Ungefähr zwölf Stunden vor der Stimulation

wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmalig mit PBS gespült und gegen ein Hungermedium ausgetauscht, welches sich aus Basalmedium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 0,5% BSA zusammensetzte. So wurde ein Proliferationsstopp der Zellen erzielt und möglichen Interferenzen mit den im FCS enthaltenden Substanzen vorgebeugt. Der Grad der Konfluenz lag bei ungefähr 70%. Nach 12 Stunden Vorinkubation folgte die Zugabe der Stimulanzien. Versuchsabhängig wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten und mit variierenden Konzentrationen unter einem Sterilflow bei Raumtemperatur stimuliert. Die Konzentrationen lagen substanzabhängig zwischen 1 pg/ml und 10 ng/ml bzw. 10^{-11} und 10^{-4} M. Zeitkinetiken wurden in der Regel für bis zu 48 Stunden mit der wirksamsten Konzentration aus der Dosis-Wirkungskurve durchgeführt. Beendet wurde die Stimulation durch die Abnahme des Mediums oder Zelllyse.

3.2.4. RNA-Isolierung

Die Arbeit mit RNA muss mit äußerster Sorgfalt erfolgen, da sie durch Ribonukleasen (RNasen) und hohe Temperatur-Empfindlichkeit einer ständigen Gefährdung unterliegt. Daher wurden bei allen Arbeiten mit RNA spezielle Maßnahmen ergriffen. Es wurden Einmalhandschuhe getragen, welche häufig gewechselt wurden. Es wurden vornehmlich Einweggeräte (Pippettenspitzen, Gefäße u.a.) eingesetzt, die zuvor durch Autoklavierung sterilisiert worden waren. Wieder verwendbare Glas- und Kunststoffgefäße wurden ebenfalls entsprechend präpariert. Glasgefäße wurden dazu über Nacht bei 200°C gebacken, Gefäße aus Kunststoff wurden entweder mit 0,03% Wasserstoffperoxid und anschließend mit destilliertem Wasser behandelt oder die RNasen mit Hilfe eines RNase-Erase-Sprays der Firma Biomedicals (Aurora, USA) entfernt. Alle Lösungen und Puffer wurden mit DEPC-Wasser in gebackenen Gefäßen angesetzt und autoklaviert (20 × SSC, 10 × MOPS, Methylenblau-Lösung, Farbstoffpuffer für RNA-Gele), um eine effektive RNase-Hemmung zu erreichen. Um die Stabilität der RNA zu gewährleisten, wurden die Arbeiten mit RNA grundsätzlich auf Eis durchgeführt und die Arbeitsgeschwindigkeit zügig gehalten. Alle Schritte der RNA-Isolierung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus kleinen Mengen an Ausgangsmaterial wurde das Rneasy-Mini-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Das angewendete System ist ein zeitsparendes Verfahren, welches die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik kombiniert. Das mehrstufige System beginnt damit, dass man die Proben zuerst lysiert und homogenisiert. Dies geschieht in der Anwesenheit eines denaturierenden Guanidinisothiozyanat-enthaltenden Puffers (RLT Puffer), der unverzüglich RNasen inaktiviert. Dadurch wird die Isolierung von intakter RNA gesichert. Durch die Zugabe gleicher Mengen an Ethanol wird das Bindungsverhalten optimiert. In den Säulen bindet die RNA selektiv an die Membran der Säulen. Restliche Substanzen werden durch Waschung mit speziellen Puffern entfernt und im letzten Schritt die RNA mit RNase-freiem Wasser aus der Säulenmembran gelöst. Dieses Verfahren ermöglicht die Anreicherung von RNA-Molekülen, mit einer Mindestlänge von 200 Nukleotiden. So werden 5-20% der Gesamt-RNA, überwiegend RNA-Moleküle mit weniger als 200 Nukleotiden, wie 5,8 s rRNA, 5 s rRNA und tRNA selektiv ausgeschlossen und es kommt zu einer Anreicherung von mRNA. Die gewonnene Probe kann dann entweder direkt weiterverwendet werden oder bei -80°C für spätere Verwendung gelagert werden.

Vor Beginn der RNA-Isolation wurden dem RLT-Puffer 14,3 M β-Mercaptoethanol (10 µl β-ME auf 1 ml RLT Puffer) und dem RPE-Puffer, das 4-fache Volumen an 99,8% Ethanol zugefügt. Zudem wurde der Überstand der Zellen abgenommen und für spätere Proteinanalysen bei –20°C eingefroren. Die Zellen wurden dann mithilfe von 700 µl des RLT-Puffers von der Oberfläche der 6-Loch-Platten gelöst und ihre Zellwände zerstört. Danach wurde das Lysat mit 700 µl von 70%igem Äthanol vermischt. Die RNeasy-Säulen wurden jeweils in zwei Etappen mit 700 µl des Lysats beladen und dann für jeweils 1 min bei > 8000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach darauf folgendem Waschen mit 700 µl RW1-Puffer, 15 sec bei > 8000 x g, wurde jede Säule auf ein frisches Unterhütchen umgesetzt. Zwei weitere Waschungen mit jeweils 500 µl RPE-Puffer folgten für 15 sec bei > 8.000 x g. Zur vollständigen Entfernung von Puffer-Rückständen wurde nun für 2 min bei > 15.700 x g zentrifugiert. Danach wurden die Säulen auf beschriftete Eppendorf-Cups umgesetzt. Im letzten Schritt wurden 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und für 1 min bei > 8.000 x g zentrifugiert. Die eluierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

3.2.5. Isolierung von Poly-A-mRNA

Das PolyATract® mRNA-Isolationssystem von Promega (Madison, USA) wurde zur Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA zur Analyse der RANKL-Spiegel verwendet. Hierfür wurden Zellen in zwei 550 ml Zellkulturflaschen gezüchtet und behandelt. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Aufgrund der hohen Zellzahl wurden zwei RNeasy-Säulen verwendet. 100 µg Gesamt-RNA wurden in RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 µl verdünnt und für 10 min bei 65°C in einem Heizblock erwärmt. Dann wurden 3 µl biotinyliertes Oligo-dT und 13 µl 20 x SSC hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die paramagnetischen mit Streptavidin beladenen Partikel wurden dreimalig mit jeweils 0,3 ml 0,5 x SSC gewaschen. Ein Magnet richtete die Partikel auf einer Seite des Gefäßes aus, was es nach ca. 30 Sekunden erlaubte, den Überstand zu entfernen. Anschließend wurden die mit Streptavidin beladenen Partikel in 0,1 ml 0,5 x SSC resuspendiert und der gesamte Ansatz der Anlagerungsreaktion zugeführt. Der Ansatz wurde nun für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und minütlich gewendet, um ein Absetzen der Partikel zu verhindern. Die Partikel wurden magnetisch fixiert und nach Entfernung der Lösung viermal mit 0,3 ml 0,1 x SSC gewaschen. Danach wurde vorsichtig der Überstand abgenommen, ohne die mit Streptavidin beladenen paramagnetischen Partikel zu irritieren. In RNase-freiem Wasser, welches die Bindung zwischen dem Poly-A-Abschnitt der mRNA und dem Poly-T, welches an die Partikel geheftet ist, spaltet, wurden die Partikel gleichmäßig verteilt. Die Eluierung der Poly-A-mRNA erfolgt in zwei Schritten mit 0,1 ml und 0,15 ml RNase-freiem Wasser. Die Poly-A-mRNA Lösung wurde dann bei 9.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, um akzidentiell übertragene Partikel zu trennen. Die Poly-A-mRNA wurde dann wie Gesamt-RNA einer Konzentrations- und Reinheitsbestimmung unterzogen und bei –80 °C gelagert.

3.2.6. Photometrische Quantifizierung der RNA

Die eluierte RNA wurde quantifiziert, indem mittels UV-Spektralphotometrie die Konzentration ermittelt wurde. 5 µl der RNA-haltigen wässrigen Lösung wurden mit 95 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Verdünnungen wurden dann in eine

Quarzküvette gegeben und in einem UV-Spektralphotometer bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gemessen und deren Verhältnis berechnet. Als Referenz wurde RNase-freies Wasser verwendet. Zur Berechnung der Konzentration der RNA geht man davon aus, dass eine RNA-Lösung von 40 µg/ml bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm eine Absorption von 1 hat. Daraus resultiert eine Formel zur Berechnung der Konzentration (C [ng/µl]) von RNA in wässriger Lösung:

$$\mathbf{C = A_{260n} \times U \times V}$$

Der Umrechnungsfaktor U entspricht bei RNA 40 µg/ml und V [ng/µl] ist der Verdünnungsfaktor. Der Quotient aus A_{260nm} zu A_{280nm} gibt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung der Probe mit Proteinrückständen. Idealerweise sollte der Quotient über 1,6 liegen.

3.2.7. Northern Blot

Der Northern Blot ist eine Methode zur Darstellung der Genexpression. Dabei wird gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA auf eine Membran übertragen. Durch Kapillarkräfte wird die RNA aus dem Gel heraus auf eine reißfeste Nylonmembran gezogen und dort fixiert. Die RNA kann nun mit komplementären Nukleinsäure-Sonden hybridisiert werden. (Thomas, 1980) Da die relativen Positionen der RNA-Banden während des Transfers auf die Matrix beibehalten werden, lässt sich die RNA sowohl qualitativ als auch semi-quantitativ bestimmen.

In Vorbereitung für den Blot wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA (2 µg mRNA) der Brustkrebszellen in einer an eine Kühlfalle angeschlossene Vakuumzentrifuge innerhalb von 40-60 min getrocknet. Zur Resuspension wurden 14 µl eines Auftragspuffers aus 350 µl Formamid, 160 µl Formaldehyd-Lösung (37%) und 90 µl 10x MOPS verwendet. Um basengepaarte Nukleotidabschnitte zu denaturieren, wurden die Proben für 5 min auf 65°C erwärmt und anschließend sofort wieder auf Eis gekühlt.

Die Auftrennung der RNA anhand ihrer Größe erfolgt mittels Gelelektrophorese. Hier übt ein angelegtes elektrisches Feld eine Kraft auf die geladenen mRNA-Moleküle aus.

Diese Kraft führt zur Wanderung der mRNA abhängig von seiner Form und Größe sowie der Durchlässigkeit der Matrix, welche vom Agaroseanteil abhängig ist und nach der zu erwartenden RNA-Fragmentgröße gewählt wird. Der Formaldehydanteil im Gel wirkt denaturierend auf die mRNA und verhindert die Ausbildung ungünstiger Sekundärstrukturen, sogenannter Hair pin loops. Somit werden die mRNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die Laufgeschwindigkeit der Größe proportional ist (Lehrach et al., 1977).

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung diente ein 1,5%iges denaturierendes Agarosegel. Dieses setzte sich aus 3 g Agarose, 144,5 ml DEPC-Wasser und 20 ml 10 x MOPS zusammen. Nach dem Erhitzen wurden 35 ml Formaldehyd-Lösung hinzugegeben und diese zügig in einen Gelträger gegossen. Das Gel wurde eine Stunde zum Aushärten bei Raumtemperatur gelagert. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x MOPS in DEPC-Wasser als Laufpuffer gefüllt. Zum Beschweren der RNA-Proben wurde diesen vor dem Auftragen 6 µl Farbstoffpuffer hinzugefügt. Der darin enthaltene blaue Farbstoff machte es möglich, das Stadium der Aufteilung zu beurteilen. Die erste Stunde wurde eine Spannung von 130 V angelegt, gefolgt von 100 V für die folgenden zwei Stunden. Nach der ersten Stunde wurde das Gel halbstündlich um 180 Grad gewendet, dieses gewährleistete die gleichmäßige Verteilung der Ionen in dem Laufpuffer. Im Anschluss wurde das Gel zum Äquilibrieren auf einem Horizontalschüttler für 25 min in 200 ml 20 x SSC geschwenkt. Eine positiv geladene Nylonmembran wurde auf Gelgröße geschnitten und ebenfalls in 20 x SSC für 25 min geschwenkt. Der Blot bestand aus einem mit Chromatographiepapier bedecktem Glasblock, der in einer mit 20 x SSC gefüllten Glasschale stand. Das Gel wurde mit der Rückseite nach unten auf dem Chromatographiepapier platziert. Etwaige Luftblasen zwischen den Kontaktflächen wurden entfernt und das Gel an allen Seiten mit Folie abgeklebt, um einen direkten Kontakt der ober- und unterhalb des Gels liegenden Papiere zu verhindern. Bedeckt wurde das Gel mit der Nylonmembran, über der vier Schichten Chromatographiepapier und eine ca. 5 cm hohe Schicht Saugpapier positioniert waren. Diese wurde zusätzlich von einem ca. 1 kg schweren Gewicht beschwert. Es wurde nun über 24 h bei Raumtemperatur geblottet. Danach wurde die Nylonmembran für 1 min in 2 x SSC geschwenkt und anschließend mit Hilfe des UV-Crosslinkers bei 1.200 J fixiert. Um die Integrität der RNA zu kontrollieren wurde der Blot als nächstes gefärbt. Die Nylonmembran wurde hierfür 15 min lang in 5 %iger

Essigsäure und danach für 5 min in Methylenblau-Lösung geschwenkt. Im Anschluss wurde der Blot dreimal für 2 min mit DEPC-Wasser gewaschen. Der gefärbte Blot wurde getrocknet und in einem Hybridisierungsbeutel vor UV-Licht geschützt aufbewahrt. Zur Dokumentation wurde er mit einem Photokopiergerät abgelichtet.

3.2.8. Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

Synthese von OPG-, RANKL- und TRAIL-cDNA-Sonden

Die OPG-cDNA-Sonde, welche drei OPG-mRNA-Formen (2,9 kb, 4,2 kb und 6,5kb) nachweist, wurde durch RT-PCR aus einer humanen Gesamt-cDNA (1.356 bp) primärer humaner Osteoblasten mit den Primerpaaren (sense: 5´ ACC-TTG-AAT-TCA-GTA-TAT-ATA-ACG-TGA-TGA-GCG 3´ und anti-sense: 5´ ACC-TTG-AAT-TCA-TTA-TCA-TCC-ATG-GGA-TCT-CGC 3´) und unter Verwendung einer *Eco*RI-Schnittstelle amplifiziert und in den pGEM-T easy-Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert. Nach Herstellung eines 4,4 kbp pGEM-OPG Expressionsvektors erfolgte die Amplifikation in Escherichia coli JM 109 und die Präparation der Plasmide. Das pGEM-OPG wurde von *Eco*RI verdaut und anschließend die OPG-cDNA-Sonde unter Verwendung des Wizard DNA purification Kit von Promega (Madison, USA) gereinigt (Hofbauer et al., 1998). Die humane RANKL-cDNA wurde von Dr. D. Lacey (Amgen, Thousand Oaks, USA) zur Verfügung gestellt und wies eine mRNA von 2,4 kb nach (Lacey et al., 1998). Die humane TRAIL-cDNA wurde von Dr. Evers zur Verfügung gestellt (Wang et al., 2000). Das als Housekeeping-Gen verwendete β-Aktin von Clontech (Palo Alto, USA) wies eine mRNA von 2,0 kb nach.

Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden

Die cDNA-Sonden wurden mithilfe des DECAprime II DNA Labelling Kit der Firma Ambion (Austin, USA) radioaktiv markiert. Hierbei bindet an einzelsträngige DNA die "Decamer Primer". Dieser Komplex wird von einer DNA-Polymerase I (Klenow) mit fehlender 5`→3`-Aktivität als Initiationsstelle zur Synthese des komplementären DNA-Stranges genutzt, bei der das radioaktive [α-^{32}P]-dCTP–Nukleotid eingebaut wird (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Als Ansatz wurden 10 µl Nuklease-freies Wasser, 1 µl cDNA und 2,5 µl 10 × Decamer in ein Eppendorfröhrchen gegeben, durchmischt, zentrifugiert und durch 5-minütiges Erhitzen bei 95°C die DNA denaturiert. Es folgte die sofortige Lagerung auf Eis und Zugabe von 5 µl 5 × Puffer-dCTP. Die folgenden Arbeitsschritte wurden in einem für die Arbeit mit radioaktiven Nukleotiden speziell ausgestatteten Raum durchgeführt. Zu dem Ansatz wurden nun 5 µl [α-^{32}P]-dCTP und 1,5 µl Klenow-DNA-Polymerase I pipettiert und für 60-120 min bei 37 °C inkubiert. Um nicht eingebaute Nukleotide von der radioaktiv markierten cDNA zu trennen, wurde das *Push-columns*-Säulensystem der Firma Stratagene verwendet. Diese beruhen auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Hierbei werden freie Nukleotide an das Austauscherharz der Säulen gebunden, DNA einer Länge von 17 bp - 50 kbp passiert dieses ungehindert. Mit 70 µl 1 × STE-Puffer wurde die DNA äquilibriert, welche mithilfe einer luftgefüllten 10 ml-Spritze durch die Säulen gedrückt wurde. Die radioaktive Probe wurde nun auf die Säulen gegeben und unter Benutzung einer luftgefüllten 10 ml-Spritze hindurchgedrückt, sowie unten in einem Eppendorfcup aufgefangen. Zum Schutz vor radioaktiver β-Strahlung wurde dieser Abschnitt hinter einer Apparatur aus Plexiglas durchgeführt. Die radioaktive Probe wurde nun auf die Säulen gegeben und mit einer luftgefüllten 10 ml-Spritze hindurch gedrückt und in einem Eppendorfröhrchen gesammelt. Zur vollständigen Elution der cDNA folgte ein weiterer Durchgang mit 70 µl 1 × STE-Puffer und zweimaligem Aufsetzen der luftgefüllten Spritze. Die cDNA-Probe wurde bis zur Verwendung zur Northern-Hybridisierung in einem Isolationsgefäß für Radioaktivität bei -20°C aufbewahrt.

Hybridisierung

Die Hybridisierung von gelelektrophoretisch aufgetrennter und anschließend im Northern Blot-Verfahren auf einer Membran fixierten RNA ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen. Radioaktiv markierte cDNA-Sonden lokalisieren und binden an ihre komplementäre RNA und werden durch Autoradiographie nachgewiesen (Alwine et al., 1977; Bonner, 1987; Meinkoth und Wahl, 1984).

Im Vorfeld wurden der Hybridisierungsofen, die Hybridisierungslösung und Hybridisierungsflaschen auf 68°C vorgewärmt. Die Nylonmembran wurde für eine halbe Stunde mit 15 ml der Hybridisierungslösung in einer Hybridisierungsflasche

gegeben und bei 68°C im Ofen inkubiert. Eine gleichmäßige Benetzung der Membran wurde dabei durch kontinuierliche Rotation der Hybridisierungsflasche gewährleistet. Die radioaktiv markierte cDNA-Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und dann sofort für 5 weitere Minuten auf Eis gestellt. Die Hybridisierungslösung wurde nach 30-minütiger Inkubationszeit wieder aus der Hybridisierungsflasche entfernt und durch eine 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt, denen zuvor 15 µl der Probe radioaktiver cDNA-Sonde zugesetzt worden war. Diese wurde nun über Nacht im Ofen unter kontinuierlicher Flaschenrotation inkubiert. Am folgenden Morgen wurde der Ofen auf 50°C gekühlt, gleichzeitig wurde außerhalb des Ofens mit dem Waschvorgang der Nylonmembran begonnen. Um die nicht-gebundenen cDNA-Sonden zu entfernen, wurde die Nylonmembran zunächst bei Raumtemperatur zweimal für 10 min in jeweils 500 ml Waschlösung 1 (2 × SSC; 0,05% SDS) auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Darauf folgte die Waschung mit der auf 50°C vortemperierten Waschlösung 2 (0,1 × SSC; 0,1% SDS) in einer neuen Hybridisierungsflasche im Ofen für 40 min bei 50°C. Die Nylonmembran wurde kurz mit Chromatographie-Papier angetrocknet und in einem Hybridisierungsbeutel platziert. Dieser wurde im Anschluss zugeschweißt, um die Austrocknung der Membran, das Verkleben von Membran und Röntgenfilm sowie die radioaktive Verunreinigung der Kassette zu verhindern. Sämtliche dieser Vorgänge wurden hinter einem Plexiglasschutz durchgeführt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und diese in einer Kassette mit beidseitigen Verstärkerfolien für 24 h bei -80°C exponiert. Je nach Filmschwärzung wurde ein neuer Film aufgelegt und die Expositionszeit bestimmt. Diese lag bei OPG-Hybridisierung bei zwei Tagen bis fünf Tagen, bei TRAIL bei 2-6 h, bei RANKL bei 6-7 Tagen und bei β-Aktin-Hybridisierung bei 1 - 4 h.

Dehybridisierung

Um eine erneute Hybridisierung der mRNA auf der Nylonmembran zu erlauben, wurde die gebundene radioaktive cDNA-Sonde zuvor wieder entfernt. Hierzu wurde eine Lösung aus 500 ml DEPC-Wasser und 12,5 ml 20% SDS auf 90°C erhitzt und die Nylonmembran darin für 10 min geschwenkt. Im Anschluss folgten weitere 10 min Schwenken in der Lösung bei Raumtemperatur. Die Nylonmembran wurde anschließend wieder in einem Hybridisierungsbeutel platziert und bis zur erneuten Hybridisierung bei 4°C gelagert.

3.2.9. Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Zur Durchführung einer PCR ist die Herstellung von cDNA aus den zu analysierenden RNA-Proben notwendig. Hierfür wird das Enzym Reverse-Transkriptase (auch RNA-abhängige DNA-Polymerase) verwendet. Mit Hilfe des Rneasy-Mini-Kits von Qiagen wurde wie bereits beschrieben die RNA isoliert. 1-2 µg RNA wurde dann mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14,1 µl gebracht. Pro Probe wurden dann 0,4 µl Oligo-dT-Primer, 0,5 µl RNase-Inhibitor (20 Units/µl), 2 µl DNTP-Mix, 2 µl 10x Buffer RT und 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das reverse Transkriptat wurde bei –20°C aufbewahrt.

3.2.10. Amplifizierung von cDNA mittels RT-PCR

In diesem Verfahren werden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche spezifische Sequenzen der produzierten cDNA amplifizieren. Der PCR dienten 2 µl des RT-Produkts als Template. Folgende Sense- und Anti-Sense-Primersequenzen wurden verwendet: RANKL sense 5’ GCC-AGT-GGG-AGA-TGT-TAG 3’, RANKL anti-sense 5’ TTA-GCT-GCA-AGT-TTT-CCC 3’, TRAIL sense 5’AAA-GAG-CAA-CAA-TCC-ATC-TCT 3’, TRAIL anti-sense 5’ TGG-TGC-CTC-TTC-TCT-CTT-TTG 3’.

Es wurden 2 µl cDNA in 19,05 µl destilliertem Wasser, 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 0,25 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl Sense- und Antisense-Primer und 0,2 µl Taq-Polymerase verwendet. Dieser aus 25 µl bestehende Ansatz wurde anschließend in einer aus 25 bis 30 Zyklen (30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C, 30 s bei 72°C) bestehenden PCR-Reaktion amplifiziert. Um unspezifische Reaktionen vor Beginn der PCR zu vermeiden, wurden sämtliche Ansätze auf Eis pipettiert. Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Proben bei 4°C gekühlt.

Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese in 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert, nachdem sie mit Ethidiumbromid gefärbt wurden. Zur Herstellung des 1,5%igen Agarosegels wurden 3 g Agarose in 200 ml 0,5xTBE durch Erhitzen gelöst und 4µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE und die Laufzeit betrug 1,5 h bei 120 Volt. β-Aktin diente als

Ladungskontrolle. Die Größenbestimmung der PCR-Fragmente wurde durch den mitgelaufenen Längenmarker (100 bp DNA Ladder Plus der Firma Fermentas, St.Leon-Rot) ermöglicht.

3.2.11. Real-time-PCR

Die Amplifizierung von cDNA mittels Real-time-PCR bietet den Vorteil gegenüber der konventionellen PCR, dass hier eine relative Quantifizierung möglich ist. Die Quantifizierung erfolgte durch Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus durchgeführt wird. Diese nimmt proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu. Anhand einer Analyse in der kurzen exponentiellen Phase der PCR erfolgt eine Quantifizierung. Als markierender Farbstoff wurde Sybr Green I verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die DNA ein, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Die ansteigende Menge an DNA korreliert daher mit der Zunahme an Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Quantifizierung erfolgt im Anschluss an die 40 Zyklen dauernde PCR. Der Durchlauf einer PCR erfolgte nach einem Standard-Protokoll mit speziell für diese Temperaturen entworfenen und optimierten Primern. Das Referenzgen Cyclophilin wurde in jeder PCR mitbestimmt und ein Verhältnis-Wert berechnet. Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurve der amplifizierten Produkte durchgeführt und analysiert. Hiermit konnte die Spezifität der gemessenen DNA-Produkte gesichert werden. Für die PCR wurde die gewonnene cDNA im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Der Ansatz für die PCR bestand pro Loch aus 10 µl Power Sybr Green 2x, 1 µl Primer (0,5 µl F und 0,5 µl R á 20 pmol/l), 7 µl destilliertem Wasser und 2 µl cDNA. Zuerst wurde hierfür der Sybr Green-Primeransatz in den entsprechenden Wells der 96 Loch-Platte vorgelegt, anschließend wurde die cDNA hinzugefügt. Dieser Vorgang wurde zügig und möglichst sauber durchgeführt, um Verschmutzungen der Platte zu verhindern.

Folgende Primer Sequenzen wurden verwendet:

ER-α	sense 5’ AAG AAA GAA CAA AGT C 3’ anti-sense 5’ CAA GCT AGG CGC GAA A 3’
ER-β	sense 5’ TGC GCC AGC CGT TAC T 3’ anti-sense 5’ TGC GCC AGC CGT TAC T 3’
OPG	sense 5’ GCT AAC CTC ACC TTC GAG 3’ anti-sense 5’ TGA TTG GAC CTG GTT ACC 3’
TRAIL	sense 5’ CTT CAC AGT GCT CCT GCA GT 3’ anti-sense 5’ TTA GCC AAC TAA AAA GGC CCC 3’
TRAIL-R1	sense 5’ CAA GAC CTT CAA GTT TGT CGT CGT C 3’ anti-sense 5’ TGC TGC ACT TCC GGC ACA TCT C 3’
TRAIL-R2	sense 5’ GGT TTT GTT GTT TAG TTA CAT TAG GCT TT 3’ anti-sense 5’ ACA CCA ACC ACG AGT GAC ACA 3’
Cyclophilin	sense 5’ CCC TCC ACC CAT TTG CT 3’ anti-sense 5’ CAA TCC AGC TAT GGG A 3’

3.2.12. Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine aus Proteinextrakten. Dabei werden Proteinextrakte unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt und durch anschließendes Blotten auf eine Membran übertragen. Proteine bestimmter Aminosäuresequenzen (Antigen) können nun mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden, an diese binden dann in einem weiteren Schritt Meerrettichperoxidase (HRP, horseradisch peroxidase) gekoppelte Zweitantikörper. Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei welcher eine Lumineszenz detektiert werden kann. Dies erlaubt eine semi-quantitative Beurteilung der Expression bestimmter Proteine.

Vorbereitung

Das Zellmedium wurde vollständig aus den 6-Loch-Platten entfernt. In jedes Loch wurden nun 70 µl des zuvor angesetzten Lyse-Puffers pipettiert, diese jeweils mit

Einmalschabern gründlich ausgeschabt und das Zelllysat sofort in eisgekühlte Eppendorfhütchen überführt. Nach anschließendem Sonifizieren der Lysat-Proben folgte 5-minütiges Zentrifugieren bei > 12.000 x g, um unlösliche Zellbestandteile zu isolieren.

Während der Arbeit mit Proteinextrakten wurde stets auf eine gute Kühlung der Proben und ein zügiges Arbeitstempo geachtet, um die Proteolyse durch Proteasen möglichst gering zu halten.

Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford

Pro Vertiefung einer 96 Loch-Kulturplatte wurden 250 µl Bradford-Lösung (Stocklösung von der Firma BioRad, Hercules, USA; Verdünnung 1:5 mit aqua dest) vorgelegt (Bradford, 1976). Für die Proteinstandard-Lösungen wurde aus einer Stocklösung 1 mg/ml BSA in H_2O eine Verdünnungsreihe, durch Zugabe von 1 µl, 2 µl, 4 µl, und 8 µl in Doppelwerten zu der vorgelegten Bradford-Lösung, erstellt. Deren Messwerte bildeten die Eichkurve für die Bestimmung der Protein-Konzentrationen der Proben, von denen jeweils 2 µl in Doppelwerten in die vorbereiteten Wells pipettiert wurden. Nach Mischen und 15 min Inkubation wurde in einem Mikrotiterplattenphotometer die Extinktion bei λ = 570 nm gemessen.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zunächst wurden die Proteinextrakte in einem Natriumdodecylsulfat (SDS) -haltigen Puffer, dem Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Lösung wurde je Probe aus 20 µl 5 x Laemmli-Puffer und 60 µl DEPC-Wasser/Protein-Gemisch mit einer Gesamtkonzentration an Protein von ca. 2 µg / µl angesetzt. Die Homogenisierung der Proteinladung durch Anlagerung anionischer Moleküle des SDS an die entfalteten Proteine schafft die Grundlage für die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach ihrem Molekulargewicht.

Abhängig von der Molekulargröße der zu untersuchenden Proteine wurden 10%ige, 12%ige oder 15%ige Gele hergestellt. Zur Herstellung der Gele wurden zunächst die Glasplatten und Spacer der Gelapparatur mit Ethanol gereinigt, in der Halterung eingespannt und mit Klammern fixiert. Um eine vorzeitige Polymerisation zu vermeiden, wurden die Gellösungen auf Eis zubereitet und TEMED (N, N, N, N,

Tetramethylethylendiamin) und 10% APS (Ammoniumperoxiddisulfat in aqua dest) jeweils erst kurz vor Ausguss des Gels der Lösung zugegeben. Als erstes wurde das Stoppgel (200 µl Trenngel-Lösung, 2 µl und 2 µl TEMED) zwischen die Platten gegossen und für 10 min gehärtet. Danach wurden ca. 2/3 der Platte mit dem Trenngel und direkt im Anschluss das letzte 1/3 mit dem Sammelgel vollgegossen und der Ethanol-gesäuberte Kamm eingesteckt. Nach 30 bis 45 min Aushärtungszeit wurde der Kamm gezogen, die Platten in die Laufkammer eingespannt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Als Standard wurden 5 µl Marker in die erste Tasche gegeben, in die folgenden je 20 µl der Proteinproben. Die Elektrophorese wurde bei 125 V für 15 min bis Erreichen des Trenngels und von dort an für weitere 45 min bei 200 V durchgeführt.

Western Blot

Im nächsten Schritt erfolgte der Geltransfer auf eine Nitrozellulose-Membran. Das Gel und die Membran wurden zunächst für 5 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Es folgte die Schichtung mit dem Schwamm zuunterst, darauf zwei Schichten Chromatographie-Papier, dann das Gel und darauf die Membran und zuoberst wieder zwei Schichten Chromatographie-Papier und ein Schwamm. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sämtliche Luftblasen ausgestrichen wurden. Geblottet wurde bei 4°C bei 300 mA und 500 V für 1 Stunde. Nach Herausnehmen aus der Blot-Kammer wurde die Membran mit Ponceau S. für ca. 5min eingefärbt. Anhand der Proteinfärbung ließ sich der erfolgreiche Transfer nachweisen und der Blot auf Gelgröße zurechtschneiden. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch ca. 10 min Schwenken in TBST. Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran für 1-2 h bei Raumtemperatur in 5% Magermilch in TBST blockiert. Dann erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C.

Der Signalnachweis erfolgte unter Nutzung eines Meerrettichperoxidase-konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion. Dazu wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 10 ml Milch-TBS/T mit 1 µl anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) unter leichtem Schwenken inkubiert, anschließend mit Waschpuffer 3 x 15 min gewaschen und dann für 5 min in eine spezielle Detektionslösung gelegt. Zur Darstellung des Ergebnisses wurde die Membran initial für 1 und 5 min in einer Filmkassette einem Röntgenfilm exponiert sowie im Folgenden entsprechend der Signalintensität.

3.2.13. OPG-Proteinanalyse

Zur Proteinanalyse des von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen ins Zellkulturmedium freigesetzten OPG-Proteins wurde der Osteoprotegerin-Assay der Firma Immundiagnostik (Bensheim) eingesetzt. Es handelt sich hierbei um einen auf dem Sandwich-Prinzip beruhenden ELISA. Verwendet werden zwei spezifische Antikörper gegen OPG. Zum einen der Bindeantikörper, welcher fest an die Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatte gebunden ist und der zweite mit Biotin markierte Detektionsantikörper. So entsteht ein Sandwich aus Bindeantikörper-OPG-Detektionsantikörper. Unspezifisch gebundenes Material wird durch einen Waschgang entfernt. Das OPG wird über ein Streptavidin-Peroxidase/TMB-System quantifiziert. Ein Stoppen der Enzymreaktion führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb, wobei die Farbintensität proportional zur OPG-Konzentration ist. Es erfolgt eine photometrische Messung der Absorption der chromogenen Verbindung bei 450 nm und parallel dazu die Erstellung einer Standardkurve der Absorptionen versus bekannter Standardkonzentrationen (25; 12,5; 6,25; 3,13 pmol/l). Hieraus werden die Konzentrationen der Proben ermittelt.

In Vorbereitung des ELISA wurde das Waschpufferkonzentrat 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt. Zur Erstellung der Standard-Verdünnungsreihe wurde die OPG-Stocklösung (500 pmol/l) mit Zellkulturmedium 1:20 vorverdünnt, dieser Ansatz diente als Standard mit der höchsten Konzentration (S1 = 25 pmol/l). Ausgehend von dieser Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:2 Verdünnungsschritten (S2 = 12,5 pmol/l, S3 = 6,25 pmol/l, S4 = 3,13 pmol/l) hergestellt. Als Standard S5 = 0 pmol/l wurde Zellkulturmedium eingesetzt. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl Assaypuffer vorgelegt. 50 µl Standard in Doppelwerten und Proben in Dreifachwerten wurden hinzu pipettiert. Nach Zugabe jeweils 50 µl des 2. Antikörpers (anti-OPG, biotinyliert) wurde vorsichtig durchmischt und die Mikrotiterplatte 24 h bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Inhalt der Vertiefungen der Mikrotiterplatte verworfen und diese fünfmal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschgang musste die Mikrotiterplatte auf Saugpapier ausgeschlagen werden. 200 µl des Konjugats (Streptavidin, Peroxidase-markiert) wurden nun für 1 h bei Raumtemperatur den Vertiefungen zugesetzt. Anschließend wurde der Inhalt der Vertiefungen verworfen, fünfmal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend auf Saugpapier ausgeschlagen. 200 µl Tetramethylbenzidin (TMB)-

Lösung in den Vertiefungen lösten die Quantifizierungsreaktion aus. Entsprechend der Farbdifferenzierung erfolgte nach 15-20 min Inkubation bei Raumtemperatur die Zugabe von 50 µl Stopplösung je Vertiefung und beendete somit die Reaktion unter Farbumschlag von blau nach gelb. Nach kurzem Mischen wurde die Extinktion sofort in einem Mikrotiterplattenphotometer bei λ = 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von λ = 690 nm gemessen. Ergab sich bei den Proben eine OPG-Konzentration höher als der höchste Standard, so wurden diese mit Waschpuffer verdünnt und einem zweiten Assay unterzogen.

3.2.14. MTT-Assay

Das MTT-Assay dient der Quantifizierung lebender Zellen. Es findet daher Anwendung um Zellzahlunterschiede zwischen Kontroll- und behandelten Zellen aufzudecken. Hierbei kann allerdings nicht zwischen apoptotischen oder proliferativen Ursachen unterschieden werden. Zellen für den MTT-Assay wurden in der Regel in 6 Loch-Platten ausgesät. Bei ca. 70%iger Konfluenz wurden die Zellen über Nacht ausgehungert. Am nächsten Morgen wurde das Medium erneut gewechselt, um Verfälschungen durch sezerniertes OPG oder andere Substanzen zu vermeiden. Dann wurden die Zellen entsprechend des Versuches stimuliert oder transfiziert. Stimulationen mit TRAIL erfolgten für 24 Stunden. Neutralisierende Antikörper wurden 2 Stunden vorher dem Medium zugefügt. Die Transfektion erfolgte wie beschrieben. Nach der Behandlungszeit wurden 120 µl MTT-Substanz jedem Well zugefügt und für 1-2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium sorgfältig entfernt und 800 µl DMSO zum Herauslösen der aufgenommenen MTT-Substanz in jedes Well pippetiert. Die 6-Loch-Platte wurde dann für 10 min auf einem Plattenschüttler gestellt um die Zellen vollständig zu lysieren. Einhundert µl jeder Messprobe wurden dann in Doppelbestimmungen in eine 96-Loch-Platte pippetiert und bei 570 nm quantifiziert. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zur Zahl der intakten Zellen, da nur intakte, Stoffwechselaktive Zellen in der Lage sind, MTT-Substanz aufzunehmen.

3.2.15. Apoptose-Assay

Zur Analyse der Apoptose bei unbehandelten Zellen und Zellen, bei denen die OPG-Expression unterdrückt wurde, erfolgte der Cell Death Detection Elisa^{PLUS} von Roche. Dieser Assay basiert ähnlich wie der OPG-Elisa auf dem Sandwichprinzip. Die zu untersuchenden Zellen wurden in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Dann wurden mit Biotin markierte Antikörper gegen Histonkörper sowie mit Peroxidase konjugierte Antikörper gegen DNA-Fragmente hinzugefügt. Während der 2-stündigen Inkubationszeit binden die Anti-Histon-Antikörper an die Histonkörper der Nukleosomen und gleichzeitig bindet das Biotin an die Streptavidinphase der Platte. Der Anti-DNA-Antikörper bindet an die DNA der Nukleosomen. In folgenden Waschschritten wurden ungebundene Antikörper entfernt. Die Menge der gebundenen Nukleosomen konnte nun durch die im Immunokomplex zurückgehaltene Peroxidase quantifiziert werden. Hierfür wurde ABTS als Substrat verwendet. Die Proben wurden daraufhin für 10 bis 20 min auf einem Schüttler bei 250 rpm inkubiert, danach wurde die Reaktion mit einer gelieferten Stopplösung angehalten. Mit den Proben wurden jeweils positive und negative Kontrollen getestet. Nach photometrischer Bestimmung bei 405 nm und der Referenzwellenlänge von 490 nm wurden die Werte subtrahiert und durch die Werte der Negativkontrolle geteilt.

3.2.16. Annexin V/Propidiumjodid-FACS-Analyse

Die Apoptose nach den TRAIL-Behandlungen wurde mit einem Annexin V Kit (BenderMedSystems, Wien) analysiert. Annexin V ist FITC-markiert und bindet vorzugsweise Phosphatidylserin (PS). PS ist in der Zellmembran lokalisiert und normalerweise zur Zellinnenseite ausgerichtet. Im Rahmen der Apoptose wird PS auf der Zellaußenseite exponiert, wo es dann von Annexin V gebunden werden kann. Allerdings wird PS auch im Rahmen der Nekrose Annexin V zugänglich, da hier die Zellintegrität nicht mehr erhalten ist. Zur Unterscheidung von Nekrose und Apoptose wurden die Zellen daher gleichzeitig auf Propidiumjodid (PI) gefärbt, welches nur dann bindet, wenn die Zellmembran zerstört ist und daher nur nekrotische oder spät apoptotische Zellen bindet. Für diesen Versuch wurden die Zellen in 6 Loch-Platten ausgesät und entsprechend dem Versuch konditioniert und behandelt. 24 h nach der

Behandlung mit TRAIL wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und 1 x 10^5 Zellen wurden in 195 µl kaltem 1x Bindungs-Puffer und 5µl Annexin-V resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut gewaschen und in 190 µl Bindungs-Puffer resuspendiert. 10 µl Propidiumjodid wurden unmittelbar vor der Analyse der Probe hinzugefügt. Die Apoptose wurde dann mittels dualer Farbdurchflusszytometrie an einem FACScan Cytoflurometer mit Cell Quest Software von Becton Dickinson (Mountain View, Kanada) durchgeführt.

3.2.17. OPG-Knock down

Käuflich erhältliche vorgefertigte siRNA gegen OPG der Firma Qiagen (Hilden) wurden getestet. Die zu transfizierenden Zellen wurden in Antibiotika-freiem Medium in 6 Loch-Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer 70%igen Konfluenz gezüchtet. Die Zellen wurden zweimal mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Kanada) und 50 pmol siRNA in serumfreiem Medium transfiziert. Zwischen den beiden jeweils zweistündigen Transfektionen wurden die Zellen für 24 h in serumhaltigem Medium gehalten. Kontrollen wurden mit unspezifischer siRNA transfiziert. Nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen 12-24 h später analysiert.

3.2.18. Time lapse-Mikroskopie

Hierbei wurden mit einem Axiovert inverted-Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) in Abständen von 10 oder 30 min Bilder von Zellen an vorprogrammierten Stellen in 6-Loch-Platten über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden gemacht. Diese Bilder ließen sich dann im Nachhinein zu einem Film zusammenfügen, der die genaue Analyse morphologischer Veränderungen zuließ. Diese Untersuchung diente vor allem der Ermittlung der optimalen Konzentrationen an TRAIL und/oder OPG, da er schnell durchzuführen ist.

3.2.19. Migrationsassay

Die Migration der Brustkrebszellen wurde mittels 2-Kammer Boyden-Migrationsassay analysiert (Muller et al., 2001). Hierbei wird in eine 24-Loch-Platte ein Insert eingefügt, in welches Zellen ausgesät werden. Die Inserts weisen Poren (8-12 µm) auf, durch welche Zellen bei entsprechenden chemotaktischen Reizen migrieren können. MDA-MB-231-Zellen wurden für 24 h in FCS-freiem Medium ausgehungert. Anschließend wurden je 50.000 Zellen im Insert ausgesät. In der unteren Kammer befand sich Hungermedium mit entsprechendem Zusatz. Versuchsabhängig wurden in manchen Fällen zusätzlich die Zellen im Insert direkt stimuliert. Nach einer Inkubation von 20 h wurde der Innenraum der Inserts gründlich gereinigt, so dass nur noch die migrierten Zellen an der Unterseite des Inserts hafteten. Diese wurden dann mittels Cell-titer glow quantifiziert. Hierbei wurde der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen in einer Luziferasereaktion als Maß für die Zahl lebender Zellen bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Luminometer von Applied Biosystems (Darmstadt).

3.2.20. Statistische Analyse

Die numerischen Werte der OPG-Proteinmessungen wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung von Dreifachbestimmungen angegeben. Zeitkinetiken und Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Varianzanalyse für Vielfachmessungen (ANOVA) analysiert. Der Student-t-Test wurde zur Analyse von Unterschieden zwischen Kontrolle und untersuchter Probe benutzt. In allen statistischen Verfahren wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Des Weiteren wurden die Messwerte für Proteinkonzentrationen aus Zellüberständen mit der Menge der isolierten RNA für den Northern Blot (A_{260nm}-Wert) in Bezug gesetzt. Dies diente der Normalisierung von Unterschieden der Zellkulturen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der gemessenen OPG-Konzentration und der Anzahl OPG-sezernierender Zellen. Die A_{260nm}-Werte wurden zur jeweiligen Kontrolle mit 1,0 ins Verhältnis gesetzt, der Mittelwert der drei Protein-Messwerte und ihre Standardabweichung durch diesen Wert dividiert. Dadurch wurden unterschiedliche Zellzahlen als Fehlerquelle in der vergleichenden Analyse von Proteinkonzentrationen korrigiert.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse der Osteoprotegerin-Produktion in Brustkrebszelllinien

Die Untersuchungen der OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion durch Zytokine, Hormone und Medikamente wurden an den Östrogenrezeptor-negativen (ER-) MDA-MB-231 und Östrogenrezeptor-positiven (ER+) MCF-7-Zellen durchgeführt. Bei der Analyse der OPG-mRNA-Spiegel wurden der Northern Blot und quantitative Real-time- PCR (qRT-PCR), zur Beurteilung der OPG-Proteinsekretion ein Immunassay eingesetzt. Als Ladungskontrolle wurde beim Northern Blot β-Aktin und bei der qRT-PCR Cyclophilin als Housekeeping-Gen benutzt.

4.1.1. Regulation von OPG durch Zytokine

Interleukine sind Peptidhormone, welche die Interaktion zwischen Leukozyten aber auch einer Reihe anderer an der Immunreaktion beteiligten Zellen vermitteln. Sie werden anhand der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert, wobei ihre Wirkung höchst unterschiedlich sein kann. Interleukin 1 gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und wird von Makrophagen, Endothelzellen und einigen anderen Zellen gebildet. Während IL-1α meistens zellgebunden vorkommt, ist IL-1β ein sezerniertes Zytokin, welches hauptsächlich durch Monozyten sezerniert wird.

Interleukin-1β

IL-1β wurde in den Untersuchungen in den Konzentrationen 1 pg/ml bis 10 ng/ml eingesetzt. Die Stimulation erfolgte für 6 h. Um zeitabhängige Effekte von Il-1β zu analysieren, wurden 10 ng/ml und Zeitpunkte zwischen 1 und 48 h gewählt. Auf RNA-Ebene zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der OPG-Spiegel. Der maximale Anstieg war nach 6 h und einer Konzentration von 1 ng/ml zu beobachten.

Untersuchungen mittels Real-time-PCR bestätigten diese Beobachtungen. Hier zeigten die MCF-7-Zellen nach 6 stündiger Stimulation mit IL-1β (10 ng/ml) einen 9-fachen Anstieg ($p < 0,01$; t-Test) und die MDA-MB-231-Zellen einen 2-fachen Anstieg ($p < 0,05$; t-Test) ihrer OPG-mRNA-Spiegel. Die Proteinanalyse ergab ein übereinstimmendes Bild mit den Ergebnissen der Northern Blots.

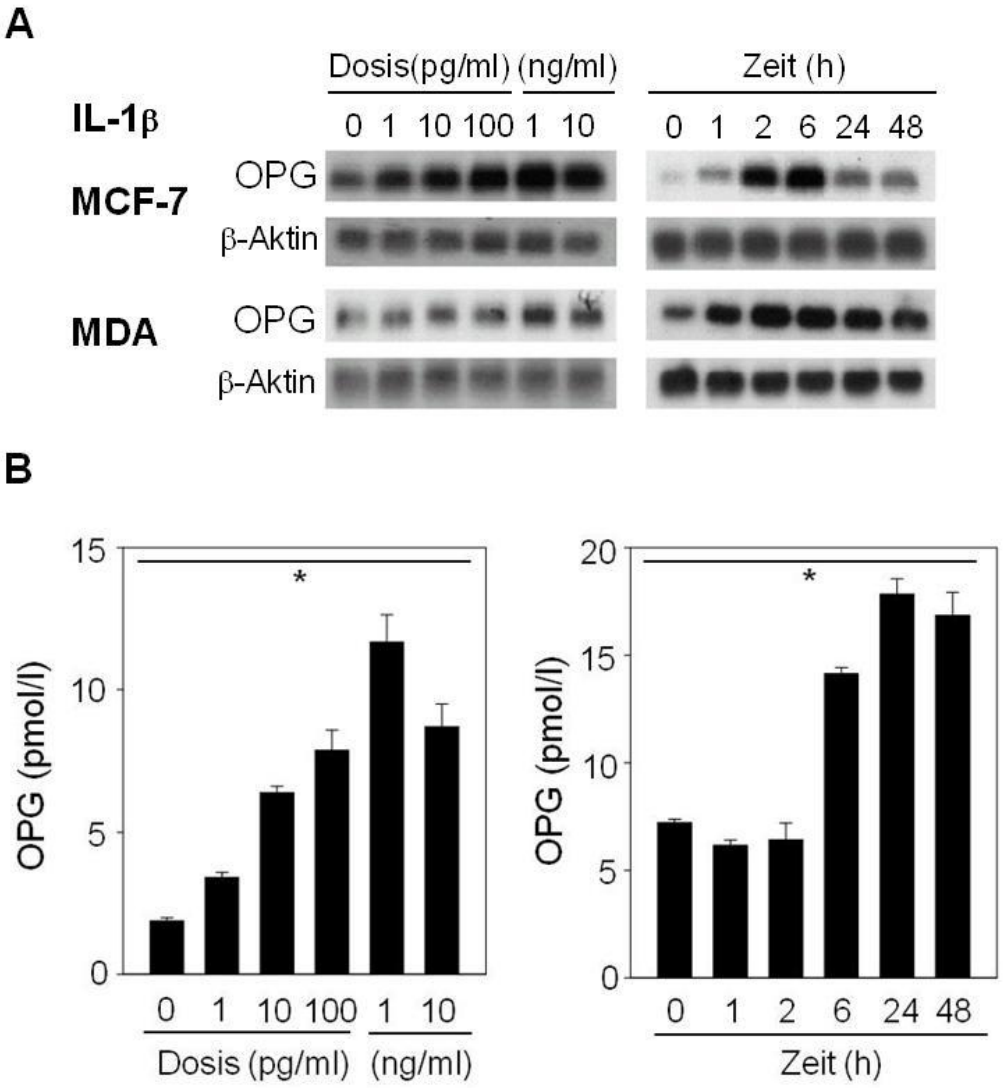

Abb. 6: Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion durch IL-1β

(A) MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden mit IL-1β in den Konzentrationen von 1 pg/ml bis 10 ng/ml für 6 h und mit 10 ng/ml für 1, 2, 6, 24 und 48 h behandelt. Die Northern Blot-Analyse zeigte die Spiegel von OPG-mRNA (2,9 kb) und β-Aktin-mRNA (2,0 kb). **(B)** Die Analyse der OPG-Sekretion der MCF-7-Zellen erfolgte mittels ELISA. Die Zellen wurden mit IL-1β in den Konzentrationen von 1 pg/ml bis 10 ng/ml für 6 h und mit 10 ng/ml für 1, 2, 6, 24 und 48 h stimuliert. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD aus einer 3-fachen Bestimmung dargestellt (*p < 0,0001; ANOVA).

Die MCF-7-Zellen zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der OPG-Sekretion unter IL-1β-Einwirkung. Maximale Effekte waren bei 1 ng/ml zu sehen, dort war die sezernierte

Menge an OPG ungefähr sechsmal höher als in der unbehandelten Kontrolle. In höheren Konzentrationen nahmen die Effekte auf OPG dann wieder ab. Die Zeitkinetik zeigte einen leicht verzögerten Anstieg der OPG-Sekretion im Vergleich zu dem Anstieg der RNA. Hier waren maximale Effekte nach 24 und 48 h zu sehen ($p < 0{,}0001$; ANOVA). Ebenso wie die MCF-7-Zellen zeigten die MDA-MB-231-Zellen einen Anstieg ihrer Proteinsekretion nach der Stimulation mit IL-1β. So stieg die Menge an sezerniertem OPG von 11,68 ± 1,03 pmol/l in der Kontrolle auf 17,70 ± 0,07 pmol/l nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml Il-1β an ($p < 0{,}01$; ANOVA).

Tumor necrosis factor-α

Tumor necrosis factor-α (TNF-α) ist ein multifunktionales Zytokin, welches hauptsächlich von Makrophagen sezerniert wird. Es hat eine pro-inflammatorische Wirkung bei lokalen und systemischen Entzündungen. Neben einem regulatorischen Effekt auf die Aktivität von Immunzellen kann es die Apoptose, Zellproliferation und Differenzierung anregen.

In den folgenden Versuchen wurde TNF-α in den Konzentrationen 1 pg/ml bis 10 ng/ml verwendet. Auch hier zeigte sich in beiden Zelllinien ein zeit- und dosisabhängiger Anstieg der OPG-mRNA-Spiegel. Maximale Effekte waren in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 10 ng/ml zu beobachten. TNF-α zeigte sein Wirkungsmaximum auf die OPG-mRNA-Spiegel nach 6 h bei den MCF-7-Zellen und nahm danach wieder ab, während die OPG-Expression in den MDA-MB-231-Zellen auch noch nach 24 h deutlich erhöht blieb.

Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene bestätigt werden. Abb. 7 verdeutlicht die zeit- und dosis-abhängigen Effekte von TNF-α auf die OPG-Sekretion der MCF-7-Zellen. Ähnliche Effekte konnten bei den MDA-MB-231-Zellen beobachtet werden. Eine zeitabhängige Stimulation mit TNF- α (10 ng/ml) zeigte nach 6 h eine verstärkte OPG-Sekretion (34,67 ± 0,27 pmol/l) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (22,04 ± 2,16 pmol/l). Eine maximale Steigerung der OPG-Sekretion war nach 24 h nachweisbar (43,70 ± 1,56 pmol/l, $p < 0{,}0001$; ANOVA).

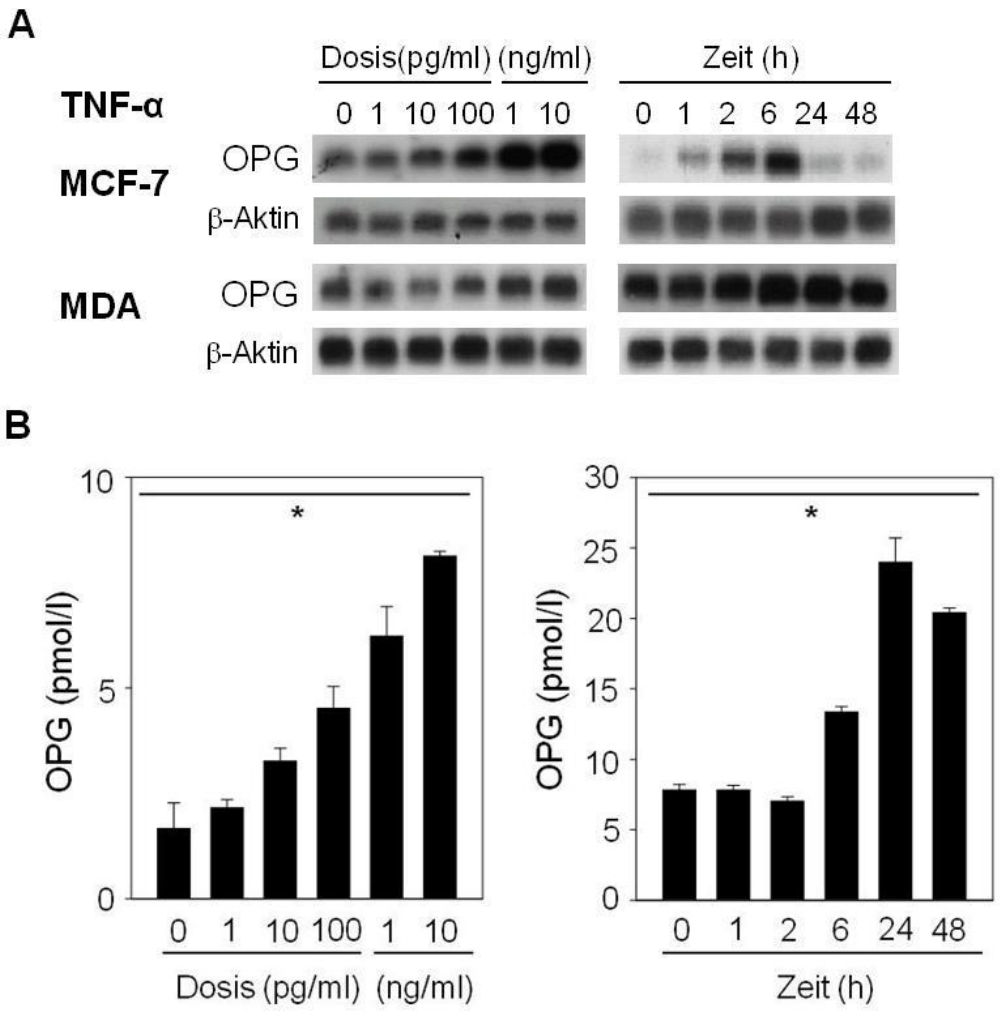

Abb. 7: Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion durch TNF-α

(A) MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden mit TNF-α in den Konzentrationen von 1 pg/ml bis 10 ng/ml für 6 h und mit 10 ng/ml für 1, 2, 6, 24 und 48 h stimuliert. Die Northern Blot- Analyse zeigte die Spiegel von OPG-mRNA (2,9 kb) und β-Aktin-mRNA (2,0 kb). **(B)** Die Analyse der OPG-Sekretion der MCF-7-Zellen erfolgte mittels ELISA. Die Zellen wurden mit TNF-α in den Konzentrationen von 1 pg/ml bis 10 ng/ml für 6 h und mit 10 ng/ml für 1, 2, 6, 24 und 48 h stimuliert. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD aus einer Dreifachbestimmung dargestellt (*p < 0,0001; ANOVA).

4.1.2. Regulation von OPG durch Glukokortikoide

Glukokortikoide haben sowohl im physiologischen Stoffwechsel als auch im therapeutischen Rahmen eine Bedeutung. Im Körper werden sie in der Zona fasciculata der Nebenniere gebildet und sind an der Regulation einer Vielzahl von Stoffwechselwegen beteiligt. So beeinflussen sie beispielsweise den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Zusätzlich haben Glukokortikoide großen Einfluss auf die Modulation von Entzündungsprozessen, was ihre therapeutische Bedeutung als Antiphlogistikum erklärt. Therapeutisch werden Kortisol oder Derivate mit variierender Potenz verwendet. Eines der potentesten Glukokortikoide ist Dexamethason, synthetisch produziert hat es eine relative glukokortikoide Potenz von 30 (bezogen auf Kortisol mit 1) und besitzt keine mineralokortikoide Wirkung.

Der Einfluss von Dexamethason auf die OPG-Spiegel der MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurde über einen Zeitraum von bis zu 48 h und einer Konzentration von 10^{-11} M bis 10^{-7} M untersucht. Unter der Exposition von Dexamethason zeigten beide Zelllinien unterdrückte OPG-mRNA-Spiegel. Allerdings übte Dexamethason in der Konzentration 10^{-7} M einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen aus, der es unmöglich machte nach 48 h noch suffiziente Mengen an RNA für die Northern Blot- Analyse zu gewinnen. In den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-7} M zeigten beide Zelllinien maximale Effekte auf die OPG-mRNA-Spiegel. In der Zeitkinetik war die Unterdrückung der OPG-Spiegel durch Dexamethason bereits nach 2 h deutlich zu erkennen und nach 24 h lagen die Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze. Die Real-time-PCR-Analyse zeigte eine Unterdrückung der OPG-mRNA-Spiegel auf 31% des Kontrollwertes in den MCF-7 ($p < 0{,}0001$, t-Test) Zellen bzw. auf 50% des Kontrollwertes in den MDA-MB-231-Zellen ($p < 0{,}01$, t-Test). Mit Hilfe des ELISA konnten diese Ergebnisse verifiziert werden. Dexamethason (10^{-7} M für 48 h) unterdrückte die OPG Sekretion in den MCF-7-Zellen um 79% und in den MDA-MB-231-Zellen um 53% (Abb. 9).

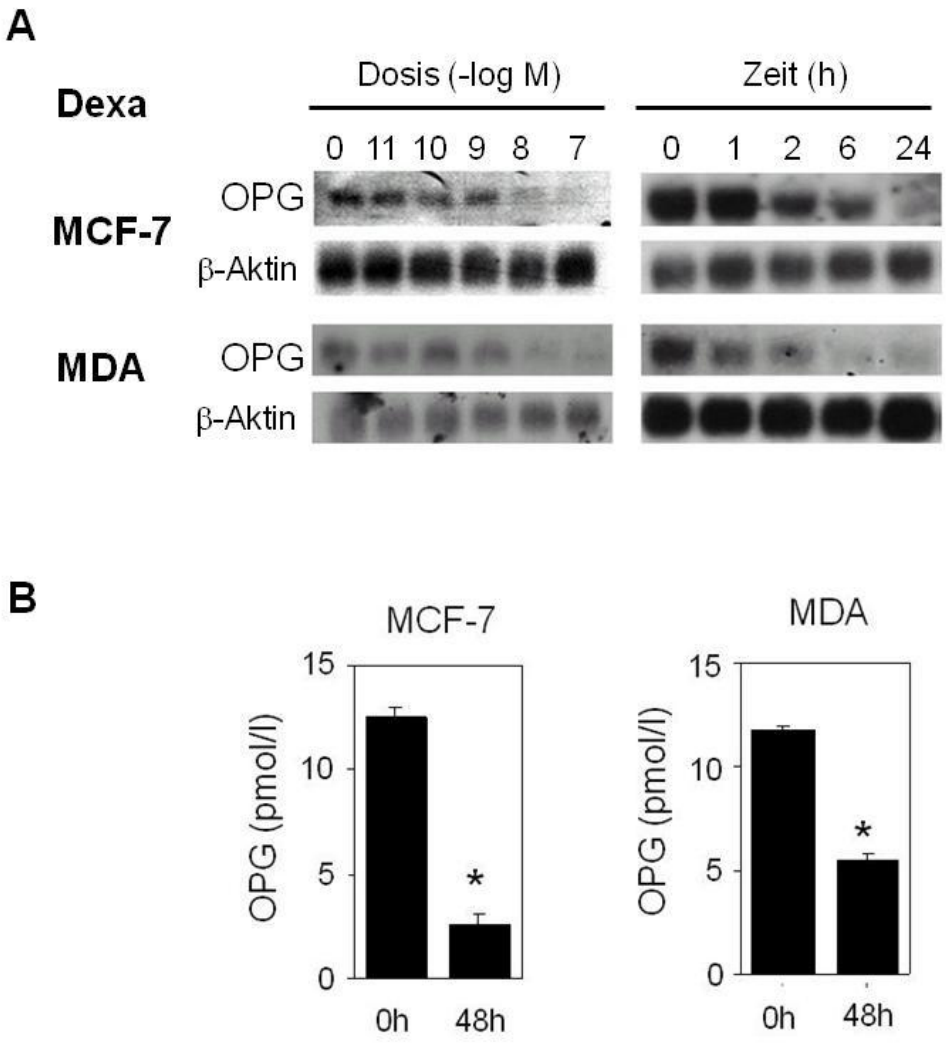

Abb. 8: Hemmung der OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion durch Dexamethason

(A) MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden mit Dexamethason in den Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-7} M für 6 h und mit 10^{-7} M für 1, 2, 6, 24 und 48 h stimuliert. (nach 48 h war keine RNA Extraktion möglich) Die Northern Blot- Analyse zeigte die Spiegel von OPG-mRNA (2,9 kb) und β-Aktin-mRNA (2,0 kb). **(B)** Die Analyse der OPG-Sekretion erfolgte mittels Immunoassay. Beide Zelllinien wurden mit 10^{-7} M Dexamethason für 48 h stimuliert. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD aus einer Dreifachbestimmung dargestellt (*p < 0,001; t-Test).

4.1.3. Regulation von OPG durch Androgene und Östrogene

Sexualhormone spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Behandlung von Brustkrebs. Die Präsenz von Östrogenrezeptoren (ER) an der Oberfläche der Tumorzellen ist von entscheidender prognostischer Bedeutung. Patienten mit ER-

positiven Tumoren haben eine deutlich bessere Prognose und vielfältigere Therapieoptionen als Patienten mit ER-negativen Tumoren. Die Einführung endokriner Behandlungsstrategien mit gezielter Östrogen-Suppression, GnRH-Analoga, Aromataseinhibitoren oder selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren hat die Prognose der Patientinnen wesentlich verbessert (Riggs und Hartmann, 2003).

Als erster Schritt wurden die beiden zu untersuchenden Brustkrebslinien auf ihren ER-Status hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die MCF-7, nicht jedoch die MDA-MB-231-Zellen eine starke Expression des ER-α aufweisen. ER-β wird von beiden Zelllinien nur auf einem sehr geringen Niveau exprimiert (Abb. 9).

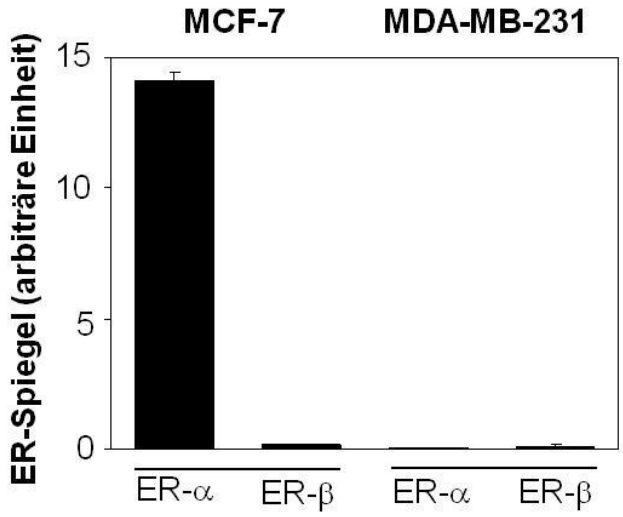

Abb. 9: MCF-7 exprimieren den Östrogenrezptor-α (ER-α)

MCF-7 und MDA-MB-231-Zellen wurden auf die Expression von Östrogenrezeptor-α (ER-α) und Östrogenrezeptor-β (ER-β) untersucht. Die Zellen wurden für 12 h ausgehungert. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten und mit dem Housekeeping-Gen Cyclophilin korrigiert dargestellt.

Wegen der eminenten Bedeutung von Sexualsteroiden in der Pathogenese des Brustkrebses wurde der Einfluss von 17β-Estradiol, Testosteron, DHEA und 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT) auf die OPG-mRNA-Spiegel untersucht. 17β-Estradiol stellt das bedeutendste und potenteste Östrogen der Ovarien dar und beeinflusst bei Frauen die Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale. Es wirkt ähnlich wie andere

Steroidhormone über intrazelluläre Rezeptoren (ER-α, ER-β) und beeinflusst die Transkription zytoplasmatischer Proteine (Carr und Bradshaw, 2001). Testosteron ist das männliche Geschlechtshormon und wird hauptsächlich in den Gonaden produziert. Im Fettgewebe kann es durch Aromatisierung in Östrogene umgewandelt werden. Dieser Vorgang hat besondere Bedeutung bei an Brustkrebs erkrankten postmenopausalen Frauen, da hier Östrogene durch Aromatisierung aus Testosteron entstehen und zur Tumorprogression beitragen können. DHEA ist ein in der Nebenniere produziertes Androgen, dessen schwache androgene Wirkung durch Umwandlung zu Testosteron potenziert werden kann.

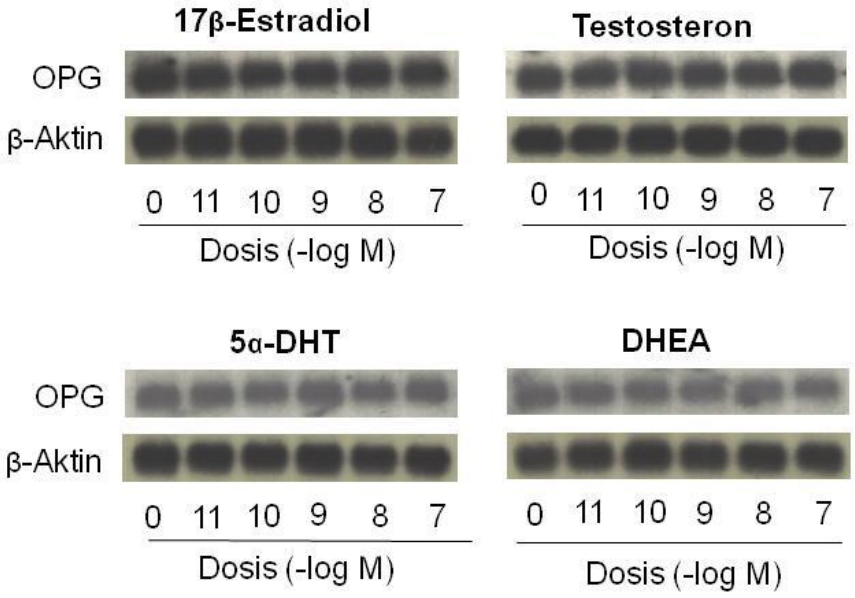

Abb. 10: Einfluss von Sexualhormonen auf die OPG-mRNA-Spiegel in MDA-MB-231

Die Zellen wurden mit 17β-Estradiol, Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT) und DHEA in den Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-7} M für 6 h stimuliert Die Northern Blot- Analyse zeigte die Spiegel von OPG-mRNA (2,9 kb) und β-Aktin-mRNA (2,0 kb).

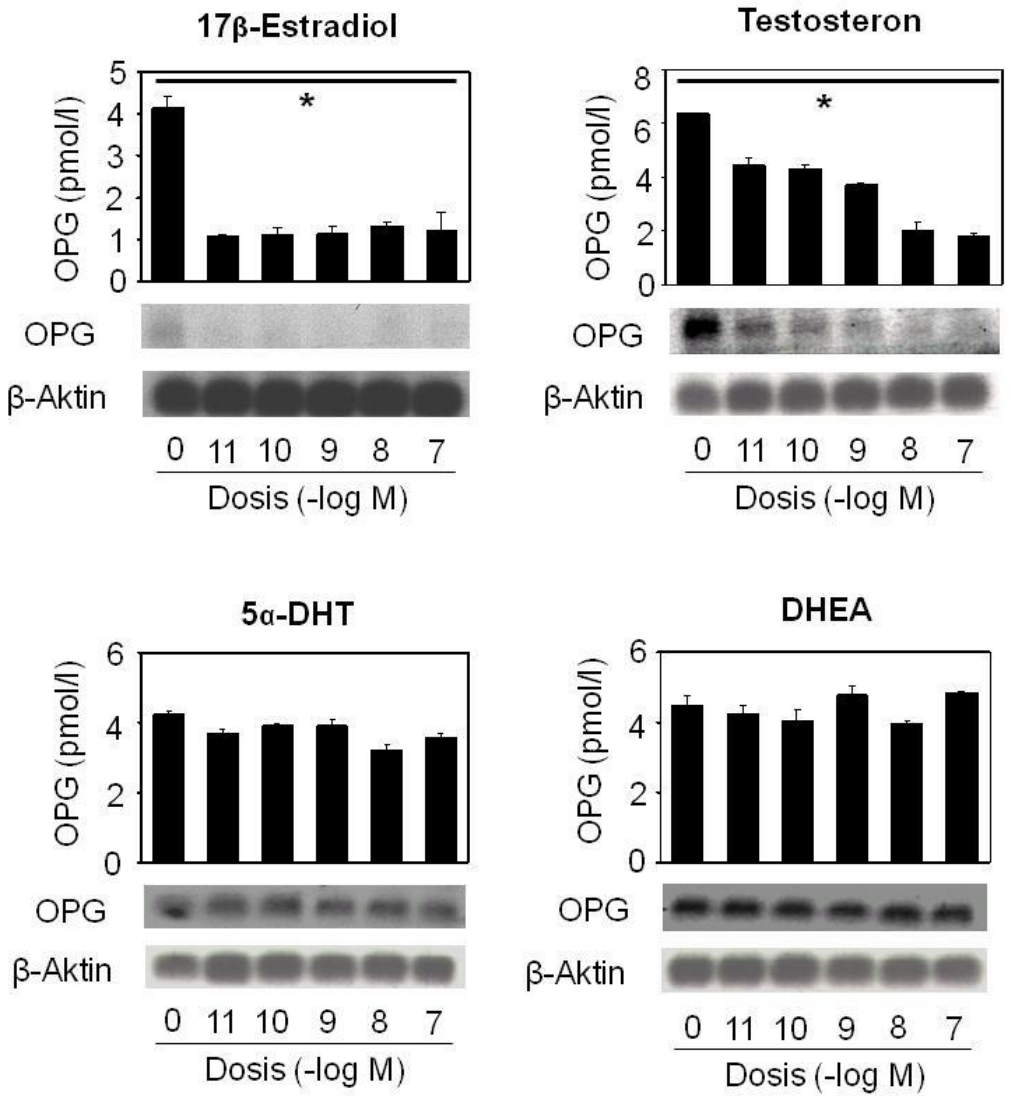

Abb. 11: Hemmung der OPG-Produktion durch 17β-Estradiol und Testosteron

MCF-7-Zellen wurden mit 17β-Estradiol, Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron (DHT) und Dehydroepiandrosteron (DHEA) in den Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-7} M behandelt. Die Proteinwerte sind als Mittelwerte ± SD aus Dreifachbestimmung dargestellt (*p < 0,001; ANOVA).

Während es bei Männern nur zu einem geringen Teil für die androgenen Effekte verantwortlich ist, sind die adrenalen Androgene bei Frauen für eine Reihe biologischer Effekte von Bedeutung, z.B. geschlechtsspezifische Behaarung oder Libido. 5α-DHT ist ein potentes Androgen, im Gegensatz zu Testosteron kann es allerdings durch das Enzym Aromatase nicht zu Östrogen konvertiert werden.

Für die Northern Blot-Analyse wurden beide Zelllinien über Nacht in serumfreiem Medium gehalten und dann mit 17β-Estradiol, Testosteron, DHEA und 5α-DHT für 6 h stimuliert. Dafür wurden Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-7} M verwendet. 17β-Estradiol unterdrückte die OPG-mRNA-Spiegel der MCF-7-Zellen bereits in niedrigster Konzentration vollständig, während es keinen Effekt auf die OPG-mRNA-Spiegel der MDA-MB-231-Zellen hatte. Auch Testosteron unterdrückte die OPG-Spiegel in den MCF-7-Zellen, allerdings waren hier höhere Konzentrationen (10^{-9} M) notwendig, um eine vollständige Unterdrückung zu erreichen. Wieder zeigte sich kein regulierender Einfluss auf die OPG-Spiegel der MDA-MB-231-Zellen. 5α-DHT und DHEA hatten in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die OPG-mRNA-Spiegel. Die Analyse der Überstände ergab ein übereinstimmendes Bild mit den Ergebnissen der RNA-Analyse. Bereits in niedrigen Konzentrationen von 17β-Estradiol erfolgte eine maximale Unterdrückung der OPG-Sekretion in den MCF-7-Zellen. Testosteron führte zu einer dosisabhängigen Unterdrückung der OPG Sekretion mit maximalem Effekt in den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-7} M ($p < 0{,}001$, ANOVA, Abb. 8).

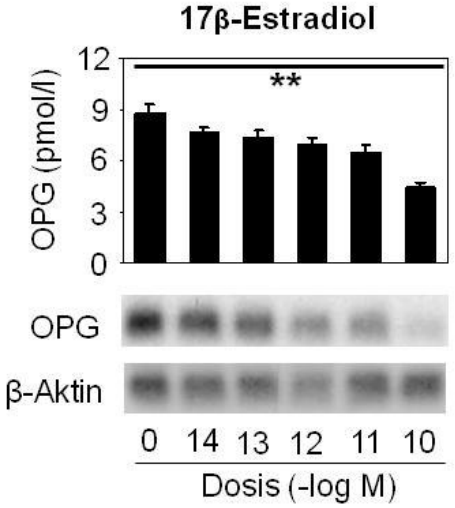

Abb. 12: Hemmung der OPG-Spiegel durch 17β-Estradiol

MCF-7-Zellen wurden mit 17β-Estradiol in den Konzentrationen von 10^{-14} M bis 10^{-10} M stimuliert. Die Protein Werte sind als Mittelwerte ± SD aus Dreifachbestimmung dargestellt (**$p < 0{,}01$; ANOVA).

Um die Wirkung von niedrigeren Konzentrationen an 17β-Estradiol auf die OPG-Sekretion der MCF-7-Zellen zu untersuchen, wurden die gleichen Versuche mit Konzentrationen von 10^{-14} M bis 10^{-10} M durchgeführt (Abb. 12). Hier zeigte sich, dass bereits Konzentrationen von 10^{-12} M zu einer deutlichen Unterdrückung der OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion führen ($p < 0,01$, ANOVA). Um zu untersuchen, ob die unter 17β-Estradiol und Testosteron beobachtete Suppression der OPG-Sekretion ein direkt über den Östrogenrezeptor vermittelter Effekt ist, wurden diese Substanzen mit dem puren Östrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant (ICI 182,780) kombiniert. Hierfür wurden die Zellen über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Am nächsten Morgen wurde dieses Medium durch frisches FCS-freies Medium ersetzt. Im Anschluss wurde eine Stunde vor Applikation von 17β-Estradiol und Testosteron das Fulvestrant den Zellen zugefügt. Die Analyse der OPG-mRNA-Spiegel erfolgte mittels Northern Blot und Real-time-PCR. Hier zeigte sich eine Dosis- abhängige Blockade der zuvor beobachteten Effekte. Fulvestrant in 10-fach höherer Konzentration als 17β-Estradiol verhinderte einen Teil der zuvor beobachteten Suppression von OPG. In 100-fach höherer Konzentration war die durch 17β-Estradiol und Testosteron induzierte Suppression von OPG vollkommen aufgehoben (Abb. 13A und B).

Die Hemmung der Testosteron-vermittelten Effekte auf die OPG-Produktion in MCF-7-Zellen durch Blockade des Östrogenrezeptors deutet darauf hin, dass Testosteron nicht direkt, sondern erst nach erfolgter Aromatisierung einen modulierenden Einfluss auf die OPG-Spiegel hat. Um diese These zu bestätigen, wurden Testosteron und ein Aromataseinhibitor gemeinsam inkubiert. Der Aromataseinhibitor (10^{-5} M) wurde 12 h vor der Stimulation mit Testosteron gemeinsam mit dem Hungermedium den Zellen zugesetzt. Nach 12 h wurde das Hungermedium gewechselt und Testosteron (10^{-7} M) gemeinsam mit dem Aromataseinhibitor für 6 h inkubiert (Abb. 13C). Die anschließende Analyse der OPG-mRNA-Spiegel mittels qRT-PCR zeigte, dass die Präsenz des Aromataseinhibitors die Testosteron-vermittelte Suppression der OPG-Spiegel weitgehend aufhebt (Anstieg auf ca. 85% des basalen OPG-mRNA-Spiegel).

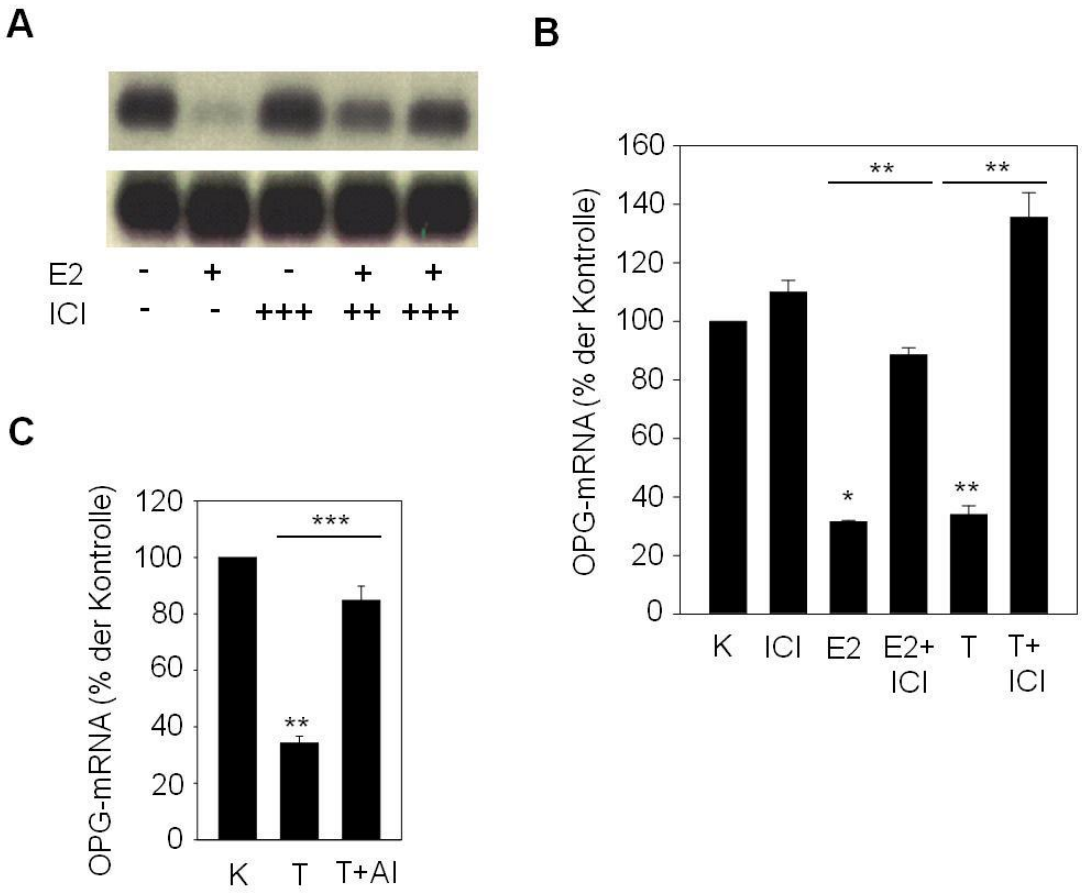

Abb. 13: Umkehr der durch 17β-Estradiol und Testosteron induzierten Suppression der OPG-mRNA-Spiegel durch das Antiöstrogen Fulvestrant und einen Aromataseinhibitor

(A) MCF-7-Zellen wurden mit Fulvestrant (ICI) in den Konzentrationen 10^{-5} M (++) und 10^{-4} M (+++) für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde dem Medium 17β-Estradiol (E2) in der Konzentration von 10^{-7} M (+) zugefügt und nach 6 h die OPG mRNA-Spiegel mittels Northern Blot analysiert. **(B)** Die Zellen wurden mit Fulvestrant (ICI) in der Konzentration 10^{-5} M für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde dem Medium 17β-Estradiol (E2) oder Testosteron (T) jeweils in der Konzentration 10^{-7} M zugesetzt und für 6 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Real-time-PCR-Analyse. **(C)** Der Aromataseinhibitor (10^{-4} M) wurde 12 h vor Stimulation der Zellen mit Testosteron (10^{-7} M) dem Medium zugefügt, nach weiteren 6 h erfolgte die Analyse mittels Real -time-PCR. Abkürzungen: K, Kontrolle; E2, 17β-Estradiol; T, Testosteron; ICI, Fulvestrant; AI, Aromataseinhibitor (*p < 0,001; **p < 0,01; ***p < 0,05; t-Test).

4.2. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

Van Poznak et al. haben in einer Studie gezeigt, dass ca. 30% der untersuchten primären Brustkrebsgewebe TRAIL exprimierten (Van Poznak et al., 2006). Aus diesem Grund wurden die von uns verwendeten MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mittels RT-PCR, qRT-PCR und Northern Blot auf ihre TRAIL- und TRAIL-Rezeptor-Expression untersucht. Zudem wurde ihre TRAIL-Sensitivität mittels Apoptoseassays untersucht. Im Anschluss wurde die Fähigkeit der Brustkrebszellen untersucht, einer TRAIL-vermittelten Apoptose durch Sekretion von OPG zu entgehen.

4.2.1. Expression und Regulation von TRAIL in Brustkrebszelllinien

Während die MDA-MB-231-Zellen eine starke TRAIL-Expression aufwiesen, konnte keine TRAIL-Expression in den untersuchten MCF-7-Zellen nachgewiesen werden. Die als Positivkontrolle verwendete Osteosarkom-Zelllinie SaOS-2 wies eine robuste TRAIL-Expression auf (Abb. 14A).

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von IL-1β und Dexamethason auf die basalen TRAIL-Spiegel untersucht. MDA-MB-231-Zellen wurden mit IL-1β (10 ng/ml) oder Dexamethason (10^{-7} M) für 6 h stimuliert und im Anschluss mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 14B). Die Stimulation mit IL-1β vermittelte eine 2,5-fache Induktion der TRAIL-mRNA-Spiegel ($p < 0{,}01$, t-Test), während Dexamethason die TRAIL-Spiegel um 70% hemmte ($p < 0{,}001$, t-Test). In weiteren Studien wurden MDA-MB-231-Zellen in ansteigender Dosis mit IL-1β oder Dexamethason stimuliert. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung bzw. Suppression der TRAIL-mRNA-Spiegel (Abb. 14C). Die Zugabe von exogenem TRAIL hatte keinen Einfluss auf die OPG-Spiegel, auch unterdrückte diese nicht die endogene TRAIL-Expression.

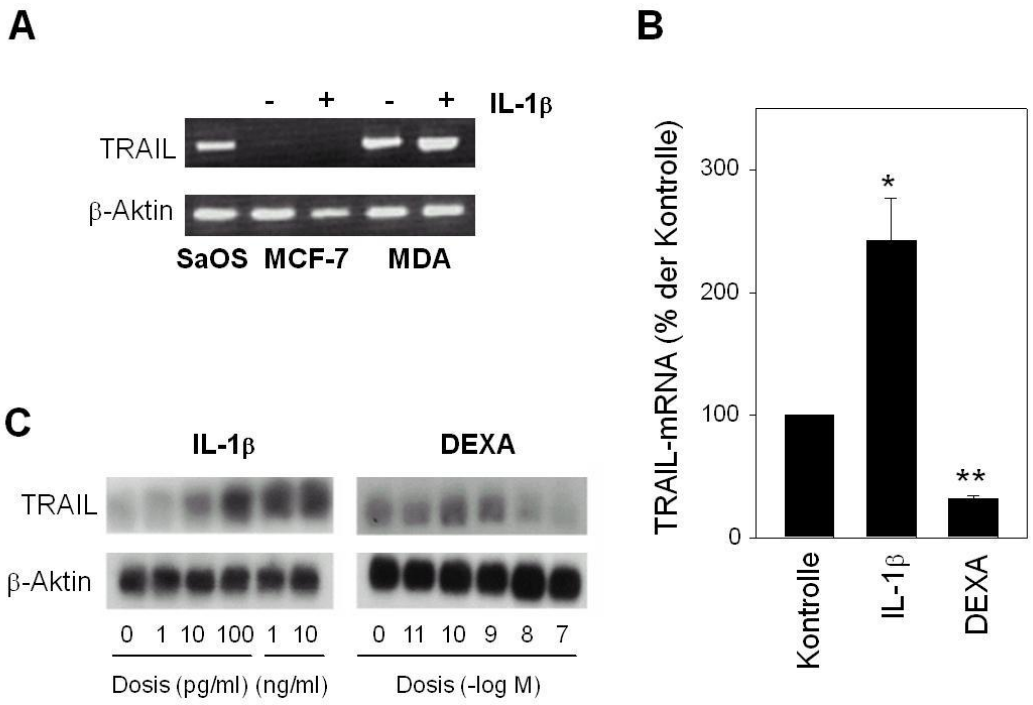

Abb. 14: TRAIL-Expression und -Regulation in MDA-MB-231-Zellen

(A) RT-PCR zum Nachweis der basalen TRAIL-mRNA-Spiegel in MDA-MB-231-Zellen. SaOS dienten als Positivkontrolle. β-Aktin wurde als Housekeeping-Gen verwendet. **(B)** MDA-MB-231-Zellen wurden mit IL-1β (10 ng/ml) und Dexamethason (10^{-7} M) für 6 h stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der TRAIL-mRNA mittels qRT-PCR. Die Expression wurde mit dem Housekeeping-Gen Cyclophilin verrechnet. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten und im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt (*p < 0,01; **p < 0,001). **(C)** Northern Blot-Analyse der TRAIL-Spiegel nach 6-stündiger Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen an IL-1β und Dexamethason.

4.2.2. TRAIL-Sensibilität der MCF-7- und MDA-MB-231-Zelllinien

Im nächsten Schritt wurde die Sensibilität der untersuchten Brustkrebszelllinien auf TRAIL untersucht. Hierfür wurde sowohl die Zellvitalität mittels MTT-Assay als auch die Apoptoserate mittels Annexin V/ Propidiumjodid-Färbungen und pro-apoptotische Caspasen mittles Western Blot untersucht.

Um TRAIL-vermittelte Effekte auf die Zellen zu untersuchen, wurden MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit steigenden Konzentrationen an TRAIL (0-100 ng/ml) für 24

h stimuliert. Im Anschluss wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay quantifiziert. Hier zeigte sich, dass die Zahl intakter MDA-MB-231-Zellen dosisabhängig abnahm. Mit 100 ng/ml TRAIL verringerte sich die Zellzahl auf 62,2% ± 8,9% ($p < 0,01$, ANOVA) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Hingegen blieb die Zellzahl in den gleich behandelten MCF-7-Zellen unverändert. Um diese Beobachtung zu ergänzen, wurden beide Zelllinien für bis zu 6 h mit 50 ng/ml TRAIL stimuliert. Im Anschluss wurde die Aktivierung der Caspasen-Kaskade mittels Western Blot untersucht.

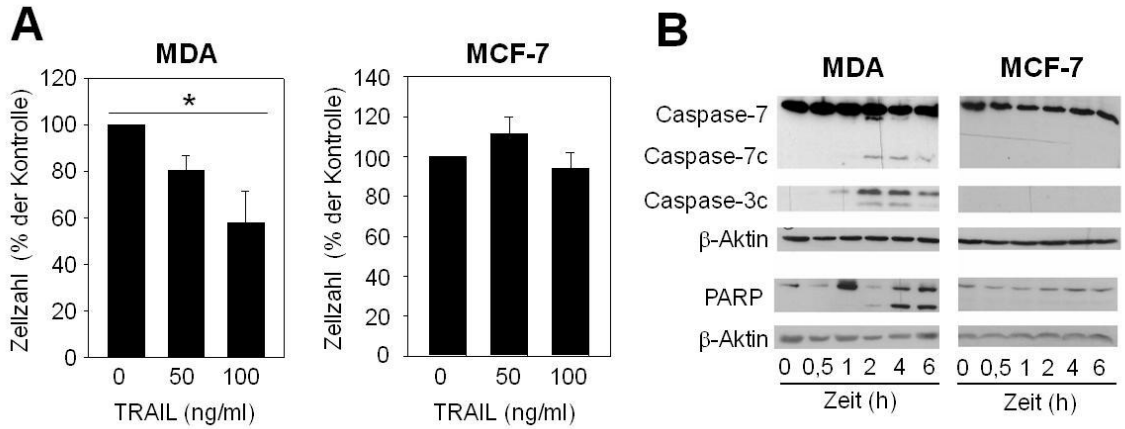

Abb. 15: MDA-MB-231-Zellen sind TRAIL-sensitiv

(A) MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen wurden für 24 h mit 0, 50 und 100 ng/ml TRAIL stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Zellzahl mittels MTT-Assay (*$p < 0,01$; ANOVA). **(B)** Analyse der gespaltenen (cleaved, c) Varianten der Caspase-3, -7 und PARP nach einer TRAIL-Stimulation (50 ng/ml) mittels Western Blot.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten nach 2 h aktivierte Formen der Caspase-3, und –7 nachgewiesen werden. Nach 4 h zeigte sich ferner eine PARP-Spaltung als Hinweis auf aktivierte intrazelluläre apoptotische Signalwege. Es zeigten sich keine derartigen Veränderungen in den untersuchten MCF-7-Zellen (Abb. 15B).

4.2.3. TRAIL-R1 und -R2-Expression in MCF-7 und MDA-MB-231

Um die unterschiedliche TRAIL-Sensitivität der beiden untersuchten Brustkrebs-Zelllinien genauer zu definieren, wurden die mRNA-Spiegel der Apoptose

induzierenden TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 analysiert. MDA-MB-231-Zellen zeigten im Vergleich zu den MCF-7-Zellen ca. 5-fach höhere TRAIL-R1- und TRAIL-R2-mRNA-Spiegel, hierbei war TRAIL-R2 der stärker exprimierte Rezeptor in beiden Zelllinien (Abb. 16A). Eine Blockade des TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mit hemmenden Antikörpern (jeweils 500 ng/ml) verursachte im Falle des TRAIL-R2 eine Umkehr des TRAIL (100ng/ml)-vermittelten Zellverlustes von 28% auf 12% ($p < 0{,}001$; t-Test). Hingegen zeigte die Blockade des TRAIL-R1 nur eine geringfügige Wirkung (Abb. 16B). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in Brustkrebszellen TRAIL-R2 möglicherweise der bedeutendere der beiden „Todes-Domän" tragenden TRAIL-Rezeptoren ist.

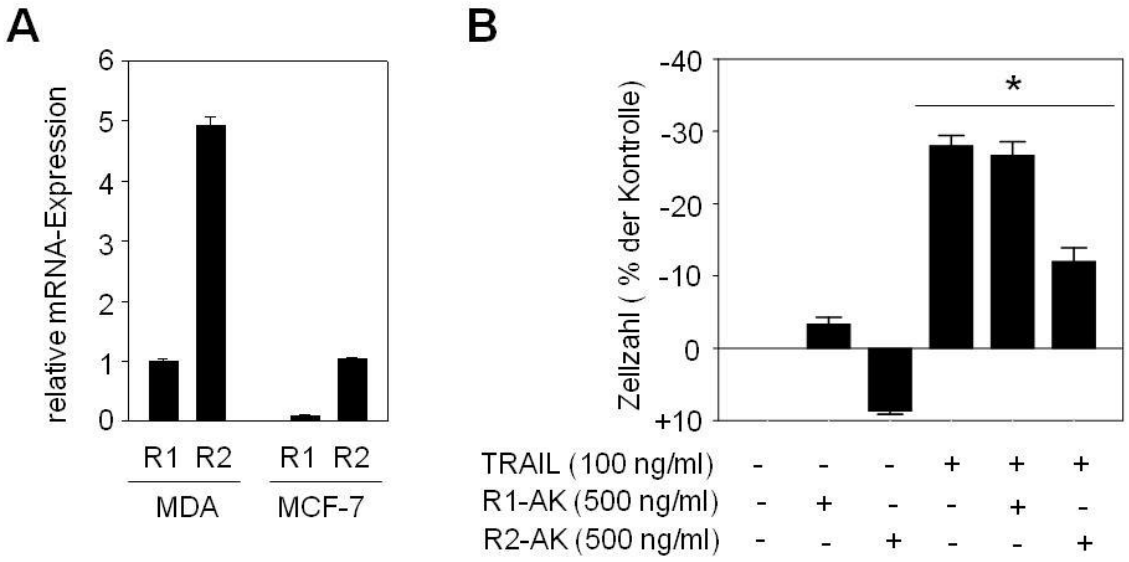

Abb. 16: TRAIL-Rezeptor-Expression in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen

(A) Darstellung der TRAIL-R1- und -R2-mRNA-Spiegel mittels qRT-PCR. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten und mit dem Housekeeping-Gen Cyclophilin verrechnet dargestellt. **(B)** Spezifische Blockade des TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mit neutralisierenden Antikörpern. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD der Dreifachbestimmung dargestellt (*$p < 0{,}001$; t-Test).

4.2.4. Einfluss von OPG auf die TRAIL-vermittelte Apoptose

OPG wird vielfach als „Decoy-Rezeptor“ für TRAIL beschrieben. Um die Rolle von OPG beim Brustkrebs genauer zu definieren, wurde seine Fähigkeit TRAIL vermittelte Apoptose *in vitro* zu beeinflussen genauer untersucht. Hierfür wurde die Zellmorphologie mittels Time lapse-Analysen untersucht. In 6 Loch-Platten ausgesäte Zellen wurden mit TRAIL (50 ng/ml) oder TRAIL und OPG (jeweils 50 ng/ml) behandelt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Während der 24-stündigen Inkubationszeit wurden Aufnahmen der Zellen in Abständen von 30 min gemacht. Hierbei zeigte sich, dass sich die mit TRAIL behandelten Zellen deutlich in Zahl und Morphologie von den unbehandelten Kontrollen unterschieden. Diese Unterschiede wurden durch die Zugabe von gleichen Mengen an OPG größtenteils nivelliert (Abb. 17). Als nächstes wurden den mit TRAIL (50 ng/ml) behandelten Zellen steigende Konzentrationen an OPG (25-75 ng/ml) zugeführt. Die Analyse mittels Annexin V/Propidiumjodid-Färbung zeigte eine dosisabhängige Reduktion apoptotischer und nekrotischer Zellen. So reduzierten 50 ng/ml TRAIL die Zahl der überlebenden Zellen von 84,95 ± 5,4% auf 60,45 ± 4,2% ($p < 0,01$), die gleichzeitige Gabe von 50 ng/ml OPG steigerte die Zahl der überlebenden Zellen auf 77,7 ± 7,4% ($p < 0,05$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass OPG eine relevante Affinität für TRAIL aufweist, welches, wenn in ähnlicher Konzentration präsent, die TRAIL vermittelten Effekte blockieren kann.

4.2.5 Bedeutung der endogenen OPG-Sekretion als Schutz vor TRAIL-induzierter Apoptose

Um die physiologische Bedeutung der beschriebenen Befunde zu verifizieren, wurde Zellmedium der MDA-MB-231-Zellen für 3 Tage konditioniert. Im Anschluss wurde untersucht, ob die Menge an sezerniertem OPG ausreicht, um die Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose zu schützen. Die dazu durchgeführte und in Abb. 18A dargestellte FACS-Analyse ergab, dass mit 50 ng/ml TRAIL exponierte MDA-MB-231-Zellen eine signifikant niedrigere Rate an Annexin-positiven Zellen aufwiesen, wenn sie in konditioniertem Medium gehalten wurden (1,3-facher Anstieg) im Vergleich zu denjenigen Zellen, die gleichzeitig in frischem Medium mit TRAIL inkubiert wurden (4,1-facher Anstieg; $p < 0,01$). Die Gabe einer 20-fach höheren RANKL-Konzentration

hob den anti-apoptotischen Effekt im für 72 h konditionierten Medium größtenteils auf (Anstieg der Apoptose vom 1,3-fachen der Kontrolle auf das 2,4-fache; $p < 0,05$).

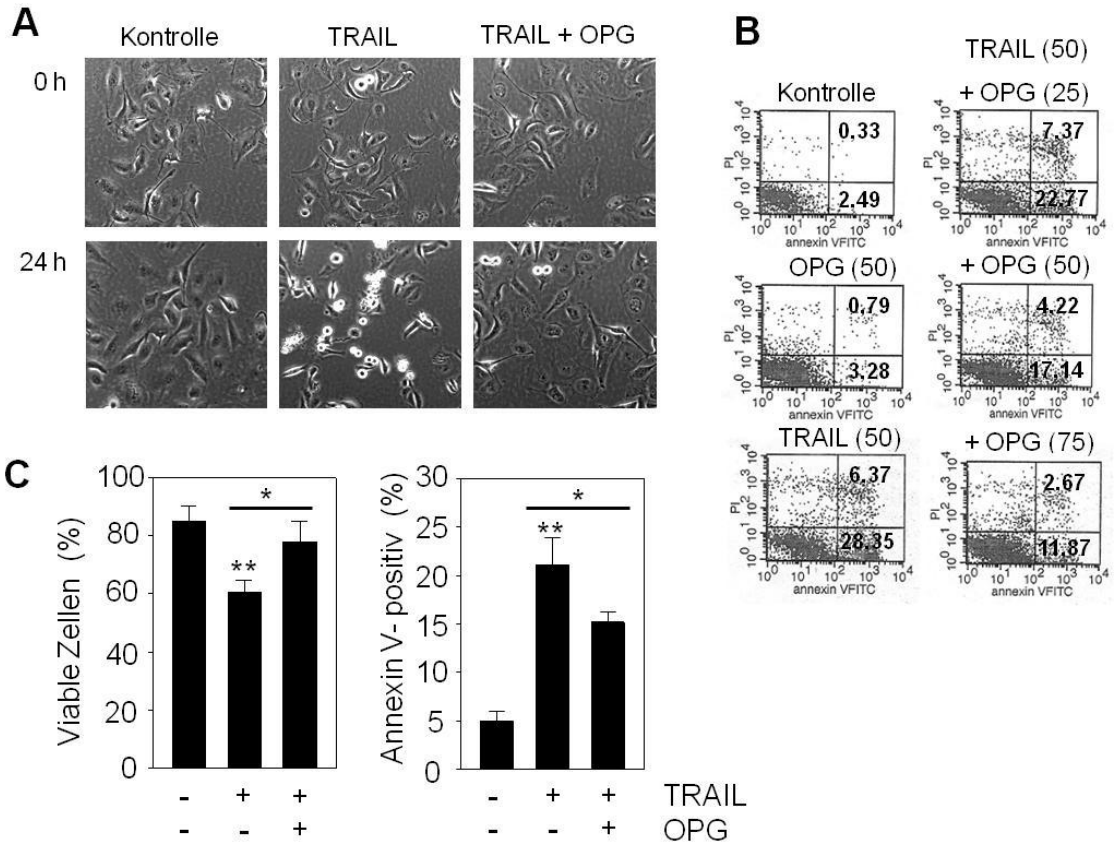

Abb. 17: Blockade der TRAIL-vermittelten Apoptose durch exogenes OPG

MDA-MB-231-Zellen wurden mit 50 ng/ml TRAIL und mit gleichen Mengen an OPG behandelt. Im Anschluss wurden die Effekte der Behandlung auf die Zellintegrität untersucht. **(A)** Time lapse-Aufnahmen der Zellen. Dargestellt sind Aufnahmen zu Beginn und nach 24-stündiger Behandlung. **(B)** FACS-Analyse Annexin V- und Propidiumjodid-positiver Zellen nach Behandlung mit TRAIL und ansteigenden OPG Konzentrationen. **(C)** Zahl der Intakten (Annexin V- und PI-negativ) und apoptotischen (Annexin V-positiv) Zellen 24 h nach TRAIL (50 ng/ml) und OPG (50 ng/ml) Behandlung. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; t-Test).

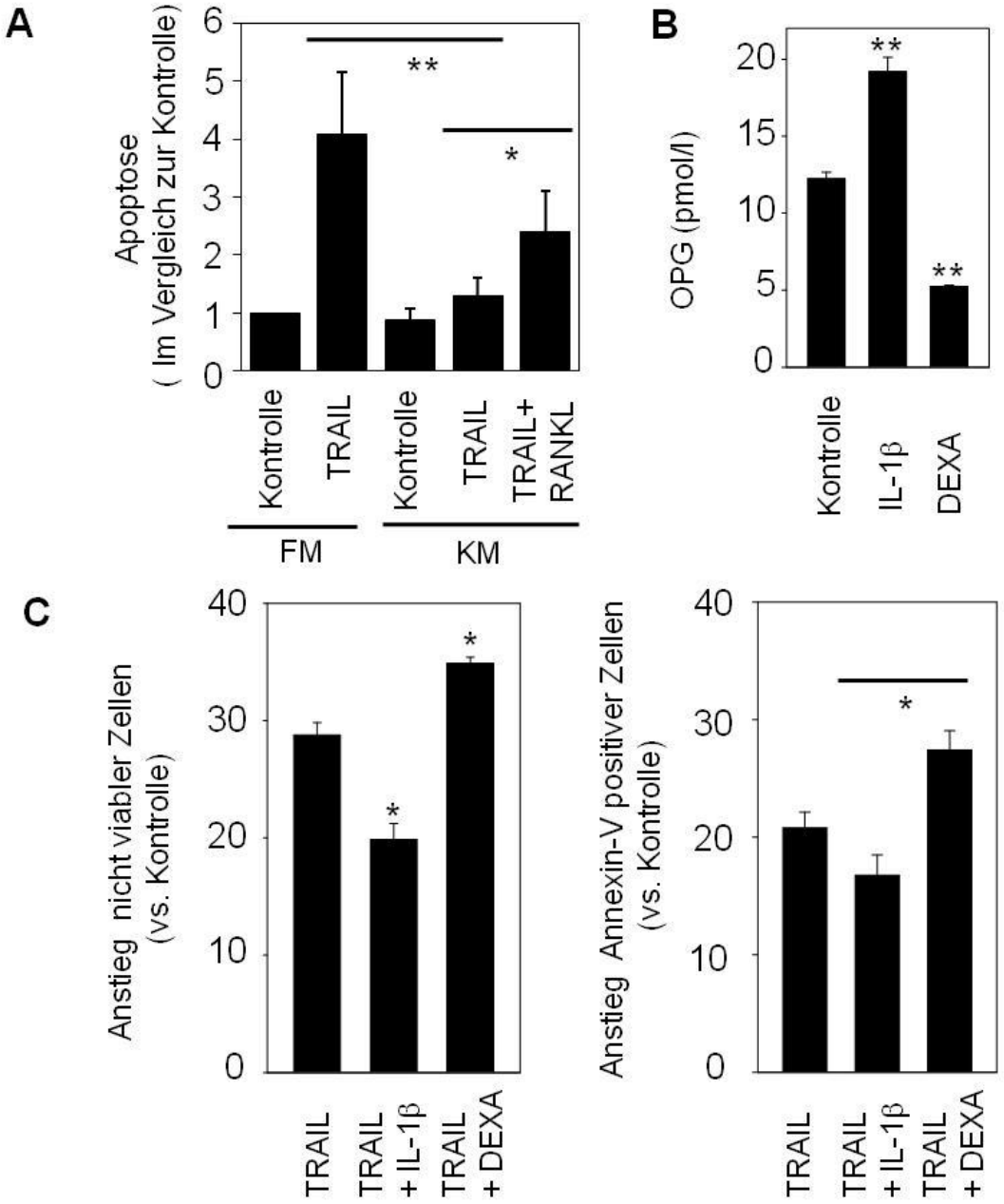

Abb. 18: Inverse Korrelation zwischen endogenem OPG und TRAIL-induzierter Apoptose

(A) Das Medium von MDA-MB-231-Zellen wurde für 3 Tage konditioniert (KM) und im Anschluss daran für 24 h mit 50 ng/ml TRAIL behandelt. Im Vergleich zu in frischem Medium (FM) gehaltenen Zellen war ein signifikant geringerer Anteil der in konditioniertem Medium gehaltenen Zellen Annexin V-positiv. Durch die Gabe von RANKL in 20-fach höherer Konzentration) konnten diese Effekte größtenteils aufgehoben werden. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD von vier unabhängigen Versuchen dargestellt (*p < 0,05; **p < 0,001). **(B)** OPG-Konzentrationen im Überstand nach Exposition mit IL-1β (10 ng/ml) und Dexamethason (10^{-8} M) (**p < 0,001). **(C)** Zellen nach 3-tägiger Vorbehandlung mit IL-1β (10 ng/ml) und Dexamethason (10^{-8} M) und nachfolgender 24-stündiger Stimulation mit TRAIL (50 ng/ml). Die Werte sind als MW ± SD von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt (*p < 0,05).

Interessanterweise wurden nur geringfügige Unterschiede in der Annexin V- und Propidiumjodid-positiven Fraktion, welche spät apoptotische oder nekrotische Zellen färbt, beobachtet. Dies könnte darin begründet sein, dass zu Beginn OPG und die auf den Zellen exprimierten TRAIL-R1 und TRAIL-R2 um TRAIL konkurrieren. Erst wenn das sezernierte OPG einen Teil des TRAIL gebunden und damit neutralisiert hat, wirkt dies als Schutz für die Zellen.

In folgenden Versuchen wurden MDA-MB-231-Zellen wiederholt (alle 24 h) mit IL-1β (10 ng/ml) oder Dexamethason (10^{-8} M) stimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Menge an sezerniertem OPG im Überstand bestimmt (Abb. 18B) Wie erwartet wiesen mit Il-1β stimulierte Zellen den höchsten Gehalt an OPG im Medium auf, während mit Dexamethason stimulierte Zellen signifikant weniger OPG sezernierten als die unbehandelten Kontrollen ($p < 0{,}001$). Dem Überstand wurden dann 50 ng/ml TRAIL hinzugefügt und die Apoptoserate nach weiteren 24 h analysiert. Hier zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen OPG und Apoptose. Mit TRAIL inkubiert zeigten diejenigen Zellen, welche vorher mit IL-1β stimuliert worden waren und daher die höchste OPG-Konzentration aufwiesen, eine signifikant höhere Überlebensrate verglichen mit Dexamethason-stimulierten Zellen, welche eine unterdrückte OPG-Konzentration aufwiesen ($p < 0{,}05$; t-Test).

4.2.6. Steigerung der Apoptoserate durch den Knock down von OPG

Während die vorangegangen Versuche die Korrelation zwischen sezerniertem OPG und Resistenz der Zellen gegenüber supplementiertem TRAIL nachwiesen, war es das Ziel der folgenden Versuche, die Bedeutung von OPG als möglichen „Überlebensfaktor“ genauer zu untersuchen. Dafür wurde gegen OPG gerichtete siRNA verwendet, die einen transienten OPG-Knock down erzeugte. Der erfolgreiche Knock down wurde mittels Real time-PCR und ELISA nachgewiesen. Hier zeigte sich in beiden Zelllinien jeweils eine etwa 70%ige Hemmung der OPG-mRNA-Spiegel, welche sich in einer im Vergleich zu den Kontrollen 80% geringeren OPG-Protein-Sekretion widerspiegelte (Abb. 19A und B). Die 24 h Stunden nach der Transfektion durchgeführten MTT-Assays zeigten eine verringerte Zahl intakter MDA-MB-231-Zellen ($p < 0{,}05$), während die Zahl TRAIL-resistenter MCF-7-Zellen unverändert blieben.

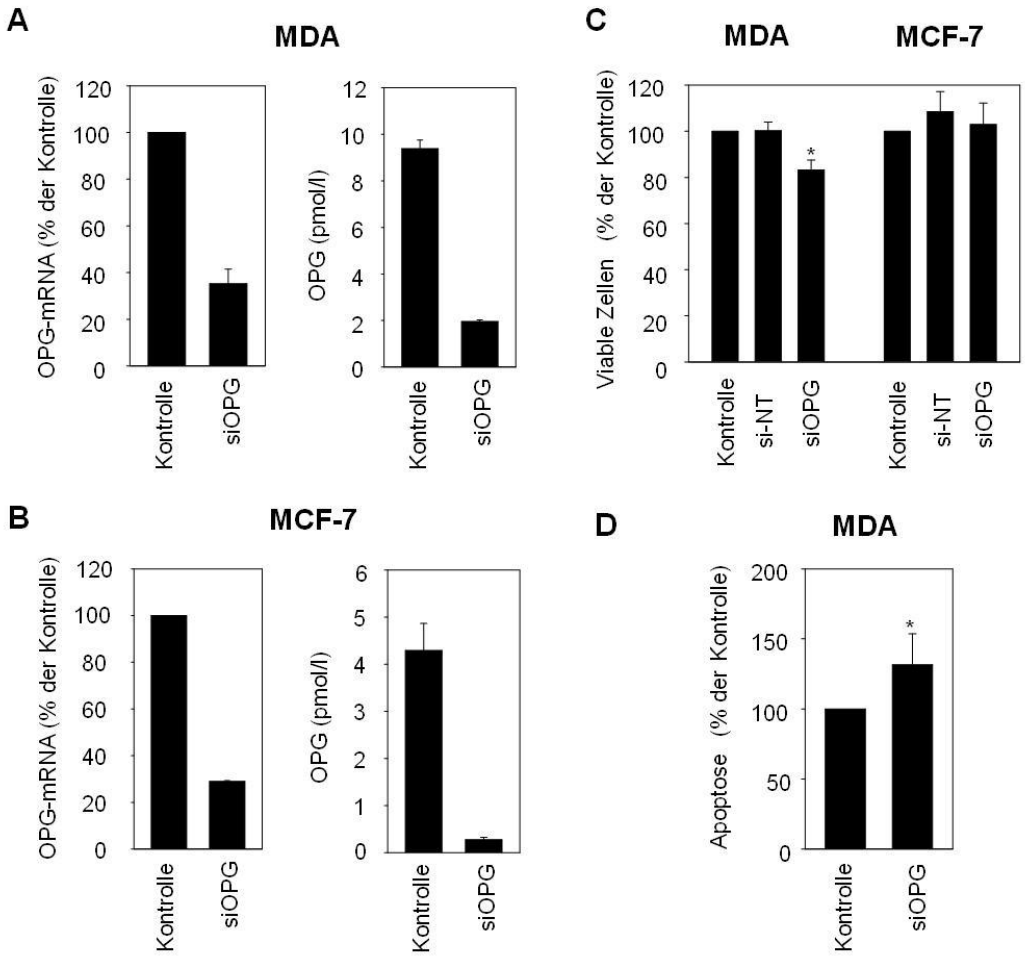

Abb. 19: OPG-Knock down reduziert die Zellvitalität und induziert Apoptose in den MDA-MB-231-Zellen

Transienter OPG-Knock down in MDA-MB-231- **(A)** und MCF-7-Zellen **(B)** mittels siRNA. **(C)** MTT-Assay zur Analyse der Zellvitalität nach OPG-Knock down. MDA-MB-231-Zellen zeigen eine reduzierte Zellvitalität, während MCF-7-Zellen nicht beeinflusst sind. Werte sind als Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Versuchen dargestellt (*p < 0,05). **(D)** Nach erfolgtem OPG-Knock down wurde die Apoptose in MDA-MB-231-Zellen mittels ELISA (siehe Methoden) analysiert. Werte sind als Mittelwerte ± SD von 5 individuellen Transfektionen dargestellt (*p < 0.05). OPG, Osteoprotegerin; si-NT, non-target siRNA; siOPG, siRNA für Osteoprotegerin.

Um die Ursache der Zellminderung genauer zu definieren, wurden der Zellzyklus und die Apoptose transfizierter MDA-Zellen untersucht. Während der Zellzyklus unbeeinflusst blieb, zeigte sich eine signifikant höhere basale Apoptoserate in den OPG-depletierten MDA-Zellen im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb. 19D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Minderung der Zellzahl auf eine gesteigerte Apoptose und nicht auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen ist.

4.3. RANKL-Expression und -Regulation in Brustkrebszelllinien

Die basale RANKL-Expression wurde in den humanen ER-positiven MCF-7 und den ER-negativen MDA-MB-231 Brustkrebszellen auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Als Positivkontrolle wurden Buffy Coat, die RANKL exprimierende Lymphozyten enthalten, und dendritische Zellen (DC) verwendet (Schrader et al., 2007). Beide Brustkrebszelllinien wiesen eine robuste basale Expression von RANKL-mRNA auf, vergleichbar mit dem im Buffy Coat detektierten RANKL-Spiegel. Währendessen zeigten die dendritischen Zellen im Vergleich niedrigere RANKL-Spiegel. Als Ladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet, welches eine gleichmäßige Ladung in allen Bahnen zeigte (Abb. 20A).

Um eine mögliche Regulation der RANKL-Spiegel durch OPG-regulierende Substanzen zu untersuchen, wurden beide Zelllinien mit 17β-Estradiol und IL-1β stimuliert und ihre RANKL-mRNA-Expression mittels Northern Blot analysiert. Wegen der geringen Expression von RANKL wurde der Northern Blot mit 2 µg poly-A-RNA durchgeführt. Hier zeigte sich, dass MCF-7- wie MDA-MB-231-Zellen nach sechsstündiger Stimulation mit 10 ng/ml IL-1β gesteigerte RANKL-Spiegel aufwiesen. 17β-Estradiol hingegen unterdrückte die RANKL-Spiegel in den MCF-7-Zellen, während sie in den MDA-MB-231-Zellen unbeeinflusst blieb (Abb. 20B).

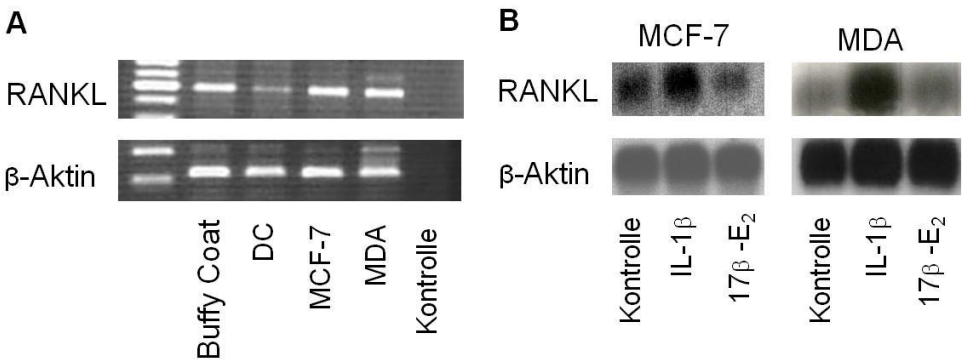

Abb. 20: RANKL-Expression und -Regulation durch IL-1β und 17β-Estradiol

(A) Basale RANKL-mRNA-Expression in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen. Buffy Coat und dendritische Zellen (DC) dienten als Positivkontrollen. In der Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von cDNA verwendet. **(B)** Regulation der RANKL-mRNA-Spiegel nach 6-stündiger Stimulation mit IL-1β (10 ng/ml) und 17β-Estradiol (10^{-7}M).

Das physiologische Wirkungspotenzial von RANKL wird vor allem durch seine Verfügbarkeit bestimmt. Hierfür ist nicht so sehr die absoluten Expression als vielmehr das relative Verhältnis von RANKL zu OPG (der RANKL/OPG-Quotient) der entscheidende Parameter. Ferner muss auch die mögliche Präsenz von TRAIL beachtet werden, da dieses mit RANKL um die OPG-Bindung kompetiert.

Im folgenden Versuch wurde die Wirkung von Substanzen mit bereits nachgewiesenem Einfluss auf OPG auf die Modulation der RANKL-mRNA-Spiegel untersucht. Hierbei wurden MDA-MB-231-Zellen und MCF-7-Zellen für 6 h mit IL-1β (10 ng/ml), Zoledronsäure (10^{-7} M), 17β-Estradiol (10^{-7} M) und Dexamethason (10^{-7} M) stimuliert. Im Anschluss wurden mittels Northern Blot-Analyse die mRNA-Spiegel von RANKL, OPG und TRAIL untersucht.

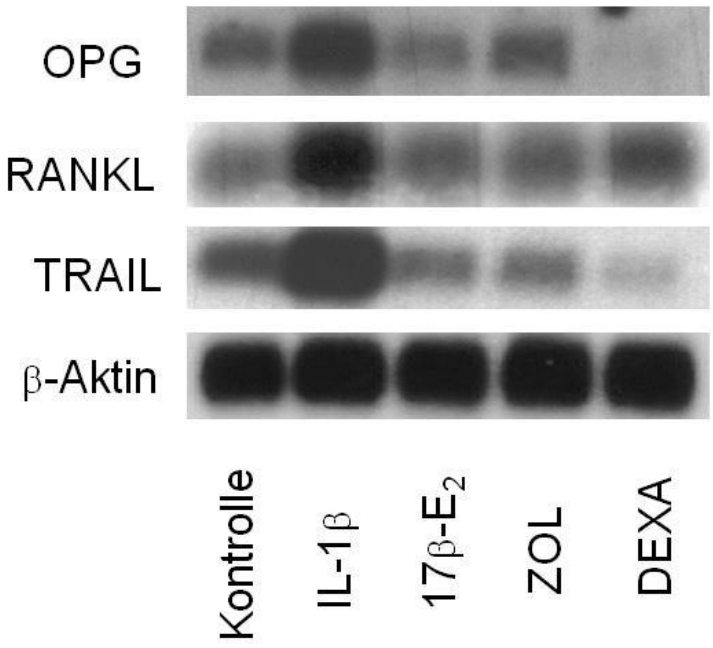

Abb. 21: Einfluss diverser Stimulantien auf die OPG-, RANKL- und TRAIL-mRNA-Spiegel von MDA-MB-231-Zellen

MDA-MB-231-Zellen wurden für 6 h mit IL-1β (10ng/ml), 17β-Estradiol (10^{-7} M), Zoledronsäure (10^{-7} M) und Dexamethason (10^{-7} M) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse der mRNA-Spiegel mittels Northern Blot. 17β-E_2,17β-Estradiol; Zol, Zoledronsäure; Dexa, Dexamethason.

Es zeigte sich, dass IL-1β die Expression aller untersuchten Gene stimulierte. 17β-Estradiol auf der anderen Seite beeinflusste keines der drei untersuchten Gene, ebenso war keine Regulation durch Zoledronsäure zu beobachten. Zusammenfassend beeinflussten IL-1β, 17β-Estradiol und Zoledronsäure das Verhältnis von RANKL/TRAIL und OPG nicht, da sie entweder keinen Einfluss auf die Expression der Gene oder gleiche Effekte auf alle Gene hatten. Dagegen zeigte sich, dass Dexamethason die OPG- und TRAIL-mRNA-Spiegel unterdrückte, während es die Expression von RANKL induzierte.

4.4. RANKL-induziert Migration in MDA-MB-231-Zellen

Jones et al. zeigten 2007 in einer umfangreichen Studie, dass RANKL einen migrationsfördernden Effekt auf eine Reihe von Krebszelllinien hat.

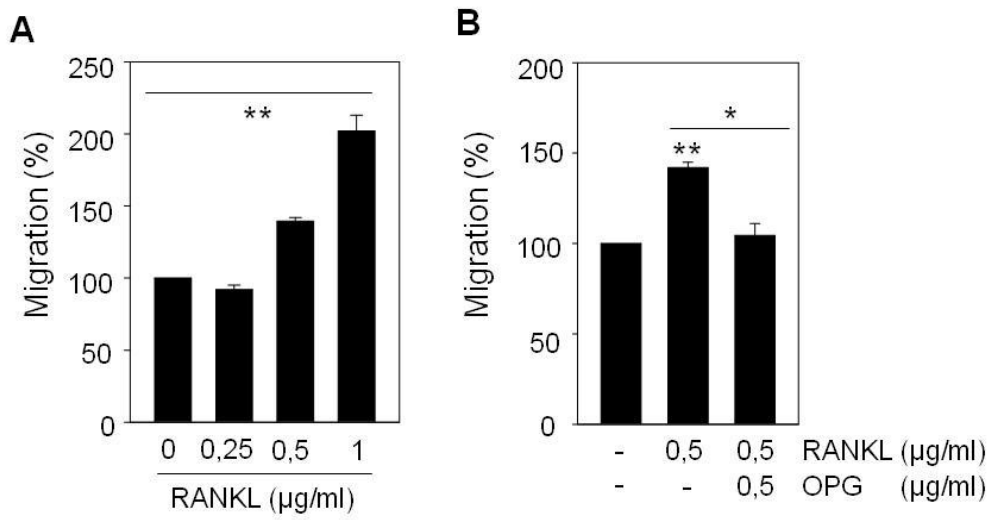

Abb. 22: Regulation der Migration in MDA-MB-231-Zellen durch RANKL

(A) MDA-MB-231-Zellen wurden für 20 h mit 0; 0,25; 0,5 und 1 µg RANKL stimuliert. Im Anschluss wurde die Migration der einzelnen Proben untersucht. Es zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Migration. (**B)** Die gleichzeitige Gabe gleicher Mengen an OPG hemmte die RANKL-vermittelten Effekte vollständig. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt (*$p < 0,05$; **$p < 0,01$).

MDA-MB-231-Zellen wurden wie im Methodenabschnitt beschrieben vorbereitet und für 20 h mit steigenden Konzentrationen an RANKL stimuliert. Die anschließende

Untersuchung zeigte eine dosisabhängige Migrationssteigerung der Zellen. Während 250 ng/ml RANKL noch keinen Effekt auf die Mobilität der Zellen hatte, führten 500 ng/ml RANKL zu einer 40% und 1000 ng/ml zu einer Verdoppelung (202 ± 11%) der Migration ($p < 0,01$; ANOVA). Diese Effekte konnten durch die Gabe gleicher Mengen an OPG vollständig neutralisiert werden ($p < 0,05$; t-Test). So steigerten 500 ng/ml RANKL die Migration der MDA-MB-231-Zellen um 42 ± 3%, während die gleichzeitige Gabe von 500 ng/ml OPG die migrationsfördernden Effekte fast vollständig hemmten (105 ± 6,5% der Kontrolle).

4.5. RANK-Expression und Regulation in Brustkrebszelllinien

Die durch RANKL induzierte Migration scheint über die Bindung an seinen Rezeptor RANK vermittelt zu werden. Die Bedeutung der RANK-Expression ist noch nicht abschließend geklärt, allerdings ist anzunehmen, dass sie möglicherweise regulierend auf die RANKL-induzierte Migration der Tumorzellen Einfluss nimmt. Daher wurden die Spiegel von RANK mittels RT-PCR untersucht. Hierbei lagen die RANK-mRNA-Spiegel der MCF-7- als auch der MDA-MB-231-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. Hingegen wiesen die als Positivkontrolle verwendeten dendritischen Zellen eine starke basale RANK-Expression auf. Buffy Coats wurden als Negativkontrolle verwendet. Eine 6-stündige Stimulation der Brustkrebszellen mit IL-1β (10 ng/ml) führte zu einer Induktion der RANK-mRNA-Spiegel. Diese fiel in den MDA-MB-231-Zellen etwas stärker aus als in den MCF-7-Zellen.

Um die mögliche Bedeutung dieser Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden im folgenden Versuch MDA-MB-231-Zellen für 20 h mit RANKL (0,5 µg/ml), IL1β (10 ng/ml) bzw. RANKL und IL1β inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Migration der Zellen analysiert (Abb. 23B). Wie erwartet steigerte RANKL die Migration der MDA-Zellen (136 ± 10,5% der Kontrolle). Auch IL-1β steigerte die Migration der Zellen, wenn auch deutlich weniger als RANKL (plus 117 ± 6,8% der Kontrolle). Die Kombination von IL-1β mit RANKL hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der Migration (193 ± 15,2% der Kontrolle). Diese war signifikant höher als die allein durch RANKL vermittelte Migration ($p < 0,05$; t-Test).

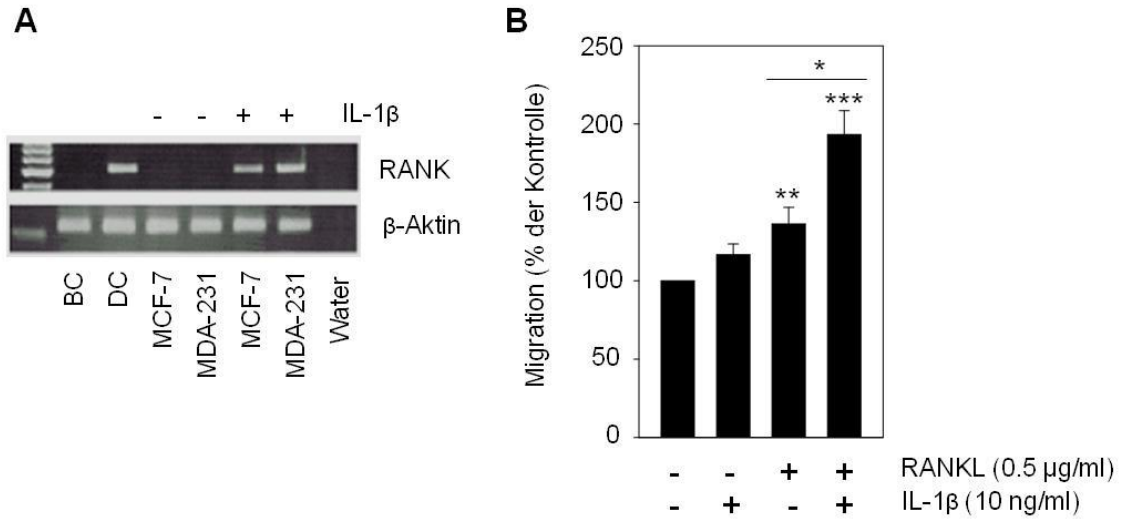

Abb. 23: IL-1β induziert RANK-mRNA-Spiegel in MDA-MB-231-Zellen und fördert deren Migration in Kombination mit RANKL.

(A) Die basale RANK-Expression und die RANK-Expression nach 6-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml IL-1β wurden mittels RT-PCR analysiert. Als Negativkontrolle wurden Buffy Coat (BC) und Wasser verwendet. Als Positivkontrolle dienten dendritische Zellen (DC). **(B)** Die Migration der MDA-MB-231-Zellen wurde nach 20 h Stimulation mit RANKL (0,5 µg/ml), IL-1β (10 ng/ml) und RANKL und IL-1β untersucht. Die Werte sind als Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Versuchen dargestellt (*p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

4.6. Einfluss von Bisphosphonaten auf Brustkrebszellen

Die Knochenmetastasierung ist eine der größten Herausforderungen in der Behandlung von Patientinnen mit Brustkrebs. Um den mit Knochenmetastasierung verbundenen und aus einem gestörten Knochenumsatz resultierenden gesteigerten Knochenabbau zu hemmen, werden Bisphosphonate als potente anti-resorptive Substanzen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass Bisphosphonate sowohl den Knochenverlust als auch das Frakturrisiko von Frauen mit Knochenmetastasen senken können (Costa, 2007; Body et al., 2003b). Bisphosphonate induzieren Apoptose in Osteoklasten (Hughes et al., 1995), zudem konnte gezeigt werden, dass sie die Tumorzellinvasion von Brust- und Prostatakarzinomen reduzieren (Boissier et al. 2000; Van der Pluijm et al. 1996) und Angiogenese inhibieren (Santini et al. 2003). Neuere Studien weisen zusätzlich darauf hin, dass Bisphosphonate einen direkten pro-apoptotischen Effekt auf Krebszellen haben könnten (Fromigue et al, 2000), allerdings scheint die Sensitivität zwischen unterschiedlichen Brustkrebszellen stark zu variieren (Lowe et al., 2005; Verdidk et al., 2007).

Insgesamt sind die positiven Effekte von Bisphosphonaten und ihr klinisches Potential in der Behandlung des metastasierten Brustkrebses in vielzähligen *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegt (Lipton et al., 2007b; Oura et al., 2003). In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass das potente Bisphosphonat Zoledronsäure die Proliferation und Apoptose von Brustkrebszellen *in vitro* beeinflusst. Zudem wurde eine mögliche Regulation von OPG und TRAIL durch Zoledronsäure untersucht.

4.6.1. Induktion der Apoptose in MDA-MB-231-Zellen durch Zoledronsäure

Beide Zelllinien wurden für 0, 24, 48 und 72 h mit Zoledronsäure in einer Konzentration von 100 µmol behandelt. Die Zellmorphologie wurde mittels Time lapse-Mikroskopie analysiert. Wie in Abb. 20A zu sehen, zeigten die MDA-MB-231-Zellen eine verringerte Zellzahl sowie vermehrte Blasenbildung bereits nach 24-stündiger Exposition mit Zoledronsäure. Nach 48 h war eine Reduktion der Zellzahl deutlich zu erkennen und nach 72 h konnte ein fast vollständiger Zellverlust beobachtet werden. Im direkten Vergleich blieben die MCF-7-Zellen morphologisch unverändert, was eine gewisse Resistenz gegenüber Zoledronsäure vermuten ließ.

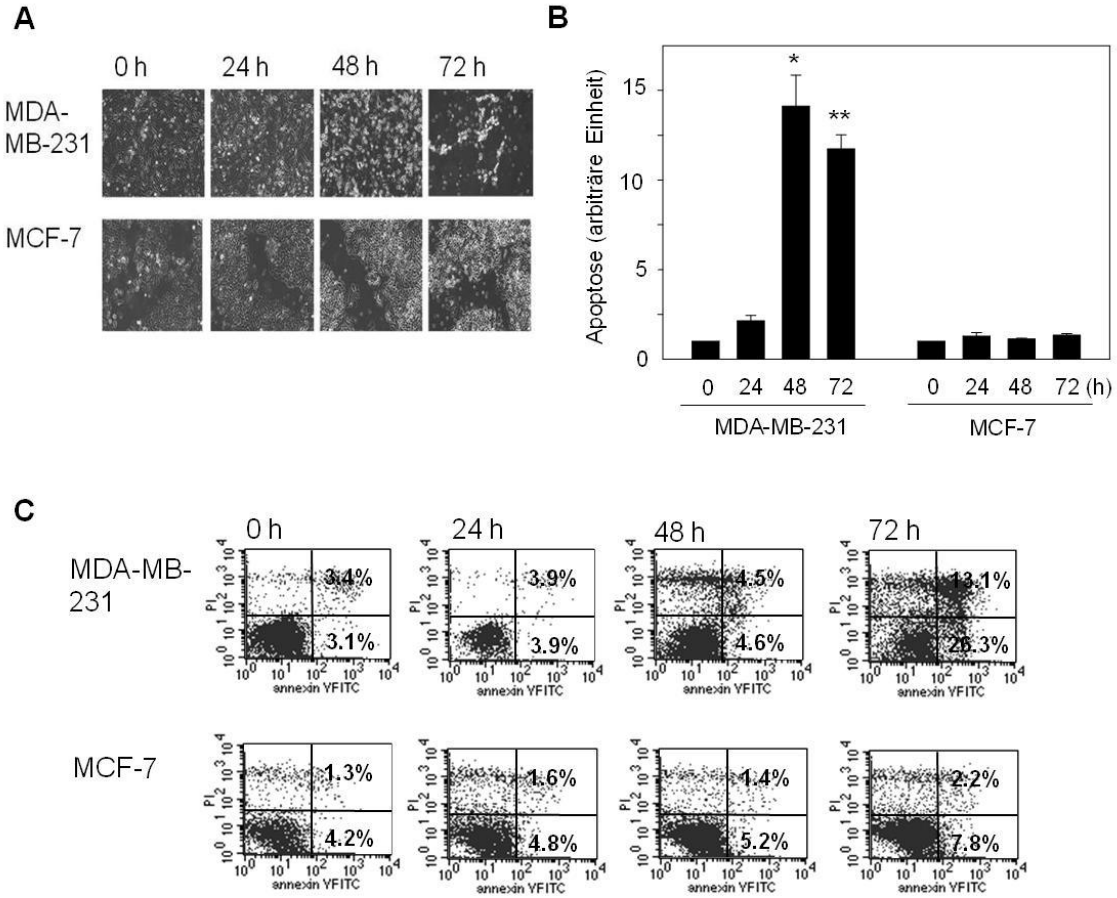

Abb. 24: Zoledronsäure induziert die Apoptose in MDA-MB-231-Zellen

(A) Morphologische Effekte auf MDA-MB-231 und MCF-7-Zellen durch Zoledronsäure (100 µM) wurde mittels Phasenkontrast-Fotographie nach 0, 24, 48 und 72 h Inkubation analysiert. **(B)** Die Apoptoserate wurde mittels Immunassay ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD von zwei unabhängigen Versuchen und als Vielfaches der Kontrolle dargestellt (*p < 0,05; **p < 0,01). **(C)** Die Apoptose wurde mittels Annexin V/Propidiumjodid (PI)-Färbung quantifiziert. Der prozentuale Anteil Annexin V-positiver und Annexin V+PI positiver Zellen ist im unteren und oberen rechten Quadranten dargestellt.

Um genaueren Aufschluss über die Sensitivität der beiden Zelllinien zu erhalten, wurde die Apoptoserate mittels Immunassay und Annexin V/Propidiumjodid-Färbung untersucht. Wie in Abb. 24B dargestellt, steigerte Zoledronsäure die Apoptoserate in den ER-negativen MDA-MB-231-Zellen um das 14-fache nach 48 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p < 0,05). Während dessen konnte keine Steigerung der Apoptoserate in den ER-positiven MCF-7-Zellen nachgewiesen werden. Um die apoptotischen Zellen zu quantifizieren, wurden mit Zoledronsäure behandelte MDA-

MB-231 und MCF-7-Zellen mit Annexin V/ Propidiumjodid gefärbt (Abb. 24C). Mit dieser Methode stieg die Fraktion Annexin V-positiver MDA-MB-231-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit Zoledronsäure von 3,1% auf 26,3% an (8,5-facher Anstieg). Die Fraktion der Annexin V-positiven MCF-7-Zellen erhöhte sich unter derselben Behandlung nur minimal um 3,6%.

4.6.2. Regulation von OPG und TRAIL durch Zoledronsäure

Um mögliche Effekte von Zoledronsäure auf die OPG-Spiegel von Brustkrebszellen zu untersuchen, wurden MDA-MB-231-Zellen sowie MCF-7-Zellen wie bereits oben beschrieben für bis zu 72 h mit Zoledronsäure (100 µM) inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA der Zellen isoliert und der Überstand zur Proteinbestimmung abgenommen. Während es in den MDA-MB-231-Zellen nach 72-stündiger Exposition aufgrund des hohen Zellverlustes unmöglich war, ausreichende Mengen an RNA zu isolieren, blieben die OPG-mRNA-Spiegel nach 24- und 48-stündiger Stimulation unverändert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden nach 48 h gleiche Mengen an OPG-Protein in dem Überstand der Kontrollzellen und der Zoledronsäure exponierten Zellen gemessen. In den MCF-7-Zellen hingegen verursachte Zoledronsäure eine Unterdrückung der OPG-Spiegel mit einer maximalen Unterdrückung auf 37 ± 8,7% der Kontrolle (100%) nach 72-stündiger Exposition mit Zoledronsäure (Abb. 25; $p < 0,01$). Die OPG Sekretion sank um 66% von 4,7 ± 0,6 pmol/l auf 1,6 ± 0,2 pmol/l nach 48-stündiger Inkubation mit Zoledronsäure ($p < 0,05$).

Ergänzend zu OPG wurden ebenfalls die TRAIL-mRNA-Spiegel unter Einfluss von Zoledronsäure untersucht. Beide Zelllinien wurden für 24, 48 und 72 h mit Zoledronsäure in einer Konzentration von 100 µM exponiert. Diese Exposition erzeugte einen gegensätzlichen Effekt auf die TRAIL-mRNA-Spiegel der untersuchten Zelllinien. Während Zoledronsäure die TRAIL-mRNA-Spiegel der MCF-7-Zellen um 50% hemmte ($p < 0,01$), wurden sie in den MDA-MB-231-Zellen um das 2,5-fache gesteigert ($p < 0,05$). Diese Regulation durch Zoledronsäure hatte eine deutliche Auswirkung auf den berechneten TRAIL/OPG-Quotienten (Abb. 25).

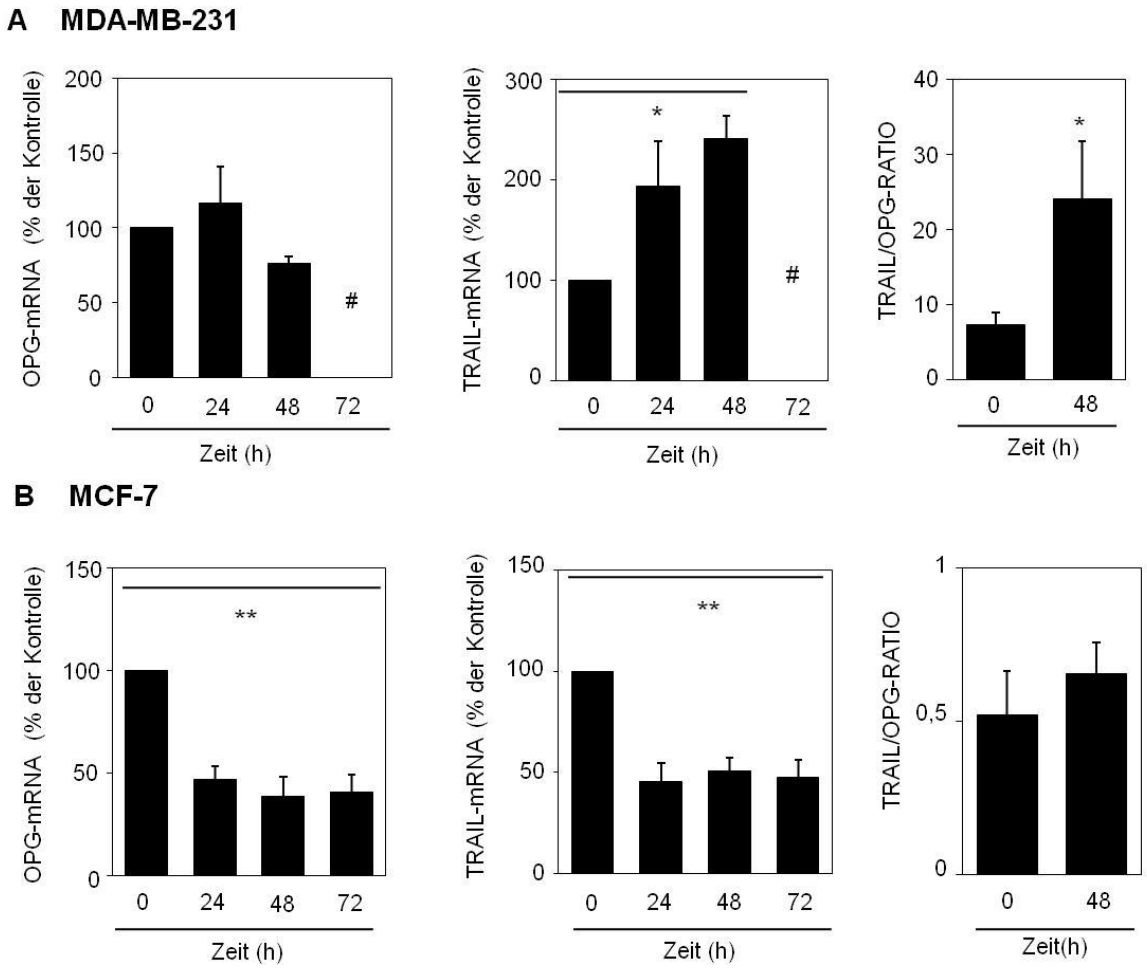

Abb. 25: Zoledronsäure moduliert den TRAIL/OPG-Quotienten in MDA-MB-231-Zellen

MDA-MB-231- **(A)** und MCF-7-Zellen **(B)** wurden für 0, 24, 48 und 72 h mit 100 µM Zoledronsäure behandelt. Im Anschluss wurden die mRNA-Spiegel von OPG und TRAIL mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expression wurde mit dem Housekeeping-Gen Cyclophilin normalisiert und ist relativ zur Kontrolle dargestellt. Der TRAIL/OPG-Quotient berechnet sich aus dem Quotienten der bestimmten OPG- und TRAIL-mRNA-Spiegel nach 48-stündiger Behandlung mit Zoledronsäure. Die Werte sind als MW ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; #, keine ausreichende RNA-Isolation möglich).

Während der basale TRAIL/OPG-Quotient der MDA-MB-231-Zellen bei 7,4 ± 1,7 lag, erhöhte sich dieser unter Behandlung mit Zoledronsäure für 48 h auf 24,1 ± 7,7 ($p < 0,05$). Im Vergleich dazu lag der TRAIL/OPG-Quotient der MCF-7-Zellen bei 0,52 ± 0,14 und dieser blieb aufgrund der gemeinsamen Suppression von TRAIL und OPG durch Zoledronsäure praktisch unbeeinflusst (0,65 ± 0,10).

5. Diskussion

5.1. Bedeutung von Osteoprotegerin bei benignen und malignen Erkrankungen

Seit der Entdeckung seiner Bedeutung für den Knochen hat das zunehmende Wissen über die vielfältigen Wirkungen von OPG zu einem besseren Verständnis verschiedener Erkrankungen beigetragen. Heute werden Änderungen des RANKL/RANK/OPG-Verhältnisses in Zusammenhang mit multiplen Erkrankungen des Knochen- und Gefäßsystems assoziiert. Sowohl bei der postmenopausalen- (Eghbali-Fatourechi et al., 2003) als auch bei der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose konnten zugunsten von RANKL verschobene RANKL/OPG-Quotienten nachgewiesen werden (Sasaki et al., 2002; von Tirpitz et al., 2003). Auch bei der rheumatoiden Arthritis zeigten Untersuchungen eine lokale Überexpression von RANKL-mRNA in der Synovialhaut (Shigeyama et al., 2000). Zudem gibt es Hinweise, dass OPG eine protektive Rolle im Rahmen der pathologischen vaskulären Kalzifizierung hat. Homozygote OPG-Knock out-Mäuse zeigten neben einer deutlichen Osteoporose eine ausgeprägte arterielle Kalzifizierung der Aorta und der Nierenarterien (Min et al., 2000). Zudem wurde im Tiermodell eine gesteigerte Expression von RANK und RANKL in kalzifizierten Arterien nachgewiesen (Sandberg et al., 2006). Interessanterweise wurde beobachtet, dass die OPG-Serumkonzentration mit zunehmendem Alter ansteigt (Browner et al., 2001; Szulc et al., 2001), während zur selben Zeit die OPG-Produktion durch Zellen des Knochens abnimmt (Makhluf et al., 2000). Dies kann möglicherweise als Versuch einer zentralen Gegenregulation zur Kontrolle von Knochenschwund und Kalzifizierung gewertet werden (Tintut und Demer, 2006). Auch das Immunsystem unterliegt einer Modulation durch RANKL. Überraschenderweise fehlten RANK- und RANKL-Knock out-Mäusen Lymphknoten (Dougall et al., 1999; Kong et al., 1999). Innerhalb des Immunsystems wird RANKL von T-Lymphozyten (Wong et al., 1997), RANK von dendritischen Zellen (Kong et al., 1999) und OPG von B-Lymphozyten und dendritischen Zellen (Simonet et al., 1997; Yun et al., 1998) exprimiert. Wong et al. zeigten, dass die Bindung von auf T-Zellen exprimierten RANKL an RANK-exprimierende dendritische Zellen deren Funktion und Überleben reguliert (Wong et al., 1997). Allerdings scheint diese Aufgabe in Abwesenheit von RANKL und RANK kompensatorisch durch die auf T-Zellen und dendritischen Zellen exprimierten CD40L

und CD40 übernommen zu werden (Bachmann et al., 1999; Padigel et al., 2003). In *in vivo*-Studien mit transgenen OPG-Ratten wird RANKL kontinuierlich gehemmt, was sich in einer supprimierten Knochenresorption und einer gesteigerten Knochenmasse äußert. Allerdings zeigten diese Studien keine nachweisbaren negativen Effekte auf das Immunsystem (Stolina et al., 2007). Möglicherweise spielt RANKL aufgrund existierender dominanter Kostimulationswege nur eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung des postnatalen Immunsystems.

Bei malignen Erkrankungen ist OPG sowohl als Ligand für RANKL und TRAIL zu sehen. Beim multiplen Myelom (MM) kommt es zur Bildung typischer osteolytischer Läsionen. Der RANKL/OPG-Quotient scheint hier ein essenzieller Mediator in ihrer Pathogenese zu sein. Der Knochen von Myelom-Patienten zeigt eine deutlich gesteigerte Expression von RANKL (Giuliani et al., 2001; Pearse et al., 2001; Roux et al., 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass andere Faktoren wie IL-1, IL-6 und MIP-1α, die mit den Myelom-typischen Osteolysen assoziiert werden und in der Lage sind Osteoklasten direkt zu aktivieren, größtenteils auch zu einer Induktion der RANKL-Expression in Osteoblasten führen (Callander und Roodman, 2001; Roodman et al., 2004b). Myelom-Zellen steigern zudem die Expression von RANKL in T-Lymphozyten (Giuliani et al., 2002), Endothelzellen (Okada et al., 2003) und exprimieren selbst geringe Mengen an RANKL (Farrrugia et al., 2003). Die lokalen OPG-Spiegel sind bei Myelom-Patienten supprimiert, was zu einer weiteren Verschiebung des RANKL/OPG-Quotienten führt (Pearse et al., 2001). Ursächlich hierfür ist die Expression von Syndecan-1 auf der Oberfläche von Myelomzellen. Syndecan-1 hat die Fähigkeit, Proteine mit Heparin-Bindungsstellen wie OPG zu binden und mit einer Kinetik von 1 ng OPG/h pro 10^6 Myelomzellen zu degradieren (Standal et al., 2002). Es wurde berichtet, dass die Serumkonzentrationen von OPG und RANKL mit den klinischen Parametern des multiplen Myeloms korrelieren und der RANKL/OPG-Quotient als unabhängiger prognostischer Faktor bei Myelom-Patienten genutzt werden kann (Terpos et al., 2003).

Sowohl im Prostatakarzinom (Brown et al., 2001; Zhang et al. 2001) als auch im Mammakarzinom (van Poznak et al., 2006; Bhatia et al., 2005) konnte eine RANKL-Expression sowohl in Zelllinien als auch in primären Tumorproben nachgewiesen werden. Wie beim MM beschrieben erfolgt auch hier eine zusätzliche RANKL-

Sekretion via Stimulation von Osteoblasten (Kitazawa et al., 2002; Fizazi et al., 2003). Die osteoblastäre OPG-Sekretion hingegen wird gehemmt (Thomas et al., 1999).

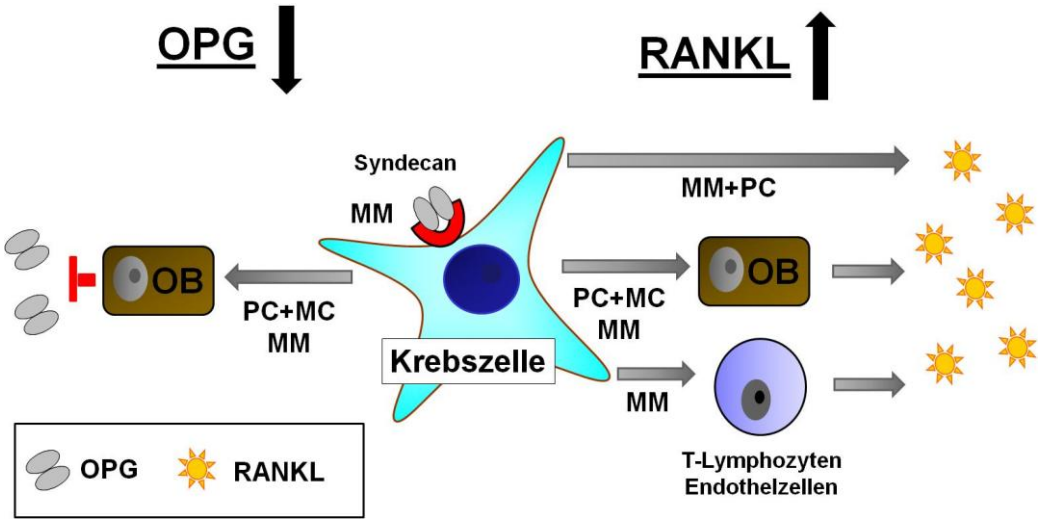

Abb. 26: Einfluss von Tumorzellen auf das RANKL/OPG-System

Sowohl Brustkrebs- (BC), Prostatakrebs- (PC) als auch Myelomzellen (MM) nehmen direkten und indirekten Einfluss über Osteoblasten (OB), T-Lymphozyten und Endothelzellen auf das RANKL/OPG-Verhältnis in ihrer Umgebung. (Angelehnt an Kearns et al., 2008)

Erhöhtes zirkulierendes OPG korreliert mit der Präsenz von Knochenmetastasen bei Patientinnen mit Mammakarzinom (Martinetti et al., 2004), was möglicherweise auf einem kompensatorischen Schutzversuch des Körpers beruht, sich vor den Effekten der erhöhten lokalen RANKL-Produktion im Knochen zu schützen. Die kausale Bedeutung des RANKL/OPG-Quotienten für die Entstehung von Knochenmetastasen konnte in einer Vielzahl an Studien mit Mausmodellen belegt werden. Morony et al. zeigten, dass die Gabe von OPG zusammen mit der Injektion von MDA-MB-231-Zellen die Entstehung radiologisch sichtbarer Knochenläsionen vollständig verhindert. Histologisch zeigte sich eine um 75% niedrigere Tumorlast in den OPG-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Morony et al., 2001). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit OPG-Fusionsprotein eine stärkere Unterdrückung Tumor-assoziierter Osteoklasten bewirkte als eine Therapie mit

Bisphosphonaten (Zheng et al., 2007). Des Weiteren hemmte die OPG-Behandlung bei Mäusen mit bereits etablierter ossärer Metastasierung die Progression der Knochenzerstörung und Tumorlast (Morony et al., 2002).

5.2. Modulation der OPG-Spiegel im Mammakarzinom

Eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen und pharmakologischen Substanzen regulieren die Spiegel von RANKL und OPG sowohl im Knochen als auch in anderen Geweben (Theoleyre et al., 2004). Besonders im Knochen wurde die Regulation von OPG und RANKL detailliert untersucht. Häufig zeigte sich hier eine reziproke Regulation beider Proteine. Diese gegenläufige Regulation dient möglicherweise der Verstärkung pro-resorptiver Signale (Nagai und Sato, 1999; Nakagawa et al., 1999). In zahlreichen inflammatorischen, malignen sowie genetischen Krankheitsmodellen konnte der RANKL/OPG-Quotient als wesentliche Determinante für die Knochenresorption etabliert werden (Haynes et al., 2001; Fazzalari et al., 2001; Morabito et al., 2004). Unterschiedliche Zytokine modulieren das RANKL/OPG-System. So wurde eine Steigerung der OPG-Sekretion im Knochen durch IL-1, IL-4, IL-13 und TNF-α beschrieben (Hofbauer et al., 1999b; Wei et al., 2005; Palmqvist et al., 2006). IL-17 hingegen supprimierte die OPG-Sekretion (Nakashima et al., 2000). Auch in Fibroblasten (Tunyogi-Csapo et al., 2008), Beta-Zellen des Pankreas (Schrader et al., 2007), Fibroblasten (Schoppet et al., 2007) und Kolonkarzinomzellen (Petterson et al., 2005) konnte eine Regulation der OPG-Sekretion durch die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α nachgewiesen werden. In dieser Studie konnte eine ER-unabhängige Steigerung der OPG-Produktion in Brustkrebszellen durch IL-1β und TNF-α gezeigt werden. So führten bereits geringe Konzentrationen (1-10 pg/ml) beider Zytokine zu einer deutlichen Steigerung der OPG-Spiegel, die sich zeit- und dosis-abhängig noch weiter steigern ließ.

Sexualhormone besitzen durch ihre vielfältigen Einflüsse auf Mammakarzinomzellen eine herausragende Bedeutung in der Pathogenese von Brusttumoren. In dieser Studie wurde der Einfluss von Östrogenen und Androgenen auf die Expression von OPG und RANKL in Brustkrebszelllinien untersucht. Hierbei zeigte sich, dass 17β-Estradiol zwar die OPG-Spiegel in den ER-positiven MCF-7-Zellen, nicht hingegen in den ER-negativen MDA-MB-231-Zellen supprimierte. Ähnliche Effekte wurden durch das

aromatisierbare Androgen Testosteron vermittelt. Die beobachtete Hemmung der OPG-Produktion in Östrogen-sensitiven humanen Brustkrebszellen durch 17β-Estradiol steht im Gegensatz zu der bisher beschriebenen Regulation in anderen Zelltypen. So wurde in Osteoblasten, Stromazellen und Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DC) eine Steigerung der OPG-Spiegel nach Exposition mit ER-Agonisten wie 17β-Estradiol, selektiven ER-Modulatoren (SERMs) oder Phytoöstrogenen beobachtet (Hofbauer et al., 1999a; Viereck et al., 2003). Hingegen konnte eine Östrogen-vermittelte OPG-Suppression in mononukleären Zellen des Blutes nachgewiesen werden (Bashir et al., 2005). Übereinstimmend mit früheren Studien an Osteoblasten (Hofbauer et al., 1999a) konnte in dieser Studie der ER-α als der dominante ER-Subtyp für die Regulation der OPG-Spiegel dargestellt werden. Die Bedeutung des ER-α konnte auch in anderen Studien mit MCF-7-Zellen belegt werden (Curtis et al., 2007). Hingegen ist die Rolle des ER-β in der Tumorbiologie von Brustkrebszellen nicht weitgehend ungeklärt (Yager und Davidson, 2002).

In dieser Studie konnte eine deutliche dosis-abhängige sowie spezifisch durch den ER vermittelte OPG-Suppression nachgewiesen werden - zwei wichtige Kriterien für eine physiologisch relevante Regulation (Hofbauer et al., 1999a; Viereck et al., 2003; Viereck et al., 2005). Es konnte zudem gezeigt werden, dass bereits sehr geringe Konzentrationen an 17β-Estradiol genügen, um die OPG-Produktion in Brustkrebszellen zu unterdrücken. Ferner wurden ähnliche Effekte durch Testosteron nachgewiesen, das im Gegensatz zu 5α-DHT aromatisierbar ist (Gruber et al., 2002). Die durch Testosteron beobachteten Effekte konnten sowohl durch die zusätzliche Gabe eines Anti-Östrogens (Fulvestrant) als auch die Gegenwart eines Aromataseinhibitors aufgehoben werden. Das klinische Management des Mammakarzinoms beinhaltet unter anderem auch eine hormonablative Therapieform, wie SERMs, die als ER-Antagonisten an der Brust fungieren, GnRH-Agonisten, die eine zentrale Suppression der Sexualhormonproduktion bewirken sowie Aromataseinhibitoren, die die Umwandlung von adrenalen Androgenen zu Östrogenen blockieren (Veronesi et al., 2005). Aromataseinhibitoren sind entscheidend bei postmenopausalen Frauen, um im Fettgewebe die Umwandlung adrenaler Androgene zu 17β-Estradiol zu verhindern und bewirken zudem eine veränderte Genexpression der Brustkrebszellen (Gruber et al., 2002; Veronesi et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass Testosteron in Brustkrebszellen im Gegensatz zu anderen Zellsystemen wie dem

Prostatakarzinom (Vandyke et al., 2007) und Osteoblasten (Hofbauer et al., 2002) keinen direkten Einfluss auf die OPG-Spiegel nimmt. Es scheint vielmehr, dass Testosteron nur nach erfolgreicher Aromatisierung zu Östrogenen über den ER die OPG-Spiegel moduliert.

Glukokortikoide sind potente Regulatoren des RANKL-OPG-Systems im Knochen. Sie hemmen die OPG-Sekretion in humanen Osteoblasten, während sie einen fördernden Effekt auf die RANKL-Expression haben (Hofbauer et al., 1999c; Kondo et al., 2008). Auch die OPG-mRNA-Spiegel und Protein-Sekretion in Brustkrebszellen wurden durch das Glukokortikoid Dexamethason unterdrückt. Die Suppression erfolgte unabhängig vom ER-Status der Zelllinie in Abhängigkeit von Zeit und Dosis mit maximalen Effekten nach 24 h bei einer Konzentration von 10^{-7} M.

5.3. Effekte von Bisphosphonaten auf Mammakarzinomzellen

Bisphosphonate sind häufig verwendete Substanzen in der Behandlung von malignen und benignen Skeletterkrankungen, denen eine gesteigerte Knochenresorption zugrunde liegt. Speziell Zoledronsäure hat sich als besonders hilfreich in der Behandlung von Knochenmetastasen erwiesen (Kohno et al., 2005). Bisphosphonate induzieren Apoptose in Osteoklasten, vermutlich durch die Hemmung der Isoprenylierung überlebenswichtiger Proteine (Luckman et al., 1998, van Beck et al., 1999). Zusätzlich gab es Hinweise auf direkte Antitumoreffekte durch Bisphosphonate u.a. beim multiplen Myelom (Shipman et al., 1997), Pankreaskarzinom (Tassone et al., 2003), Prostatakarzinom (Lee et al., 2001) und Mammakarzinom (Senaratne et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das potente Bisphosphonat Zoledronsäure die Zellproliferation hemmt und zudem die Apoptose in Brustkrebszellen fördert. Eine Behandlung mit Zoledronsäure für 72 h hemmte die Zellproliferation in der aggressiven und ER-negativen MDA-MB-231 Zelllinie um mehr als 90%. Außerdem ließ sich ein deutlicher Anstieg der zellulären Apoptoserate nachweisen. In der ER-positiven MCF-7-Zelllinie waren die Effekte hingegen deutlich schwächer ausgeprägt und schienen hauptsächlich durch Veränderungen der Proliferation und weniger durch pro-apoptotische Effekte vermittelt zu sein. Konzentrationen von 100 µM waren notwendig, um deutliche anti-proliferative und apoptotische Effekte zu erzeugen. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen *in vitro*-Studien, die maximal-inhibitorische Effekte von

Bisphosphonaten in einem Konzentrationsbereich erzielten, der deutlich über der typischerweise bei Patienten erreichbaren Serumkonzentration lag. Eine pharmakologische Studie hat gezeigt, dass die Bisphosphonat-Konzentration im Serum bei 1-3 µM liegt und sich nach Infusion schnell verringert (Chen et al., 2002). Diese niedrigen Serumkonzentrationen stellen auf den ersten Blick die physiologische Relevanz der hier beschriebenen Daten in Frage. Allerdings gibt es Hinweise, dass der Abfall der Serumkonzentration hauptsächlich Ausdruck der schnellen Inkorporation der Bisphosphonate in skeletale Strukturen ist, wo Konzentrationen von 100 µM bis 1 mM beschrieben wurden (Sato et al., 1991). In den Knochen integrierte Bisphosphonate werden kontinuierlich ins lokale Milieu freigesetzt. Die dadurch entstehenden Bisphosphonatkonzentrationen sind möglicherweise Voraussetzung für die direkten Antitumoreffekte i*n vivo*.

Zoledronsäure scheint unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von der Art des Tumors zu haben. Beim Lungenkarzinom wurde beispielsweise eine reine Proliferationshemmung durch Bisphosphonate erzielt ohne Einfluss auf die Apoptose (Li et al., 2008). Allerdings gibt es widersprüchliche Daten bezüglich der Sensitivität von Brustkrebszellen gegenüber Bisphosphonaten. Eine Studie von Fromigue et al. untersuchte den Einfluss von diversen Bisphosphonaten auf drei Brustkrebszelllinen. MCF-7-Zellen waren in dieser Studie sensitiver als MDA-MB-231-Zellen (Fromigue et al., 2000). Im Gegensatz dazu beschrieb eine Studie von Senaratne et al. beide Zelllinien als ähnlich sensitiv (Senaratne et al., 2000). In einer weiteren Studie hingegen beeinflusste das Bisphosphonat Clodronat das Überleben von MDA-MB-231-Zellen, hatte aber keinen Einfluss auf die MCF-7-Zellen (Busch et al., 1998). In dieser Studie zeigten sich die MDA-MB-231-Zellen hoch sensibel gegenüber Zoledronsäure, während die MCF-7-Zellen relativ resistent waren. Es bleibt unklar, warum diese Unterschiede existieren. Manche Autoren haben die Bisphosphonat-induzierte Apoptose als Caspasen-abhängig beschrieben (Senaratne et al., 2000; Coxon et al., 1998). Eine mögliche Erklärung für die relative Resistenz der MCF-7-Zellen könnte daher ihr Mangel an Caspase-3 sein (Jänicke et al., 1998).

Studien mit primären Brustkrebsproben könnten Aufschluss darüber geben, ob eine Korrelation zwischen dem ER-Status und der Zoledronsäure-Empfindlichkeit besteht. Dies ist vor allem angesichts der limitierten Behandlungsmöglichkeiten von ER-negativen Mammakarzinomen von Interesse (Rahman et al., 2008). Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom profitieren von einer Therapie mit Bisphosphonaten.

So konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Zoledronsäure zur neoadjuvanten Chemotherapie die Tumorempfindlichkeit steigerte (Winter et al., 2008). Zudem gibt es zunehmend Hinweise, dass auch Frauen in frühen Brustkrebsstadien ohne Metastasen von einer präventiven Bisphosphonattherapie profitieren (Coleman et al., 2007). Gesteigerte Überlebensraten könnten zum Teil auf den hier demonstrierten pro-apoptotischen Effekten der Tumorzellen basieren. Die Gabe von Zoledronsäure und die daraus resultierende Akkumulation im Knochen könnten ein ungünstiges Mikromillieus für das Überleben disseminierter Brustkrebszellen schaffen.

Es ist möglich, dass der TRAIL/OPG-Quotient einen Einfluss auf das Überleben der sowohl TRAIL-sensitiven als auch TRAIL-exprimierenden MDA-MB-231-Zellen hat (Rahman et al., 2008). Die Exposition der MDA-MB-231-Zellen mit Zoledronsäure steigert deren TRAIL-Spiegel, ohne jedoch einen Einfluss auf OPG zu haben. Diese Veränderungen führten zu einem deutlich gesteigerten TRAIL/OPG-Quotienten. Interessanterweise konnte diese Beobachtung nur in den Bisphosphonat- und TRAIL-sensitiven MDA-MB-231-Zellen gemacht werden, während der TRAIL/OPG-Quotient der resistenten MCF-7-Zellen unverändert blieb.

Zusammenfassend zeigt Zoledronsäure starke anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte in den ER-negativen MDA-MB-231-Zellen, wohingegen die MCF-7-Zellen relativ resistent sind. Des Weiteren steigert Zoledronsäure die TRAIL-Produktion und beeinflusst dadurch den TRAIL/OPG-Quotienten der TRAIL-sensitiven MDA-MB-231-Zellen, was möglicherweise die Zellintegrität und das Überleben beeinflusst. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass TRAIL und OPG Bisphosphonat-responsive Zielgene in Brustkrebszellen sind.

5.4. Die Bedeutung von TRAIL beim Mammakarzinom

Der Nachweis, dass manche Brustkrebszellen in der Lage sind ausreichende Mengen an OPG zu sezernieren, um der TRAIL-induzierten Apoptose zu entgehen (Holen et al., 2005), lässt die Vision zu, durch Modulation der OPG-Sekretion diesen Vorgang zu beeinflussen. OPG unterliegt einer vielfältigen Regulation durch Zytokine, Hormone und Medikamente, aber lokale Regulatoren der OPG-Expression von Brustkrebszellen sind bisher nur unzureichend untersucht worden. Kapoor et al. haben zuvor gezeigt,

dass IL-1β zu einer Steigerung der OPG Produktion in Brustkrebszelllinien führt (Kapoor et al., 2008) und in dieser Arbeit konnte eine ER-abhängige Suppression der OPG-Spiegel nachgewiesen werden (Rachner et al., 2008). Das Konzept der Studie war, dass Substanzen, die OPG hemmen, die Empfindsamkeit auf TRAIL verbessern. Während Östrogene die OPG-Expression in MCF-7-Zellen supprimieren (Rachner et al., 2008), zeigt eine neue Studie, dass ER-positive Brustkrebszelllinien überwiegend TRAIL-resistent sind (Rahman et al., 2008). Daher wäre hier zu erwarten, dass die Senkung von OPG keinen Einfluss auf die Zellintegrität hätte, möglicherweise sogar die ossäre Metastasierung fördern könnte, da RANKL, dessen Aktivität durch OPG reguliert wird, die Brustkrebsmigration fördert (Jones et al., 2006). Dexamethason unterdrückt nachweislich die Produktion von OPG in Knochenzellen (Hofbauer et al., 1999c; Kondo et al., 2008) und Glukokortikoide werden zusätzlich zur Chemotherapie bei Brustkrebs verabreicht. Möglicherweise hat der Glukokortikoid-Rezeptor einen additiven Einfluss auf die Biologie von Brustkrebszellen (Moutsatou und Papavassiliou, 2008). So steigert Dexamethason beispielsweise die Wirkung von Krebsmedikamenten *in vitro*, indem es das Resistenzprotein ABCG2 hemmt (Honorat et al., 2008) und induziert die Natrium-Jodid-Symporter-Expression *in vivo* (Willhauck et al., 2008), was diese Tumoren prinzipiell einer Radiojodtherapie zugänglich macht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Dexamethason unabhängig vom ER-Status die OPG-Produktion der Brustkrebszellen zeit- und dosisabhängig supprimiert. Im Gegensatz dazu steigert das pro-inflammatorische Zytokin IL-1β zeit- und dosis-abhängig die OPG-Produktion. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die OPG Produktion in Brustkrebszellen der Kontrolle systemischer Regulatoren der Knochen- und Tumorzellbiologie unterliegt. Zwar waren die beobachtete Regulation durch Dexamethason und IL-1β unabhängig vom ER-Status der Zelle, allerdings waren die Effekte auf die OPG-Spiegel durchgängig stärker in den differenzierteren ER-positiven MCF-7 -Zellen.

In Übereinstimmung mit einer aktuellen Studie hatte TRAIL keinen Einfluss auf die MCF-7-Zellen (Rahman et al., 2008), wohingegen in den MDA-MB-231 eine dosisabhängige Steigerung der Apoptoserate durch TRAIL erfolgte. Diese Effekte konnten durch die Gabe von OPG vollständig aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass die Affinität von OPG und TRAIL grösser und physiologisch relevanter sein

könnte als bisher angenommen. Ähnliche Folgerungen wurden von Vitovski et al. aus einer komplexen 2007 veröffentlichten Bindungsstudie von OPG und seinen zwei Liganden gezogen. Auch konnte eine Korrelation zwischen sezerniertem OPG und dem Überleben dargestellt werden. Brustkrebszellen, in denen die OPG-Sekretion durch Dexamethason unterdrückt war, waren empfänglicher für die TRAIL-vermittelte Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Umgekehrt waren die Zellen, bei denen die OPG-Sekretion durch IL-1β gesteigert wurde, resistenter. Während frühere Studien zu dem Ergebnis kamen, dass lokale Quellen irrelevant für den zellulären Schutz vor TRAIL seien (Neville-Webbe et al., 2004; Nyambo et al., 2004), weisen unsere *in vitro* Daten darauf hin, dass Brusttumore mit hohen endogenen OPG-Spiegeln oder einer Lokalisation in Arealen mit hoher OPG-Präsenz durchaus einen Überlebensvorteil haben. Selbstverständlich muss dieses Konzept in weiteren *in vivo*-Studien validiert werden.

Die meisten Studien untersuchten die Fähigkeit von OPG, Tumorzellen vor exogenem TRAIL zu schützen. Die potentielle Rolle der endogenen TRAIL-Expression wurde bisher nicht ausführlich erforscht, obwohl ein beträchtlicher Teil primärer Brusttumore TRAIL exprimieren (van Poznak et al., 2006). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die TRAIL-sensitiven MDA-MB-231-Zellen im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen eine hohe TRAIL-Expression aufweisen und diese durch IL-1β und Dexamethason reguliert wird. Interessanterweise verursacht die Deletion von endogenem OPG, die zu einem erhöhten TRAIL/OPG-Quotienten führt, eine Steigerung der Apoptose. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit Osteoklasten bestätigte den funktionellen Antagonismus von endogenem TRAIL und exogenem OPG bei der Regulation der Apoptose (Chamoux et al., 2008).

Normalerweise scheinen benigne Brusttumore und normales Brustgewebe kein OPG zu exprimieren (Cross et al., 2006), so dass anzunehmen ist, dass die Fähigkeit OPG zu exprimieren während der Tumorigenese erworben wird und möglicherweise als Schutzfaktor die Zellen vor TRAIL protegiert und so die Tumorprogression fördert. Epitheliale Brustzellen sind in der Lage, TRAIL zu produzieren, was möglicherweise als intrinsischer Schutzmechanismus vor maligner Transformation anzusehen ist (Sohn et al., 2001). Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, warum und zu welchem Zeitpunkt manche der Brustkrebszellen TRAIL-sensitiv werden und andere nicht. Zwar wurde die

Sicherheit einer TRAIL-Anwendung *in vivo* untersucht (Walczak et al., 1999), aber die Komplexität eines Zytokinsystems bestehend aus mindestens fünf Rezeptoren erschwert die Prognose pharmakologischer Interaktionen sehr schwer. Dieses Problem hat zur Entwicklung spezifischer agonistischer TRAIL-R1- und TRAIL-R2-Antikörper geführt (Ichikawa et al., 2001; Ichikawa et al., 2003). Die konstitutive und erworbene TRAIL-Resistenz bleibt aber auch hier weiterhin ein Problem (Li et al., 2006). Die Kombination von TRAIL mit anderen antiproliferativen Therapeutika kann unter speziellen Umständen eine erworbene TRAIL-Resistenz aufheben und daher die antitumoralen Effekte potenzieren (Gliniak und Le, 1999; Keane et al., 1999; Matsuzaki et al., 2001).

Insbesondere dreifach negative Tumore (ohne ER, PR und HER-2) mit limitierten Behandlungsoptionen könnten von einer TRAIL-Behandlung oder selektiven TRAIL-R1/TRAIL-R2 Stimulation profitieren, wenn sich zeigen sollte, dass sich die *in vitro*-Ergebnisse bezüglich deren TRAIL-Sensitivität (Rahman et al., 2008) auch auf primäre Krebszellen übertragen lässt. Die TRAIL-Empfindlichkeit von Brustkrebszellen lässt sich möglicherweise durch die gleichzeitige Gabe von Substanzen, die OPG unterdrücken, steigern. In dieser Hinsicht wäre die Kombination mit Dexamethason sinnvoll, da es bei verschiedenen Zellen OPG hemmt. Weitere *in vivo*-Studien sind nötig, um dieses Konzept zu evaluieren.

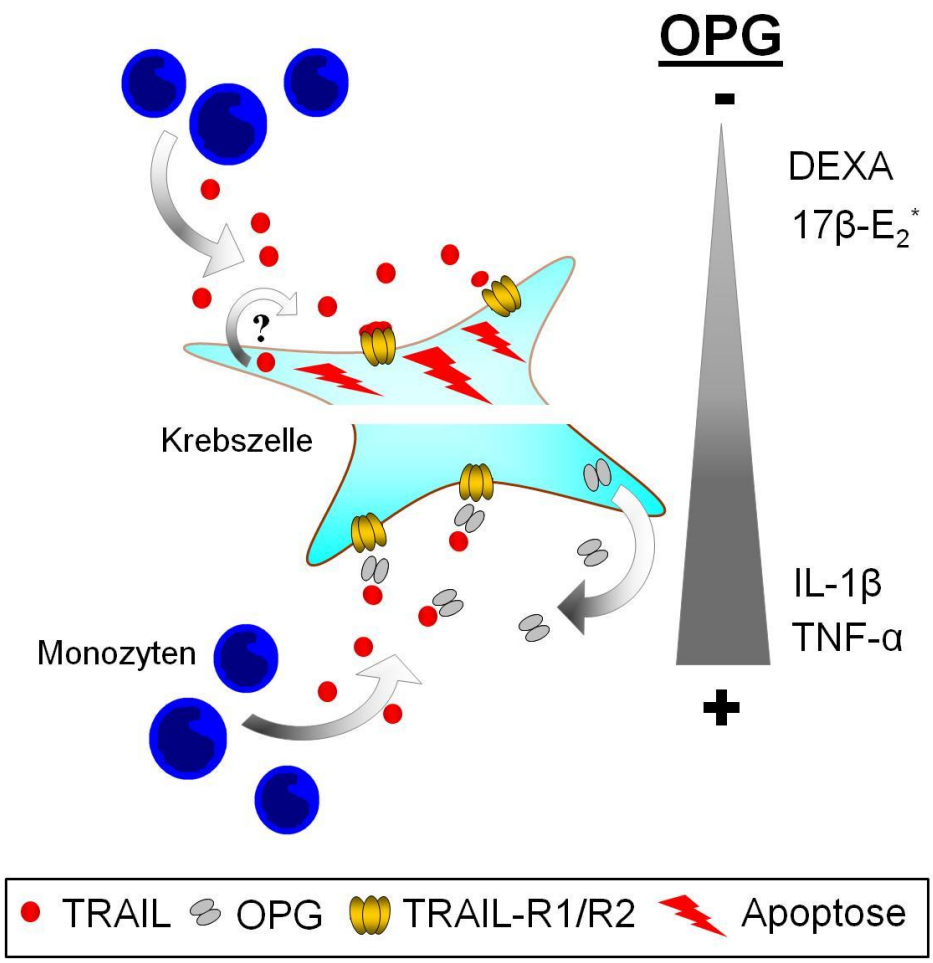

Abb. 27: Bedeutung der OPG/TRAIL-Interaktion im Mammakarzinom

TRAIL-R1/R2-exprimierende Zellen können hohe Mengen an OPG exprimieren, um sich vor TRAIL zu schützen. Physiologisch wird TRAIL von Monozyten und in manchen Fällen auch endogen sezerniert. Bei supprimierter OPG-Produktion sind die Zellen empfindlicher gegenüber TRAIL und *vice versa*. Die OPG-Produktion im Mammakarzinom wird durch IL-1β und TNF-α gesteigert und durch Dexamethason, und bei ER-positiven Zellen, auch durch 17β-Estradiol supprimiert.

Abkürzungen: DEXA, Dexamethason; 17β-E_2, 17β-Estradiol; ER, Östrogenrezeptor; *, wenn ER+

5.5. Die Bedeutung von RANKL beim Mammakarzinom

Während in einer früheren Studie keine RANKL-Expression in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen nachgewiesen werden konnte (Thomas et al., 1999), ließ sich in dieser

Arbeit eine basale RANKL-Expression, sowie eine Regulation durch 17β-Estradiol, Dexamethason und IL-1β in beiden Zelllinien zeigen (Rachner et al., 2008). In der Zwischenzeit wurde die RANKL-Expression in MDA-MB-231-Zellen auch von Nicolin und Narducci nachgewiesen (Nicolin und Narducci, 2008). Dies steht in Übereinstimmung mit Studien von Cross et al. und van Poznak et al., welche eine basale RANKL-Expression in einem Teil der von ihnen untersuchten primären Brustkrebsproben nachwiesen (Cross et al., 2006; van Poznak et al., 2006). Neben seiner Bedeutung für die Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten (siehe oben), wurde RANKL erstmalig 2006 von Jones et al. als migrationsförderndes Zytokin für Brustkrebs- und Melanom-Zellen beschrieben (Jones et al., 2006). Es konnte eine dosis-abhängige Migration sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die beobachteten Effekte konnten durch die Gabe von OPG aufgehoben werden. Mittlerweile konnten ähnliche Effekte auch in anderen Tumoren mit häufiger ossärer Metastasierung wie Prostata- (Armstrong et al., 2008) und Nierenzell-Karzinomen (Mikami et al., 2009) nachgewiesen werden. Alle diese Zellen exprimieren RANK und die beobachteten Effekte werden über eine direkte RANK/RANKL-Bindung vermittelt. Ungeklärt bleibt die Frage, ob die Expressionsstärke von RANK einen Einfluss auf das Metastasierungspotenzial einer Krebszelle hat. Da die biologische Aktivität von RANKL durch die Anwesenheit von OPG reguliert wird, könnte die Regulation von OPG einen direkten Einfluss auf das Metastasierungsverhalten der Krebszellen nehmen. Die Bedeutung der endogenen RANKL-Expression im Metastasierungsprozess bleibt unklar, ebenso wie die Frage, ob endogenes RANKL einen direkten Einfluss auf die Aktivität tumornaher Osteoklasten hat.

5.6. Denosumab als künftige Therapieoption des Mammakarzinoms

Eine gesteigerte Osteoklastenaktivität ist eine Voraussetzung für die Entstehung von ossären Knochenmetastasen und daher ein vielversprechendes therapeutisches Ziel. So vermitteln Bisphosphonate die meisten ihrer Effekte über direkte und indirekte Einflüsse auf Osteoklasten. Durch die Entdeckung des RANK/RANKL/OPG-Systems eröffnen sich neue therapeutische Möglichkeiten.

Erste klinische Studien untersuchten die Wirksamkeit von zwei rekombinanten OPG-Konstrukten zur Behandlung von Osteoporose und Tumor-assoziiertem Knochenverlust. Fc-OPG war das erste untersuchte Konstrukt. Hier zeigte sich bei gesunden postmenopausalen Frauen nach einmaliger subkutaner Gabe eine Unterdrückung verschiedener Knochenresorptionsmarker (Bekker et al., 2001). Der Nachfolger von Fc-OPG war OPG-Fc, bei dem im Gegensatz zu seinem Vorgänger das Fc-Fragment des IgG1 nicht mehr mit dem C- sondern dem N-Terminus des OPG fusioniert war. Dadurch konnte eine deutlich verlängerte Halbwertszeit erreicht werden. OPG-Fc wurde in einer Phase-1-Studie bei 28 Patienten mit multiplem Myelom und 26 Patientinnen mit osteolytischen Knochenläsionen bei Mammakarzinom untersucht (Body et al., 2003a). Die Behandlung führte zu einer rapiden Abnahme des Knochenresorptionsmarkers uNTX und war in etwa vergleichbar mit der Wirkung des in der Kontrollgruppe getesteten Bisphosphonates Pamidronat. Mit Einführung des monoklonalen RANKL-Antikörpers Denosumab wurde von weiteren Studien mit OPG-Fc abgesehen. Denosumab hat eine deutlich längere Halbwertszeit als OPG-Fc (Kostenuik, 2005) und weist zudem eine hohe und spezifische Affinität für RANKL auf, ohne mit TNF-α, TNF-β, TRAIL oder dem CD40 Liganden zu kreuzreagieren (Elliott et al., 2006). Eine Reihe an Phase-2 und -3-Studien wurden bzw. werden momentan durchgeführt um die Wirkung von Denosumab bei postmenopausaler Osteoporose, rheumatoider Arthritis und der Behandlung von Knochenmetastasen zu erforschen. Postmenopausale Frauen mit einer niedrigen Knochendichte profitierten von der Denosumab-Gabe. Sowohl nach 12 als auch nach 24 Monaten zeigte sich eine gesteigerte Knochendichte in Hüfte, Femur und Radius (McClung et al., 2006). Auch nach einer 2-jährigen Behandlung mit Denosumab blieb die Knochenresorption supprimiert und die Knochendichte erhöht. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Knochendichte war auch hier vergleichbar mit der mit Alendronat behandeltet Gruppe des zweiten Arms der Studie (Lewiecki et al., 2007). Erste Studien weisen darauf hin, dass auch Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) von einer Behandlung mit Denosumab profitieren. So wurde in einer multizentrischen, randomisierten, doppel-blinden Phase 2-Studie mittels Kernspintomographie die Knochenerosion bei Patienten mit milder bis mäßig ausgeprägter RA nach halbjährlicher Denosumab-Gabe mit einer Plazebo-Gruppe verglichen (Cohen et al., 2008). Nach 12 Monaten profitierten sowohl mit 60 mg als auch mit 180 mg behandelte Patienten von der Denosumab-Therapie.

Speziell für Krebserkrankungen mit typischer ossärer Beteiligung ist die Behandlung mit Denosumab von großem Interesse. Denosumab scheint gut toleriert zu werden. Eine Phase 1-Studie von Body et al. zeigte, dass bei Patienten mit vorhandenen Osteolysen durch Brustkrebs oder MM eine Behandlung mit Denosumab zu einer langfristigen Suppression des Resorptionsmarkers *Urinary N-Telopeptide* (uNTX) führte bei vergleichbarer Zahl unerwünschter Nebenwirkungen in der Kontrollgruppe (Body et al., 2006). Die Hemmung der uNTX war ähnlich stark, aber länger wirksam als in der mit Pamidronat behandelten Kontrollgruppe. Eine Phase 2-Studie mit 255 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom ohne vorherige Bisphosphonat-Therapie, konnte diese Ergebnisse bestätigen. Die Behandlung mit Denosumab führte zu einer schnellen und langfristige Suppression des Knochenumsatzes und senkte das Risiko skeletaler Komplikationen ähnlich stark wie intravenöse Bisphosphonate (Lipton et al., 2007a; Lipton et al., 2008). Auch Patienten mit nicht metastasiertem Prostatakarzinom profitieren von einer Therapie mit Denosumab. Denosumab steigert signifikant die Knochendichte im Vergleich zur Kontrollgruppe und senkte die Inzidenz vertebraler Frakturen (Smith et al., 2009). Interessanterweise zeigten Patienten mit bereits begonnener Bisphosphonattherapie nach einem Wechsel auf Denosumab einen stärkeren uNTX-Abfall als die Patienten, bei denen die Bisphosphonattherapie fortgeführt wurde (Fizazi et al., 2009).

Zwei theoretische Komplikationen, die bei einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen RANKL oder rekombinantem OPG auftreten könnten, sind die Entwicklung von Infektionen und ein gesteigertes Risiko für Malignität durch eine Modulation des Immunsystems (Whyte, 2006). Effekte auf das Immunsystem sind möglich, da RANK sowohl auf T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Zellen der Hämatopoese exprimiert wird (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998). In RANKL-Knock out Mäusen konnte eine gestörte T- und B-Zell Funktion festgestellt werden (Kong et al., 1999). Erste Ergebnisse zeigen allerdings, dass das Immunsystem bei Patienten mit Denosumab nicht beeinflusst wird (Bekker et al., 2004). Auch in der klinischen Phase 3-Studie ergaben sich keine signifikant häufigeren Infektionen oder Malignome durch Denosumab im Vergleich zum Plazebo (Cummings et al., 2009). Erst Langzeitstudien werden die Sicherheit von Denosumab abschließend klären können.

6. Zusammenfassung

Obwohl es in der Behandlung des Mammakarzinoms deutliche Fortschritte gibt, bleiben die Therapieoptionen für Hormonrezeptor-negative und ossär metastasierte Tumoren begrenzt. Die Entdeckung des RANKL/RANK/OPG-Systems im Jahre 1997 hat das Verständnis über die komplexe Regulation des Knochenstoffwechsels grundlegend beeinflusst. Das Zytokin RANKL, sein Rezeptor RANK und der Rezeptorantagonist OPG sind essenzielle Regulatoren der Osteoklastenbiologie. Zunehmend wird auch die Bedeutung von OPG und RANKL in der Tumorbiologie akzeptiert. So konnte gezeigt werden, dass RANKL die Migration von Brust- und Prostatakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* fördert. TRAIL ist ein Mitglied der TNF-Familie, das in malignen Zellen Apoptose induziert. Als Rezeptorantagonist für sowohl RANKL als auch TRAIL, besitzt OPG prinzipiell die Fähigkeit, zwei fundamentale Prozesse der Tumorbiologie zu beeinflussen, die Apoptose und die ossäre Migration.

Östrogene regulieren vielfältige Zytokine und Wachstumsfaktoren in Östrogen-Rezeptor (ER)-positiven Brustkrebszellen. Im **ersten Teil** dieser Arbeit wurde die Regulation des RANKL/OPG-Systems durch Östrogene und Androgene in der ER-positiven MCF-7- und der ER-negativen MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie untersucht. In den hauptsächlich ER-α-exprimierenden MCF-7-Zellen führte die Exposition mit 17β-Estradiol und Testosteron zu einer dosisabhängigen Hemmung der OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion um 70 bzw. 65%. Ferner konnte die Expression von RANKL in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Während IL-1β in beiden Zelllinien zu einer Induktion von RANKL führte, unterdrückte 17β-Estradiol die RANKL-Spiegel der MCF-7-Zellen, nicht aber der MDA-MB-231-Zellen. Die Suppression der OPG-Produktion durch 17β-Estradiol und Testosteron konnte durch die Gabe des Anti-Östrogens ICI 182,780 verhindert werden. Zudem konnte der Testosteron-Effekt durch einen Aromataseinhibitor blockiert werden, was darauf hinweist, dass Androgene die OPG-Spiegel in Brustkrebszellen indirekt nach einer Aromatisierung und Bindung an den ER beeinflussen können.

Im **zweiten Teil** wurde die Expression und Modulation von OPG und TRAIL durch IL-1β und Dexamethason in den MCF-7- und den MDA-MB-231-Zellen untersucht. In beiden Zelllinien, wurden die OPG-mRNA-Spiegel und -Proteinsekretion zeit- und

dosisabhänig durch IL-1β gesteigert und durch Dexamethason gehemmt. Im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen exprimierten die MDA-MB-231-Zellen TRAIL, welches durch IL-1β gesteigert und durch Dexamethason unterdrückt wurde. TRAIL aktivierte die pro-apoptotischen Caspase-3,-7 und PARP und führte zum Zellverlust in den MDA-MB-231-Zellen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die MCF-7-Zellen. Der OPG-Knock down mittels siRNA führte zu einer um 31% gesteigerten Apoptoserate im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten MDA-MB-231-Zellen. Zudem schützte das ins konditionierte Medium sezernierte OPG die Zellen vor der TRAIL-vermittelten Apoptose. Dieser protektiven Effekte konnten durch die Blockade von OPG mit seinem spezifischem Liganden RANKL aufgehoben werden. Die Assoziation zwischen Zellschutz und OPG-Produktion in den MDA-MB-231-Zellen wurde ferner durch die Beobachtung unterstützt, dass die Modulation der OPG-Sekretion mittels IL-1β und Dexamethason vor einer TRAIL-Exposition zu einer Senkung bzw. Steigerung der Apoptose führte.

Bisphosphonate sind etablierte Medikamente zur Behandlung von Knochenmetastasen, welche die Osteoklastenaktivität hemmen und so den Circulus vitiosus aus Osteoklast-Tumorzell-Interaktion unterbrechen. Im **dritten Teil** dieser Arbeit wurden die direkten Effekte von Zoledronsäure auf die MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen evaluiert. Während Zoledronsäure (100 µM) die Zellproliferation der MDA-MB-231-Zellen nach 72 h hemmte und die Apoptose über eine Aktivierung von Caspase-3 und -7 induzierte, zeigten sich nur geringe Effekte in den MCF-7-Zellen. Des Weiteren steigerte Zoledronsäure die Expression von TRAIL in den MDA-MB-231-Zellen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression seines Rezeptorantagonisten OPG. In den MCF-7-Zellen wurden beide Zytokine durch die Gegenwart von Zoledronsäure gehemmt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zwei potentielle Ergänzungen zur Therapie des Mammakarzinoms erforscht. Zum einen wurde der direkte pro-apoptotische Effekt von Zoledronsäure auf ER-negative Brustkrebszellen nachgewiesen und weiter geklärt. Zum anderen wurde die vielfältige Regulation des OPG/TRAIL/RANKL-Systems durch karzinomrelevante Substanzen untersucht. Die Bedeutung der endogenen OPG-Sekretion als Überlebensfaktor für TRAIL-sensitive Mammakarzinomzellen wurde dargestellt sowie die Möglichkeit diese Fähigkeit therapeutisch durch eine gezielte pharmakologische Hemmung der OPG-Sekretion zu nutzen.

Summary

Despite advances in the therapy of breast cancer, treatment options for women suffering from hormone receptor-negative breast cancer or bone metastases remain limited. The discovery of the RANKL/RANK/OPG system in 1997 has fundamentally influenced our knowledge about the complex regulation of bone metabolism. The cytokine RANKL, its receptor RANK and the decoy receptor OPG are essential regulators of osteoclast biology. OPG is also thought to play a role in tumor biology. It was shown that RANKL enhances the migration of breast and prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. TRAIL is a member of the TNF ligand family that selectively induces apoptosis in malignant cells. As a decoy receptor for both RANKL and TRAIL, OPG has the unique ability to regulate two fundamental aspects of tumor biology, apoptosis and migration.

Estrogen regulates various cytokines and growth factors in estrogen receptor (ER)-positive human breast cancer. In the **first part** of this study, the regulation of the RANKL/OPG system by estrogens and androgens in the ER-positive breast cancer cell line MCF-7 and the ER-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 were analyzed. In MCF-7 cells, which predominantly express ER-α, 17β-estradiol and testosterone dose-dependently decreased OPG mRNA levels and protein secretion by 70 and 65%, respectively. Furthermore, both cell lines expressed RANKL. While IL-1β induced RANKL expression in both cell lines, 17β-estradiol decreased RANKL expression only in MCF-7 cells. The inhibition of OPG production by 17β-estradiol and testosterone was specifically prevented by the pure anti-estrogen ICI 182,780, and the testosterone effect was prevented by an aromatase inhibitor. This indicates that androgens indirectly influence OPG expression in breast cancer cells after aromatization and binding of the ER.

In the **second part** of this study the expression and modulation of OPG and TRAIL by IL-1β and dexamethasone were analyzed in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. In both cells, OPG mRNA levels and protein secretion were dose- and time-dependently enhanced by IL-1β and suppressed by dexamethasone. In contrast to MCF-7 cells, MDA-MB-231 abundantly expressed TRAIL mRNA, which was enhanced by IL-1β and inhibited by dexamethasone. TRAIL activated pro-apoptotic caspase-3, -7, and poly-

ADP-ribose polymerase and decreased cell numbers of MDA-MB-231, but had no effect on MCF-7 cells. Gene silencing using siRNA directed against OPG resulted in a 31% higher apoptotic rate compared to non-target siRNA-treated MDA-MB-231 cells. Furthermore, TRAIL induced significantly less apoptosis in cells cultured in conditioned media (containing OPG) compared to cells exposed to TRAIL in fresh medium lacking OPG and these protective effects were reversed by blocking OPG with its specific ligand RANKL. The association between cancer cell survival and OPG production by MDA-MB-231 cells was further supported by the finding that modulation of OPG secretion using IL-1β or dexamethasone prior to TRAIL exposure resulted in decreased and increased rate of apoptosis, respectively.

Bisphosphonates are established drugs in the treatment of bone metastasis that inhibit osteoclast activity and interrupt the vicious cycle of osteoclast-tumor cell interactions. In the **third part** of this study the direct effects of zoledronic acid on MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells were evaluated. While zoledronic acid (100 µM) inhibited MDA-MB-231 cell proliferation after 72 h, and induced apoptosis via activation of caspase-3 and -7, it had only minor effects in MCF-7 cells. In addition, zoledronic acid induced the expression of TRAIL in MDA-MB-231 cells, but had no effect on the expression of its decoy receptor OPG. In MCF-7 cells, both cytokines were suppressed by zoledronic acid.

In summary, this study investigated two potential concepts to target breast cancer. First, the direct apoptotic effects of zoledronic acid and its underlying mechanisms on the ER negative MDA-MB-231 cells were demonstrated. Second, the regulation of the OPG/TRAIL/RANKL system by multiple disease relevant substances was analyzed. The role of endogenously secreted OPG as a survival factor for TRAIL sensitive breast cancer cells was demonstrated as well as the possibility to therapeutically target this ability by pharmacologically suppressing the OPG secretion.

7. Literaturverzeichnis

Albelda SM. 1994. Role of cell adhesion molecule in tumor progression and metastasis. In: Wegner CD. The handbook of adhesion molecule. Adhesion molecules. Academic press, New York 71-88

Almasan A, Ashkenazi A. 2003. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev 14:337-348

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridisation with DNA probes. Proc Natl Acad Sci 74:5350-5354

Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 390:175-179

Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, et al. 2008. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. Prostate 68:92-104

Bachmann MF, Wong BR, Josien R, et al. 1999. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. J Exp Med 189:1025-1031

Baker SJ, Reddy EP. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. Oncogene 17:3261-3270

Bashir A, Mak YT, Sankaralingham S, et al. 2005. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. Steroids 70:847-855

Bauer KR, Brown M, Cress RD, et al. 2007. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive

breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. Cancer 109:1721–1728

Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, et al. 2001. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. J Bone Miner Res 16:348-360

Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, et al. 2006. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 45:1033-1040

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. 2006. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. Cancer Res 66:4636-4644

Bhatia P, Sanders MM, Hansen MF. 2005. Expression of receptor activator of nuclear factor-κB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. Clin Cancer Res 11:162-165

Body JJ, Greipp P, Coleman RE, et al. 2003a. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. Cancer 97:887-892

Body JJ, Diel IJ, Lichinitser MR, et al. 2003b. Intravenous ibandronate reduces the incidence of skeletal complications in patients with breast cancer and bone metastases. Ann Oncol 14:1399-1405

Body JJ, Facon T, Coleman RE, et al. 2006. A study of the biological receptor activator of nuclear factor-κB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. Clin Cancer Res 12:1221-1228

Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, et al. 2000. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. Cancer Res 60:2949-2954

Bonner W. 1987. Autoradiograms: ^{35}S and ^{32}P. Methods Enzymol 152:55-61

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Brooks SC, Locke ER, Soule HD. 1973. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. J Biol Chem 248:6251-6253

Brown JM, Corey E, Lee ZD, et al. 2001. Osteoprotegerin and RANK ligand expression in prostate cancer. Urology 57:611-616

Browner WS, Lui LY, Cummings SR. 2001. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. J Clin Endocrinol Metab 86:631-637

Busch M, Rave-Fränk M, Hille A, et al. 1998. Influence of clodronate on breast cancer cells in vitro. Eur J Med Res 3:427-431

Cailleau R, Young R, Olivé M, et al. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. J Natl Cancer Inst 53:661-674

Callander NS, Roodman GD. 2001. Myeloma bone disease. Semin Hematol 38:276-285

Calvocoressi L, Sun A, Kasl SV, et al. 2008. Mamography screening of women in their 40s: Impact of changes in screening guidelines. Cancer 112:473-480

Calza S, Hall P, Auer G, et al. 2006. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. Breast Cancer Res 8: R34

Carr BR, Bradshaw KD. 2001. Disorders of the ovary and female reproductive tract. 2154-2168. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds.), HPIM, 15th edition, Mc Graw-Hill, New York

Chaisson ML, Branstetter DG, Derry JM, et al. 2004. Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of κB kinase α. J Biol Chem 279:54841-54848

Chamoux E, Houde N, L'eriger K, et al. 2008. Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway. J Cell Physiol 216:536-542

Chen T, Berenson J, Vescio R, et al. 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. J Clin Pharmacol 42:1228-1236

Cohen SB, Dore RK, Lane NE, et al. 2008. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. Arthritis Rheum 58:1299-1309

Coleman RE. 2001. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. Cancer Treat Rev 27:165-176

Coleman RE. 2007. Potential use of bisphosphonates in the prevention of metastases in early-stage breast cancer. Clin Breast Cancer Suppl 1:29-35

Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, et al. 2001. Receptor activator of NF-κB and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. J Biol Chem 276:20659-20672

Costa L. 2007. Bisphosphonates: Reducing the risk of skeletal complications from bone metastasis. Breast 16:16-20

Coxon FP, Benford HL, Russell RG, et al. 1998. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. Mol Pharmacol 54:631-638

Cross SS, Harrison RF, Balasubramanian SP, et al. 2006. Expression of receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) and tumour necrosis factor related, apoptosis inducing ligand (TRAIL) in breast cancer, and their relations with osteoprotegerin, oestrogen receptor, and clinicopathological variables. J Clin Pathol 59:716-720

Curtis CD, Likhite VS, McLeod IX, et al. 2007. Interaction of the tumor metastasis suppressor nonmetastatic protein 23 homologue H1 and estrogen receptor alpha alters estrogen-responsive gene expression. Cancer Res 67:10600-10607

Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. 2009. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med 361:756-765

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. Genes Dev 13:2412-2424

Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A, et al. 2003. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. J Clin Invest 111:1221-1230

Elliott R, Kostenuik PJ, Chen C, et al. 2006. Denosumab is a selective inhibitor of human receptor activator of NF-κB ligand that blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. Eur J Cancer Suppl 4:62

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem 273:14363-14367

Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. 2006. Concordance among gene expression-based predictors for breast cancer. N Engl J Med 355:560–569

Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. 2005. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. Oncogene 24:4660-4671

Fata JE, Kong YY, Li J, et al. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell 103:41-50

Fazzalari NL, Kuliwaba JS, Atkins GJ, et al. 2001. The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor κB ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis. J Bone Miner Res 16:1015-1027

Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132:6-13

Fiumara P, Snell V, Li Y, et al. 2001. Functional expression of receptor activator of nuclear factor κB in Hodgkin disease cell lines. Blood 98:2784-2790

Fizazi K, Yang J, Peleg S, et al. 2003. Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. Clin Cancer Res 9:2587-2597

Fizazi K, Lipton A, Mariette X, et al. 2009. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. J Clin Oncol 27:1564-1571

Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. N Engl J Med 361:123-134

Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ. 2000. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. J Bone Miner Res 15:2211-2221

Giuliani N, Bataille R, Mancini C, et al. 2001. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. Blood 98:3527-3533

Giuliani N, Colla S, Sala R, et al. 2002. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. Blood 100:4615-4621

Gliniak B, Le T. 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. Cancer Res 59:6153-6158

Graziano A, d'Aquino R, Tirino V, et al. 2008. The stem cell hypothesis in head and neck cancer. J Cell Biochem 103:408-412

Green EA, Flavell RA. 1999. TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. J Exp Med 189:1017-1020

Griffith TS, Lynch DH. 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. Curr Opin Immunol 10:559-563

Gruber JC, Tschugguel W, Schneeberger C, et al. 2002. Production and actions of estrogens. N Engl J Med 340:340-352

Haffty BG, Yang Q, Reiss M et al. 2006. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. J Clin Oncol 24:5652–5657

Harvey EJ, Li N, Ramji DP. 2007. Critical role for casein kinase 2 and phosphoinositide-3-kinase in the interferon-gamma-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other key genes implicated in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:806-812

Haynes DR, Crotti TN, Loric M, et al. 2001. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. Rheumatology 40:623-630

Healey JH, Brown HK. 2000. Complications of bone metastases: surgical management. Cancer 88:2940-2951

Heron M. 2007. Deaths: Leading causes for 2004. Natl Vital Stat Rep 56:1-95

Hilton MJ, Gutierrez L, Zhang L, et al. 2001. An integrated physical map of 8q22-q24: Use in positional cloning and deletion analysis of Langer-Giedion syndrome. Genomics 71:192-199

Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. 1998. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. Biochem Biophys Res Commun 250:776-781

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. 1999a. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology 140:4367-4370

Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, et al. 1999b. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. Bone 25:255-259

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. 1999c. S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocrinology 140:4382–4389

Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, et al. 2002. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. Eur J Endocrinol 147:269-273

Hofbauer LC, Schoppet M. 2004. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. JAMA 292:490-495

Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, et al. 2005. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? Breast Cancer Res Treat 92:207-215

Honorat M, Mesnier A, Di Pietro A, et al. 2008. Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 375:308-314

Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, et al. 1998. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. Endocrinology 139:4743-4746

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci (USA) 96:3540-3545

Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. 2006. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics 7:96

Hughes AE, Ralston SH, Marken J, et al. 2000. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. Nature Genet 24:45-48

Hughes DE, Wright KR, Uy HL, et al. 1995. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. J Bone Miner Res 10:1478-1487

Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25

Ichikawa K, Liu W, Zhao L, et al. 2001. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. Nat Med 7:954-960

Ichikawa K, Liu W, Fleck M, et al. 2003. TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. J Immunol 171:1061-1069

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, et al. 2001. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-κB ligand and their differential expression in bone and thymus. Endocrinology 142:1419-1426

Irie A, Takami M, Kubo H, et al. 2007. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. Bone 41:165-174

Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, et al. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem 273:9357-9360

John A, Tuszynski G. 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. Pathol Oncol Res 7 :14-23

Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. 2006. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature 440:692–696

Josien R, Wong BR, Li HL, et al. 1999. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. J Immunol 162:2562-2568

Kapoor P, Suva LJ, Welch DR, et al. 2008. Osteoprotegrin and the bone homing and colonization potential of breast cancer cells. J Cell Biochem 103:30-41

Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, 1999. Localization of RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. Bone 25:525-534

Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, et al. 1999. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. Cancer Res 59:734-741

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. 2008. Receptor activator of nuclear factor κB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. Endocr Rev 29:155-192

Kiechle MB. 2007. Gynäkologie und Geburtshilfe, 1.Auflage. Urban & Fischer

Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. 1999. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. Biochem Biophys Acta 1445:134-141

Kitazawa S, Kitazawa R. 2002. RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions. J Pathol 198:228-236

Kodaira K, Kodaira K, Mizuno A, et al. 1999. Cloning and characterization of the gene encoding mouse osteoclast differentiation factor. Gene 230:121-127

Koh JM, Park BL, Kim DJ, et al. 2007. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. Osteoporos Int 18:323-331

Kohno N, Aogi K, Minami H, et al. 2005. Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial. J Clin Oncol 23:3314-3321

Kondo T, Kitazawa R, Yamaguchi A, et al. 2008. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. J Cell Biochem 103:335-345

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 397:315-323

Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, et al. 2003. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. Cancer Res 63:7167-7175

Kostenuik PJ. 2005. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. Curr Opin Pharmacol 5:618-625

Kronenwett U, Ploner A, Zetterberg A, et al. 2006. Genomic instability and prognosis in breast carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15:1630-1635

Kwon BS, Wang S, Udagawa N, et al. 1998. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. FASEB J 12:845-854

Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. 1998. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93:165-176

Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. 2004. Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. Endocr Relat Cancer 11:497–522

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685

Lam J, Nelson CA, Ross FP, et al. 2001. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. J Clin Invest 108:971-979

LeBlanc HN, Ashkenazi A. 2003. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. Cell Death Differ 10:66-75

Lee MV, Fong EM, Singer FR, et al. 2001. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostrate cancer cells. Cancer Res 61:2602-2608

Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, et al. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16:4743-4751

Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, et al. 2007. Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. J Bone Miner Res 12:1832-1841

Li J, Sarosi I, Yan XQ, et al. 2000. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. Proc Natl Acad Sci 97:1566-1571

Li YY, Chang JW, Chou WC, et al. 2008. Zoledronic acid is unable to induce apoptosis, but slows tumor growth and prolongs survival for non-small-cell lung cancers. Lung Cancer 59:180-191

Li Y, Wang H, Wang Z, et al. 2006. Inducible resistance of tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2-mediated apoptosis by generation of a blockade at the death domain function. Cancer Res 66:8520-8528

Lipton A, Steger GG, Figueroa J, et al. 2007a. Randomized active- controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. J Clin Oncol 25:4431-4437

Lipton A, Cook RJ, Major P, et al. 2007b. Zoledronic acid and survival in breast cancer patients with bone metastases and elevated markers of osteoclast activity. Oncologist 12:1035-1043

Lipton A, Steger GG, Figueroa J, et al. 2008. Extended efficacy and safety of denosumab in breast cancer patients with bone metastases not receiving prior bisphosphonate therapy. Clin Cancer Res 14:6690-6696

Lowe LC, Senaratne SG, Colston KW. 2005. Induction of apoptosis in breast cancer cells by apomine is mediated by caspase and p38 mitogen activated protein kinase activation. Biochem Biophys Res Commun 329:772-779

Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, et al. 1998. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTPbinding proteins, including Ras. J Bone Miner Res 13:581-589

Lum L, Wong BR, Josien R, et al. 1999. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-a (TNF-a)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. J Biol Chem 274:13613-13618

Makhluf HA, Mueller SM, Mizuno S, et al. 2000. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in threedimensional collagen sponges. Biochem Biophys Res Commun 268:669-672

Martinetti A, Bajetta E, Ferrari L, et al. 2004. Osteoprotegerin and osteopontin serum values in postmenopausal advanced breast cancer patients treated with anastrozole. Endocr Relat Cancer 11:771-779

Martinez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F. 2006. Somatic stem cells and the origin of cancer. Clin Trans Oncol 8:647-663

Matsubara T, Myoui A, Ikeda F, et al. 2006. Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. J Bone Miner Metab 24:368-372

Matsuzaki H, Schmied BM, Ulrich A, et al. 2001. Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL-resistant human pancreatic cancer cells. Clin Cancer Res 7:407-414

McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, et al. 2006. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. N Engl J Med 354:821-831

Merewether LA, Le J, Jones MD, et al. 2000. Development of disulfide peptide mapping and determination of disulfide structure of recombinant human

osteoprotegerin chimera produced in Escherichia coli. Arch Biochem Biophys 375:101-110

Meinkoth J, Wahl G. 1984. Hybridization of nucleic acid immobilized on solid supports. Anal Biochem 138:267-284

Mikami S, Katsube KI, Oya M, et al. 2009. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. J Pathol 218:530-539

Min H, Morony S, Sarosi I, et al. 2000. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. J Exp Med 192:463-474

Min JK, Kim YM, Kim EC, et al. 2003. Vascular endothelial growth factor upregulates expression of receptor activator of NF-κB (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. J Biol Chem 278:39548–39557

Minino AM, Heron MP, Smith BL. 2006. Deaths: Preliminary data for 2004. Natl Vital Stat Rep 54:1-49

Mizuno A, Murakami A, Nakagawa N, et al. 1998. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin gene and its expression in embryogenesis. Gene 215:339-343

Morabito N, Gaudio A, Lasco A, et al. 2004. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of thalassemia-induced osteoporosis: new pieces of the puzzle. J Bone Miner Res 19:722-727

Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, et al. 1998. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. Eur J Biochem 254:685-691

Morony S, Capparelli C, Sarosi I, et al. 2001. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. Cancer Res 61:4432-4436

Morony S, Warmington K, Tan H, et al. 2002. OPG inhibits the progression of bone destruction and skeletal tumor burden in mice with established osteolytic MDA-231 breast cancer metastases. J Bone Min Res 17:S147

Moutsatsou P, Papavassiliou AG. 2008. The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. J Cell Mol Med 12:145-163

Muller A, Homey B, Soto H, et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 410:50–56

Mundy GR. 1997. Mechanisms of bone metastasis. Cancer 80:1546-1556

Myers DE, Collier FM, Minkin C, et al. 1999. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. FEBS Lett 463:295-300

Nagai M, Sato N. 1999. Reciprocal gene expression of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoclast differentiation factor regulates osteoclast formation. Biochem Biophys Res Commun 257:719-723

Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. 1998. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 253:395-400

Nakagawa N, Yasuda H, Yano K, et al. 1999. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells. Biochem Biophys Res Commun 265:158-163

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. 2000. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-κB ligand:

modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Commun 275:768-775

Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y, et al. 2007. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF-κB ligand derived from osteoblasts. J Immunol 178:192-200

Nakano K, Okada Y, Saito K, et al. 2004. Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 50:2450-2458

Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, et al. 2002. Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. J Natl Cancer Inst 94:17-25

Neville-Webbe HL, Cross NA, Eaton CL, et al. 2004. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Breast Cancer Res Treat 86:269-279

Nguyen DM, Sam K, Tsimelzon A, et al. 2006 Molecular heterogeneity of inflammatory breast cancer: a hyperproliferative phenotype. Clin Cancer Res 12:5047-5054

Nicolin V, Narducci P. 2008. Soluble TRAIL could enhance bone destruction acting on RANK-ligand in estrogen-independent human breast cancer cell line MDA-MB-231. Acta Histochem (im Druck)

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. 2004. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res 10:5367–5374

Nyambo R, Cross N, Lippitt J, et al. 2004. Human bone marrow stromal cells protect prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. J Bone Miner Res 19:1712-1721

Okada T, Akikusa S, Okuno H, et al. 2003. Bone marrow metastatic myeloma cells promote osteoclastogenesis through RANKL on endothelial cells. Clin Exp Metastasis 20:639-646

Olesen P, Ledet T, Rasmussen LM. 2005. Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-α. Diabetologia 48:561-568

Oura S, Hirai I, Yoshimasu T, et al. 2003. Clinical efficacy of bisphosphonate therapy for bone metastasis from breast cancer. Breast Cancer 10:28-32

Padigel UM, Kim N, Choi Y. 2003. TRANCE-RANK costimulation is required for IL-12 production and the initiation of a Th1-type response to Leishmania major infection in CD40L-deficient mice. J Immunol 171:5437-5441

Paget S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Lancet 1:571–573

Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, et al. 2006. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. J Biol Chem 281:2414-2429

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 276:111-113

Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, et al. 2001. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. Proc Natl Acad Sci 98:11581-11586

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 406:747–752

Pettersen I, Bakkelund W, Smedsrod B, et al. 2005. Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. Anticancer Res 25:3809-3816

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem 271:12687-12690

Rachner TD, Schoppet M, Niebergall U, et al. 2008. 17β-Estradiol inhibits osteoprotegerin production by the estrogen receptor-alpha-positive human breast cancer cell line MCF-7. Biochem Biophys Res Commun 368:736-741

Rahman M, Davis SR, Pumphrey JG, et al. 2008. TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype. Breast Cancer Res Treat 113:217-230

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. 2007. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. Cancer 109:25-32

Rani CS, MacDougall M. 2000. Dental cells express factors that regulate bone resorption. Mol Cell Biol Res Commun 3:145-152

Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, et al. 2002. Differential gene expression of TGF-β family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. Breast Cancer Res Treat 74:255-269

Riggs BL, Hartmann LC. 2003. Selective estrogen-receptor modulators - mechanisms of action and application to clinical practice. N Engl J Med 348:618-629

Rubens RD. 1998. Bone metastases - the clinical problem. Eur J Cancer 34:210–213

Roodman GD. 2004a. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med 350:1655-1664

Roodman GD, Choi SJ. 2004b. MIP-1 alpha and myeloma bone disease. Cancer Treat Res 118:83-100

Roodman GD, Dougall WC. 2008. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. Cancer Treatment Reviews 34:92-101

Roux S, Mariette X. 2004. The high rate of bone resorption in multiple myeloma is due to RANK (receptor activator of nuclear factor-κB) and RANK Ligand expression. Leuk Lymphoma 45:1111-1118

Roylance R, Gorman P, Harris W, et al. 1999. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. Cancer Res 59:1433-1436

Sandberg WJ, Yndestad A, Oie E, et al. 2006. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:857-863

Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, et al. 2003. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. Clin Cancer Res 9:2893-2897

Sasaki N, Kusano E, Ando Y, et al. 2002. Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis. Bone 30:853-858

Sato M, Grasser W, Endo N, et al. 1991. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. J Clin Invest 88:2095-2105

Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. 2005. Functional dissection of Osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kB ligand. J Biol Chem 280:41155-41164

Schoppet M, Henser S, Ruppert V, et al. 2007. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-κB-dependent. J Cell Biochem 100:1430-1439

Schrader J, Rennekamp W, Niebergall U, et al. 2007. Cytokine-induced osteoprotegerin expression protects pancreatic beta cells through p38 mitogen-activated protein kinase signalling against cell death. Diabetologia 50:1243-1247

Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, et al. 1997. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: A novel anti-tumour activity. Br J Haematol 98:665-672

Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, et al. 2000. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43:2523-2530

Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, et al. 2000. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. Br J Cancer 82:1459-1468

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89:309-319

Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, et al. 2005. Molecular evolution of breast cancer. J Pathol 205:248-254

Smith MR, Egerdie B, Hernández Toriz N, et al. 2009. Denosumab HALT Prostate Cancer Study Group. Denosumab in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. N Engl J Med 361:745-755

Sohn BH, Moon HB, Kim TY, et al. 2001. Interleukin-10 up-regulates tumour-necrosis-factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene expression in mammary epithelial cells at the involution stage. Biochem J 360:31-38

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10869–10874

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci USA 100:8418–8423

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci USA 100:10393–10398

Soule HD, Vazguez J, Long A, et al. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 51:1409-1416

Southby J, Kissin MW, Danks JA, et al. 1990. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer. Cancer Res 50:7710-7716

Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, et al. 2002. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. Blood 100:3002-3007

Stolina M, Dwyer D, Ominsky MS, et al. 2007. Continuous RANKL inhibition in osteoprotegerin transgenic mice and rats suppresses bone resorption without impairing lymphorganogenesis or functional immune responses. J Immunol 179:7497-7505

Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE, et al. 2001. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. J Clin Endocrinol Metab 86:3162-3165

Tan KB, Harrop J, Reddy M, et al. 1997. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. Gene 204:35-46

Tassone P, Tagliaferri P, Viscomi C, et al. 2003. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. Br J Cancer 88:1971-1978

Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, et al. 2003. Soluble receptor activator of nuclear factor κB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. Blood 102:1064-1069

Teitelbaum SL. 2005. Osteoporosis and integrins. J Clin Endocrinol Metab 90:2466-2468

Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, et al. 2004. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev 15:457-475

Thomas PS. 1980. Hybridisation of denatured RNA and small DNA-fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci (USA) 77:5201-5205

Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al. 1999. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. Endocrinology 140:4451-4458

Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, et al. 2000. The osteoblast-specific transcription factor cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. J Biol Chem 275:25163-25172

Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, et al. 2001. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-β (TGF-

β): Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-β effects. J Biol Chem 276:36241-36250

Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al. 1999. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. Endocrinology 140:4451-4458

Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, et al. 2007. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. BMC Cancer 7:134

Tintut Y, Demer L. 2006. Role of osteoprotegerin and its ligands and competing receptors in atherosclerotic calcification. J Investig Med 54:395-401

Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, et al. 1997. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 234:137–142

Tunyogi-Csapo M, Kis-Toth K, Radacs M, et al. 2008. Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption. Arthritis Rheum 58:2397-2408

Van Beek E, Pieterman E, Cohen L, et al. 1999. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentyl 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 der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, et al. 1996. Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. J Clin Invest 98:698-705

Van Garderen E, Schalken JA. 2002. Morphogenic and tumorigenic potentials oft he mammary growth hormone/growth hormone receptor system. Mol Cell Endocrinol 197:153-165

Van Poznak C, Cross SS, Saggese M, et al. 2006. Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) in human breast tumours. J Clin Pathol 59:56-63

Vandyke K, Jackson P, Rowe A, et al. 2007. Androgen decreases osteoprotegerin expression in prostate cancer cells. Prostate Cancer Prostatic Dis 10:160-166

Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. 2007. CLINICAL Review: the role of receptor activator of nuclear factor-κB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. J Clin Endocrinol Metab 92:4514-4521

Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al. 2005. Breast cancer. Lancet 365:1727-1741

Verdidk R, Franke HR, Wolbers F, et al. 2007. Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. Cancer Lett 246:308-312

Viereck V, Gründker C, Blaschke S, et al. 2003. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6 production by human trabecular osteoblasts. J Clin Endocrinol Metab 88:4206-4213

Viereck V, Gründker C, Friess SC, et al. 2005. Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. J Bone Miner Res 20:2036-2043

Vitovski S, Phillips JS, Sayers J, et al. 2007. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-κB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. J Biol Chem 282:31601-31609

von Tirpitz C, Epp S, Klaus J, et al. 2003. Effect of systemic glucocorticoid therapy on bone metabolism and the osteoprotegerin system in patients with active Crohn's disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 15:1165-1170

Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, et al. 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. Nat Med 13:1070-1077

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. EMBO J 16:5386-5397

Wang Q, Ji Y, Wang X, et al. 2000. Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. Biochem Biophys Res Commun 276:466-471

Wei S, Kitaura H, Zhou P, et al. 2005. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. J Clin Invest 115:282-290

Whyte MP. 2006. The long and the short of bone therapy. N Engl J Med 354:860-863

Wicha MS, Liu S, Dontu G. 2006. Cancer stem cells: An old idea: A paradigm shift. Cancer Res 66:1883-1890, 1895-1896

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 3:673-682

Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Senekowitsch-Schmidtke R, et al. 2008. Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. Breast Cancer Res Treat 109:263-272

Wang MW, Wei S, Faccio R, et al. 2004. The HIV protease inhibitor ritonavir blocks osteoclastogenesis and function by impairing RANKL-induced signaling. J Clin Invest 114:206-213

Wang Q, Ji Y, Wang X, et al. 2000. Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. Biochem Biophys Res Commun 276:466-471

Wong BR, Josien R, Lee SY, et al. 1997. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J Exp Med 186:2075-2080

Wong BR, Lee SY, Vologodskia M, et al. 1998. The TRAF family of signal transducers mediates NF- B activation by the TRANCE receptor. J Biol Chem 273:28335-28359

Xu J, Tan JW, Huang L, et al. 2000. Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of NF-κB ligand. J Bone Miner Res 15:2178-2186

Yager JD, Davidson NE. 2002. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. N Engl J Med 340:270-282

Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. 1998. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. J Biol Chem 273:5117-5123

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci (USA) 95:3597-3602

Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, et al. 1998. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. J Immunol 161:6113-6121

Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, et al. 2000. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. FEBS Lett 482:193-199

Zhang J, Dai J, Qi Y, et al. 2001. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. J Clin Invest 107:1235-1244

Zhang J, Fu M, Myles D, et al. 2002. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. FEBS Lett 521:180-184

Zheng Y, Zhou H, Brennan K, et al. 2007. Inhibition of bone resorption, rather than direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis. Bone 40:471-478

Zhao H, Langerød A, Ji Y, et al. 2004. Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. Mol Biol Cell 15:2523-2536

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

Tilman Daniel Rachner

Geburtsdatum	18.07.1984
Geburtsort	Bremerhaven
Adresse	Markt 22
	35037 Marburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulische Ausbildung

1990-1992	Goethe-Schule Bremerhaven (Grundschule)
1992-1994	Johannes-Schule Bremerhaven (Grundschule)
1994-1996	Edith-Stein-Schule Bremerhaven (Orientierungsstufe)
1996-1998	Llantwit Major Comprehensive School, Llantwit Major (Wales)
1998-1999	St. John's Public School, Newton, Porthcawl (Wales)
1999-2002	Deutsche Schule Prag (Tschechische Republik)
2002	Allgemeine Hochschulreife

2002-2003	Zivildienst, St.Josephshospital, Bremerhaven

Universitäre Ausbildung

2003-2009	Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
2005	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2009	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

2006	Famulatur, Innere Medizin, Krankenhaus Reinkenheide, Bremerhaven
2006	Famulatur, Innere Medizin, Addington Hospital, Durban, Südafrika
2007	Famulatur, Endokrinologische Ambulanz, Universitätklinik Marburg
2008	Famulatur, Gynäkologie, Karatu General Hospital, Karatu, Tansania
2008	Praktisches Jahr, Unfallchirurgie, Universitätsklinik Marburg
	Praktisches Jahr, Allgemeinchirurgie, S. Curtis Memorial Hospital, St.Anthony, Neufundland, Kanada
2009	Praktisches Jahr, Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsspital Zürich, Schweiz
2009	Praktisches Jahr, Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Frankenberg

8.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen/ Herren Dr. Adamkiewicz, Prof. Dr. med. Arnold, Prof. Dr. Barth, Dr. Barth, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Baum, PD. Dr. Becker, Prof. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Eilers, Prof. Dr. Feuser, Prof. Dr. Fuchs, PD Dr. Gerdes, Prof. Dr. Geus, Prof. Dr. med. Gotzen, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Gress, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Hofbauer, PD Dr. Höffken, Prof. Dr. Hofmann, Prof. Dr. Jungclas, Prof. Dr. Kann, Prof. Dr. Klose, Prof. Dr. med. Klenk, Prof. Dr. Köhler, Prof. Dr. Koolmann, Prof. Dr. Krause, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Lang, Prof. Dr. Lill, Prof. Dr. med. Maisch, Dr. Dr. Mandrek, Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Dr. med. Mueller, Dr. Müller, Prof. Dr. Mutters, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. med. Renz, Prof. Dr. med. Ruchholz, Prof. Dr. Schmidt, PD. Dr. Schoppet, Prof. Dr. Steiniger, PD Dr. med. Stiletto, Prof. Dr. Studer, Prof. Dr. Vogelmeier, Dr. med. v. Garrel, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Werner, PD Dr. Wilhelm, Prof. Dr. Wulf, PD Dr. Zettl

8.3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lorenz C. Hofbauer und Herrn PD Dr. Michael Schoppet für ihre intensive Betreuung und Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Mathias Gress, Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie des Universitätsklinikums Marburg und Gießen, Standort Marburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Einrichtungen seiner Klinik durchzuführen.

Der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Ute Niebergall danke ich für ihre hervorragende Einarbeitung und ihre fürsorgliche Betreuung.

Herrn PD Dr. Malte Buchholz danke ich für die Förderung, seine konstruktive Kritik und dafür, dass er sich stets die Zeit genommen hat, meine Fragen zu beantworten.

Bei Herrn Dipl.-Biol. Shiv K. Singh und Frau Dipl.-Biol. Peggy Benad bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den Publikationen.

Frau Katrin Schlengemann und Frau Manuela Malsy danke ich für ihre Gesellschaft an den Wochenenden im Labor und ihre konstruktive Kritik.

Ich danke den Mitarbeitern der AG Michl und der AG Ellenrieder für ihre Hilfe.

8.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel **„Modulation und funktionelle Relevanz des RANKL/TRAIL/Osteoprotegerin-Systems bei Mammakarzinom-Zellen“** in der Klinik für Innere Medizin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Mathias Gress mit Unterstützung durch Prof. Dr. Lorenz C. Hofbauer und PD Dr. Michael Schoppet ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe. Bei der Abfassung der Arbeit habe ich keine anderen als die in der Dissertation angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt und vollständig oder sinngemäß übernommene Zitate entsprechend gekennzeichnet. Ich habe bisher weder an einem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch eine andere Arbeit als Dissertation oder die vorliegende zu anderen Prüfungszwecken vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Rachner TD, Singh SK, Schoppet M, Benad P, Bornhäuser M, Ellenrieder V, Ebert R, Jakob F, Hofbauer LC. 2009. Zoledronic acid induces apoptosis and changes the TRAIL/OPG Ratio in breast cancer cells. Cancer Letters (im Druck)

Rachner TD, Benad P, Rauner M, Goettsch C, Singh SK, Schoppet M, Hofbauer LC. 2009. Osteoprotegerin production by breast cancer cells is suppressed by dexamethasone and confers resistance against TRAIL-induced apoptosis. J Cell Biochem 108:106-116

Rachner TD, Schoppet M, Niebergall U, Hofbauer LC. 2008. 17beta-Estradiol inhibits osteoprotegerin production by the estrogen receptor-alpha-positive human breast cancer cell line MCF-7. Biochem Biophys Res Commun 368:736-741

Hofbauer LC, **Rachner T**, Singh SK. 2008. Fatal attraction: why breast cancer cells home to bone. Breast Cancer Res 10:101

Marburg, den 27.09.2009