

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



**Charakterisierung von Osteoprotegerin (OPG) und
Receptor Activator of NF- κ B-Ligand (RANKL) in der
Schilddrüse**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sibylle Kluger aus Marburg

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am 08.12.2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: PD Dr. L. C. Hofbauer

Koreferent: Prof. Dr. P. Barth

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Anatomie und Physiologie der Schilddrüse	3
1.2 Die chronisch-lymphozytäre Thyreoiditis vom Typ Hashimoto	4
1.3 Die Immunthyreopathie vom Typ Morbus Basedow	5
1.4 Mitglieder der TNF-Liganden und-Rezeptorenfamilie und ihre Funktionen	6
1.5 Regulation der Apoptose durch TNF-Mitglieder	6
1.6 RANKL, RANK-Rezeptor und OPG	7
1.7 Osteoprotegerin (OPG)	8
1.8 Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)	8
1.9 Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)	9
1.10 Dendritische Zellen und ihre Rolle im Immunsystem	9
2. Fragestellung	11
3. Material und Methoden	12
3.1 Materialien	12
3.1.1 Präparate	12
3.1.2 Arbeitsmaterialien	12
3.1.3 Puffer und Standardlösungen	14
3.2 Zellkultur	14
3.3 RNA- und Poly-A-mRNA-Isolierung aus Zellen	15
3.4 RNA-Isolierung aus Schilddrüsengewebe	16
3.5 Gelelektrophorese und Northern-Blot	17
3.6 Radioaktive Markierung der cDNA (Random Priming)	18
3.7 Hybridisierung	19
3.8 Dehybridisierung	20
3.9 OPG-ELISA	21
3.10 Isolierung und Kultivierung von dendritischen Zellen	21
3.11 Berechnung der Proteinwerte und Statistische Auswertung	22

4. Ergebnisse	23
4.1 Expression von OPG-und RANKL-mRNA in verschiedenen endokrinen und nicht endokrinen Geweben	23
4.2 Analyse der OPG-mRNA-Expression und OPG-Proteinsekretion in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen (XTC)	26
4.3 Modulation der RANKL-Genexpression in XTC-Zellen	32
4.4 OPG-Proteinsekretion in primären Schilddrüsenzellen	33
4.5 OPG-mRNA-Expression in humanen Schilddrüsenresektaten	34
4.6 Biologische Wirkung von OPG auf dendritische Zellen	35
5. Diskussion	38
5.1 Intra-und extraskeletale Expression von RANKL und OPG	38
5.2 Wirkung von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen auf das OPG-RANKL-System	40
5.3 Wirkung von TSH auf die Expression von RANKL und OPG	43
5.4 Regulation von RANKL und OPG durch andere Faktoren	44
5.5 OPG-mRNA-Expression in Schilddrüsen-Präparaten von Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen	45
5.6 Dendritische Zellen als Zielzellen für das RANKL-OPG-System	47
6. Zusammenfassung	50
7. Literaturverzeichnis	52
8. Abkürzungsverzeichnis	66
9. Anhang	67
9.1 Danksagung	67
9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer	68

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse beeinflusst die Stoffwechselaktivität zahlreicher Organe und Gewebe. Sie ist als schmetterlingsförmiges Organ, bestehend aus zwei Lappen und einem Isthmus, am Schildknorpel des Kehlkopfes angeheftet. Das Schilddrüsengewebe besteht aus Follikeln, funktionelle Einheiten aus Thyreozyten, die von einschichtigem kubischen Follikelepithel ausgekleidet sind. Im Lumen der Schilddrüsenfollikel befindet sich das Kolloid, welches im Wesentlichen aus Thyreoglobulin besteht. Zwischen den Basalmembranen der Follikel liegen die calcitoninbildenden C-Zellen. Zentrale Aufgabe der Schilddrüse ist die Synthese und Sekretion der Hormone L-3,5,3'-Trijodthyronin (T_3) und L-3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin/ T_4). Beide werden aus der Aminosäure Thyrosin durch Anlagerung von elementarem Jod gebildet. Durch die Schilddrüsenhormone kommt es zu einer Steigerung der Glukoneogenese, der Glykogensynthese und der Glykogenolyse. Besonders für die normale Skelettreifung sind T_3 und T_4 unerlässlich. So kann eine Hypothyreose im Kindesalter zum Minderwuchs, eine Hyperthyreose hingegen zum Gigantismus führen. Die besondere Bedeutung für die Entwicklung des ZNS zeigt sich im Bild des Kretinismus, bei dem es durch Schilddrüsenhormonmangel in der Fetalzeit zu Minderwuchs und geistiger Retardierung kommt. Die Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone unterliegen dem hypothalamisch-hypophysären Regelkreis, im Besonderen dem stimulierenden Einfluss des im Hypophysenvorderlappen produzierten Thyroidea-stimulierendem Hormon oder Thyrotropin (TSH), welches wiederum als Antwort auf die Sekretion des Thyrotropin-releasing hormone (TRH) durch den Hypothalamus beeinflusst wird. Dadurch, dass die freien Schilddrüsenhormone fT_3 und fT_4 im Serum einen hemmenden Einfluss auf die Sekretion von TSH haben, wird dieses System zu einem Regelkreis mit positivem und negativem Feedback-Mechanismus. In der Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen wie des Morbus Basedow und der Hashimoto-Thyreoiditis spielen pro- und anti-apoptotische Prozesse, eine gesteigerte Aktivität intrathyroidaler dendritischer Zellen und proinflammatorische Zytokine, in erster Linie die Mitglieder der TNF-Liganden und-Rezeptorenfamilie eine wichtige Rolle (Palazzo et al., 2000; Yamazaki et al., 2000; Bretz et al., 1999).

1.2 Die chronisch-lymphozytäre Thyreoiditis vom Typ Hashimoto

Die lymphozytäre Thyreoiditis oder Hashimoto-Thyreoiditis gehört zusammen mit der Immunthyreopathie vom Typ Morbus Basedow zum Formenkreis der Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse. Das histologische Bild der Hashimoto-Thyreoiditis zeichnet sich durch eine ausgeprägte lymphozytäre und plasmazelluläre Infiltration aus. Nach einer diffusen meist schmerzlosen Vergrößerung in der Anfangsphase kommt es im Verlauf der Thyreoiditis zu einer fortschreitenden Zerstörung des Schilddrüsengewebes mit Funktionseinbußen bis hin zur manifesten Hypothyreose. Charakteristisch sind die hohen Titer schilddrüsenpezifischer Autoantikörper gegen die thyreoidale Peroxidase (TPO-AK) sowie gegen Thyreoglobulin (Tg-AK), welche im Verlauf der Erkrankung abfallen können. In seltenen Fällen sind auch Antikörper gegen TSH-Rezeptoren (TSH-R-AK) beschrieben worden. Die Hashimoto-Thyreoiditis ist die häufigste Form der Thyreoiditis und kann mit anderen endokrinen und nicht endokrinen Autoimmunerkrankungen wie einem Typ 1 Diabetes mellitus, einem Hypogonadismus, einer Sprue, einer perniziösen Anämie, einer Nebenniereninsuffizienz, einer Vitiligo oder einer Myasthenia gravis assoziiert sein.

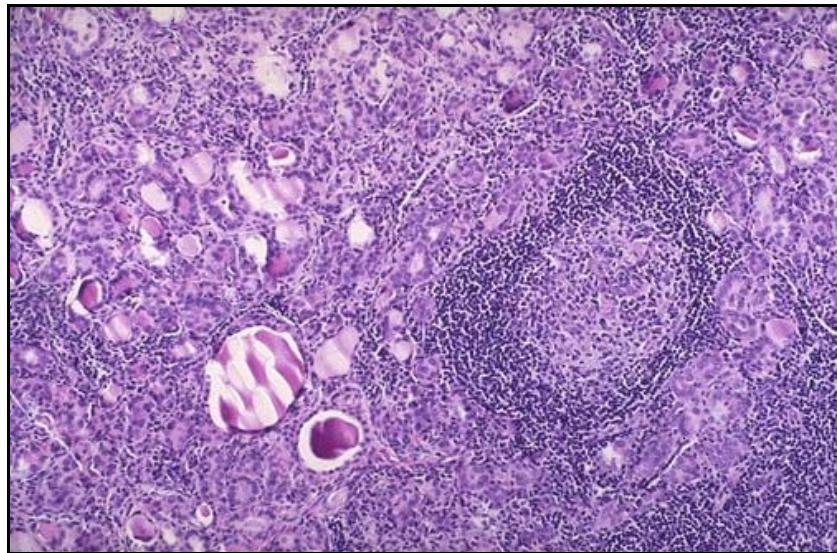


Abb. 1: Mikroskopisches Bild einer Schilddrüse mit Hashimoto-Thyreoiditis. Die lymphozytäre Infiltration mit Bildung eines Lymphfollikels ist deutlich im rechten Zentrum zu erkennen.

1.3 Die Immunthyreopathie vom Typ Morbus Basedow

Die Immunhyperthyreose vom Typ Morbus Basedow (im angelsächsischen Graves Disease genannt) kann sich sowohl thyreoidal als auch extrathyreoidal manifestieren. Extrathyreoidale Manifestationen sind die endokrine Orbitopathie, das prätibiale Myxödem oder eine Akropathie. Thyreoidale Manifestationen sind die Struma diffusa und die Hyperthyreose. Wie auch bei der Hashimoto-Thyreoiditis findet sich im histologischen Bild des Morbus Basedow eine ausgeprägte lymphozytäre Infiltration. Grundlage der Immunhyperthyreose sind Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor (TSH-R-AK). Diese Autoantikörper binden an den TSH-Rezeptor der Schilddrüsenzellen und aktivieren diesen (Rapoport et al., 1999). Neben den TSH-R-AK finden sich beim Morbus Basedow auch Antikörper gegen die Schilddrüsenperoxidase (TPO-AK) und in seltenen Fällen gegen das Thyreoglobulin (Tg-AK). Das klinische Bild des Morbus Basedow ist klassischerweise durch eine Hyperthyreose sowie die sog. Merseburger Trias mit ihren Symptomen Tachykardie, Exophthalmus und Struma charakterisiert.



Abb. 2: Klinisches Bild eines Patienten mit Morbus Basedow:
Symmetrische Struma diffusa und Exophthalmus.

1.4 Mitglieder der TNF-Liganden und-Rezeptorenfamilie und ihre Funktionen

Die Mitglieder der TNF-Liganden (TNF) und-Rezeptoren (TNFR) Superfamilie regulieren das Überleben und die Apoptose in verschiedenen endokrinen und nicht-endokrinen Zellen (Smith et al., 1994). Zu den TNF-Liganden zählen RANKL, FasL, TRAIL, CD40L und CD30L (Wong et al., 1997). Als Typ 2-Membranproteine wirken sie entweder als gebundene Membranproteine oder als lösliche Proteine. RANKL spielt als Mitglied dieser Familie eine entscheidende Rolle in der Regulation des Immunsystems und der Knochenentwicklung. Indem es von aktivierten T-Zellen präsentiert wird und dendritische Zellen aktiviert, scheint RANKL die Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen während der Immunantwort zu beeinflussen. Dies geschieht über den RANK-Rezeptor. Dabei kann diese Aktivierung durch den löslichen Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) verhindert werden (Wong et al., 1999). Die Rezeptoren von RANKL, FasL, CD40L oder CD30L sind ebenso Mitglieder der TNF-Familie und umfassen Fas, CD40, OPG, RANK (Anderson et al., 1997) und TRAIL-R1-4.

1.5 Regulation der Apoptose durch TNF-Mitglieder

Die Apoptose ist als physiologischer Prozess entscheidend für das Gleichgewicht des Immunsystems, durch Terminierung der Immunantwort und Eliminierung von autoreaktiven T- und B-Lymphozyten, sowie der Gewebehomöostase durch die Eliminierung mutationsgeschädigter Zellen (Krammer et al., 2000; Yamazaki et al., 2000).

Als Auslöser der Apoptose in der Schilddrüse und somit relevant für Schilddrüsenerkrankungen sind TNF- α mit seinen Rezeptoren TNFR I und TNFR II, Fas Ligand (FasL) mit seinem Rezeptor Fas, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) und seine Rezeptoren TRAIL-R1 und-R2 zu nennen (Baker et al., 1999; Yamazaki et al., 2000). TRAIL-R3 und TRAIL-R4 sind lösliche Rezeptoren, die keine Apoptose auslösen, vielmehr wird von TRAIL-R4 angenommen, dass er durch eine Aktivierung von NF- κ B zum Schutz der Zellen vor Apoptose beiträgt (Yamazaki et al., 2000). Fas und FasL werden in der Schilddrüse im Rahmen einer Hashimoto-Thyreoiditis exprimiert und führen durch Apoptose zum klinischen Bild der Hypothyreose (Giordano et al., 1997; Yamazaki et al., 2000). Die Suppression der Apoptose bzw. Antiapoptose könnte bei Patienten mit Morbus Basedow zum

klinischen Bild der Hyperthyreose führen. Obwohl die genaue Regulation von Fas und FasL, sowie TRAIL und TRAIL-R1/TRAIL-R2 Expression noch nicht geklärt ist, werden die von intrathyreoidalen Lymphozyten gebildeten inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IFN- γ mit zu den Regulatoren der Fas und FasL, TRAIL und TRAIL-R1/TRAIL-R2 Expression in der Schilddrüse gezählt (Yamazaki et al., 2000; Kawakami et al., 1996; Kawakami et al., 1997; Hammond et al., 1997).

1.6 RANKL, RANK-Rezeptor und OPG

Die Entdeckung und Charakterisierung von Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), seines Rezeptors Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) und seines Rezeptorantagonisten Osteoprotegerin (OPG) haben zu einem neuen molekularen Konzept der Zellbiologie von Osteoklasten und des Knochenstoffwechsels geführt. RANKL und OPG stellen als Agonist und Antagonist eines neuen Zytokinsystems essentielle Faktoren bei der Regulation der Differenzierung, Fusion, Aktivierung und Apoptose von Osteoklasten dar. RANKL steigert die Anzahl und Aktivität funktionsfähiger Osteoklasten durch Aktivierung des osteoklastären Rezeptors RANK und steigert damit die Knochenresorption, während OPG durch Neutralisierung von RANKL die Knochenresorption hemmt. Darüber hinaus wird RANKL von aktivierten T-Zellen und RANK von T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998; Kong et al., 1999; Josien et al., 2000).

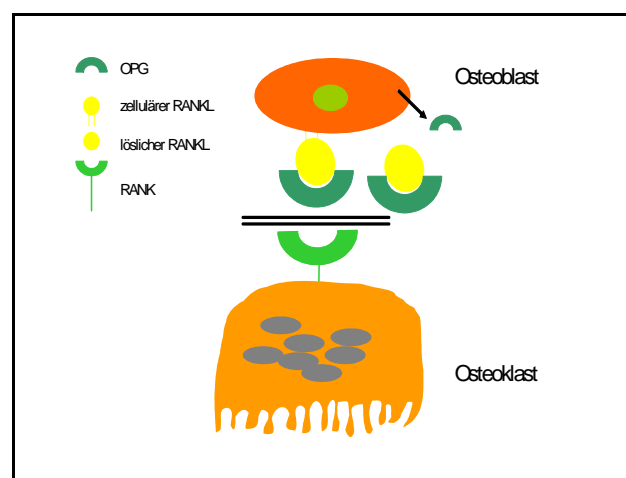


Abb. 3: OPG-Wirkmechanismus

OPG konkurriert mit dem löslichen und an Osteoblasten gebundenen RANK-Liganden um die Bindung an den von Osteoklasten exprimierten RANK-Rezeptor.

1.7 Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin (OPG; Simonet et al., 1997) und Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF; Tsuda et al., 1997; Yasuda et al., 1998) wurden 1997 von zwei unabhängigen Gruppen als erste sezernierte Mitglieder der TNF-Rezeptor (TNFR)-Familie identifiziert und nach ihren biologischen Wirkungen benannt. Auf Beschluß der American Society for Bone and Mineral Research soll künftig die Bezeichnung OPG verwendet werden (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000). OPG besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu anderen TNFR wie TNFR-2 und CD40 (Simonet et al., 1997). OPG fungiert als sezernierter Rezeptor, der sämtliche RANKL-Formen kompetitiv bindet und auf diese Weise die biologischen Wirkungen von RANKL neutralisiert (Kostenuik et al., 2005; Lacey et al., 1998; Rogers et al., 2005; Yasuda et al., 1998). OPG neutralisiert ebenfalls die biologische Wirkung des TNF-Liganden TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; Emery et al., 1998). OPG-mRNA-Expression und-Proteinsekretion wurden in zahlreichen normalen und malignen Zelltypen nachgewiesen. Zu den Geweben starker OPG-Produktion zählen der Zahnhalteapparat (Rani et al., 2000; Shiba et al., 2000) und die Wand großer Arterien (Simonet et al., 1997).

1.8 Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)

Osteoprotegerin ligand (OPGL; Lacey et al., 1998) und Osteoclast differentiation factor (ODF; Yasuda et al., 1998) wurden als spezifische Liganden von OPG im Jahr 1998 identifiziert. Eine Sequenzanalyse ergab, dass dieses Zytokin bereits 1997 von zwei anderen Arbeitsgruppen als wichtiges immunologisches Zytokin unter den Bezeichnungen Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL; Anderson et al., 1997) bzw. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE; Wong et al., 1997) beschrieben worden war. Die American Society for Bone and Mineral Research legte sich auf den Begriff RANKL fest (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Verschiedene skeletale Zellen exprimieren RANKL wie mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Periostzellen und Chondrozyten (Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997; Yasuda et al., 1998). Zu den

nicht-skeletalen Zellen mit nachgewiesener RANKL-Expression zählen Endothelzellen (Collin-Osdoby et al., 2001), T-Lymphozyten (Josien et al., 1999; Kong et al., 1999), mesenchymale und epitheliale Zellen des Zahnhalteapparats (Rani et al., 2000) und verschiedene Tumorzellen (Nagai et al., 2000; Zhang et al., 2001). Die Gewebeexpression von RANKL ist daher vor allem im Knochen und Knochenmark, in lymphatischen Organen und osteotropen Malignomen am höchsten (Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998; Xu et al., 2000; Zhang et al., 2001). RANKL unterstützt das Wachstum und das Überleben von Osteoklasten (Lacey et al., 1998; Kong et al., 1999) und von dendritischen Zellen (Anderson et al., 1997; Josien et al., 2000), indem es deren Apoptose verhindert.

1.9 Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)

Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) wurde als Rezeptor zusammen mit seinem spezifischen Liganden (RANKL) erstmals 1997 beschrieben und nach einem seiner intrazellulären Zielgene, Nuclear factor- κ B (NF- κ B) benannt (Anderson et al., 1997). Im Knochenstoffwechsel wurde RANK erstmals 1998 beschrieben (Nakagawa et al., 1998), von Hsu et al. wurde ebenfalls den Begriff Osteoclast differentiation and activation receptor (ODAR) eingeführt (Hsu et al., 1999). Eine Konsensuskommission empfahl den Begriff RANK (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Funktionell aktives RANK-Protein ist vor allem auf Osteoklasten, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten und Fibroblasten lokalisiert. Zu den Geweben stärkster RANK-Expression zählen das Knochengewebe und das lymphatische Gewebe (Anderson et al., 1997; Green et al., 1999; Hsu et al., 1999; Myers et al., 1999).

1.10 Dendritische Zellen und ihre Rolle im Immunsystem

Dendritische Zellen umfassen eine heterogene Population antigenpräsentierender Zellen, die die Immunantwort initiieren und regulieren. Sie entstehen im Knochenmark, treffen auf Antigene in der Peripherie, prozessieren sie und präsentieren sie T-Zellen, den Effektorzellen

der Immunantwort in den sekundären lymphatischen Organen (Hart et al., 1997; Banchereau et al., 1998; Fanger et al., 1999; Kong et al., 2000). In ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen, sind dendritische Zellen nicht nur an der primären Immunantwort maßgeblich beteiligt. Sie spielen auch eine bedeutende Rolle bei der Graft-versus-host-Reaktion und der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen (Steinmann et al., 1991; Winzler et al., 1997). Im Gegensatz zu B-Zellen, die mit ihrem Antigen-Rezeptor direkt Antigene erkennen können, brauchen T-Zellen Antigen präsentierende Zellen, um eine Immunantwort induzieren zu können. Dazu werden die intrazellulär prozessierten Antigenfragmente mit Hilfe von MHC I- und MHC II-Molekülen an der Zelloberfläche von dendritischen Zellen den zytotoxischen T-Zellen und den T-Helferzellen präsentiert. Nachdem die T-Zellen aktiviert sind, komplettieren sie die Immunantwort durch Interaktion mit Antikörper-produzierenden B-Zellen, mit Zytokin-produzierenden Makrophagen und Killerzellen (Banchereau et al., 1998). Der Kontakt mit einem Antigen, unterstützt durch die Wirkung verschiedener Zytokine wie TNF- α , Il-1 oder GM-CSF (Sallusto et al., 1994; Steinmann et al., 1991; Winzler et al., 1997, Banchereau et al., 1998), begünstigt die Ausreifung der dendritischen Zellen. Die aktivierten T-Zellen sorgen durch die Produktion von FasL und TNF- α für die Apoptose von dendritischen Zellen nach stattgefundenener Antigen-Präsentation (Ingulli et al., 1997; Kong et al., 2000). Gleichzeitig regulieren aktivierte T-Zellen durch die Produktion von CD40L und RANKL die Vermehrung und das Überleben dendritischer Zellen. Somit ist ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen die Voraussetzung für die Homöostase der Immunantwort (Wong et al., 1997).

2. Fragestellung

Zentrale Hypothese dieser Arbeit war die Frage, ob RANKL und OPG in der Schilddrüse produziert, von Zytokinen und Hormonen moduliert werden und eine Rolle bei der Kommunikation zwischen endokrinen und immunologischen Zellen spielen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Nachweis der OPG- und RANKL-Genexpression in verschiedenen humanen endokrinen und gastrointestinalen Geweben
 - Schilddrüse
 - Aorta
 - Nieren
 - Pankreas
 - Lymphknoten
 - Appendix
 - Nebennieren

- Modulation der OPG- und RANKL-mRNA-Expression und OPG-Proteinsekretion in folliculären Schilddrüsenzellen (XTC) durch Zytokine und Hormone
 - IL-1 β
 - TNF- α
 - TSH

- Reproduktion dieser Befunde anhand von primären Schilddrüsenzellen. OPG-mRNA-Expression in humanen Schilddrüsenresektaten von Schilddrüsenerkrankten mit
 - Morbus Basedow
 - Hashimoto-Thyreoiditis
 - Autonomes Adenom
 - Jodmangel Struma

- Immunmodulatorische Funktion des von Schilddrüsenzellen gebildeten RANKL und OPG anhand der CD40-Expression und Clusterbildung dendritischer Zellen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Präparate

Die Schilddrüsen-Gewebeproben und die primären Schilddrüsenzellen stammten von Patienten, die sich einer Schilddrüsenoperation unterzogen hatten und ihre Einwilligung für eine Weiterverwendung gaben. Die dendritischen Zellen wurden aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen, die sich freiwillig zu Verfügung stellten. Die Versuche, in denen menschliches Gewebe verwendet wurde, sind von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg/Lahn genehmigt worden (Aktenzeichen 28/00).

3.1.2 Arbeitsmaterialien

Zellkulturflaschen, 6-Well-Platten, 24-Well-Platten, Cryo-Cups zum Einfrieren der Zellen und Zentrifugenröhrchen wurden von der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) bezogen. Das Zellmedium, die Zusätze Penicillin (10.000 Units/ml) und Streptomycin (10 mg/ml), sowie das Fetale Kälberserum stammten von der Firma PAA GmbH (Linz, Österreich). (Das 1,8 M NaCl, das 0,123% PBS/BSA, sowie der Ethanol zur Verdünnung der Stimulationsreagenzien wurde selbst angesetzt.) Alle Zytokine wurden von der Firma R & D Systems (Minneapolis, USA) bezogen. Ethanol absolut, Formaldehydlösung 37 %, Natrium-Chlorid, tri-Natrium-2-hydrat und Eisessig 99,8% lieferte die Firma Riedel-de Haen (Seelzen, Deutschland). Von der Firma SIGMA (St. Louis, USA) wurden 3-[N-Morpholino]-Propansulfon-Säure (MOPS), Ethylendiamin-Tetraacetat Säure (EDTA), Formamide, Methylene Blau, β -Mercaptoethanol, BSA sowie sämtliche Hormone, Wachstumsfaktoren und molekularbiologische Reagenzien bezogen. J.T.Baker (Phillipsburg, USA) lieferte Natrium-Azetat.

Die Express-Hyb-Hybridisierungslösung stammte von Clontech (Palo Alto, USA), das [α -³²P]-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) von der Firma DuPont-NEN (Boston, USA), das House keeping-Gen β -Aktin von der Firma Clontech (Palo Alto, USA).

Der RNeasy-Mini-Kit, sowie die QIAshredder-Säulen zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe stammten mit samt den dazu benötigten Puffern und dem RNase-freien Wasser von der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland). Um Poly-A RNA zu isolieren verwendeten wir den PolyAtract mRNA Kit von Promega (Madison, USA). Die radioaktive Markierung der cDNAs (Random Priming) erfolgte mit dem DECAprime II DNA Labeling Kit der Firma Ambion (Austin, Texas). Das „Push Colum System“ zur Trennung nicht inkorporierter Nukleotide stammte zusammen mit der Schutzvorrichtung von der Firma Stratagene (La Jolla, USA). Die OPG-Proteinmessungen wurde mit einem von Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland) entwickelten kommerziell erhältlichen ELISA gemessen.

Die Agarose stammte von der Firma Life Technologies (Paisley, Schottland). Die Firma Amersham Pharmacia Biotech (Arlington Heights, USA) lieferte die positiv geladene Nylon-Membran (Hybond-N+), die Hybridisierungs-Beutel die Firma Gibco-BRL LIFE Technologies (Paisley; Schottland). Das Whatmanpapier stammte von der Firma Whatman (Maidstone, England). Die für die Autoradiographie benötigten Kassetten mit Verstärkerfolie und die X-OMAT Filme bezogen wir von Eastman Kodak (Rochester, USA) der Filmautomat Curix 160 stammte von der Firma Agfa (Köln, Deutschland). Das FACSScan Flow Zytometer stammte von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), der dazu benötigte Antikörper von der Firma PharMingen (Hamburg, Deutschland).

3.1.3 Puffer und Standardlösungen

20 x SSC (Standard sodium citrat)	3 M NaCl 0,3 M Natriumzitrat pH 7,0
10 x MOPS	20 mM 3-N-(Morpholino)propansulfonsäure-Na-Salz 5 mM Natriumazetat pH 7,0 0,1 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)	136 mM NaCl 2,7 mM KCL 12,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM K ₂ HPO ₄ .
1 x STE-Puffer	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 7,0
Auftragspuffer	24% Eisessig 0,8 M Natrium-Azetat-3-Hydrat 0,04% Methylenblau DEPC-Wasser
Resuspensionspuffer	350 µl Formamid 160 µl Formaldehyd 90 µl 10 x MOPS

Tab. 1: Lösungen und Puffer

3.2 Zellkultur

Für die Versuche wurde eine differenzierte folliculäre Schilddrüsen Zelllinie (XTC) verwendet. Die XTC-Zellen exprimieren den TSH-Rezeptor, nehmen Jodid auf und produzieren RANKL und OPG, weshalb sie als Modell für folliculäre Schilddrüsenzellen und zur Analyse der Rolle von RANKL und OPG in der Schilddrüsenphysiologie geeignet waren. Die XTC-Zelllinie wurde aus einer Hürthle-Zell-Karzinometastase gewonnen und von Herrn PD Dr. A. Zielke (Klinik für VTG-Chirurgie der Phillips-Universität Marburg) zur

Verfügung gestellt (Zielke et al., 1998). Die XTC-Zellen wurden in DMEM-h21/Ham's Medium zusammen mit HEPES (25 mM), Natriumpyruvat (0.5 mM), Glutamin (2.5 mM), 10% fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin, und Streptomycin bei 37°C kultiviert. 48 Stunden vor der RNA-Isolierung, wurden die XTC-Zellen in serum-freies Medium, versetzt mit Rinder-Insulin (10 µg/ml), humanem Transferrin (5 µg/ml), Somatostatin (10 ng/ml) und Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin (2 ng/ml) überführt (Zielke et al., 1999). Wie erwähnt ähneln XTC-Zellen den folliculären Schilddrüsenzellen, eine Stimulation mit TSH (Thyreotropin) bewirkt daher eine vermehrte Proliferation, sowie einen Anstieg der Thyreoglobulin-Sekretion (Zielke et al., 1999).

3.3 RNA-und Poly-A-mRNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA-Isolierung aus Zellen mit dem RNeasy Mini Kit und dem Poly-A Tract mRNA Kit ermöglicht es, aus geringem Ausgangsmaterial eine relativ große Menge von gesamt RNA bzw. Poly-A-mRNA zu erzielen. Als Ausgangspunkt wurde eine mit Zellen bewachsene 6-Well Platte, die Reagenzien und Säulen aus dem RNeasy Kit, sowie eine 70% Ethanol-Lösung und eine Mischung aus RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-ME auf 1 ml RLT-Puffer) benötigt. Die Temperatur in der Mikrozentrifuge sollte um 20°C betragen, die Arbeitsgeschwindigkeit schnell sein und besondere Beachtung wurde auf RNase-freie Arbeitsbedingungen gelegt. Daher wurde mit Handschuhen und RNase-freien Materialien gearbeitet.

Der Zellkulturüberstand wurde in Eppendorf-Cups gesammelt und für eine spätere Verwendung in einem OPG-Elisa bei -80°C aufbewahrt. In jedes Well wurden 350 µl des RLT-β-ME-Gemisches geladen und vermischt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden sie mit einer Pipette gründlich homogenisiert und dadurch lysiert. Unter Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol wurde noch einmal kräftig gemischt, das Volumen von 700 µl auf die RNeasy – Säulen geladen und eine Minute bei 10000 Umdrehungen pro Minute (upm) zentrifugiert. Danach folgte ein Waschschritt mit 700 µl RWI-Puffer und nochmaliges 15-sekündiges Zentrifugieren mit 10000 upm. Die Säule wurde nun auf einen neuen Filter gesetzt, mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und 15 Sekunden zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen mit 500 µl RPE-Puffer schloss sich eine Zentrifugation von 2 Minuten bei 13000 upm an, in deren Anschluss die Säulen auf Eppendorf-Cups gesetzt wurden. Auf die an den Säulen gebundene

RNA wurden nun 50 µl RNase freies Wasser gegeben, 1 Minute bei 10000 upm zentrifugiert und die RNA somit in die Eppendorf-Cups eluiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups bei -80°C gelagert.

3.4 RNA-Isolierung aus Schilddrüsengewebe

Die Gewebeproben stammten von Patienten, die sich einer Schilddrüsenoperation unterzogen, nach deren schriftlicher Einwilligung, mit Genehmigung der Ethikkommission der Phillips-Universität Marburg, unter dem Vorsitz von Prof. Dr. Gerd Richter (Aktenzeichen 28/00). Die Gewebeproben wurden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Die RNA-Isolierung aus Gewebe erforderte zwei Verfahren. Das QIAshredder-Säulen System zur Trennung der festen Bestandteile des Gewebes von den Gewebezellen und den RNeasy-Mini-Kit zur Isolierung der RNA aus diesen Zellen.

Die Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Stößels, der zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, in einem Mörser zu feinem Puder zerstoßen. Zu 20 mg Schilddrüsengewebe wurden 350 µl RLT-Puffer/ β -Mercaptoethanol (350 µl RLT-Puffer mit 3,5 µl β -ME) gegeben, dieses Gemisch auf die QIAshredder-Säulen geladen und bei 13000 Umdrehungen pro Minute (upm) 2 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen mit dem Zelldebris verworfen, zu dem Lysat 350 µl 70%iger Ethanol gegeben, gut durchmischt und zur RNA-Isolierung auf die RNeasy-Säulen gegeben. Zuerst wurde eine Minute bei 10000 Umdrehungen pro Minute (upm) zentrifugiert, danach folgte ein Waschschriff mit 700 µl RWI-Puffer und nochmaliges 15-sekündiges Zentrifugieren mit 10000 upm. Die Säule wurde nun auf ein neues Hütchen gesetzt, mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und 15 Sekunden zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen mit 500 µl RPE-Puffer schloss sich eine Zentrifugation von 2 Minuten bei 13000 upm an, in deren Anschluss die Säulen auf Eppendorf-Cups gesetzt wurden. Auf die an den Säulen gebundene RNA wurden nun 50 µl RNase freies Wasser gegeben, 1 Minute bei 10000 upm zentrifugiert und die RNA somit in die Eppendorf-Cups gespült. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups bei -80°C gelagert.

3.5 Gelelektrophorese und Northern-Blot

Die Northern-Gelelektrophorese dient der Auftrennung der denaturierten RNA entsprechend ihrer Molekülgröße. Um die Bildung einer für die Auftrennung hinderlichen Sekundärstruktur zu verhindern, findet sie unter denaturierenden Bedingungen in einem formaldehydhaltigen Agarosegel statt (Lehrach et al., 1977). Der Northern-Blot dient der Übertragung der mit Hilfe des Agarosegels aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran. Diese wird nach Fixierung in einem UV-Crosslink-Ofen bei der Hybridisierung verwendet. Die Hybridisierung ist ein sensitives Verfahren zum Nachweis von RNA.

Zur Herstellung eines 1,5% denaturierenden Agarose-Gels wurden 4.5 g Agarose mit 217 ml DEPC-behandeltem Wasser und 30 ml 10 x MOPS versetzt und in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurden unter dem Abzug 53 ml Formaldehyd hinzugegeben und das Gel in die Gelkammer gegossen. Nach Polymerisierung des Gels (ca. 1 Stunde) wurde der Gelträger in die mit 2.7 l DEPC-Wasser und 300 ml 1 x MOPS gefüllte Kammer gesetzt.

Die in Wasser gelösten mRNA-oder Poly-A-mRNA-Proben von 1 µg bis 10 µg wurden eine Stunde lang in eine Speed-Vac-Zentrifuge gestellt und in 14 µl Resuspensionspuffer (350 µl Formamid, 160 µl Formaldehyd, 90 µl 10 x MOPS) aufgenommen, danach für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und sofort gekühlt. Anschließend wurden 6 µl Auftragspuffer (24% Eisessig, 0,8 M Natrium-Azetat-3-Hydrat, 0,04% Methylenblau und DEPC-Wasser) zu den Proben gegeben und das Gel damit beladen.

Die Gelelektrophorese dauerte insgesamt 3 Stunden, wobei die erste Stunde bei 130 Volt und ohne Zirkulation, die 2. und 3. Stunde bei einer Spannung von 100 Volt und mit Zirkulation des Puffers lief.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in einen Behälter mit 200 ml 20 x SSC gelegt und die Hybond-Nylon-Membran vorbereitet, indem sie zuerst in DEPC-Wasser und danach in 20 x SSC eingelegt wurde. Das Gel und die Membran wurden für 25 Minuten auf eine Schüttelplatte gestellt und in dieser Zeit die Apparatur für den Kapillar-Blot vorbereitet. Eine Schale wurde mit 1 l 20 x SSC und 300 ml 1x MOPS gefüllt, ein Block hineingestellt und dieser mit Whatmanpapier bedeckt (beide Enden tauchten in das 20 x SSC und das 1 x MOPS ein).

Das Gel wurde (umgekehrt) auf das Whatmanpapier gelegt und Luftblasen mit einer sterilen 10 ml Pipette entfernt. Nachdem die Ränder auf einer Breite von einem Zentimeter mit Frischhaltefolie bedeckt worden waren, wurde die Hybond-Nylon-Membran darüber gelegt, mit 4 Whatmanpapieren, einem Stapel Papiertücher (ca. 10 cm) und einem Gewicht beschwert. Durch die dabei entstehenden Kapillarkräfte wurde die RNA auf die Nylonmembran übertragen. Am folgenden Tag wurde die Blotting-Einrichtung auseinandergebaut und die Membran für eine Minute in 100 ml 2x SSC (10 ml 20x SSC in 90 ml DEPC-Wasser) gelegt.

Zur irreversiblen Bindung der RNA an die Membran wurde diese in einem UV-Crosslinker mit einer Energie von 1200 J x 100 behandelt. Bevor die Membran bei Raumtemperatur für 30 Minuten getrocknet wurde, wurde sie in einem Hybridisierungsbeutel lichtgeschützt gelagert, 15 Minuten in 100 ml 5% Essigsäure und danach 5 Minuten in 100 ml Methylenblau eingelegt und zur Entfernung des Farbstoffhintergrundes 2 mal 3 Minuten mit DEPC-Wasser gewaschen.

3.6 Radioaktive Markierung der cDNA (Random Priming)

Das Random Priming basiert auf einer Methode von Feinberg und Vogelstein und ermöglicht die schnelle Synthese von DNA-Sonden mit hoher spezifischer Aktivität bei geringem DNA-Bedarf (Feinberg et al., 1983). Dabei binden nonamere Primer an Einzelstrang-DNA. Die entstandenen Primer-DNA-Komplexe dienen dem Klenow-Fragment als Initiationsstelle. Bei der Synthese komplementärer DNA-Stränge wird das radioaktive Nukleotid [α -³²P]-dCTP eingebaut. Die nun hergestellte cDNA-Sonde diente zum Nachweis der mRNA bei der Northern-Hybridisierung. Die β -Aktin-cDNA wurde verwendet, um eine mRNA von 2.0 kb Länge nachzuweisen, eine OPG-cDNA zum Nachweis von 2.9 kb, 4.4 kb und 6.6 kb mRNA, außerdem eine RANKL-cDNA zum Nachweis einer 2.4 kb langen mRNA Spezies.

In ein Eppendorfgefäß wurden 10 μ l Wasser, 1 μ l OPG-cDNA und 2,5 μ l 10 x Decamer pipettiert, durchmischt, abzentrifugiert und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde die denaturierte DNA-Lösung sofort auf Eis gestellt und 5 μ l 5 x -dCTP-Puffer hinzugegeben. Im radioaktiven Schutzraum wurden 5 μ l [α -³²P]-dCTP und 1,5 μ l Klenow

Enzym zu dem Ansatz pipettiert, durchmischt, zentrifugiert und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert.

Zur Abtrennung der nicht in die neusynthetisierte DNA eingebauten Nukleotide, wurde das „Push columns“ Säulensystem der Firma Stratagene verwendet.

Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie, der Bindung von freien Nukleotiden an ein Austauscherharz, während DNA mit der Länge zwischen 17 bp und 50 kbp dieses Harz unverändert passiert (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden auf eine Säule 70 µl STE-Puffer (50 x TE-Puffer, 5 M NaCl, H₂O) pipettiert und damit das Austauscherharz präkonditioniert.

Zum Schutz vor Radioaktivität wurde die Säule in eine Plexiglasvorrichtung, eingespannt. Die 25 µl des Random Priming Ansatzes wurden anschließend auf die Säule geladen und mit Hilfe einer Spritze durchgedrückt und in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Daraufhin wurde mit 70 µl STE-Puffer nachgespült und zur vollständigen Elution der cDNA einige Luftboli injiziert. Die nun vorliegende cDNA wurde in einem Isolierbehälter für Radioaktivität bei – 20°C bis zur Verwendung bei der Hybridisierung gelagert.

Dasselbe Verfahren wurde auch durchgeführt, um die oben beschriebenen Sonden für β-Aktin-cDNA und RANKL-cDNA herzustellen.

Bei Arbeiten mit radioaktivem Phosphor wurden die einschlägigen Richtlinien zum Umgang mit radioaktiven Substanzen beachtet.

3.7 Hybridisierung

Die Northern-Hybridisierung stellt ein sensitives Verfahren zum Nachweis gelelektrophoretisch getrennter RNA dar. Die zu untersuchende RNA wird durch die Zugabe von komplementärer radioaktiver cDNA lokalisiert und durch die Autoradiographie nachgewiesen (Alwine et al., 1980).

Für die Prähybridisierung wurde die Nylon-Membran in Hybridisierungsflaschen zusammen mit 10 ml auf 68°C vorgeheizter Hybridisierungslösung (Clontech, Palo Alto) gegeben. Anschließend wurde sie 30 Minuten im Hybridisierungssofen inkubiert. Die zuvor durch das

Random Priming hergestellte cDNA-Sonde wurde 5 Minuten denaturiert, 10 µl davon mit 10 ml Hybridisierungslösung vermischt und auf die Membran in die Hybridisierungsflasche gegeben. Der Ansatz wurde 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 mal 10 Minuten in 300 ml der Waschlösung I (2 x SSC und 0,05% SDS) auf einer Schüttelplatte gewaschen.

Die Membran wurde zusammen mit 200 ml der Waschlösung II (0,1x SSC und 0,1% SDS) 2 mal 20 Minuten bei 50°C gewaschen. Zum Schluss wurde die Membran mit einem Whatmanpapier kurz abgetrocknet und in einem Hybridisierungsbeutel platziert, wobei eine Austrocknung der Membran verhindert werden sollte. Um das Ergebnis zu visualisieren, wurde die Membran über Nacht auf einem Autoradiographiefilm exponiert

Die Autoradiographie beruht auf der Schwärzung eines photographischen Films durch die photochemische Wirkung der Strahlung radioaktiver Nuklide (Sambrook et al., 1989).

Zur Filmexposition bei -80°C diente eine Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie. Nach 24 Stunden Testexposition wurden die Filme entwickelt und anschließend in Abhängigkeit ihrer Signalstärke erneut exponiert.

Die Hybridisierung mit dem Housekeeping-Gen β -Aktin diente der Normalisierung, also der Prüfung ob gleiche Mengen der zu analysierenden RNA auf das Gel geladen wurden. Im Gegensatz zu Genen die in Folge einer bestimmten Stimulation oder exogenen Faktoren von der Zelle exprimiert werden, erfolgt die Expression der Housekeeping-Gene weitgehend konstant, sie kodieren für Struktur- und Funktionsproteine der Zelle. Das verwendete Housekeeping-Gen β -Aktin wies eine mRNA von 2,0 kb Länge nach.

3.8 Dehybridisierung

Um die mRNA Blots für erneute Hybridisierungen mit OPG-cDNA, mit β -Aktin-cDNA oder RANKL-cDNA verwenden zu können, wurde die Radioaktivität mittels Dehybridisierung entfernt. Zuerst erhitze man 200-300 ml 0,5% SDS in einer Schale bei 95°C, danach wurde die Membran 10 Minuten in diesem Bad gewaschen und anschließend noch einmal 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem die Membran aus diesem Bad entfernt wurde, konnte mit Hilfe eines Geigerzählers überprüft werden, ob eventuell noch Radioaktivität

nachzuweisen war. In diesem Fall, musste die oben aufgeführte Dehybridisierung noch einmal wiederholt werden.

3.9 OPG-ELISA

Mit Hilfe des Osteoprotegerin-ELISAs, konnte Osteoprotegerin direkt aus Patientenserum, Urin, Plasma oder konditioniertem Zellkulturmedium bestimmt werden (Szulc et al., 2001). Es wurden Überstände von Zellkulturen verwendet, die vor der RNA-Isolation asserviert, zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert wurden. Funktionsweise des Systems von Immundiagnostik Bensheim war ein monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes humanes OPG (rhOPG). Dieser diente dazu die biologische Wirkung von OPG zu neutralisieren. Als Nachweis-Antikörper diente ein biotinylierter polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen menschliches OPG. Die untere Nachweisschwelle dieses Systems betrug 4 pg/ml. Der Intraassay-Varianzkoeffizient betrug 8–10 % (n=16), der Interassay-Varianzkoeffizient 12–15 % (n=7).

3.10 Isolierung und Kultivierung von dendritischen Zellen

Nach der von Romani beschriebenen Methode (Romani et al., 1996) wurden dendritische Zellen über Differenzierung von CD14^+ Monozyten aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen, mit RPMI 1640 Medium, 10% Kälberserum, Penicillin und Streptomycin (komplettes Medium) versetzt und in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in Petri Schalen ausgesät. Nach einer Stunde wurden nicht adhärenente Zellen entfernt und die adhärenente Zellfraktion für sieben Tage mit Medium, GM-CSF (1000 U/ml), sowie IL-4 (800 U/ml) supplementiert. Am 3. und 5. Tag wurden jeweils frische Zytokine zugesetzt. Am 7. Tag wurde die Hälfte des Mediums ersetzt durch frisches Medium und IL- 1β (1000 U/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF- α (1000 U/ml), sowie Prostaglandin E2 (10^{-8} M). Nach 10 Tagen hatten sich aus den monozytären Ausgangszellen unreife dendritische Zellen differenziert, die mit RANKL (1 $\mu\text{g/ml}$) oder PBS/BSA als Negativkontrolle in einem Volumen von 500 μl in 24-Well-Platten ausgesät wurden. Dabei wurde sich zunutze gemacht, dass RANKL in dieser Konzentration als Überlebensfaktor für dendritische Zellen *in vitro* gilt (Wong et al., 1997).

3.11 Berechnung der Proteinwerte und Statistische Auswertung

Die numerischen Werte der OPG-Proteinmessungen wurden als Mittelwerte \pm SD von Dreifachbestimmungen angegeben. Zeitkinetiken und Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Varianzanalyse für Vielfachmessungen (ANOVA) analysiert. In allen statistischen Verfahren wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Die Proben wurden in dreifacher Bestimmung analysiert. Zur Auswertung der Ergebnisse gehörte ebenfalls die Korrektur der Messwerte zum A260-Wert als Marker für die RNA-Menge. Die Absorption der mit RNase freiem Wasser eluierten RNA bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm (A260-Wert) wurde im Rahmen der RNA-Isolierung für den Northern Blot bestimmt. Aus der Absorption konnte die Menge an eluierter RNA berechnet werden, welche wiederum Rückschlüsse auf die Zellzahl der einzelnen Löcher einer Zellkulturplatte zuließ. Es bestand eine direkte Korrelation zwischen der gemessenen Proteinkonzentration und der Anzahl OPG sezernierender Zellen. Die A260-Werte wurden zur jeweiligen Kontrolle mit 1,0 ins Verhältnis gesetzt. Der Mittelwert der drei Messwerte und deren Standardabweichung wurden durch diesen Wert dividiert. Dadurch konnten unterschiedliche Zellzahlen als Fehlerquelle in der vergleichenden Analyse von Proteinkonzentrationen ausgeschlossen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Expression von OPG- und RANKL-mRNA in verschiedenen endokrinen und nicht endokrinen Geweben

Um die Expression von OPG- und RANKL-mRNA in verschiedenen endokrinen und nicht-endokrinen Organen zu charakterisieren, wurde ein kommerzieller Dot-Blot mit OPG- und RANKL-mRNA Proben hybridisiert (Hofbauer et al., 1998, 1999). Das Ergebnis zeigte eine hohe OPG-mRNA-Expression in der Schilddrüse, der Aorta und den Nieren. RANKL wurde hingegen in der Schilddrüse kaum exprimiert, dafür aber in hohem Maße in den Lymphknoten und der Appendix.

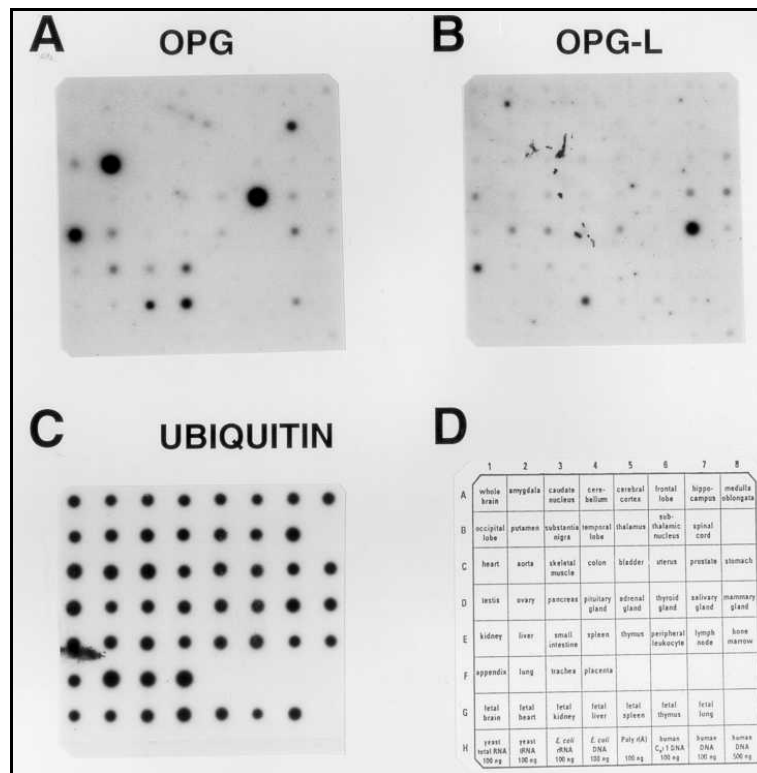


Abb. 4: Gewebeverteilung der OPG- und RANKL-Genexpression. RANKL- und OPG-Genexpression in verschiedenen Geweben dargestellt mit einem DOT-BLOT.

A: Besonders hohe Expression von OPG in der Schilddrüse, außerdem in der Aorta und der Niere. **B:** OPG-L (RANKL) wird in der Schilddrüse kaum exprimiert, dafür aber in Lymphknoten und in der Appendix. **C:** Die Hybridisierung mit Ubiquitin dient der Kontrolle, ob gleich viele Probenmengen geladen wurden. **D:** Legende der Organe.(englisch)

D

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Gesamt Gehirn	Amygdala	Nukleus Caudatus	Cerebellum	Kortex	Frontallappen	Hypokampus	Medulla oblongata
B	Occipital-lappen	Putamen	Subst. Nigra	Temporal-lappen	Thalamus	Subthalamischer Nukleus	Rückenmark	
C	Herz	Aorta	Skelettmuskel	Kolon	Harnblase	Uterus	Prostata	Magen
D	Hoden	Ovar	Pankreas	Hypophyse	Nebenniere	Schilddrüse	Speicheldrüse	Brustdrüse
E	Niere	Leber	Dünndarm	Milz	Thymus	Leukozyt	Lymphknoten	Knochenmark
F	Appendix	Lunge	Trachea	Plazenta				
G	Gehirn, fetal	Herz, fetal	Niere, fetal	Leber, fetal	Milz, fetal	Thymus, fetal	Lunge, fetal	
H			E coli RNA 100 ng	E coli DNA 138 ng			Humane DNA 100 ng	

Tab. 2: D: Legende der Organe.

(vergrößert, ins Deutsche übersetzt)

Da die Ergebnisse des Dot Blots auf ein starkes Vorkommen von OPG-mRNA in endokrinen Geweben schließen ließen, wurde versucht dieses Ergebnis zu verifizieren, indem ein kommerzieller Northern Blot verschiedener endokriner und gastrointestinaler Gewebe mit OPG-mRNA hybridisiert wurde. Es zeigte sich eine starke Expression dreier OPG-mRNA-Spezies in der Schilddrüse (2,9 kb, 4,4 k,; 6,6 kb). Die Nebennieren mit Rinde und Kortex, sowie das Pankreas zeigten eine geringere OPG-mRNA-Expression (Abb.2). Die hohe OPG-mRNA-Genexpression, welche diejenige in anderen endokrinen Geweben übertraf, veranlasste zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Rolle von RANKL und OPG in der Physiologie und Pathophysiologie der Schilddrüse.

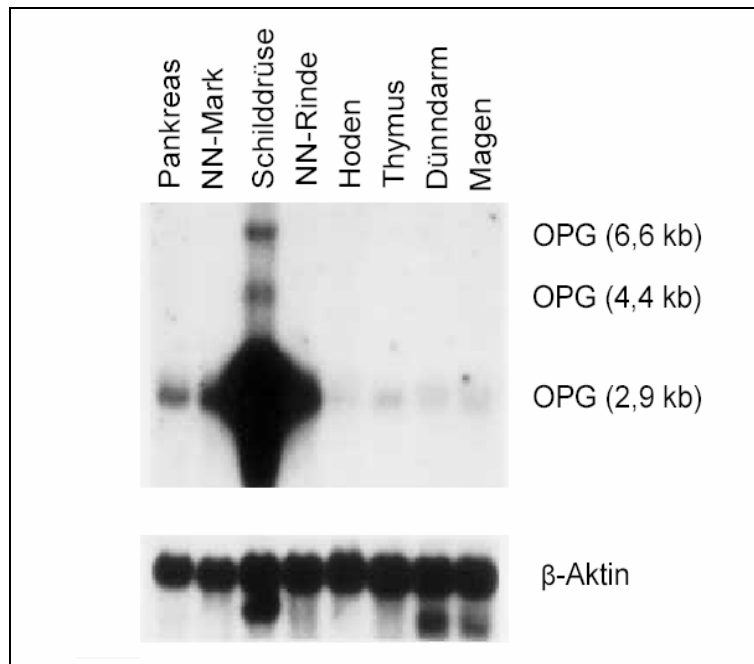


Abb. 5: OPG Genexpression in humanen endokrinen und gastrointestinalen Geweben. Die Hybridisierung eines kommerziellen poly-A-RNA Northern Blots mit radioaktiv markiertem OPG und β -Aktin zeigt eine hohe OPG-mRNA-Expression in der Schilddrüse von 3 OPG-mRNA Spezies mit 2,9 kb, 4,4 kb, 6,6 kb, sowie β -Aktin bei 2,0 kb. Eine niedrige OPG-mRNA-Expression zeigt sich in der Rinde und dem Mark der Nebennieren, sowie dem Pankreas.

4.2 Analyse der OPG-mRNA-Expression und OPG-Proteinsekretion in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen (XTC)

Zur Analyse der Expression von RANKL- und OPG-mRNA in der Schilddrüse, sowie zur Analyse der Effekte proinflammatorischer Zytokine und TSH auf die Schilddrüse, wurden die aus einem Hürthle-Zell-Karzinom etablierten XTC-Zellen verwendet. Diese Zellen exprimieren den TSH-Rezeptor, nehmen Jodid auf und sind somit ein gutes Modell für differenzierte follikuläre Schilddrüsenzellen (Zielke et al., 1998).

Zunächst wurde die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β auf humane Schilddrüsenkarzinomzellen untersucht.

IL-1 β (in Konzentrationen von 0,5 fM bis 5 nM) steigerte die geringe basale OPG-mRNA-Expression nach einer Exposition von 24 Stunden um mehr als das 20-fache.

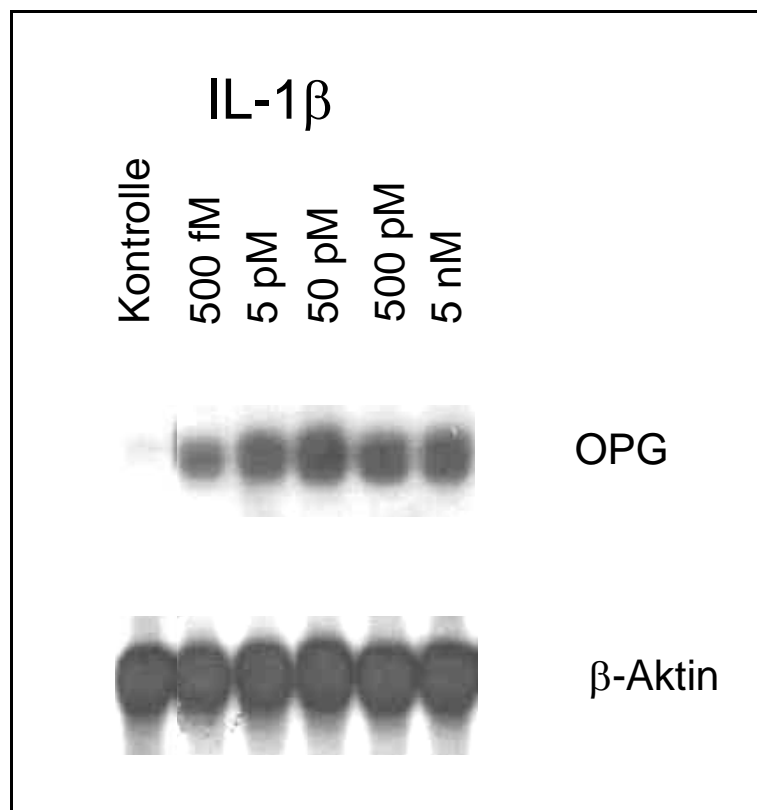


Abb. 6: Stimulation der OPG-mRNA-Expression in XTC-Zellen durch IL-1 β .

Nach der Stimulation von XTC-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1 β für 24 Stunden, wurden 10 μ g totaler RNA anhand von Northern Blot und Hybridisierung analysiert. Gezeigt sind die OPG-mRNA-Expression bei 2,9 kb und die β -Aktin Expression bei 2,0 kb. Die Zahlen geben die Dosierung der Zytokine in pM, fM, nM an.

Als nächstes wurde die Wirkung von TNF- α auf die OPG-mRNA-Expression der XTC-Zellen untersucht. TNF- α gilt neben IL-1 β als wichtiges proinflammatorisches Zytokin in der Schilddrüse

Ferner führte TNF- α (in Konzentrationen von 9 pM bis 9 nM) zu einer dosisabhängigen Steigerung der OPG-mRNA-Expression nach 24 stündiger Exposition um das 8-fache.

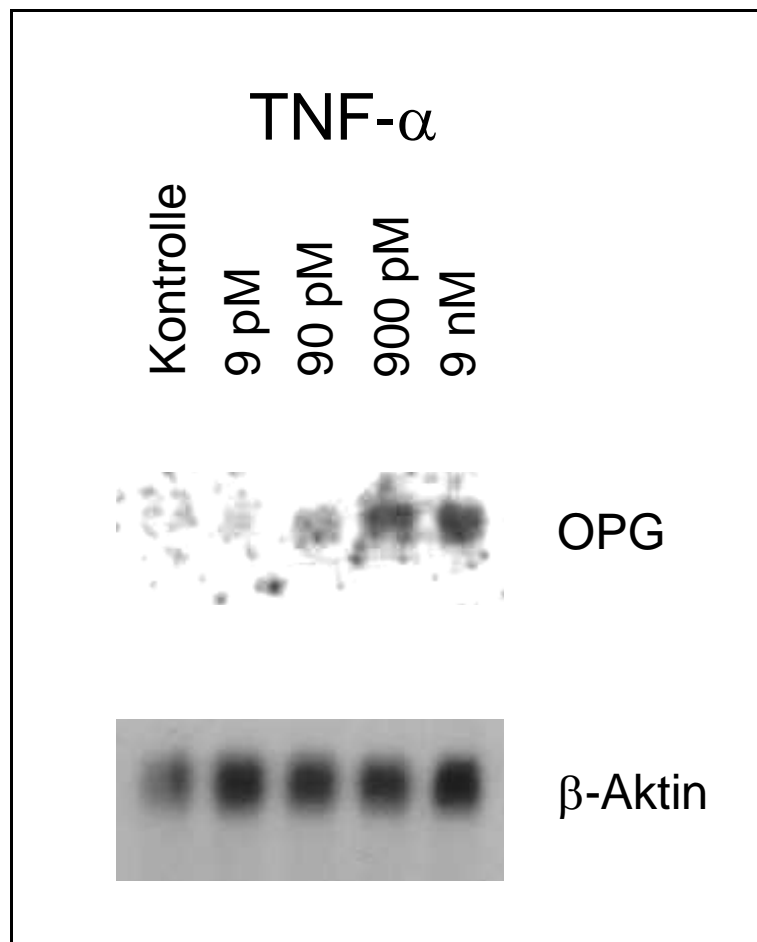


Abb. 7: OPG-mRNA-Expression in XTC-Zellen nach Stimulation mit TNF- α .

Die XTC-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α in einem Zeitraum von 24 Stunden stimuliert und 10 μ g der Gesamt-RNA mit Hilfe von Northern Blot und Hybridisierung analysiert. Dargestellt sind die OPG-mRNA-Expression bei 2,9 kb und die β -Aktin Expression bei 2,0 kb. Die Dosierung der Zytokine in pM wird durch die Zahlen angegeben.

Die stimulierende Wirkung dieser beiden proinflammatorischen Zytokine ließ sich auch auf Proteinebene durch Analyse des Zellkulturmediums von mit IL-1 β oder TNF- α behandelten XTC-Zellen bestätigen. Die durch IL-1 β erzielte Steigerung der OPG-Proteinsekretion betrug dosisabhängig bei einem IL-1 β Gehalt von 5 nM das 33-fache ($p < 0.0001$).

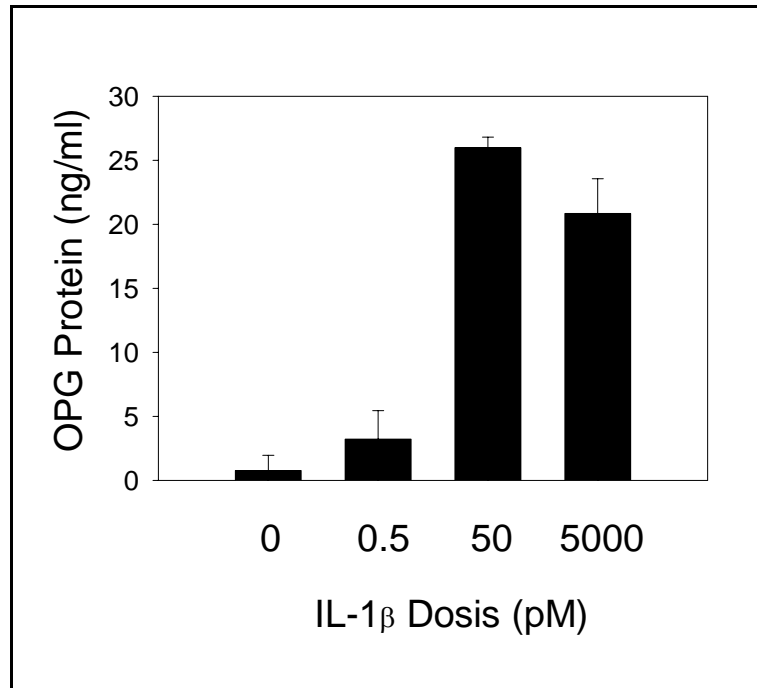


Abb. 8: Stimulation der OPG-Proteinsekretion in XTC-Zellen durch IL-1 β .

Dargestellt ist die OPG-Proteinsekretion von XTC-Zellen, die für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1 β behandelt wurden. Mittels ELISA wurden die Protein-Konzentrationen im Zellmedium bestimmt. Die OPG-Proteinkonzentration ist in ng/ml, die IL-1 β Dosierung in pM angegeben.

Außerdem wurde die OPG-Proteinsekretion in einer zeitabhängigen Weise durch TNF- α (in Konzentration von 9 nM) um das 4-fache (nach 24h) gesteigert ($p < 0.001$).

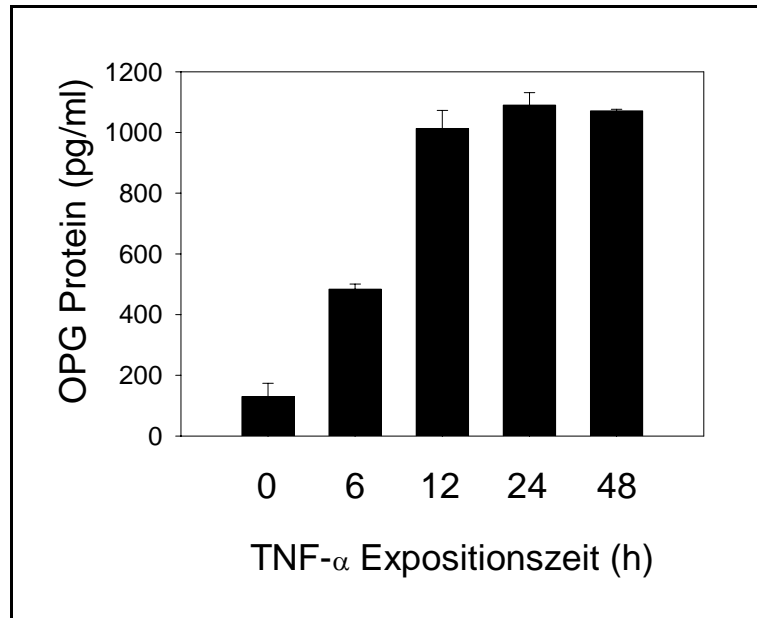


Abb. 9: OPG-Proteinsekretion von XTC-Zellen nach Stimulation mit TNF- α .

Die XTC-Zellen wurden 6 bis 48 Stunden TNF- α in einer konstanten Konzentration von 9 nM ausgesetzt. Der OPG-Proteingehalt des Mediums wurde mit Hilfe von ELISA bestimmt. Die OPG-Proteinkonzentration des Mediums ist in pg/ml, die Expositionszeit mit TNF- α in Stunden angegeben

TSH, als ein für die Funktion, Proliferation und Differenzierung von folliculären Schilddrüsenzellen entscheidendes Peptidhormon (in Konzentrationen von 1 μ U/ml bis 10 mU/ml) führte nach einer Exposition von 24 Stunden bei 37°C zu einer Steigerung der OPG-mRNA-Expression (Abb. 10a), sowie der OPG-Proteinsekretion um das 2-fache ($p < 0.005$) (Abb. 10b).

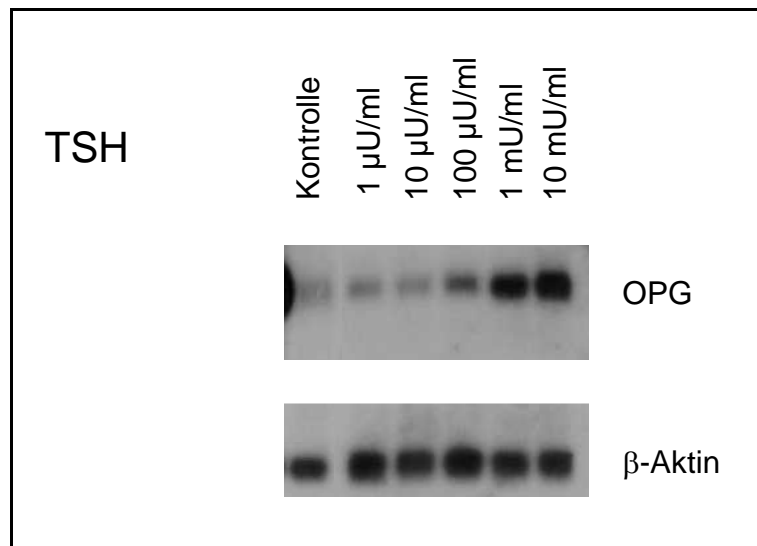


Abb 10a: Dosisabhängige Steigerung der OPG-mRNA-Expression in XTC-Zellen durch TSH.

XTC-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von TSH (in mU/ml) für 24 Stunden bei 37°C stimuliert und 10 μ g der gesamt RNA mit Hilfe von Northern Blot und Hybridisierung analysiert. Dargestellt sind die OPG-mRNA-Expression bei 2,9 kb und die β -Aktin-Expression bei 2,0 kb. Die Konzentrationen sind in mU/ml angegeben.

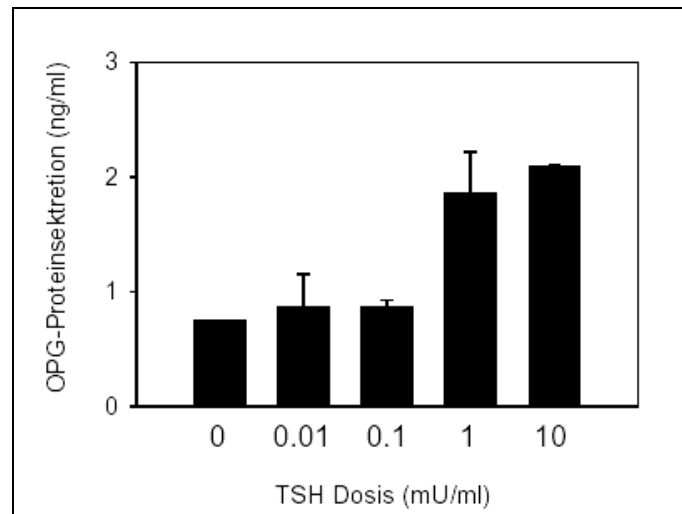


Abb. 10b: Dosisabhängige Steigerung der OPG-Proteinsekretion in XTC-Zellen durch TSH.

Das durch das Vorgehen in 7a gewonnene Zellkulturmedium wurde mittels ELISA auf seinen OPG-Proteingehalt überprüft. Die OPG-Proteinkonzentration ist in ng/ml, die TSH Dosierung in mU/ml angegeben.

4.3 Modulation der RANKL-Genexpression in XTC-Zellen

Die RANKL-mRNA-Expression wird ebenfalls durch IL-1 β , TNF- α , sowie TSH moduliert. Zur Untersuchung der RANKL-mRNA Spiegel wurden die XTC-Zellen für 24h mit IL-1 β (5 nM), TNF- α (9 nM) und TSH (10 mU/ml) stimuliert. Dabei zeigte sich eine Steigerung der RANKL-mRNA-Expression durch IL-1 β um das 3-fache, durch TNF- α um das 4-fache, sowie eine Suppression durch TSH um 60%.

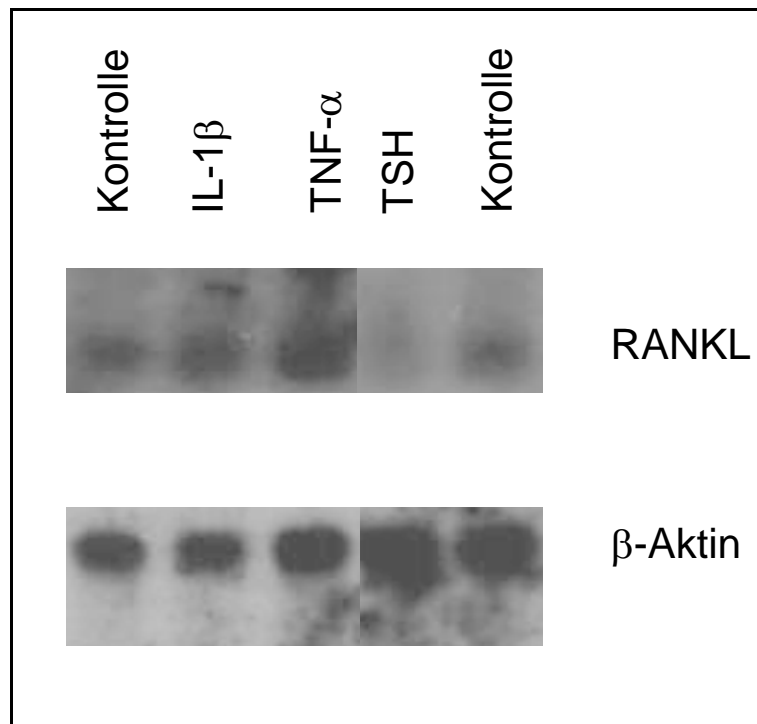


Abb. 11: RANKL-mRNA-Expression in XTC-Zellen moduliert durch TSH, IL-1 β , TNF- α und ihre basale Sekretion.

Dargestellt ist der Northern Blot von mit TSH (10 mU/ml), IL-1 β (5 nM), TNF- α (9 nM) und PBS/BSA (Kontrolle) stimulierten XTC-Zellen. Die XTC-Zellen wurden bei 37°C 24 Stunden inkubiert und anschließend wurden 2 μ g Poly-A-RNA für den Northern Blot verwendet. RANKL-mRNA stellt sich bei 2,4 kb und β -Aktin-mRNA bei 2,0 kb dar.

4.4 OPG-Proteinsekretion in primären Schilddrüsenzellen

Zur Reproduktion der an dem Zellmodell für folliculäre Schilddrüsenzellen XTC erhobenen Ergebnisse wurde der Einfluss der Substanzen mit positivem Effekt auf OPG-mRNA-Expression und OPG-Proteinsekretion an primären Schilddrüsenzellen getestet. Neben einer basalen OPG-Proteinsekretion von primären Schilddrüsenzellen zeigte sich eine Stimulation der Proteinsekretion durch IL-1 β (5 nM) um das 2,2-fache, durch TNF- α (9 nM) um das 2,7-fache. Durch TSH in einer Dosierung von 10 mU/ml kam es zu einer Steigerung der OPG-Proteinsekretion um das 1,7-fache ($p < 0,01$).

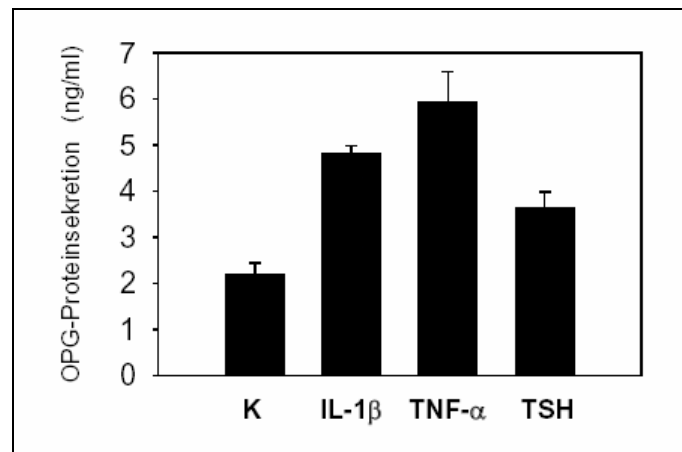


Abb. 12: Substanzabhängige Steigerung der OPG-Proteinsekretion in primären Schilddrüsenzellen.

Die XTC-Zellen wurden mit IL-1 β (5 nM), TNF- α (9 nM) und TSH (10 mU) für 24 Stunden behandelt. Mittels ELISA wurde die OPG-Proteinkonzentration im konditionierten Medium gemessen. Die Substanzen wurden in der Höhe dosiert, in der sie den größten Effekt auf die OPG-mRNA-Expression in XTC-Zellen hatten. Die Kontrolle zeigt die OPG-Proteinkonzentration in dem Medium un behandelter primärer Schilddrüsenzellen.

4.5 OPG-mRNA-Expression in humanen Schilddrüsenresektaten

Zur Charakterisierung der Ergebnisse *in vivo* folgte eine Untersuchung der OPG-mRNA-Expression in humanen Schilddrüsenresektaten von Schilddrüsenerkrankten mit Morbus Basedow, Hashimoto-Thyreoiditis, autonomen Adenom und Jodmangelstruma. Die Analyse des Patientenmaterials von an Morbus Basedow Erkrankten zeigte eine drei bis vierfach höhere OPG-mRNA-Expression als die bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis, autonomem Adenom oder Jodmangelstruma.

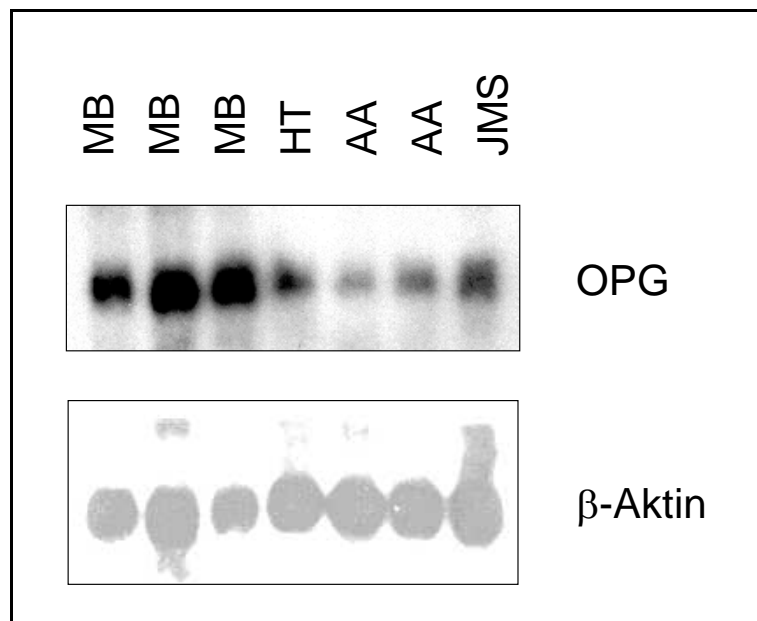


Abb. 13: Grad der OPG-mRNA-Expression in Resektaten von Patienten mit gutartigen Schilddrüsenerkrankungen.

Die durch Schilddrüsenoperation gewonnenen Resektate wurden homogenisiert. 10 µg der separierten Gesamt-RNA wurden zur Northern-Blot-Analyse und zur Hybridisierung verwendet. Die OPG-mRNA stellt sich bei 2,9 kb, die β-Aktin-mRNA bei 2,0 kb dar. MB: Morbus Basedow, HT: Hashimoto-Thyreoiditis, AA: Autonomes Adenom, JMS: Jodmangelstruma.

4.6 Biologische Wirkung von OPG auf dendritische Zellen

Da RANKL die Überlebensdauer von dendritischen Zellen zu verlängern scheint und OPG diesen Effekt antagonisieren kann (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997; Josien et al., 2000), dendritische Zellen in der Schilddrüse vorkommen, und als Zielzellen einer OPG-Wirkung in Frage kommen, wurde der Effekt von OPG auf die Funktion und Morphologie dendritischer Zellen untersucht. Dendritische Zellen wurden aus peripheren Zellen des Bluts gesunder Probanden differenziert (Romani et al., 1996). Charakterisiert wurden sie mittels FACS-Analyse anhand ihrer Oberflächenexpression von CD40, einem phänotypischen Merkmal reifer dendritischer Zellen. Um den Einfluss von OPG auf dendritische Zellen zu überprüfen, wurde 10-fach konzentriertes Zellmedium von mit IL-1 β (in einer Konzentration von 5 nM) oder mittels PBS/BSA (Kontrolle) stimulierten XTC-Zellen gewonnen. Wie in Abb. 5 gezeigt, kam es durch IL-1 β in dieser Konzentration zu einem 33-fachen Anstieg der OPG-Proteinsekretion in XTC-Zellen. Zusammen mit diesem Medium wurden die dendritischen Zellen entweder mit oder ohne RANKL (in einer Konzentration von 1 μ m/ml) für 2 Tage bei 37°C inkubiert. RANKL hat sich in dieser Konzentration als Überlebensfaktor dendritischer Zellen *in vitro* erwiesen (Wong et al., 1997).

Die FACS Analyse zeigte bei dendritischen Zellen ohne RANKL, oder konditioniertem Medium ein regelmäßiges Vorkommen der CD40-Expression (Abb. 14A).

Zusammen mit nicht stimuliertem XTC Medium und RANKL, zeigte sich durch die basale OPG-Proteinsekretion der XTC-Zellen eine abgeschwächte CD40-Expression der dendritischen Zellen (Abb. 14B).

Zu einer leichten Abnahme der CD40-Expression kam es jedoch durch das Medium der XTC-Zellen, welche mit IL-1 β konditioniert worden waren und somit einen hohen Anteil löslichen OPGs enthielten. (Abb. 14C).

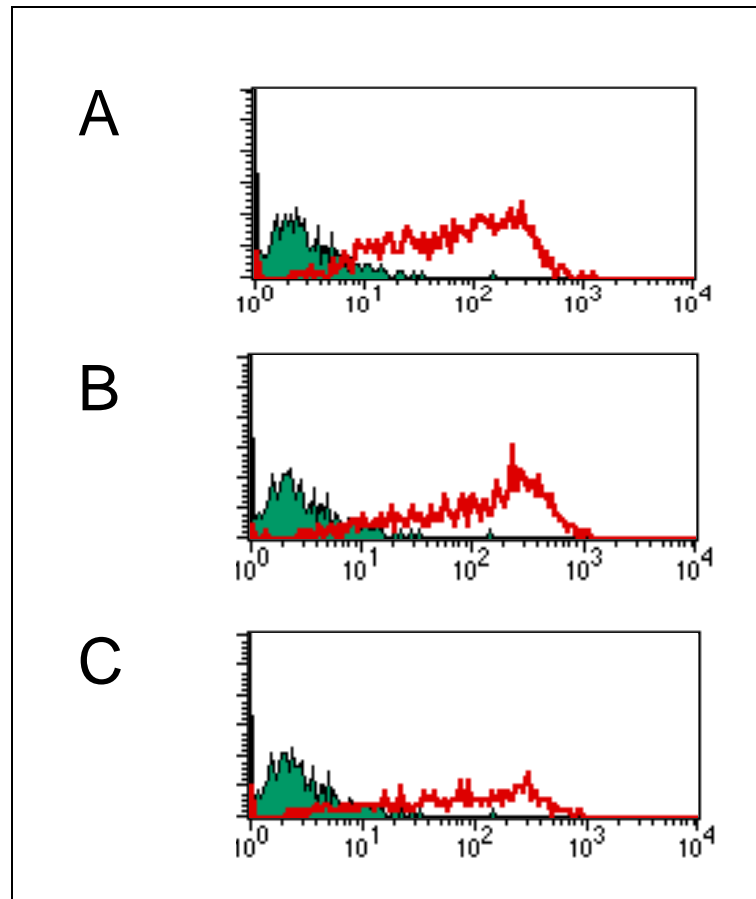
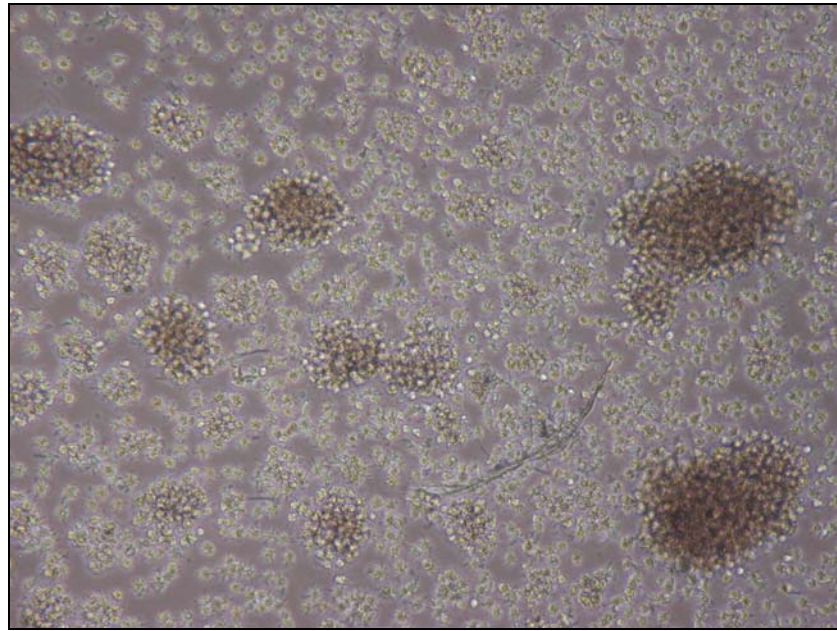


Abb. 14A-C: Einfluss OPG-Protein-haltigen Mediums von XTC-Zellen auf die CD40 Expression dendritischer Zellen.

Die dendritischen Zellen wurden aus peripheren Zellen des Bluts gesunder Probanden differenziert und ihre CD40-Expression mittels FACS Analyse bestimmt. Die y-Achse gibt die relative Zellzahl an, die x-Achse den Logarithmus der Fluoreszenz. **14A:** Die Kontrolle wurde mit nicht konditioniertem Medium durchgeführt und zeigt die basale CD40 Expression der dendritischen Zellen in der Abwesenheit von RANKL und OPG. **14B:** Dargestellt ist die FACS Analyse von dendritischen Zellen, die mit Medium von XTC-Zellen versetzt wurden. Dieses Medium enthält durch basale OPG-Proteinsekretion geringe Mengen an OPG, außerdem war RANKL in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt. **14C:** Das Medium von mit IL-1β behandelten XTC-Zellen enthält hohe OPG-Proteinkonzentrationen, die zu einer verminderten CD40 Expression führen, RANKL wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt.

Zusätzlich bildeten dendritische Zellen, die mit RANKL und nicht stimuliertem XTC Medium (mit PBS/BSA) behandelt worden waren vermehrt Cluster (Abb.15A). Bei denjenigen, die mit Medium von mit IL-1β behandelten XTC-Zellen versetzt wurden, blieb die Clusterbildung fast vollständig aus (Abb.15B)

A



B

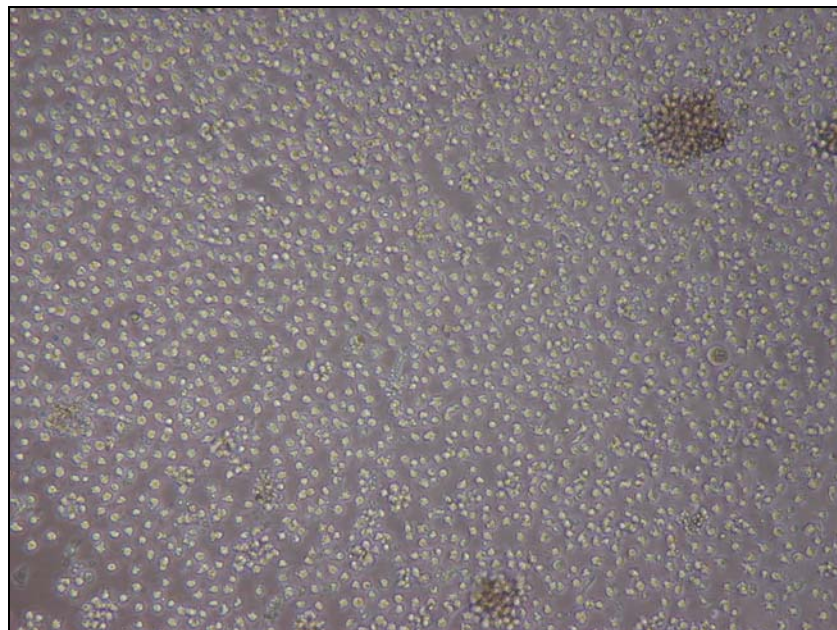


Abb. 15A-B: Veränderung der Zellmorphologie dendritischer Zellen durch Zugabe von OPG-Proteinhaltigem Medium von XTC-Zellen. 15A:

Clusterbildung dendritischer Zellen nach der Behandlung mit Medium von XTC-Zellen. Eine basale OPG-Proteinsekretion führte zu geringeren Konzentrationen von OPG, außerdem war RANKL in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. **15B:** Durch Medium von mit IL-1 β behandelten XTC-Zellen, welche hohe OPG-Proteinkonzentrationen enthalten, zeigte sich eine Hemmung der Clusterbildung.

5. Diskussion

5.1 Intra-und extraskelatale Expression von RANKL und OPG

Störungen im RANKL/OPG-System werden in der Pathogenese von postmenopausaler Osteoporose, Rheumatoider Arthritis, M. Paget, gutartigen und bösartigen Knochentumoren, sowie ossärer Metastasierung angenommen. Ein Mangel an RANKL kann zu Defekten in der B- und T-Zell-Reifung in Form von Lymphknotenagenese und Thymushypoplasie führen (Kong et al., 1999). OPG scheint in der Pathogenese dieser Erkrankungen eine protektive Funktion einzunehmen (Hofbauer et Heufelder., 2001). Am ausführlichsten wurde bis heute das RANK, RANKL und OPG-System in Verbindung mit dem Knochenstoffwechsel untersucht. OPG wird dabei zusammen mit dem löslichen und zellulären RANKL von Osteoblasten sezerniert. Der RANK-Rezeptor wird hingegen von den Osteoklasten exprimiert. Eine Fusion zwischen Ligand und Rezeptor aktiviert die Osteoklasten, sie differenzieren sich, fusionieren, ihre Apoptose wird gehemmt und es kommt zu einer verstärkten Knochenresorption. OPG konkurriert mit RANKL um den RANK-Rezeptor und verhindert dadurch die Interaktion zwischen RANKL und RANK, sodass eine verstärkte Knochenresorption verhindert wird (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998; Hofbauer et al., 2001, 2000; Lacey et al., 1998; Kong et al., 1999). Generell kann sich eine gestörte Balance zwischen Osteoblasten- und Osteoklastenfunktion in skeletalen Abnormalitäten, wie Osteopetrose oder Osteoporose äußern (Simonet et al., 1997).

Um die Expression von OPG- und RANKL-mRNA in verschiedenen endokrinen und nicht endokrinen Geweben zu vergleichen, wurde in dieser Arbeit ein kommerzieller Dot Blot, der Gewebe von Schilddrüse, Niere, Nebenniere, Aorta, Mamma, Lymphknoten, Appendix, Pankreas enthielt, mit OPG und RANKL Proben hybridisiert. Die Northern Blot Analyse zeigte eine hohe OPG-mRNA-Expression in der Aorta, den Nieren sowie eine besonders hohe Expression dreier OPG-mRNA-Spezies in der Schilddrüse (2,9 kb; 4,4 kb; 6,6 kb). Eine geringere OPG-mRNA-Expression wurde zudem in der Lunge, der Plazenta, dem Rückenmark, sowie der fetalen Leber und Niere gefunden. Keinerlei OPG-mRNA-Expression war hingegen im Gehirn, dem Uterus, Ovar und der Skelettmuskulatur nachzuweisen. Die Hybridisierung mit RANKL zeigte eine deutliche Expression von RANKL-mRNA in Lymphknotengewebe, der Appendix und der fetalen Leber. Weit geringere Konzentrationen fanden sich in der Schilddrüse, der Mamma und der Nebenniere. Keinerlei RANKL-mRNA-

Expression zeigte sich im Gehirn, Aorta und Rückenmark. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Wong und Lacey, die eine Expression von RANKL in Lymphknoten, der Milz, dem Thymus, Zonen des aktiven Knochenumbaus, hypertrophen Chondrozyten und aktivierten T-Zellen beschreiben (Wong et al., 1997; Lacey et al., 1998). Fata beschreibt in seiner Arbeit eine Abwesenheit von RANKL in Brustdrüsen nicht-schwangerer Mäuse, deren RANKL-Expression jedoch während einer Schwangerschaft deutlich zunimmt. Dies lässt auf eine Regulation der RANKL-Expression durch Schwangerschaftshormone wie Progesteron, Östrogen und Prolaktin schließen (Fata et al., 2000). Ähnlich wie in dieser Arbeit untersuchte Kartsogiannis extraskeletale Gewebe auf eine RANKL-mRNA und -Proteinexpression, um einerseits den Einfluss außerhalb des Knochenstoffwechsels produzierten RANKL auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen und andererseits potentielle extraskeletale Effekte von RANKL-mRNA und -Protein zu erforschen. Kartsogiannis et al untersuchten die extraskeletale Expression von RANKL-mRNA in verschiedenen Geweben von Mäusen in unterschiedlichen Entwicklungsstufen. Er beschreibt eine geringe Expression in Nieren, Leber, Lunge bei adulten Mäusen, sowie eine deutliche Expression in Gehirn, Herz, Haut und Skelettmuskel bei adulten und embryonalen Mäusen. Bei der Untersuchung der intraskeletalen mRNA-Expression wurde diese bei Osteoklasten verschiedener Spezies, Mensch, Maus und Hase beschrieben (Kartsogiannis et al., 1999). Neuere Untersuchungen zur intraskeletalen OPG- und RANKL-mRNA-Expression und OPG- und RANKL-Proteinsekretion führten Silvestrini et al durch. Dabei untersuchten sie das Vorkommen von OPG- und RANKL-mRNA, sowie eine OPG- und RANKL-Proteinsekretion in Femur und Tibia von Ratten. Im Rahmen ihrer Arbeit konnten sie eine deutliche OPG- und RANKL-mRNA-Expression und Proteinsekretion in Chondrozyten, Osteoblasten und frühen Osteozyten nachweisen (Silvestrini et al., 2005). Eine Arbeit von Komuro et al beschreibt die Wirkungsweise des OPG-RANK-RANKL-Systems in gesundem und arthritischem humanen Knorpelgewebe. So ließ sich mRNA und Protein dieser 3 Zytokine exprimieren und ein Zusammenspiel vergleichbar mit dem Knochenstoffwechsel etablieren (Komuro et al., 2001). Zusammenfassend scheint es sich bei OPG um ein abundant exprimiertes Zytokin zu handeln, welches in hoher Konzentration in verschiedenen skeletalen und nicht-skeletalen Geweben, einschliesslich der Aorta und der Schilddrüse exprimiert wird. Hingegen ist die Expression von RANKL überwiegend auf lymphatische Gewebe begrenzt.

5.2 Wirkung von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen auf das OPG-RANKL-System

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Tatsache, dass Mitglieder der TNF-Liganden- und Rezeptoren-Superfamilie wie TNF/TNFR, Fas/FasL, CD40/CD40L und TRAIL-R/TRAIL als Regulatoren der Differenzierung, Proliferation, Überleben und Apoptose in verschiedenen endokrinen Organen bekannt sind (Smith et al., 1994; Baker et al., 1999). Fas (CD95) gehört zu den ersten beschriebenen Zelloberflächenrezeptoren, die Apoptose auslösen können, damit gehört Fas zu einer TNF-Rezeptorsubfamilie, deren Mitglieder auch als Todesrezeptoren bezeichnet werden (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1998; Peter et al., 1998). Zur Auslösung der Apoptose dient eine intrazelluläre Domäne, die Death Domain genannt wird (Itoh et al., 1993; Tartaglia et al., 1993). Unter physiologischen Bedingungen werden die sogenannten Todesrezeptoren, zu denen auch TRAIL-R1-4; TNF-R1 und CD40 gehören durch die Bindung an ihre spezifischen Liganden aktiviert, die Apoptose wird dann über den Caspase- oder c-jun Kinasesignalweg ausgelöst (Baker et al., 1998). So ist der Ligand von Fas, FasL (CD95L) und kommt sowohl in einer membranständigen, als auch in einer löslichen Form vor (Takahashi et al., 1994; Yu et al., 1999; Kayagaki et al., 1995; Mariani et al., 1995; Takayama et al., 1995). Vornehmlich findet die Expression von FasL in aktivierten T-, B-, und NK-Zellen statt (Krammer et al., 2000). Neben FasL ist TRAIL ein weiteres wichtiges Mitglied der TNF-Liganden-Superfamilie, das den programmierten Zelltod, bzw. die Apoptose auslöst. Ebenso wie FasL oder TNF- α kommt TRAIL in einer löslichen, sowie auch zellgebundenen Form vor. Seine Wirkung vermittelt es über Typ-I Membranrezeptoren, die eine Death Domain enthalten. Dazu gehören unter anderem TRAIL-R1 und TRAIL-R2. (Bretz et al., 1999). Lerner et al stellt in seiner Arbeit die neuen TNF-Liganden und Rezeptoren OPG, RANKL und RANK vor, die eine wichtige Rolle in der Osteoklasten-Biologie spielen (Lerner et al., 2004). Osteoprotegerin (OPG) wurde 1997 von Simonet et al als erstes sezerniertes Mitglied der TNF-Rezeptor (TNFR)-Familie identifiziert (Simonet et al., 1997). Anderson et al und Lacey et al identifizierten Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) bzw. Osteoprotegerin ligand (OPGL) oder TRANCE (Kitazawa et al., 1999), als spezifischen Liganden von OPG im Jahr 1998, hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Mitglied der TNF-Rezeptor und Ligandensuperfamilie (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998), der hauptsächlich von Osteoblasten, Chondrozyten, Mesenchymzellen des Periosts, Osteoklasten, Endothelzellen und T-Zellen sezerniert wird (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998; Wong et

al., 1997; Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999). OPG neutralisiert ebenfalls die biologische Wirkung des TNF-Liganden TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), von aktivierten T-Lymphozyten gebildet, dessen zytotoxische Aktivität Apoptose auslösend ist, wohingegen TRAIL im Gegenzug die anti-osteoklastische Wirkung von OPG blockieren kann (Emery et al., 1998). Die dem TNF verwandten Liganden oder Rezeptoren werden in der Regel, aber nicht zwingend, von aktivierten T-Zellen oder Makrophagen exprimiert und im Verlauf einer T-Zell gesteuerten Immunantwort freigesetzt. Das Zusammenspiel von zueinander passenden Liganden und Rezeptoren, ist entscheidend für eine erfolgreiche Immunantwort, deren Spektrum von zellulärer Reaktion, T-Zell Aktivierung, Proliferation, Differenzierung bis hin zum programmierten Zelltod, der Apoptose, reichen kann (Baker et al., 1998, Armitage et al., 1994). In erster Linie kommen die Liganden als Typ II Membranproteine vor, die auf autokrine, parakrine oder endokrine Weise als membranständige oder lösliche Rezeptoren agieren (Wong et al., 1999). Die dem TNF verwandten Liganden oder Rezeptoren sind Mediatoren der Immunantwort und des Entzündungsprozesses, sie gelten als Schlüsselfaktor für die Osteoklastogenese, sowie als Regulatoren der Lymphozytenentwicklung, außerdem sind sie eng mit der Entstehung von Erkrankungen, vor allem Autoimmunerkrankungen assoziiert (Giordano et al., 1997; Bretz et al., 1999; Ikeda et al., 2001; Yamazaki et al., 2000). Ferner werden sie von intrathyreoidal gelegenen Epithel- und Immunzellen gebildet und haben einen wichtigen Einfluss auf die Schilddrüsenfunktion und -dysfunktion, beispielsweise bei der Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen (Giordano et al., 1997; Bretz et al., 1999; Yamazaki et al., 2000).

Zur Analyse der Effekte proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von RANKL- und OPG-mRNA in der Schilddrüse, wurden die bereits im Ergebnisteil ausführlich beschriebenen XTC-Zellen verwendet. Diese Zellen exprimieren den TSH-Rezeptor, nehmen Jodid auf und sind somit ein gutes Modell für differenzierte folliculäre Schilddrüsenzellen (Zielke et al., 1998).

Die deutlichsten Ergebnisse einer physiologischen Reaktion wurden mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α erzielt. Neben der zuvor schon bestätigten basalen Expression von OPG in XTC-Zellen, konnte IL-1 β die OPG-mRNA-Expression nach einer Exposition von 24 Stunden um mehr als das 20-fache steigern. TNF- α führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der OPG-mRNA-Expression nach 24 stündiger Exposition um das 8-fache. Die RANKL-mRNA-Expression wurde ebenfalls durch IL-1 β und TNF- α

moduliert. Zur Untersuchung der RANKL-mRNA Spiegel wurden die XTC-Zellen für 24h mit IL-1 β und TNF- α in der maximal effektiven Dosis stimuliert. Dabei zeigte sich eine Steigerung der RANKL-mRNA-Expression durch IL-1 β um das Dreifache und durch TNF- α um das Vierfache.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde ein steigender Effekt auf die OPG-mRNA-Expression osteoblastärer Zellen (hFOB, hOB, hMS) durch proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α etwa um das Drei-bis Achtfache gezeigt (Hofbauer et al., 1998, 1999; Brandström et al., 1998, 2001). Page et al untersuchten den steigenden Effekt von IL-1 β und TNF- α in Kombination mit IL-17 auf die RANKL-mRNA-Expression in Synovialzellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Dabei zeigte sich eine deutliche Steigerung der RANKL-mRNA-Expression durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α (Page et al., 2005). Im Gegensatz dazu beschreiben Tomoki et al eine Suppression der OPG-mRNA-Expression osteoblastärer Zellen durch IL-1 β und TNF- α . Dazu trägt jedoch wahrscheinlich das außerdem verwendete 1,25 (OH)2D3/PGE2 bei, welches alleine verwendet einen suprimierenden Effekt auf die OPG-mRNA-Expression osteoblastärer Zellen hat (Tomoki et al., 2000). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigen Collin-Osdoby et al neben einer basalen OPG-und RANKL-mRNA-Expression eine dosis-und zeitabhängige Steigerung der RANKL-und OPG-mRNA durch TNF- α in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC). Durch die Exposition der HMVEC mit TNF- α kam es zu einer signifikanten und dosisabhängigen Steigerung der RANKL-und OPG-mRNA-Expression innerhalb von 24 Stunden. So bewirkte TNF- α in einer Konzentration von 1 bis 10 nM einen Anstieg des OPG-mRNA Levels um mehr als das Fünfundzwanzigfache, und einen Anstieg des RANKL-mRNA Levels um das Fünffache im Vergleich mit der basalen Expression (Collin-Osdoby et al., 2001).

Die stimulierende Wirkung dieser beiden proinflammatorischen Zytokine ließ sich auch auf Proteinebene durch Analyse des Zellkulturmediums von mit IL-1 β oder TNF- α behandelten XTC-Zellen bestätigen. Die durch IL-1 β erzielte Steigerung der OPG-Proteinsekretion betrug dosisabhängig bei einem IL-1 β Gehalt von 5 nM des Mediums das Dreiunddreißigfache. Die OPG-Proteinsekretion konnte in einer zeitabhängigen Weise (nach 24h) durch TNF- α (in Konzentration von 9 nM) um das Vierfache gesteigert werden.

Vergleichbar mit dem Versuchsaufbau dieser Arbeit ist eine Arbeit von Hofbauer et al., welche die OPG-Protein-Produktion von humanen fetalen osteoblastären Zellen untersucht. Dabei wurde das Medium nach einer Stimulation von 48 h bei 39,5°C mit IL-1 β und TNF- α auf eine OPG-Protein-Produktion untersucht. So zeigte sich bei einem IL-1 β Gehalt von 5x10⁻⁹ M eine Steigerung der basalen OPG-Produktion osteoblastärer Zellen um 390%. TNF- α in einer Konzentration von 9x10⁻⁹ bewirkte eine Steigerung der OPG-Protein-Produktion um 300% (Hofbauer et al., 1998).

Die weiteren Analysen dieser Arbeit wurden von der deutlich gezeigten Stimulation der OPG-mRNA-Expression und OPG-Proteinsekretion durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst. Außerdem stand die Verbindung von RANKL, RANK und OPG als Mitglieder der TNF-Liganden und -Rezeptorenfamilie und ihre Funktion bei der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen im Vordergrund. Die Induktion von OPG durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α scheint somit ein ubiquitäres Phänomen zusein, das unabhängig vom Organsystem, der Zellkultur und der Spezies der Untersuchung ist.

5.3 Wirkung von TSH auf die Expression von RANKL und OPG

Neben den proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β wurde mit TSH ein für die Funktion, Proliferation und Differenzierung von follikulären Schilddrüsenzellen entscheidendes Peptidhormon und seine Wirkung auf die OPG- und RANKL-Expression untersucht. XTC-Zellen wurden mit TSH für 24 Stunden bei 37°C stimuliert und ihr OPG-mRNA-Gehalt analysiert. Die Analyse zeigte neben der bereits vorher beschriebenen basalen OPG-mRNA-Expression der XTC-Zellen eine Steigerung der OPG-mRNA-Konzentration durch TSH um das Dreifache.

Gleichermaßen konnte in den Zellkulturüberständen durch die Stimulation mit TSH eine Dreifache Steigerung der OPG-Protein-Sekretion erzielt werden. Zur Validierung der an einem Zellmodell erhobenen Daten dienten humane primäre follikuläre Schilddrüsenzellen. Diese zeigten neben einer basalen OPG-Proteinsekretion eine Stimulation der OPG-Proteinsekretion durch TSH in einer Dosierung von 10 mU um das 1,7-fache. Dies zeigte, dass TSH nicht nur die Differenzierung und das Wachstum von follikulären

Schilddrüsenzellen stimuliert, sondern auch zusätzlich zu einer gesteigerten OPG m-RNA und Proteinsekretion führt. Im Gegensatz zu TNF- α und IL-1 β führte TSH jedoch zu einer Suppression der RANKL-mRNA-Expression von follikulären Schilddrüsenzellen. Somit könnte TSH mit einer Steigerung der OPG-mRNA-Expression und einer Suppression der RANKL-mRNA-Expression einen protektiven Faktor bei steigender Differenzierung von follikulären Schilddrüsenzellen *in vitro* und *in vivo* darstellen. Sowohl von Gori et al als auch von Hofbauer et al wird in ihren Arbeiten zum Knochenstoffwechsel beschrieben, dass die OPG-Produktion mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Osteoblasten ansteigt (Gori et al., 2000), bzw. die OPG-Produktion durch die Faktoren angeregt wird, die die Osteoblastendifferenzierung stimulieren, außerdem wird eine Abnahme der RANKL-mRNA-Konzentration beschrieben (Hofbauer et al., 1998, Gori et al., 2000).

Vergleichend mit der Arbeit von Abe et al lässt sich auch ein direkter Einfluss von TSH auf den Knochenstoffwechsel vermuten. TSH führt durch Abschwächung des JNK/c-jun und NFkappa B Signalweges über RANK-L und TNF- α zu einer Verminderung der Osteoklasten-Formation, Differenzierung und ihrem Überleben, sowie zu einer verminderten Osteoblasten-Differenzierung. Damit werden beide Komponenten des skeletalen Remodelings gleichsam durch TSH gehemmt. (Abe et al., 2003). Wang et al stellt in seiner Arbeit TSH als ein zentrales Hormon in der Hypophysen-Schilddrüsen-Achse dar. Gleichmaßen beschreibt er jedoch auch TSH als ein von Zellen des Immunsystems gebildetes Hormon, das an der Immunantwort beteiligt ist. So stellt er die Fähigkeit von Monozyten aber vor allem auch von dendritischen Zellen dar, biologisch aktives TSH zu produzieren, welches entweder auf eine parakrine oder autokrine Weise eine TSH gesteuerte frühe Immunantwort auslösen kann. (Wang et al., 2001). Ob das RANKL-OPG-System dabei auch eine Rolle spielt, oder ob TSH die Immunantwort unabhängig beeinflusst, könnte Gegenstand weiterführender Analysen sein.

5.4 Regulation von RANKL und OPG durch andere Faktoren

Neben der Auseinandersetzung mit der Wirksamkeit von proinflammatorischen Zytokinen und TSH, beschäftigte sich diese Arbeit auch mit dem Einfluss anderer Faktoren auf die OPG- und RANKL-mRNA-Expression und -Proteinsekretion. Besonderes Augenmerk wurde auf die Glukokortikoide vor allem Dexamethason gerichtet. Als Ausgangspunkt diente vor allem

eine Arbeit von Hofbauer et al, die sich mit der Glukokortikoid-Regulation von OPG und RANKL in humanen osteoblastären Zellen, wie fetalen Osteoblasten (hFOB), primären trabekulären Osteoblasten (hOB) und Osteosarkomzellen (MG-63) beschäftigte (Hofbauer et al., 1999). Als Ergebnis wurde eine Hemmung der OPG-mRNA-Expression durch Glukokortikoide (Dexamethason) in allen verwendeten humanen osteoblastären Zellen (hFOB, hOB, MG-63) beschrieben, wobei die Hemmung der OPG-mRNA-Expression unabhängig von dem Differenzierungsstadium oder der basalen OPG-mRNA-Expression war. Auch erfüllte die Hemmung der OPG-Proteinsekretion die Kriterien einer physiologischen Reaktion. Die RANKL-mRNA-Expression stieg durch den Einfluss von Dexamethason in einer zeit- und dosisabhängigen Weise um das Zwei- bis Vierfache (Hofbauer et al., 1999). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit eine Stimulation der XTC-Zellen mit Dexamethason durchgeführt, die jedoch zu keinem Ergebnis führten (Daten nicht gezeigt).

Von Tomoki et al wurden weitere Osteoklastogenese stimulierende Zytokine und ihr Einfluss auf eine RANKL-OPG-mRNA-Expression sowie -Proteinsekretion osteoblastären Zellen untersucht. Dabei zeigte sich durch IL-6 und IL-11 eine deutliche Steigerung der RANKL-mRNA-Expression, sowie eine Suppression der OPG-mRNA-Expression dieser Zellen. Osteoklastogenese inhibierende Zytokine wie IFN- γ zeigten zwar keinen Effekt auf die OPG-mRNA-Expression, dafür konnte jedoch die RANKL-mRNA-Expression deutlich supprimiert werden (Tomoki et al., 2000). Die daraufhin in dieser Arbeit durchgeführte Stimulation der XTC-Zellen mit IL-6 und IFN- γ konnte keine Ergebnisse einbringen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ließ sich in der hier vorliegenden Arbeit eine gleichsinnige Stimulation der OPG- und RANKL-mRNA-Expression und Proteinsekretion in osteoblastären Zellen und Schilddrüsenzellen nur durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α hervorrufen.

5.5 OPG-mRNA-Expression in Schilddrüsen-Präparaten von Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen

Die bis dahin erhobenen Daten wurden ausschließlich unter *in vitro* Bedingungen erhoben, deshalb wurde anschliessend zur Überprüfung der möglichen klinischen Relevanz dieser Befunde die OPG-mRNA-Expression unter *in vivo* Bedingungen in humanem Gewebe

untersucht. Dazu dienten Schilddrüsenresektate von Patienten mit Morbus Basedow, Hashimoto-Thyreoiditis, Jodmangelstruma oder autonomem Adenom. Morbus Basedow ist eine autoimmune Schilddrüsenerkrankung, die durch Hyperthyreose und Strumabildung charakterisiert wird (Baker et al 1997). Verantwortlich für die Pathogenese sind TSH-Rezeptor-Antikörper, die von B-Zellen gebildet werden. Hashimoto-Thyreoiditis ist eine meist auf die Schilddrüse beschränkte Autoimmunerkrankung, die sich durch eine Destruktion der Schilddrüse mit Entwicklung einer Hypothyreose bemerkbar macht. Durch Anti-Thyreoglobulin Antikörper und Anti-Thyreoid-Peroxidase Antikörper kommt es zu einer Hypothyreose (Baker et al., 1997). Vor allem bei der Hashimoto-Thyreoiditis findet sich eine lymphozytäre Infiltration der Schilddrüse (Yamazaki et al., 2000).

Zahlreiche Arbeiten deuten darauf hin, dass die Apoptose eine entscheidende Rolle in der Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen spielt. Als Auslöser der Apoptose in der Schilddrüse gelten vor allem die TNF-Rezeptoren und -Liganden Familienmitglieder Fas und FasL, sowie TRAIL mit seinen Rezeptoren. Bei der Hashimoto-Thyreoiditis führen unter anderem Fas- und FasL-Interaktionen in Thyreozyten zur Apoptose und somit zum klinischen Bild der Hypothyreose. In Schilddrüsen von an Morbus Basedow erkrankten Patienten scheint die Fas-Expression supprimiert zu werden, was sich in einem antiapoptotischen Effekt und Strumabildung äußert (Giordano et al., 1997). TRAIL führt in der Schilddrüse gleichermaßen zur Apoptose, wobei TRAIL sowohl von intrathyreoidalen Lymphozyten als auch von mit den proinflammatorischen Zytokinen stimulierten follikulären Schilddrüsenzellen exprimiert wird (Bretz et al., 1999). Da RANKL ein Rezeptor von TRAIL ist und RANKL und OPG auch zur Familie der TNF-Liganden und -Rezeptoren gehören, wurde in dieser Arbeit das Vorkommen von OPG-mRNA und OPG-Protein in Schilddrüsenresektaten von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen untersucht. Die Analyse von Schilddrüsenresektaten bei Morbus Basedow zeigte eine drei bis vierfach höhere OPG-mRNA-Expression als die bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis, autonomem Adenom oder Jodmangel Struma. OPG wird *in vivo* bei Patienten mit Morbus Basedow überexprimiert und genau diese Patienten überexprimieren auch $IL-1\beta$ und $TNF-\alpha$, die *in vitro* zu den stärksten Stimulantien für eine OPG-Produktion gelten. Hypothetisch könnte also OPG als Immunmodulator bei an Morbus Basedow Erkrankten gelten, so dass sich ein Teilaspekt der Pathogenese durch ein Ungleichgewicht zwischen dem OPG- und RANKL-System erklären würde (siehe Abb. 16).

5.6 Dendritische Zellen als Zielzellen für das RANKL-OPG-System

Dendritische Zellen exprimieren den RANK-Rezeptor (Anderson et al., 1997; Josien et al., 2000; Kong et al., 2000). Von Wong et al und Josien et al wurden bereits 1997 bzw. 1999 Einflüsse des RANKL-OPG-Zytokinsystems auf dendritische Zellen beschrieben (Wong et al., 1997; Josien et al., 1999). In einer Arbeit von Caux wird besonders auf die Rolle der TNF-Liganden-und -Rezeptoren-Familie in der Physiologie dendritischer Zellen eingegangen. So bewirken TNF- α und FasL beim Menschen eine Differenzierung dendritischer Zellen von CD34⁺ Vorläuferzellen des Knochenmarks (Caux et al., 1996; Szaboles et al., 1995). Dendritische Zellen kommen als unreife Zellen in fast allen Geweben vor, sie nehmen Antigene auf, prozessieren sie und wandern als reife Zellen zu den T-Zellzonen der sekundären lymphatischen Organe, wo sie die Antigene den T-Zellen präsentieren (Kong et al., 2000; Banchereau et al., 1998; Grouard et al., 1997). Die aktivierten T-Zellen induzieren nun die Apoptose der dendritischen Zellen durch die Produktion proapoptotischer Faktoren wie TRAIL und FasL. Besonders TRAIL, ein TNF-Familienmitglied, hat einen proapoptotischen Effekt auf dendritische Zellen (Kong et al., 2000; Ingulli et al., 1997). Möglicherweise soll die kurze Lebensdauer reifer dendritischer Zellen exzessive Immunantworten vermeiden (Kong et al., 2000). *In vitro* kann die rasche Apoptose reifer dendritischer Zellen, durch eine Behandlung mit RANKL, CD40L oder TNF- α , welche von aktivierten T-Zellen exprimiert werden, verlangsamt werden. Dies weist darauf hin, dass ein ausgeglichenes Zusammenspiel zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen unerlässlich für eine funktionierende Immunantwort ist (Wong et al., 1997). Reife dendritische Zellen exprimieren den RANK-Rezeptor. Durch Stimulation des Anti-Apoptosemoleküls Bcl-XL fungiert RANKL bei Ligation mit dem RANK-Rezeptor als Überlebensfaktor für dendritische Zellen (Wong et al., 1997), vielmehr kooperiert RANKL mit CD40L, um das Überleben der dendritischen Zellen zu sichern (Josien et al., 1999; Anderson et al., 1997). Während RANKL antiapoptotische Effekte auf dendritischen Zellen ausübt, fungiert OPG als sezernierter Rezeptor, der sämtliche RANKL-Formen kompetitiv bindet und auf diese Weise die biologische Wirkung von RANKL neutralisiert, bzw. antagonisiert (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b; Wong et al., 1997; Josien et al., 1999; Kong et al., 2000). Dieses wurde von Simonet et al sowohl in der Osteogenese zwischen Osteoklasten und Osteoblasten, OPG blockiert *in vitro* die Osteoklastogenese in einer dosiabhängigen Weise (Simonet et al., 1997), als auch im Immunsystem, OPG als Modulator für Interaktionen zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen, angenommen. Dendritische Zellen kommen unter physiologischen

Bedingungen in der Schilddrüse vor. Durch die Präsentation intrathyreoidaler Autoantigene werden chronische Autoimmun- und Entzündungsprozesse aufrechterhalten (Weetmann et al., 2000). Mit dieser Arbeit wurde ein parakriner Wirkmechanismus von in der Schilddrüse gebildetem OPG deutlich gemacht. Als Ausgangspunkt dienten die Ergebnisse von Wong et al., der den RANK-Rezeptor auf reifen dendritischen Zellen des Knochenmarks, auf dendritischen Zellen der Lymphknoten, sowie dendritischen Zellen der Milz darstellte. Es wurde gezeigt, dass RANKL die Oberflächenexpression von CD40, ein Expressionsmarker dendritischer Zellen, auf reifen dendritischen Zellen induziert, andere Faktoren wie CD80, CD86 oder Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, CD11b oder CD11c aber unbeeinflusst lässt (Wong et al., 1997).

Um die biologische Aktivität von OPG und RANKL zu testen, wurde in dieser Arbeit der Effekt von OPG und RANKL auf die Funktion und Morphologie dendritischer Zellen untersucht. Die dendritischen Zellen wurden nach etablierter Methode gewonnen. Mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) wurde die Oberflächenexpression von CD40 analysiert. Um den Einfluss von OPG auf dendritische Zellen zu überprüfen, wurde konzentriertes Zellmedium von mit IL-1 β oder mittels PBS/BSA stimulierten XTC-Zellen, im Weiteren nur noch Kontrolle genannt, gewonnen. Wie schon vorher gezeigt wurde, kam es durch IL-1 β in dieser Konzentration zu einem 33-fachen Anstieg der OPG-Proteinsekretion in XTC-Zellen. Zusammen mit diesem Medium wurden die dendritischen Zellen entweder mit oder ohne RANKL inkubiert. Nach Ergebnissen von Wong et al. hat sich RANKL in dieser Konzentration als Überlebensfaktor dendritischer Zellen *in vitro* erwiesen (Wong et al., 1997).

Die FACS Analyse zeigte bei dendritischen Zellen ohne RANKL, oder Kontrolle, eine CD40-Expression. Zusammen mit Kontrolle und RANKL, zeigte sich durch die basale OPG-Proteinsekretion der XTC-Zellen eine abgeschwächte CD40-Expression der dendritischen Zellen. Zu einer eindeutigen Abnahme der CD40-Expression kam es jedoch durch das Medium der XTC-Zellen, welche mit IL-1 β konditioniert worden waren und entsprechend hohe OPG-Konzentrationen aufwies.

Übereinstimmend mit der Arbeit von Wong et al. bildeten die dendritischen Zellen vermehrt Cluster, die mit RANKL und mit Kontrolle (PBS/BSA) behandelt worden waren. In seiner Arbeit beschreibt er eine dichte Clusterbildung von mit RANKL behandelten dendritischen Zellen und eine eher spärliche Clusterbildung in der Abwesenheit von RANKL (Wong et al.,

1997). Bei denjenigen dendritischen Zellen, die mit Medium von mit IL-1 β behandelten XTC-Zellen versetzt wurden, blieb die Clusterbildung fast vollständig aus da das Medium eine hohe OPG-Konzentration aufwies. Zusammenfassend ist also von Thyreozyten gebildetes OPG biologisch aktiv und in der Lage RANKL-Effekte auf dendritischen Zellen zu beeinflussen. Diese parakrine Interaktion könnte einen lokalen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase dendritischer Zellen innerhalb der Schilddrüse darstellen. In Schilddrüsen von Patienten mit Morbus Basedow, könnte die erhöhte Aktivität dendritischer Zellen für eine vermehrte Produktion von TSH-Autoantikörpern und proinflammatorischen Zytokinen, also TNF- α und IL-1 β verantwortlich sein (Weetmann et al., 2000). Bei an Morbus Basedow erkrankten Patienten steigt die intrathyreoidale OPG-Gen- und Proteinexpression am ehesten infolge der lokal überproduzierten proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β an (Baker et Fosso., 1993; Weetmann et al., 1997; Rasmussen et al., 2000), so dass angenommen werden kann, dass OPG die Aktivität und Funktion der dendritischen Zellen kontrolliert (Baker et Fosso., 1993; Weetmann et al., 1997; Paolierit et al., 1999; Rasmussen et al., 2000). Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, zeigt sich, dass die Schilddrüse gleichsam ein Ort der Produktion, sowie auch ein Zielorgan des OPG/RANKL-Systems ist. RANKL und OPG werden von follikulären Schilddrüsenzellen gebildet, von proinflammatorischen Zytokinen reguliert und scheinen die Aktivität und Funktion dendritischer Zellen zu beeinflussen. Beide sind Teil einer wichtigen lokalen Immunregulation, die maßgeblich an der Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen beteiligt zu sein scheint.

6. Zusammenfassung

Die Aufgabe der für die Immunantwort und den Knochenstoffwechsel entscheidenden TNF-Liganden und Rezeptoren-Familienmitglieder RANKL, OPG und RANK war in der Pathophysiologie und Physiologie der Schilddrüse lange ungeklärt. Mit dieser Arbeit wurde die Schilddrüse als ein an OPG-mRNA, RANKL-mRNA und OPG-Protein reiches Organ identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine basale Expression von RANKL-mRNA und OPG-mRNA, sowie eine basale Sekretion von OPG-Protein in follikulären Schilddrüsenzellen. Die Analyse der Effekte von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen auf die Expression von OPG und RANKL in follikulären Schilddrüsenzellen erfolgte mit IL-1 β und TNF- α . Die Versuche mit diesen beiden proinflammatorischen Zytokinen zeigten die deutlichsten Zeichen einer physiologischen Reaktion. Die stimulierende Wirkung dieser beiden Zytokine auf die RANKL- und OPG-Expression konnte sowohl auf Genexpressions-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Stimulation mit anderen Substanzen wie Glukokortikoiden oder Interferon führte am Zellmodell mit XTC-Zellen und an follikulären Schilddrüsenzellen im Rahmen dieser Untersuchungen zu keinen Ergebnissen. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Wirkung des für die Funktion, Proliferation und Differenzierung von follikulären Schilddrüsenzellen entscheidenden Peptidhormons TSH auf die OPG- und RANKL-Expression untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Steigerung der OPG-Expression auf zellulärer und Proteinebene durch TSH. Demgegenüber wurde jedoch eine Suppression der RANKL-Expression durch das Peptidhormon TSH verzeichnet.

Um den Einfluss von OPG und RANKL auf die Pathophysiologie der Schilddrüse zu untersuchen, bzw. ihren Beitrag zur Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen zu analysieren, wurde in dieser Arbeit der parakrine Effekt von OPG und RANKL auf die Funktion und Morphologie dendritischer Zellen anhand ihrer CD40-Expression und Clusterbildung untersucht.

Dabei zeigte sich, dass RANKL zu einer Zunahme der CD40-Expression und Clusterbildung führte, wohingegen OPG die CD40-Expression und Clusterbildung verminderte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Schilddrüse sowohl ein Ort der Produktion, als auch ein Zielorgan des OPG/RANKL-Zytokin-Systems ist. RANKL und OPG werden von folliculären Schilddrüsenzellen produziert, sie werden moduliert durch proinflammatorische und immunmodulatorische Zytokine und haben Einfluss auf die Funktion von dendritischen Zellen. Dies lässt auf ein lokales immunmodulatorisches System schließen, das in der Pathogenese von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

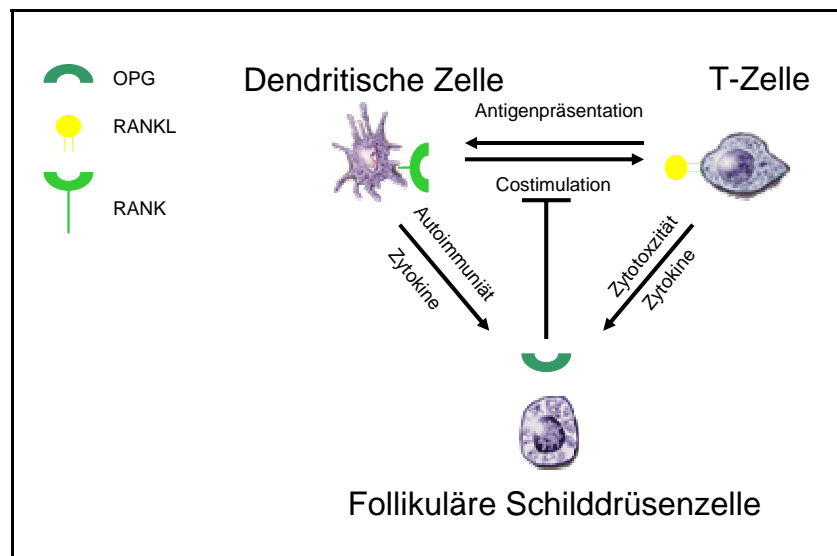


Abb. 16: OPG als Immunmodulator der Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen

7. Literaturverzeichnis

Abe E, Mariani RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, Iqbal J, Eldeiry L, Rajendren G, Blair HC, Davies TF, Zaidi M. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell* 2003;115:151-162.

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

Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic cell function. *Nature* 1997;390:175-179.

American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *Bone* 2000;27:761-764.

Bachmann MF, Wong BR, Josien R, Steinman RM, Oxenius A, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* 1999;189:1025-1031.

Bagriacik EU, Klein JR. The thyrotropin (thyroid stimulating hormone) receptor is expressed on dendritic cells and on a subset of CD45Rb high lymph node T cells function role for thyroid-stimulating hormone during immune activation. *J Immunol* 2000;164:6158-6165.

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

Baker JR. Dying (apoptosing?) for a consensus on the Fas death pathway in the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2593-2595.

- Baker JR, Fosso CK. Immunological aspects of cancer arising from thyroid follicular cells. *Endocr Rev* 1993;14:729-746.
- Banchereau J, Steinmann RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
- Bretz JD, Arscott PL, Myc A, Baker JR. Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. *J Biol Chem* 1999;274:25433-25438.
- Bretz JD, Rymaszewski M, Arscott PL, Myc A, Ain KB, Thompson NW, Baker JR. TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. *J Biol Chem* 1999;274:23627-23632.
- Capparelli C, Kostenuik PJ, Morony S, Starnes C, Weimann B, Van G, Scully S, Qi M, Lacey DL, Dunstan CR. Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 2000;60:783-787.
- Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:20659-20672.
- Diamond FB Jr, Shulman DI, Lacson A, Casadonte J, Favara B. Atypical dendritic cell-related histiocytosis with goiter and primary hypothyroidism. *J Pediatr* 1998;132:357-360.
- Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412-2424.
- Drexhage HA, Mooy P, Jansen A, Kerrebijn J, Allaerts W, Tas MP. Dendritic cells in tumor growth and endocrine diseases. *Adv Exp Med Biol* 1993;329:643-650.

- Emery JG, McDonnell P, Brigham Burke M, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273:14363-14367.
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41-50.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochemistry* 1983;132:6-13.
- Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998;273:34120-34127.
- Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997;275:960-963.
- Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000;141:4768-4776.
- Green EA, Flavell RA. TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J Exp Med* 1999;189:1017-1020.
- Grubeck-Loebenstein B, Buchan G, Sadeghi R, Kissonerghis M, Londey M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H. Transforming growth factor β regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter. *J Clin Invest* 1989;83:764-770.

- Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG, et al. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J Pathol* 1997;182:138-144.
- Hart DNJ. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997;90:3245-3287.
- Harth DNJ, Fabres JW. Demonstration and characterization of Ia-positiv Dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981;153:347-361.
- Hirokawa M, Shimizu M, Manabe T, Sonoo H, Harada T. S-100+ protein positive dendritic cells in follicular lesions of the thyroid. *APMIS* 1998;106:704-708.
- Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:776-781.
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla 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* 1999;140:4382-4389.
- Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;25:255-259.
- Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 1999;141:195-210.
- Hofbauer LC, Khosla S, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.

- Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2355-2363.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-253.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Serum measurement of osteoprotegerin-clinical relevance and potential applications. *Eur J Endocrinol* 2001;145:681-683.
- Honore P, Luger NM, Sabino MAC, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, O'keefe PF, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nature Med* 2000;5:521-528.
- Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001;142:1419-1426.
- Ingulli E et al. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;185:2133-2141.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993;268:10932
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-243.
- Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* 1999;162:2562-2568.

- Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaia M, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2000;191:495-502.
- Kabel PJ, Voorbij HA, De Haan M, van der Gaag RD, Drexhage HA. Intrathyroidal Dendritic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:199-207.
- Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JMW, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999;25:525-534.
- Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S. Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 1996;137:3163-3169.
- Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S. Modulation of Fas-mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves disease and idiopathic myxoedema. *Clin Exp Immunol* 1997;110:434-439.
- Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995;182:1777-1783.
- Kitahama S, Iitaka M, Shimizu T, Serizawa N, Fukasawa N, Miura S, Kawasaki S, Yamanaka K, Kawakami Y, Murakami S, Ishii J, Katayama S. Thyroid involvement by malignant histiocytes of Langerhans cell type. *Clin Endocrinol* 1996;45:357-363.
- Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochem Biophys Acta* 1999;1445:134-141.

- Knight SC, Farrant J, Chan J, Bryant A, Bedford PA, Bateman C. induction of Autoimmunity with Dendritic cells: studies on thyroiditis in Mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1988;48:277-289.
- Komuro H, Olee T, Kuhn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, Valbracht J, Creighton-Acherman L, Lotz M. The Osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor κ B/receptor activator of nuclear factor κ B ligand system in cartilage. *Arthritis Rheum* 2001;44:2768-2776.
- Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H-L, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliviera-Dos Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315-323.
- Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-309.
- Kong Y-Y, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand:A regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 2000;21:495-502.
- Kostenuik PJ, Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol* 2005;Sep 23
- Kwon BS, Wang S, Udagawa N, Haridas V, Lee ZH, Kim KK, Oh K-O, Greene J, Li Y, Su J, Gentz R, Aggarwal BB, Ni J. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J* 1998;12:845-854.

- Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian Y-X, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 1977;16:4743-4751.
- Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilie with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:61-81.
- Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlöndorff J, Tempst P, Choi Y, Blobel CP. Evidence for a role of a tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 1999;274:13613-13618.
- Mariani SM, Matiba B, Baumler C, Krammer PH. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol* 1995;25:2303-2307.
- Meinkoth J, Wahl G. Hybridisation of nucleic acid immobilized on solid supports. *Anal Biochemistry* 1984;138:267-284.
- Nagaya T, Fujieda M, Otsuka G, Yang JP, Okamoto T, Seo H. A potential role of activated NF- κ B in the pathogenesis of euthyroid sick syndrom. *J Clin Invest* 2000;106:393-402.
- Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P. Molecular structure of the human cytoplasmatic beta-actin gene:interspecies homology of sequences in introns. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1985;82:6133-6137.

- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Egucji K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:768-775.
- Oehm A, Behrmann I, Falk, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992;267:10709-10715.
- Page G, Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum* 2005;52:2307-2312
- Palazzo FF, Hammond LJ, Goode AW, Mirakian R. Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump? *Thyroid* 2000;10:561-572.
- Paolierit F, Salmaso C, Battifora M, Montagna P, Pesce G, Bagnasco M, Richiusa P, Galluzzo A, Giordano C. Possible pathogenetic relevance of interleukin-1 β in “destructive” organ-specific autoimmune disease (Hashimoto’s thyroiditis). *Ann NY Acad Sci* 1999;876:221-228.
- Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel FC, Krammer PH. The death receptors. In apoptosis, problems and diseases. S. Kumar, editor. Heidelberg: Springer 1998:25-63.
- Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev* 1999;20:100-108.
- Rasmussen AK, Bentzen K, Feldt-Rasmussen U. Thyrocyte interleukin-1 interactions. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108:67-71.

- Rogers A, Eastell R. Circulating Osteoprotegerin (OPG) an receptor activator for NF kappa B ligand (RANKL): clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;Aug 16.
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibel B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;137-151.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1994; 179:1109-1118.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds.). *Molecular cloning:a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Scarpino S, Stoppacciaro A, Ballerini F, Marchesi M, Prat M, Stella MC, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A, Ruco LP. Papillary carcinoma of the thyroid: hepatocyte growth Factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells. *Am J Pathol* 2000;156:831-837.
- Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri N, Monnazi P, Tremante E, Sardella D, Bonucci E. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Histol* 2005;36:59-67.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Amgen EST Program, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.

- Simons PJ, Delemarre FGA, Drexhage HA. Antigen-presenting Dendritic cells as regulators of the growth of thyrocytes: a role of Interleukin-1 β and Interleukin-6. *J Endocrinol* 1998;139:3148-3156.
- Simons PJ, Delemarre FGA, Jeucken J, Drexhage HA. Pre-autoimmune thyroid abnormalities in the biobreeding diabetes-prone (BB-DP) rat: a possible relation with the intrathyroid accumulation of dendritic cells and the initiation of thyroid autoimmune response. *J Endocrinol* 1998;157:43-51.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, coactivation, and death. *Cell* 1994;76:959-962.
- Song K. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 2000;191:1095-1104.
- Steinbrink K, Woelfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10 treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159:4772-4780.
- Steinmann RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-215.
- Tamaru M, Matsuura B, Miyauchi S, Onji M. Dendritic cells produce interleukin-12 in hyperthyroid mice. *J Endocrinol* 1999;141:625-629.
- Tanaka S, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EBMO J* 1995;14:1129-1135
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845-853.
- Thomas PS. Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1980;77:5201-5205.

- Tsuda E, Goto M, Mochizuki S-I, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:137-142.
- Trauth BC, Klas C, Paters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989;245:301-305.
- Weetman AP. Grave's disease. *N Engl J Med* 2000;343:1236-1248.
- Weetman AP, Ajjan RA, Watson PF. Cytokines and Grave's disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1997;11:481-497.
- Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997;185:317-328.
- Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. 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* 1997;186:2075-2080.
- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orliniek J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997; 272:25190-25194.
- Xu J, Tan JW, Huang L, Gao XH, Laird R, Liu D, Wysocki S, Zheng MH. Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of NF- κ B ligand. *J Bone Miner Res* 2000;15:2178-2186.
- Yamakawa M, Yamada K, Orui H, Tsuge T, Ogata T, Dobashi M, Imai Y. Immunohistochemical analysis of dendritic/Langerhans cells in thyroid carcinoma. *Anal Cell Pathol* 1995;8:331-343.

- Yamakawa M, Kato H, Takagi S, Karube Y, Seki K, Imai Y. Dendritic cells in various human thyroid diseases. *In Vivo* 1993;7:249-256.
- Yamazaki H, Bretz JD, Arscott PL, Baker JR. Apoptosis and the thyroid: The biology and potential implications for thyroid disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2000;7:260-264.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki S-I, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-1337.
- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989;169:1747-1756.
- Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Kwon BS. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:13733-13736.
- Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol* 1998;161:6113-6121.
- Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, Rafferty KL, Marshall AJ, Moon JJ, Ewings ME, Mohaupt M, Herring SW, Clark EA. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol* 2001;166:1482-1491.
- Zal T, Volkmann A, Stockinger B. Mechanism of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 1994;180:2089-2099.

Zielke A, Tezelman S, Jossart GH, Wong M, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hürthle cell origin. *Thyroid* 1998;8:475-483.

Zielke A, Hoffmann S, Plaul U, Duh QY, Clark OH, Rothmund M. Pleiotropic effects of thyroid stimulating hormone in a differentiated thyroid cancer cell line. Studies on proliferation, thyroglobulin secretion, adhesion, migration, and invasion. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107:361-369.

8. Abkürzungsverzeichnis

CD40	Cluster of differentiation 40
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
HT	Hashimoto Thyreoiditis
hFOB	fetale humane Osteoblasten Zelllinie
hOB	humane Osteoblasten
hMS	immortalisierte humane Knochenmarkzellen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MB	Morbus Basedow
mRNA	messenger ribonukleinacid
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
ODF	Osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin Ligand
PGE2	Prostaglandin E2
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
TRH	thyrotropin releasing hormone
TSH	Thyreostimulierendes Hormon (Thyrotropin)
XTC	Oxyphilic (Hürthle) thyroid cancer cell

9. Anhang

9.1 Danksagung

Für die erfolgreiche Durchführung dieser experimentellen Untersuchungen war die Förderung und Hilfestellung zahlreicher Personen Grundlage. Mehrere Institutionen der Philipps-Universität Marburg/Lahn waren mit großem Interesse beteiligt und leisteten sowohl personell als auch materiell große Hilfe. Im Einzelnen möchte ich Herrn PD Dr. Andreas Zielke von der Klinik für Visceral-, Thorax-und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg für die Herstellung und Bereitstellung der Zellkulturen und Präparate hervorheben. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Michael Schoppet für die Zellpräparate der dendritischen Zellen und seine Unterstützung bei deren Bearbeitung. Des Weiteren danke ich den Medizinisch-Technischen-Assistentinnen, Frau Svaanhild Fischer(+) und Frau Manuela Kauß für ihre tatkräftige Mithilfe und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Experimente.

Herrn Prof. Rudolf Arnold, Direktor der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel der Philipps-Universität Marburg, danke ich sehr dafür, dass er mir für diese Arbeit die Einrichtungen seines Institutes zur Verfügung stellte.

Es ist mir ein besonderer Wunsch dem Initiator dieser Arbeit, Herrn PD Dr. Lorenz Hofbauer an dieser Stelle sehr herzlich für die stets wohlwollende, geduldige und dauerhafte Unterstützung zu danken.

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Behr, Bertalanffy, Bien, Daut,
Eilers, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Görg C., Görg K., Gotzen, Griss, Grzeschik,
Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Höffken, Hofbauer, Hofmann, Jones,
Jungclas, Kern, Klenk, Klose, Koolman, Kretschmar, Krieg, Kroll, Lammel,
Lang, Lennartz, Leppek, Lill, Löffler M., Lorenz, Maisch, Moll, Moosdorf,
Müller, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Röhm,
Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schwarz, Seitz, Seyberth, Siegel,
Steiniger, Sturm, Sundermeyer, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Walter, Weihe,
Werner, Westermann, Wulf

In Traunstein:

Biedermann, Bürger, Ketterl, Klein, Kohl, Kreuzmeier, Mooshage, Schafbauer, Sokiranski,
Zucker