

Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg
Standort Marburg



Regulation von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor activator of
nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in humanen
Schilddrüsenkarzinomzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von Nele Brulez aus Kiel

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 21.09.06.

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: PD Dr. L. C. Hofbauer

Korreferent: PD Dr. G. Jaques

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1. Klinische Aspekte des Schilddrüsenkarzinoms | 4 |
| 1.1.1. Epidemiologie | 4 |
| 1.1.2. Ätiologie | 5 |
| 1.1.3. Symptome | 6 |
| 1.1.4. Histologische Einteilung | 7 |
| 1.1.5. Diagnostik | 8 |
| 1.1.6. Therapie | 8 |
| 1.1.7. Prognose | 9 |
| 1.2. Osteoprotegerin (OPG), Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) und Receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) | 10 |
| 1.2.1. Osteoprotegerin (OPG) | 10 |
| 1.2.2. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) | 12 |
| 1.2.3. Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) | 13 |
| 1.2.4. Interaktionen von RANKL und OPG | 14 |
| 2. Fragestellung | 21 |
| 3. Material und Methoden | 22 |
| 3.1. Material | 22 |
| 3.1.1. Reagenzien und Verbrauchsmaterial | 22 |
| 3.1.2. Geräte | 23 |
| 3.1.3. Puffer und Standardlösungen | 23 |
| 3.1.4. Zellen | 25 |
| 3.2. Methoden | 26 |
| 3.2.1. Zellkultur | 26 |
| 3.2.2. Isolierung der OPG-mRNA aus Schilddrüsenkarzinomzellen | 26 |
| 3.2.3. Photometrische RNA-Quantifizierung | 28 |
| 3.2.4. Northern-Gelelektrophorese und Northern-Blot | 28 |
| 3.2.5. Radioaktive Markierung der cDNA (Random Priming) | 30 |
| 3.2.6. Hybridisierung | 31 |
| 3.2.7. Entfernung radioaktive Probe | 32 |
| 3.2.8. OPG-ELISA | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Ergebnisse | 35 |
| 4.1. Nachweis von OPG in der Schilddrüse | 35 |
| 4.2. Nachweis von OPG und RANKL in Schilddrüsenkarzinomzellen | 36 |
| 4.3. Regulation von OPG durch Sexualhormone | 38 |
| 4.3.1. Regulation von OPG durch Östrogene | 38 |
| 4.3.2. Regulation von OPG durch 5 α -Dihydrotestosteron und Testosteron | 40 |
| 4.3.3. Regulation von OPG durch Dehydroepiandrosteron | 42 |
| 4.4. Regulation von OPG durch Glukokortikoide | 45 |
| 4.5. Regulation von OPG durch Medikamente | 47 |
| 4.5.1. Regulation von OPG durch Cycloheximid | 46 |
| 4.5.2. Regulation von OPG durch Lovastatin | 48 |
| 4.6. Regulation von OPG durch Zytokine | 50 |
| 5. Diskussion | 51 |
| 5.1. Bedeutung des OPG/RANKL-Systems bei Malignomen | 51 |
| 5.2. Regulation von OPG durch Steroidhormone | 54 |
| 5.2.1. Regulation von OPG durch Östrogene und Phytoöstrogene | 54 |
| 5.2.2. Regulation von OPG durch Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron | 59 |
| 5.2.3. Regulation von OPG durch Dehydroepiandrosteron | 60 |
| 5.2.4. Regulation von OPG durch Glukokortikoide | 62 |
| 5.3. Regulation von OPG durch Medikamente | 63 |
| 5.3.1. Regulation von OPG durch Cycloheximid | 63 |
| 5.3.2. Regulation von OPG durch Lovastatin | 63 |
| 5.4. Regulation von OPG durch Zytokine | 66 |
| 6. Zusammenfassung | 67 |
| 7. Literaturverzeichnis | 69 |
| 8. Anhang | 89 |
| 8.1. Lebenslauf | 89 |
| 8.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer | 91 |
| 8.3. Danksagung | 92 |
| 8.4. Eidesstattliche Erklärung | 93 |

Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| DC | Dendritische Zelle (Dendritic Cell) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid) |
| ER | Östrogenrezeptor (Estrogen receptor) |
| IL | Interleukin |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid) |
| NF- κ B | Nuclear factor- κ B |
| OCIF | Osteoclastogenesis inhibitory factor |
| ODF | Osteoclast differentiation factor |
| OPG | Osteoprotegerin |
| OPGL | Osteoprotegerin ligand |
| PTH | Parathormon |
| PTHrP | Parathyroid hormone-related peptide |
| RANK | Receptor activator of NF- κ B |
| RANKL | Receptor activator of NF- κ B ligand |
| TACE | TNF- α -converting enzyme-like protease |
| TGF- β | Transforming growth factor- β |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TNFR | Tumor necrosis factor receptor |
| TRAF | Tumor necrosis factor receptor-associated factor |
| TRAIL | TNF-related apoptosis-inducing ligand |
| TRANCE | TNF-related activation-induced cytokine |
| TRAP | Tartrat-resistente saure Phosphatase (Tartrate-resistant acidic phosphatase) |

1. Einführung

1.1. Klinische Aspekte des Schilddrüsenkarzinoms

1.1.1. Epidemiologie

Die malignen Schilddrüsentumoren zählen zu den selteneren Krebserkrankungen, sie machen einen Anteil von 1-2% an allen diagnostizierten Malignomen aus (Farahati et al., 2004). Die Inzidenz des Schilddrüsenkarzinoms liegt bei ca. 9/100000 pro Jahr (Kasper et al., 2005). Es erkranken geschätzt ca. 4500 Personen pro Jahr in Deutschland neu an einem Schilddrüsenkarzinom (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004), davon sind ca. 2/3 Frauen (Kasper et al., 2005). Im Kindesalter treten Schilddrüsenkarzinome selten auf, ihre Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter (Kasper et al., 2005; Onkologischer Arbeitskreis des Tumorzentrums der Universität Würzburg, 2004).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt etwa um das 55. Lebensjahr und damit deutlich unter dem mittleren Erkrankungsalter für Krebs insgesamt (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Ungefähr 90% der Schilddrüsenkarzinome sind differenzierte follikuläre (ca. 20-30%) oder papilläre (ca. 50%) Karzinome die aus den Thyreozyten entstehen (Onkologischer Arbeitskreis, 2004; Shaha AR et al., 2004). 5% sind medulläre Karzinome, die aus den parafollikulären Zellen (C-Zellen) hervorgehen (Onkologischer Arbeitskreis 2004; Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Die restlichen ca. 10% entfallen auf undifferenzierte (anaplastische) Schilddrüsenkarzinome (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Extrem selten werden auch Sarkome, maligne Hämangio-Endotheliome, maligne Lymphome und Metastasen extrathyreoidaler Tumoren gefunden (Onkologischer Arbeitskreis, 2004).

1.1.2. Ätiologie

- **Genetische Disposition:**

Etwa 25% der medullären Schilddrüsenkarzinome kommen familiär gehäuft vor (häufig bei multipler endokriner Neoplasie Typ 2). Es besteht ein autosomal dominanter Erbgang, als Ursache liegt eine Keimbahnmutation im RET-Proto-Onkogen vor. Eine positive Familienanamnese liegt auch bei 3-6% der Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom vor. Der Erbgang ist ebenfalls autosomal dominant mit variabler Penetranz, ein spezifisches Gen konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden (Onkologischer Arbeitskreis, 2004).

- **Strumainzidenz und Iodversorgung:**

Bei Patienten mit multinodulärer Struma kommt es gehäuft zu papillären Karzinomen. Ein Zusammenhang zwischen Schilddrüsenkarzinomen und unzureichender Iodversorgung wird noch diskutiert (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Man nimmt an, dass unter Iodmangelernährung gehäuft anaplastische und follikuläre Karzinome vorkommen. Unter Iodzufuhr nimmt die Gesamtinzidenz an Schilddrüsenkarzinomen zwar nicht ab, aber man beobachtet eine Umverteilung der Häufigkeiten der einzelnen histologischen Subtypen des Schilddrüsenkarzinoms von den follikulären Tumoren hin zu den papillären Karzinomen (Farahati et al., 2004).

- **Ionisierende Strahlung:**

Als gesicherter Risikofaktor für das Entstehen einer Schilddrüsen-Neoplasie ist eine Bestrahlung der Halsregion anerkannt, besonders wenn diese im Kindes- oder Jugendalter erfolgte. Nach dem Atomreaktorunfall 1986 in Tschernobyl, bei der Iod 131 und Cäsium 137 austraten, stieg die Inzidenz vom Schilddrüsenmalignomen von 1990-1998 bei Kindern unter 15 Jahren von durchschnittlich 13 auf 109 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr (Moser et al., 2002).

1.1.3. Symptome

Das klinisch führende Symptom des Schilddrüsenkarzinoms ist häufig ein rasch wachsender derber, schmerzloser Knoten. Die Wachstumsgeschwindigkeit hängt von dem Entdifferenzierungsgrad des Karzinoms ab und ist in der Regel umso höher, je undifferenzierter das Karzinom ist. Allerdings machen nur 40% der Karzinome durch einen Solitärknoten auf sich aufmerksam, da bei 50% der Patienten eine Struma vorliegt. Die Schwellung zervicaler Lymphknoten stellt in 27% beim medullären Karzinom und in 15% beim papillären Karzinom das Erstsymptom dar. Beschwerden und Befunde wie derbe, höckrige, unverschiebliche Struma, fixierte Haut, Heiserkeit (Recurrensparese), Horner'scher Symptomenkomplex, Hals-Ohren-Hinterhaupt-Schmerz, Stridor, Schluckbeschwerden oder Einflusstauung treten erst in sehr späten Stadien auf und werden heute fast ausschließlich nur noch beim anaplastischen Karzinom beobachtet (Moser et al., 2002).



Abb.1 Patientin mit Schilddrüsenkarzinom aus Urban & Fischer 2003 – Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage. Deutlich sichtbarer rechtsseitiger Schilddrüsenknoten mit oberer Einflusstauung

1.1.4. Histologische Einteilung

Man teilt die Schilddrüsenkarzinome nach ihrem histologischen Bild in differenzierte und undifferenzierte (anaplastische) Karzinome ein. Zu den differenzierten Karzinomen gehören die von den Thyreozyten ausgehenden papillären und follikulären Karzinome, die in der Regel Iodspeichernd sind und die von den C-Zellen ausgehenden medullären Karzinome. Als dritte Gruppe sind die anaplastischen Karzinome zu nennen, die durch ihre Entdifferenzierung die Fähigkeit Iod zu speichern verloren haben (Kasper et al., 2005).

Papilläre Karzinome

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom metastasiert vorwiegend lymphogen. Häufig treten regionale Lymphknotenmetastasen vor dem Primärtumor klinisch in Erscheinung (Kasper et al., 2005). Das papilläre Karzinom ist das Schilddrüsenkarzinom, das gehäuft nach radioaktiver Strahlenbelastung auftritt (Moser et al., 2002). Typischerweise erkranken hauptsächlich junge Erwachsene am papillären Schilddrüsenkarzinom (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Bei 3-6% aller Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom liegt eine positive Familienanamnese vor (Onkologischer Arbeitskreis, 2004).

Follikuläre Karzinome

Das follikuläre Karzinom metastasiert vorwiegend hämatogen in den Knochen (osteolytisch), die Lunge und das Gehirn (Kasper et al., 2005). An histologischen Subtypen kommt das Karzinom vom oxyphilem Zelltyp (onkozytäres Karzinom) und vom Klarzelltyp vor (Moser et al., 2002).

Medulläre Karzinome

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom tritt in etwa 75% der Fälle sporadisch, in etwa 25% der Fälle familiär im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN Typ 2a und 2b) auf (Siewert et al., 2000). Bei annähernd 100% der betroffenen Familien lassen

sich Keimbahnmutationen im Bereich des RET-Protoonkogens nachweisen (Siewert et al., 2000).

Anaplastische Karzinome

Das anaplastische Karzinom metastasiert sowohl lymphogen als auch hämatogen und ist der sich am aggressivsten ausbreitende Schilddrüsentumor mit der daraus folgenden schlechtesten Prognose. 60% der Patienten mit diesem Tumor sterben in den ersten 6 Monaten nach Diagnosestellung (Moser et al., 2002).

1.1.5. Diagnostik

Eine ausführliche Diagnostik wird durchgeführt, wenn sich durch Anamnese und klinische Untersuchung ein Tumorverdacht ergibt. Durchgeführt wird eine Sonographie der Halsregion, eine Schilddrüsenszintigraphie, Blutuntersuchung der Schilddrüsenfunktionsparameter fT3, fT4, TSH und Thyreoglobulin, ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen und eine Prüfung der Stimmbandbeweglichkeit. Ergänzend können bei sich erhärtendem Tumorverdacht eine Feinadelpunktion, Bestimmung von Kalzitonin und CEA im Serum, eine Halslyphknotenexstirpation, ein MRT oder CT (ohne Kontrastmittel) der Halsregion, eine Trachea-Zielaufnahme bei Verdacht auf Organübergreifendes Wachstum, die Abklärung eines MEN II- Syndroms oder weitere Diagnostik zum Ausschluss von Fernmetastasen angeschlossen werden (Moser et al., 2002).

1.1.6. Therapie

Es bestehen beim Schilddrüsenkarzinom, je nach histologischem Subtyp unterschiedliche Therapieoptionen. Man hat die Möglichkeit der Operation, der Radiojodtherapie, der perkutanen Strahlentherapie, der Schilddrüsenhormontherapie und der Chemotherapie. Bei den differenzierten Karzinomen wie dem papillären und dem follikulären Karzinom besteht die Primärtherapie in einer operativen Entfernung der kompletten Schilddrüse und der zentralen Lymphknotendissektion. An die

Thyreoidektomie schließt sich dann eine Radiojodtherapie an, die das Ziel hat, eventuell noch vorhandenes Restschilddrüsengewebe zu zerstören sowie speichernde Lymphknoten und Fernmetastasen auszuschließen bzw. nachzuweisen. Weiterhin kann man eine perkutane Strahlentherapie durchführen, entweder primär oder postoperativ. Nach Abschluss der Primärbehandlung erfolgt eine lebenslange Substitution mit Schilddrüsenhormonen. Diese dient dem Ausgleich der fehlenden Schilddrüsenhormone in Verbindung mit einer Suppression der hypophysären TSH-Sekretion, da sonst evtl. noch vorhandenes Resttumorgewebe mit Thyreotropin-Rezeptoren von TSH zum Wachstum stimuliert werden könnte. Eine Chemotherapie wird bei papillären und follikulären Tumoren nur dann eingesetzt, wenn alle operativen und strahlentherapeutischen Optionen ausgeschöpft sind und es zu einer Progredienz und zu einer ernsten klinischen Symptomatik gekommen ist (Knochenschmerzen, drohende Fraktur, Kompression). Beim medullären Karzinom hat man an Therapieoptionen hauptsächlich die Operation, da das medulläre Karzinom nicht jodspeichernd und somit einer Radiojodtherapie nicht zugänglich ist. Eine perkutane Bestrahlung wird nur durchgeführt, wenn der Tumor nicht im Gesunden entfernt werden konnte und ein palliatives Konzept verfolgt wird. Beim anaplastischen Karzinom muss eine Operation mit einer größtmöglichen Radikalität erfolgen. Eine Radiojodtherapie ist beim anaplastischen Karzinom nicht möglich, da es durch seine Entdifferenzierung die Fähigkeit zur Jodspeicherung verloren hat. Wegen der raschen Ausbreitung dieses Karzinoms muss nach der Operation häufig eine perkutane Strahlentherapie angeschlossen werden, die in fast allen Fällen nur palliativ ist und das Auftreten und die Ausprägung von Symptomen nur verzögern oder lindern kann. Eine Chemotherapie sollte dann begonnen werden, wenn Metastasen nachgewiesen wurden. (Moser et al., 2002).

1.1.7. Prognose

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für das Schilddrüsenkarzinom sind im Durchschnitt für Frauen mit 82% besser als für Männer mit rund 73% (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Als wichtigste Prognosefaktoren für das Schilddrüsenkarzinom gelten das Alter, das Vorliegen von Fernmetastasen, die Tumorgöße und Ausdehnung, das Tumorigrading

und das histologische Erscheinungsbild. Das Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung spielt für die Prognose keine Rolle (Shaha et al., 2004). Patienten unter 45 Jahre haben eine wesentlich bessere Prognose als Patienten, die älter als 45 Jahre sind. Ebenso haben das papilläre Karzinom und ein Tumor mit einer hohen Differenzierung eine gute Prognose (Shaha et al., 2004). Zurzeit werden noch viele weitere Faktoren erforscht, die künftig Prognosefaktoren für das Schilddrüsenkarzinom darstellen könnten. Dazu gehören die Überexpression verschiedener Gene wie z. B. ras, p21, p53 sowie andere biologische Marker wie Epidermal growth factor receptor, Kathepsin, E-Cadherin, Östrogenrezeptor-assoziiertes Protein, TSH-induzierter cAMP-Anstieg, DNA Ploidy, Telomerase-Aktivität oder onkofetales Fibronectin (Shaha et al., 2004).

1.2. Osteoprotegerin (OPG), Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) und Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)

1.2.1. Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin (OPG; Simonet et al., 1997) und Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF; Tsuda et al., 1997; Yasuda et al., 1998a) wurden erstmals 1997 von zwei unabhängigen Gruppen entdeckt und der Gruppe der TNF-Rezeptorfamilie zugeordnet. Sie stellen die bisher einzigen Vertreter dieser Gruppe dar, die sezerniert werden. Andere Arbeitsgruppen bestätigten diese Ergebnisse und nannten das Protein TNF Receptor-related molecule-1 (TR1; Kwon et al., 1998; Tan et al., 1997) bzw. Follicular dendritic cell receptor-1 (FDCR-1; Yun et al., 1998). Nach einer revidierten Nomenklatur soll künftig die Bezeichnung OPG verwendet werden (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das OPG-Gen wurde 1998 identifiziert und geklont. Es enthält 5 Exons, die sich über 29 Kilobasen (kb) des Chromosoms 8q23-24 verteilen (Hilton et al., 2001). Die humane OPG-mRNA liegt hauptsächlich als 2,9 kb lange Form vor, weiterhin gibt es noch zwei geringer exprimierte Formen, die 4,2 kb und 6,5 kb lang sind und infolge einer partiellen oder kompletten Duplikation von Intron 2 entstehen (Morinaga et al., 1998; Yasuda et al., 1998a). Das OPG-Protein ist ein sezerniertes basisches Glykoprotein, bestehend aus 401 Aminosäuren, das entweder als monomere (60 kDa) oder – nach Bildung einer Disulfidbrücke – als homodimere Form (120 kDa) von ähnlicher

biologischer Aktivität vorliegen kann (Merewether et al., 2000; Tomoyasu et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998). OPG hat eine große Ähnlichkeit in der Sequenz mit anderen TNFR wie TNFR-2 und CD40 (Simonet et al., 1997). Es wurde bisher auch eine zellgebundene OPG-Form beschrieben (Yun et al., 1998), bei der bisher aber keine Gensequenzen identifiziert werden konnten, die für die transmembranäre Region kodieren (Simonet et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998). OPG besteht aus einem Signalpeptid mit 21 Aminosäuren und aus 7 strukturellen Domänen, denen spezifische Funktionen zugeordnet werden können. Die N-terminalen Domänen 1 bis 4 sind, wie für TNFR-Mitglieder charakteristisch, Cystein-reich (Baker et al., 1998). Ihnen kann die Hemmung verschiedener Osteoklastenfunktionen zugeordnet werden (Simonet et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998; Yasuda et al., 1998a). Die Domänen 5 und 6 besitzen "Death domain homologous" (DDH)-Regionen, Apoptose-vermittelnde Proteinsequenzen, die ebenfalls bei anderen Mitgliedern der TNFR-Familie beschrieben wurden (Baker et al., 1998; Simonet et al., 1997). Die C-terminale Domäne 7 enthält sowohl eine Heparin-bindende Domäne als auch eine Cysteinverbindung an Position 400, welche durch Ausbildung einer Disulfidbrücke eine Dimerisierung ermöglicht (Merewether et al., 2000; Simonet et al., 1997; Tomoyasu et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998).

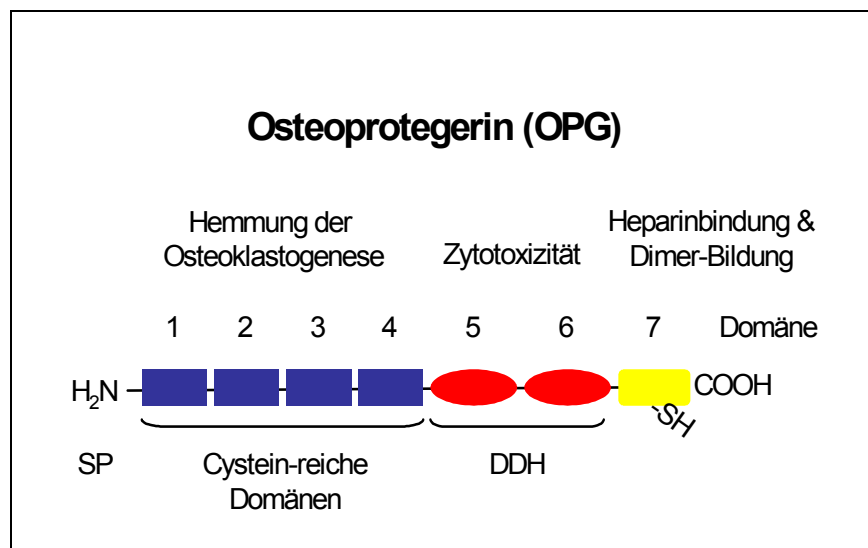


Abb. 2 Struktur-Funktions-Beziehung von OPG. Abkürzungen. SP Signalpeptid, DDH Death Domain Homologue

OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion wurden bisher schon in zahlreichen normalen und malignen Zelltypen nachgewiesen, wie z.B. in osteoblastären Zellen (Kwon et al., 1998; Simonet et al., 1997; Tan et al., 1997; Tsuda et al., 1997; Yasuda et al., 1998a; Yun et al., 1998), dem Zahnhalteapparat und den Zähnen (Rani et al., 2000; Sakata et al., 1999; Shiba et al., 2000), der Wand großer Arterien (Simonet et al., 1997), der Schilddrüse (Hofbauer et al., 2002b), synovialen Fibroblasten (Kubota et al., 2004) und Prostatakarzinomzellen (Holen et al., 2002).

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

RANKL wurde 1997 erstmals von zwei Arbeitsgruppen identifiziert und unter dem Namen Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL; Anderson et al., 1997) bzw. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE; Wong et al., 1997a) beschrieben. 1998 veröffentlichten zwei weitere Arbeitsgruppen ihre Ergebnisse und nannten die damals als spezifisch für OPG identifizierten Liganden Osteoprotegerin ligand (OPGL; Lacey et al., 1998) und Osteoclast differentiation factor (ODF; Yasuda et al., 1998b). Eine Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei diesem Zytokin um das bereits 1997 von Anderson und Wong beschriebene Zytokin Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL; Anderson et al., 1997) bzw. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE; Wong et al., 1997a) handelte. Nach einer revidierten Nomenklatur soll künftig der Begriff RANKL verwendet werden (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das humane RANKL-Gen ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert und die RANKL-mRNA ist zwischen 2,2 und 2,4 kb lang (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997a). Im RANKL-Genpromoter konnten Bindungsstellen für Vitamin D und Glukokortikoide (Kitazawa et al., 1999; Kodaira et al., 1999) sowie für den osteoblastären Transkriptionsfaktor cbfa-1 identifiziert werden (Gao et al., 1998). RANKL ist ein membran-gebundenes Protein, bestehend aus 317 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 38 kDa. RANKL besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu anderen TNF-Liganden wie TRAIL, CD40-Ligand und Fas-Ligand (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997a). RANKL kommt als zellulär gebundene Variante vor (Lum et al., 1999), wurde aber auch in aktivierten T-Lymphozyten (Kong

et al., 1999b) und einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (Nagai et al., 2000) als primär sezernierte RANKL-Form beschrieben. Nach detaillierten Analysen kennt man heute drei RANKL-Isoformen, die klassische RANKL-Form (RANKL-1) mit 317 Aminosäuren, RANKL-2, die eine kürzere Intrazellulärdomäne besitzt als RANKL-1, aus 287 Aminosäuren besteht und vor allem innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats lokalisiert ist, sowie RANKL-3, eine lösliche Form ohne Transmembranregion, bestehend aus 199 Aminosäuren (Ikeda et al., 2001).

Verschiedene skeletale Zellen, wie mesenchymale Stammzellen exprimieren RANKL, z.B. Osteoblasten, Osteoklasten, Periostzellen und Chondrozyten (Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b). 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., 1999b), mesenchymale und epitheliale Zellen des Zahnhalteapparats (Rani et al., 2000) und verschiedene Tumorzellen (Nagai et al., 2000; Penno et al., 2002; Zhang et al., 2001). Die Expression von RANKL ist 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; Wong et al., 1997a; Yasuda et al., 1998b; Xu et al., 2000; Zhang et al., 2001).

1.2.3. Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)

Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) wurde erstmals 1997 als Rezeptor von RANKL, das spezifisch an RANK bindet, identifiziert, beschrieben und nach einem seiner intrazellulären Zielgene, Nuclear factor- κ B (NF- κ B) benannt (Anderson et al., 1997). Eine weitere Arbeitsgruppe führte 1999 den Begriff Osteoclast differentiation and activation receptor (ODAR) ein (Hsu et al., 1999). Nach einer revidierten Nomenklatur soll künftig der Begriff RANK verwendet werden (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das humane RANK-Gen ist auf Chromosom 18q22.1 lokalisiert (Anderson et al., 1997). Die hauptsächlich exprimierte Form der humanen RANK-mRNA ist 4,5 kb lang (Anderson et al., 1997). Daneben kommen drei weitere humane RANK-mRNA-Formen

von 3,0, 3,5 und 5,5 kb vor (Anderson et al., 1997). RANK ist ein membranständiges Polypeptid, das aus 616 Aminosäuren besteht (Anderson et al., 1997). RANK enthält ein Signalpeptid (28 Aminosäuren), eine N-terminale extrazelluläre Liganden-bindende Domäne (184 Aminosäuren), eine Transmembranregion (21 Aminosäuren) und eine lange C-terminale intrazelluläre Domäne (383 Aminosäuren), die für die Signaltransduktion erforderlich ist (Anderson et al., 1997). Wie OPG enthalten die extrazellulären Domänen von RANK die für TNFR charakteristischen Cystein-reichen Domänen (Anderson et al., 1997; Simonet et al., 1997). Das RANK-Protein ist vor allem auf Osteoklasten, dendritischen Zellen (DC), 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; Nakagawa et al., 1998). Zusammen mit dem Kalzitininrezeptor hat sich RANK inzwischen als Oberflächenmarker für die Phänotypisierung von Osteoklasten etabliert (Arai et al., 1999; Yamane et al., 2000).

1.2.4. Interaktionen von RANKL und OPG

OPG, als sezernierter Rezeptor, bindet kompetitiv an RANKL und neutralisiert so alle biologischen Wirkungen von RANKL (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b). OPG neutralisiert ebenfalls die biologische Wirkung des TNF-Liganden TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; Emery et al., 1998).

Am besten untersucht ist das OPG/RANKL/RANK-System im Knochen. Durch die Bindung von RANKL, das in osteoblastären Zellen gebildet wird, an seinen Rezeptor RANK wird eine Vielzahl osteoklastärer Zellfunktionen aktiviert (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b). RANKL stellt das für die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferstufen (Osteoklastogenese) notwendige Zytokin dar, stimuliert das Überleben und die Fusion von Osteoklasten-Vorläuferzellen und aktiviert reife Osteoklasten (Fuller et al., 1998; Quinn et al., 1998; Udagawa et al., 1999; Xu et al., 2000). Zusammenfassend vergrößert RANKL das Reservoir resorptionsfähiger Osteoklasten durch Beeinflussung verschiedener Aspekte der Osteoklastenzellbiologie.

Das Zusammenspiel zwischen OPG, RANKL und RANK konnte in verschiedenen Experimenten nachgewiesen werden. OPG führt nach parenteraler Gabe am Knochen zu einer Osteopetrose (Simonet et al., 1997), das Fehlen von OPG hingegen zu Osteoporose (Bucay et al., 1998; Mizuno et al., 1998). In allen diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Knochenmasse positiv mit der skeletalen Konzentration von OPG korreliert. Die parenterale Gabe von RANKL führte im Gegensatz dazu zu einer schweren Osteoporose (Lacey et al., 1998; Xu et al., 2000). Das Fehlen von RANKL führt wiederum zu einer Osteopetrose sowie verschiedenen immunologischen Defekten (Kong et al., 1999a). Die Untersuchungsergebnisse konnten somit zeigen, dass der RANKL/OPG-Quotient positiv mit der Resorptionsfunktion von Osteoklasten und negativ mit der Knochenmasse korreliert.

Weitere Erkrankungen des Knochen sind mit dem RANKL-OPG-System assoziiert, z.B. die rheumatoide Arthritis (Kubota et al., 2004; Yoneda et al., 2004), der Hyperparathyreoidismus (Huang et al., 2004), eine Peridontitis, osteotrope Tumore/Metastasen wie der Riesenzelltumor, das Plasmozytom, das multiple Myelom, das metastasierte Mamma- und Prostatakarzinom, das metastasierte Neuroblastom und das Osteosarkom.

Wegen seiner Wirkung auf den Knochenstoffwechsel kam man auf die Idee, die Bedeutung des OPG/RANKL/RANK-Systems bei osteotropen menschlichen Tumoren zu erforschen. Es konnte eine Interaktion von Tumorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten mit abnormer Produktion von RANKL und OPG sowie inadäquater Expression von RANK gezeigt werden (Guise, 2000; Hofbauer et al., 2001b; Roodman, 2001). Es findet sich z.B. bei Riesenzelltumoren, benignen osteolytischen Läsionen im Bereich von Epiphysen der Röhrenknochen, eine gesteigerte RANKL-Genexpression in mesenchymalen Stammzellen und Synovialfibroblasten sowie eine Überexpression von RANK in den osteoklastären Riesenzellen (Huang et al., 2000; Takayanagi et al., 2000b). Ebenso konnte eine gesteigerte RANKL-Genexpression mit dadurch gesteigerter direkter Aktivierung von Osteoklasten in Plasmozytomzellen nachgewiesen werden (Pearse et al., 2001; Sezer et al., 2002). Diese Wirkungen von RANKL konnten wiederum durch die Gabe von löslichem blockierendem RANK-Antikörper (Pearse et al., 2001) oder rekombinantem OPG (Croucher et al., 2001) effektiv blockiert und die Entwicklung von Osteolysen verhindert werden. Auch bei Patienten mit adulter T-

Zelleukämie (ATL), die klinisch häufig durch Episoden schwerer Hyperkalzämie gekennzeichnet ist, konnte eine deutliche Überexpression der RANKL-mRNA bei Patienten mit Hyperkalzämie gezeigt werden (Nosaka et al., 2002). Auch auf Hodgkin/Sternberg-Reed-Zellen konnten RANKL und RANK nachgewiesen werden (Fiumara et al., 2001). Zelllinien aus Mammakarzinomen, die häufig osteolytische Metastasen und Hyperkalzämie verursachen, hemmen durch Produktion von Parathormon-related peptide (PTHrP) die Bildung von OPG und steigern die Expression von RANKL (Chikatsu et al., 2000; Guise, 2000; Thomas et al., 1999a). Infolge der gesteigerten RANKL-Expression und der verminderten OPG-Produktion kommt es lokal zur vermehrten osteoklastären Differenzierung und Aktivierung sowie zur Hemmung der Apoptose von Osteoklasten mit der Folge lokaler Osteolysen und systemischer Hyperkalzämie (Hofbauer et al., 2001b; Roodman, 2001).

Auch in Prostatakarzinomzellen wurden RANKL und OPG nachgewiesen (Brown et al., 2001a; Lin et al., 2001; Holen et al., 2002; Penno et al., 2002). Die RANKL-mRNA-Spiegel waren bei Prostatakarzinomzelllinien, die osteolytische Metastasen bilden, wesentlich höher als bei solchen, die osteoblastische Metastasen bilden (Brown et al., 2001a). Es konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass eine Gabe von OPG möglicherweise die Entstehung von Knochenmetastasen verhindert. Im Tierexperiment wurde gezeigt, dass durch die Gabe von OPG die Differenzierung von Osteoklasten und die Ausbildung osteolytischer Läsionen nach Injektion von Prostatakarzinomzellen in die Tibia komplett verhindert werden konnte (Zhang et al., 2001).

Auch beim Neuroblastom konnte die Bedeutung von RANKL anhand eines Tiermodells bewiesen werden, hier zeigte sich eine gesteigerte RANKL-Expression der Neuroblastomzellen, die zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten am Ort der osteolytischen Läsionen führten. Dieser Effekt konnte durch Gabe von OPG blockiert werden (Michigami et al., 2001).

Obwohl RANKL als antiapoptotischer Faktor für das Brustdrüsenepithel identifiziert worden ist, ist die Bedeutung von RANKL für die primäre Tumorgenese bislang nicht geklärt (Fata et al., 2000). Es gibt Untersuchungen, die RANKL als Co-Faktor für die TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand)-induzierte Apoptose sehen. TRAIL, ein weiteres Mitglied der TNF Superfamilie, wird normalerweise in den meisten Geweben produziert. Es induziert Apoptose, indem es an DR4 oder DR5, death

receptors, die transmembrane Domänen enthalten, und Todesdomänen, die das Todessignal über den Caspaseweg weiterleiten bindet. Die Bindung von OPG an TRAIL verhindert, dass TRAIL Apoptose induzieren kann (Emery et al., 1998). Eine weitere Studie zeigt OPG als Überlebensfaktor für humane Prostatakarzinomzellen, welche mit TRAIL behandelt wurden. Durch Zugabe von rekombinantem OPG konnte die TRAIL induzierte Apoptose verhindert werden. Dieser für die Prostatakarzinomzellen protektive Effekt konnte durch Zugabe von RANKL aufgehoben werden (Holen et al., 2002).

Innerhalb der Schilddrüse wurden für die TNF-Liganden Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Fas-Ligand (Fas-L) und TRAIL Apoptose-induzierende Eigenschaften postuliert (Ahmad et al., 2000). An Schilddrüsenkarzinomzelllinien (SW579) wurde untersucht, in wie weit Apoptose durch diese drei Zytokine induziert werden kann. Es zeigte sich, dass TRAIL am potentesten Apoptose induzieren konnte. Dieser Effekt ließ sich durch die Zugabe von Cycloheximid noch verstärken (Ahmad et al., 2000). Die Bedeutung von OPG (und RANKL) als diagnostischer biochemischer Marker zur Risikostratifizierung, Aktivitätsabschätzung und Therapieüberwachung maligner metabolischer Erkrankungen ist bislang nur in Ansätzen erforscht und Gegenstand laufender Untersuchungen.

Da RANKL eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Knochenmetastasen, Osteolysen, humoraler Hyperkalzämie, pathologischen Frakturen und Tumor-assoziierten Knochenschmerzen spielt, stellt die Blockade von RANKL durch OPG oder eine lösliche, neutralisierende RANK-Form ein neues, kausal orientiertes therapeutisches Prinzip bei onkologischen Erkrankungen in Aussicht (Hofbauer et al., 2001b; Roodman, 2001). Durch die Anwendung von OPG war es möglich, in Tiermodellen mit Mamma- und Kolonkarzinomen die ossäre Metastasierung zu verhindern oder eine etablierte Skelettmetastasierung wirksam zu unterdrücken (Morony et al., 2001).

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass RANKL, RANK und OPG auch im Immunsystem eine wichtige Rolle spielen. Sie modulieren die Zellfunktionen des Immunsystems und sind insbesondere an der Organogenese des Immunsystems, der Antigenpräsentation und der zellulären Immunantwort beteiligt (Kong et al., 2000; Wong et al., 1999a). Untersuchungen ergaben, dass die für Antigenpräsentation und T-

Zell-Aktivierung verantwortlichen dendritischen Zellen (DC) den Rezeptor RANK exprimieren. Über seine Aktivierung durch RANKL wurde die Apoptose verhindert und so die Lebenszeit von DC entscheidend verlängert (Anderson et al., 1997; Lum et al., 1999; Wong et al., 1997a). Durch OPG hingegen werden die immunologischen Effekte von RANK durch Neutralisierung von RANKL und damit fehlender Aktivierung von RANK blockiert (Kong et al., 2000; Wong et al., 1999a). RANKL und OPG modulieren die Entwicklung und Funktion von B-Zellen (Yun et al., 2001), RANKL aktiviert außerdem T-Zellen (Wong et al., 1997b). Auch in vivo ließ sich die wichtige Rolle des RANK/RANKL-Systems für die Organogenese des Immunsystems nachweisen. Da RANKL und RANK im Skelett- und Immunsystem eine wichtige Rolle spielen, wurde ihnen auch eine Beteiligung bei der Pathogenese immunologischer Skeletterkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (Hofbauer et al., 2001a; Kubota et al., 2004) und der Peridontitis (Teng et al., 2000) zugeschrieben. Weitere Untersuchungen zeigten, dass RANKL und OPG für die Funktion und Immunmodulation der Schilddrüse eine wichtige Rolle einnehmen (Hofbauer et al., 2002b). Das Schilddrüsengewebe weist die stärkste OPG-Genexpression aller bisher untersuchten endokrinen Gewebe auf, während RANKL dort nur gering exprimiert wird. Es konnten follikuläre Schilddrüsenzellen als Produzenten von RANKL und OPG identifiziert werden. In follikulären Schilddrüsenzellen (XTC) ließ sich durch Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β und TNF- α die RANKL- und OPG-Expression steigern, die OPG-Produktion nahm durch IL-1 β um mehr als das Dreißigfache zu (Hofbauer et al., 2002b). Thyreotropin (TSH) hingegen steigerte die OPG-Genexpression und -Proteinsekretion und hemmte jedoch die RANKL-Genexpression. Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus Basedow wiesen im Vergleich zu anderen benignen Schilddrüsenerkrankungen deutlich gesteigerte OPG-mRNA-Spiegel auf. Dies ist wahrscheinlich auf die Überexpression von IL-1 β und TNF- α in Schilddrüsengewebe von Patienten mit M. Basedow zurückzuführen. Das von Schilddrüsenzellen gebildete OPG war zudem im Stande, die Funktion von dendritischen Zellen zu modulieren. Diese Befunde deuten auf eine parakrine Rolle von RANKL und OPG bei der Pathogenese von Immunthyreopathien wie dem Morbus Basedow hin (Hofbauer et al., 2002b).

Dass das RANKL-OPG-Systems auch Effekte auf das Gefäßsystem haben könnte, zeigte sich bei der Analyse von OPG^{-/-}-Mäusen, deren große Arterien (Aorta, Aa. renales) eine massive Kalzifizierung und eine erhöhte Inzidenz von Aneurysmata

aufwiesen (Bucay et al., 1998). Schon 1997 wurde von Simonet nachgewiesen, dass die Media der großen Arterien zu den Geweben stärkster OPG-Genexpression gehört (Simonet et al., 1997; Jono et al., 2002). Untersuchungen zeigten, dass die OPG-Serumspiegel mit dem Vorhandensein und der Schwere einer koronaren Herzkrankheit assoziiert sind, so dass man OPG als Marker für die Progression einer koronaren Herzkrankheit annehmen kann (Jono et al., 2002). Diese Befunde deuten auf eine wichtige Rolle des RANKL-OPG-Systems als parakrine Verbindung zwischen dem Knochenstoffwechsel und dem vaskulären System hin. Eine gestörte Balance dieser beiden Komponenten könnte das molekulare Korrelat der klinischen Koinzidenz von Osteoporose und vaskulärer Kalzifizierung vor allem bei postmenopausalen Frauen und älteren Männern darstellen (Hofbauer et al., 2001c).

Die durchwegs positiven Ergebnisse der präklinischen Versuche bildeten schließlich die Basis für die Konzeption und Durchführung klinischer Studien zum Einfluß einer RANKL-Blockade beim Menschen. Zwei kleinere randomisierte kontrollierte Studien untersuchten den Kurzzeit-Effekt einer einzigen subkutanen Injektion eines OPG-Fc-Fusionproteins auf biochemische Marker des Knochenumsatzes (Bekker et al., 2001; Body et al., 2003). In einer Studie an Frauen mit postmenopausaler Osteoporose über 12 Wochen führte die Gabe von OPG zu einer ausgeprägten und anhaltenden Suppression biochemischer Marker der Knochenresorption und -formation (Bekker et al., 2001). Eine weitere Studie verglich die Effekte einer einzelnen Gabe von OPG mit einer Pamidronat-Gabe bei Patienten mit multiplen Myelom und Frauen mit skeletal metastasiertem Mammakarzinom über einen Zeitraum von 8 Wochen (Body et al., 2003). Der Resorptionsmarker N-Telopeptid wurde durch die OPG-Gabe um 74% (Mammakarzinom) bzw. 47% (Myelom) reduziert, was in der Größenordnung der Pamidronattherapie lag. Diese beiden Studien waren „Proof of principle“, dass eine RANKL-Blockade auch bei Knochenerkrankungen des Menschen effektiv die Knochenresorption hemmen kann.

Eine Weiterentwicklung dieser Strategie stellt Denosumab dar, ein humaner monoklonaler Antikörper gegen RANKL. Denosumab bietet gegenüber dem OPG-Fusionsprotein wichtige Vorteile: Es hat eine höhere Spezifität für RANKL, eine längere Halbwertszeit (was eine subkutane Gabe alle 6 Monate ermöglicht) und induziert keine Auto-Antikörper (Bekker et al., 2004). Denosumab führte zu einer

raschen, ausgeprägten und nachhaltigen Suppression biochemischer Knochenumsatzparameter (Bekker et al., 2004) und einem Anstieg der Knochendichte bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose.

Die Ergebnisse erster Phase III-Studien evaluieren derzeit die Effekte von Denosumab auf die Knochendichte und Frakturrisiko bei verschiedenen benignen und malignen Indikationen. Es konnte gezeigt werden, dass eine subkutane Gabe von Denosumab bei postmenopausalen Frauen mit einer erniedrigten Knochendichte in 3-monatigen oder 6-monatigen Intervallen über einen Zeitraum von 12 Monaten zu einem verringerten Knochenumbau und zu einem raschen Ansteigen der Knochendichte führte (McClung et al., 2006). Der Anstieg der Knochendichte der durch eine Denosumabtherapie erreicht wurde, schien über dem der Placebogruppe und gleich oder größer dem der Gruppe, die mit Alendronat behandelt wurden zu liegen. Diese Daten führen zu dem Schluss, dass eine Denosumabtherapie möglicherweise eine effektive Behandlungsmethode für Osteoporose sein könnte (McClung et al., 2006).

Eine weitere klinische Studie beschäftigte sich mit der Denosumabtherapie bei Patienten mit multiplem Myelom und bei Patienten mit Knochenmetastasen bei Brustkrebs (Body et al., 2006). Es zeigte sich, dass Denosumab, ein humaner monoklonaler Antikörper mit einer hohen Affinität und Spezifität zu RANKL, effektiv zu einem raschen Absinken der Knochenresorption führte. Als Parameter wurden die Spiegel von N-Telopeptid im Urin und Serum bestimmt. Die Dauer der Unterdrückung der Knochenresorption war Dosis-abhängig und hielt bis zu 84 Tage nach einer einmaligen subkutanen Dosis von 1,0 - 3,0 mg/kg Körpergewicht Denosumab. Der Abfall der Knochenumbauparameter war in der Höhe ähnlich der der Vergleichsgruppe, die mit 90 mg Pamidronat i.v. behandelt wurden, hielt jedoch länger an (Body et al., 2006). Knochenspezifische alkalische Phosphatase wurde durch Denosumab nur schwach und spät supprimiert. Die Therapie mit Denosumab wurde sehr gut vertragen, was ein Vorteil gegenüber der Therapie mit Bisphosphonaten zu sein scheint. In keinem der Fälle kam es zu einer Hypokalzämie. Es konnte auch kein Hinweis für eine Nephrotoxizität gefunden werden. Auch die subkutane Applikationsform ist ein Vorteil gegenüber der i.v. Gabe von Bisphosphonaten (Body et al., 2006).

2. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die OPG- und RANKL-Expression in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen zu analysieren sowie die Regulation von OPG und RANKL in diesen Zellen zu untersuchen.

Im Einzelnen sollte untersucht werden:

- Die Charakterisierung der OPG-Produktion in Schilddrüsengewebe und anderen endokrinen und nicht-endokrinen Geweben.
- die Produktion von RANKL und OPG in verschiedenen humanen Schilddrüsenkarzinomzellen
- die Regulation der OPG-Produktion in Schilddrüsenkarzinomzellen durch:
 - proinflammatorische Zytokine (IL-1 β)
 - Sexualhormone
 - 17 β -Estradiol
 - 5 α -DHT (Dihydrotestosteron) und Testosteron
 - DHEA (Dehydroepiandrosteron)
 - Glukokortikoide
 - Medikamente
 - Cycloheximid
 - Lovastatin

Als Modellsysteme standen Zellkulturen von Schilddrüsenkarzinomzelllinien zur Verfügung. Die Analyse der OPG-mRNA-Expression und OPG-Proteinsekretion wurde mittels Northern Blot-Hybridisierung und ELISA durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Zellkulturflaschen, 6-Well-Platten, Cryo-Cups zum Einfrieren der Zellen und Zentrifugenröhrchen sowie Zellschaber waren von Greiner Bio-One (Frickenhausen). Das Zellmedium Leibovitz L-15 und Ham F12, die Zusätze Penicillin und Streptomycin sowie das fötale Kälberserum stammten von PAA GmbH (Linz, Österreich). Alle Zytokine wurden von der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) bezogen. Die Hormone für die Stimulation waren von Sigma (Steinheim). Cerivastatin war von Bayer (Leverkusen). Ethanol (absolut), Formaldehydlösung 37 %, Natrium-Chlorid und Eisessig 99,8% lieferte Riedel-de-Haën (Seelzen). Von SIGMA (Steinheim) bezogen wir 3-[N-Morpholino]-Propansulfon-Säure (MOPS), Ethylendiamin-Tetraacetat Säure (EDTA), DMSO, Formamide, Methylen Blau, β -Mercaptoethanol und PBS/BSA. 10 x TBE stammte von Roth (Karlsruhe). RNase-Erase war von ICN Biomedicals (Aurora, USA). Der RNeasy-Mini-Kit, sowie die QIAshredder-Säulen zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe stammten mitsamt den dazu benötigten Puffern und dem RNase-freien Wasser von der Firma QIAGEN (Hilden). Um Poly-A-RNA zu isolieren verwendeten wir den PolyA-Tract mRNA-Kit von Promega (Madison, USA). Die radioaktive Markierung der cDNA (Random Priming) erfolgte mit dem DECAprimer II DNA Labeling Kit von Ambion (Austin, USA). Das „Push Column System“ zur Trennung nicht inkorporierter Nukleotide stammte zusammen mit der Schutzvorrichtung von der Firma Stratagene (La Jolla, USA). Die Express-Hybridisierungslösung stammte von Clontech (Palo Alto, USA), das [α - 32 P]-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) von der Firma DuPont-NEN (Boston, USA). Die OPG-Proteinmessungen wurden mit einem von Immundiagnostik (Bensheim) kommerziell erhältlichen ELISA gemessen. Die Agarose stammte von der Firma Life Technologies (Paisley, Schottland). Amersham (Braunschweig) lieferte die Hybond-N+-Nylon-Membran und die radioaktiven [α - 32 P]-Nukleotide, die Hybridisierungsbeutel Gibco BRL LIFE Technologies (Paisley, Schottland). Das Chromatographiepapier stammte von Whatman (Maidstone, England). Die für die Autoradiographie benötigten Kassetten mit Verstärkerfolie und die X-OMAT Filme waren von Eastman Kodak (Rochester, NY).

3.1.2. Geräte

Die Zellkultur Bench (Lamin Air), der CO₂-Brutschrank und die Zentrifuge (Labofuge 400e) waren von Heraeus (Hanau). Das Mikroskop CK2 stammte von Olympus (Japan). Die Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl) und die Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml) wurden von Eppendorf (Hamburg) bezogen. Autoklaviert wurde mit einem Gerät der Firma Fritz Gössner (Hamburg). Der Vortexer (Reax 2000) und das Magnetrührwerk (MR 2002) waren von der Firma Heidolph Elektro GmbH (Kehlheim). Die Minizentrifuge (Picofuge) stammte von Stratagene (La Jolla, USA). Für die Elektrophorese wurden ein Netzgerät und eine Gelkammer von BIO RAD (Richmond, USA) benutzt. Zum Trocknen der mRNA-Proben wurde die Zentrifuge (Vakuum Concentrator) von Bachofer (Reutlingen), die Kühlfalle Alpha I-5 von Christ (Osterode) und eine Vakuumpumpe von Pfeiffer (Aßlar) verwendet. Das Photometer zur Bestimmung des RNA Gehaltes der Proben stammte von der Firma Pharmacia (Biochrom, UK). Der Hybridisierungs-ofen wurde von der Firma Bachhofer (Reutlingen) eingesetzt. Zum Entwickeln der Filme wurde der Filmautomat Curix 60 von AGFA (Köln) benutzt. Zum Fixieren der RNA auf den Hybond-N+ Membranen wurde der UV Stratalinker 2400 von Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Die OPG-ELISA wurden in dem Gerät MRX von Dynatech Laboratories (Guernsey, UK) ausgewertet.

3.1.3 Puffer und Standardlösungen

| | Hersteller |
|------------------------------------|-------------------|
| BSA in PBS | |
| 1 × PBS (Phosphat buffered saline) | |
| 0,1% BSA (Bovines Serum-Albumin) | Sigma, Steinheim |
| DEPC-behandeltes Wasser | |
| destilliertes Wasser mit 0,1% DEPC | Sigma, Steinheim |
| nach 24 h 30 min autoklavieren | |

Farbstoffpuffer für RNA-Gele

| | |
|----------------------|------------------|
| 50% Glyzerin | Sigma, Steinheim |
| 0,25% Bromphenolblau | Sigma, Steinheim |
| 0,25% Xylencyanol | Sigma, Steinheim |
| 1 mM EDTA pH 8,0 | Roth, Karlsruhe |

Methylenblau-Lösung

| | |
|----------------------------|------------------|
| 0,04% Methylenblau | Sigma, Steinheim |
| 0,8 M Natriumazetat pH 4,0 | Sigma, Steinheim |

10 × MOPS

| | |
|--|------------------|
| 20 mM MOPS (3-(N-Morpholino-Propansulfonsäure) | Sigma, Steinheim |
| 5 mM Natriumazetat | Sigma, Steinheim |
| 0,1 mM EDTA | Roth, Karlsruhe |
| mit NaOH pH-Wert 7,0 einstellen | |

PBS-Puffer

| | |
|--|------------------|
| 136 mM Natriumchlorid | Sigma, Steinheim |
| 2,7 mM Kaliumchlorid | Sigma, Steinheim |
| 12,1 mM Na ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt |
| 1,5 mM K ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt |
| mit 1 M HCl pH-Wert 7,4 einstellen | |

20 × SSC (Standard sodium citrate)

| | |
|----------------------------|------------------|
| 3 M Natriumchlorid | Sigma, Steinheim |
| 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 | Sigma, Steinheim |

1 × STE Puffer (Tris-NaCl-EDTA-Puffer)

| | |
|--|------------------|
| 100 mM Natriumchlorid | Sigma, Steinheim |
| 20 mM Tris-HCL pH 7,5 (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) | Merck, Darmstadt |
| 10 mM EDTA pH 7,0 | Roth, Karlsruhe |

0,5 × TBE (Tris-Borat-EDTA)

| | |
|-------------------------|------------------|
| 44,5 mM Tris-HCL pH 8,0 | Merck, Darmstadt |
| 44,5 mM Borsäure | Merck, Darmstadt |

1 mM EDTA pH 8,3

Roth, Karlsruhe

Waschlösung 1

2 × SSC

0,05% SDS (Sodium dodecylsulphate)

Merck, Darmstadt

Waschlösung 2

0,1 × SSC

0,1% SDS

Merck, Darmstadt

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

3.1.4. Zellen

Bei den von uns hauptsächlich verwendeten Schilddrüsenkarzinomzellen SW579 handelt es sich um wenig differenzierte Zellen mit Eigenschaften von papillären und Schwammzellkarzinomen der Schilddrüse. Die Zellen wuchsen adhären und wurden bei 37° C in einem Medium aus 90% Leibovitz L-15 mit 2 mM L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum kultiviert.

Für einen Teil der Versuche wurde die differenzierte follikuläre Schilddrüsenzelllinie XTC verwendet. Die XTC-Zelllinie wurde aus einer Hürthle-Zell-Karzinommetastase gewonnen und von Herrn PD Dr. A. Zielke (Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Phillips-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt (Zielke et al., 1998). Die XTC-Zellen wurden in DMEM-h21/Ham Medium zusammen mit HEPES (25 mM), Natrium Pyruvat (0.5 mM), Glutamin (2.5 mM), 10% fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin und Streptomycin bei 37°C kultiviert.

HTC Zellen sind humane Schilddrüsenkarzinomzellen, die aus einem follikulären Schilddrüsenkarzinom stammen. Die Zellen wuchsen adhaerent und wurden bei 37° C in einem Ham F12 Medium mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin und Streptomycin kultiviert. Sie wurden von Herrn PD Dr. A. Zielke (Klinik für Visceral-, Thorax- und

Gefäßchirurgie der Phillips-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt (Zielke et al., 1998).

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Zellen wurden geteilt, in dem man das Medium entfernte, dann 1-2 ml Trypsin-EDTA Lösung (0,25%Trypsin, 0,03%EDTA) auf die Zellen gab und so lange inkubierte, bis sich die Zellen vom Untergrund gelöst hatten. Anschließend füllte man die Trypsin-EDTA Lösung mit den abgelösten Zellen in ein Eppendorfröhrchen und zentrifugierte das Ganze, bis sich die Zellen am Boden des Röhrchens abgesetzt hatten. Nun verwarf man den Überstand, löste die Zellen in neuem Medium und verteilte sie dann auf neue Zellkulturflaschen. Zum Einfrieren der Zellen benutzte man eine Mischung aus 95% Kulturmedium + 5% DMSO.

Beim Arbeiten mit Zellkulturen wurde zur Vermeidung einer Kontamination der Zellen mit Keimen präventiv dem Medium Penicillin und Streptomycin zugegeben. Die Zellkulturbank, unter der alle Arbeiten an der Zellkultur wie Teilen, Stimulationen oder Mediumwechsel durchgeführt werden, war vor und nach jeder Benutzung zu desinfizieren.

3.2.2. Isolierung der OPG-mRNA aus Schilddrüsenkarzinomzellen

Die RNA-Isolierung aus Zellen mit dem RNeasy Mini Kit von QIAGEN (Deutschland) und dem QiaShredder ermöglicht es, aus einer geringen Zellmenge einen relativ hohen Ertrag von Gesamt-RNA zu erzielen. Poly-A RNA isoliert man auf ähnliche Weise mit Hilfe des PolyAtract mRNA kit von Promega (Madison, WI).

Zur RNA Isolation benötigt man eine ausreichend konfluent 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 μ l β -ME auf 1 ml RLT-Puffer). Die Temperatur in der Mikrozentrifuge sollte um die 20° C betragen,

die Arbeitsgeschwindigkeit schnell sein und die RNase-freien Bedingungen eingehalten werden.

Der Zellkulturüberstand wurde in Eppendorfgläsern (2 ml) gesammelt und für eine spätere Verwendung in einer Proteinbestimmung mittels OPG-ELISA bei -80°C aufbewahrt. In jedes Well wurden 350 μl des RLT- β -Mercaptoethanol-Gemisches geladen und gut verteilt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden sie mit einer Pipette durch Auf- und Abpipettieren gründlich homogenisiert und lysiert. Nach Zugabe von 350 μl 70%igem Ethanol wurde noch einmal kräftig gemischt. Dann ludt man das Volumen von 700 μl auf die RNeasy-Säulen und zentrifugierte eine Minute bei 9.300 g. Danach folgte ein Waschschrift mit 700 μl RWI-Puffer, den man auf die Säulen gabt und nochmalig 15 Sekunden mit 9.300 g zentrifugierte. Die Säule wurde nun auf ein neues Gefäß gesetzt, mit 500 μl RPE-Puffer gewaschen und erneut 15 Sekunden zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen mit 500 μl RPE-Puffer schloss sich eine Zentrifugation von 2 Minuten bei 15.700 g an, in deren Anschluss die Säulen auf Eppendorf-Cups gesetzt wurden. Auf die an den Säulen gebundene RNA wurde nun 50 μl RNase freies Wasser gegeben, 1 Minute bei 9.300 g zentrifugiert und die RNA somit in die Eppendorf-Cups eluiert. Anschließend beschriftete man die Eppendorf-Cups und lagerte sie dann bei -80°C .

Beim Umgang mit RNA sollte darauf geachtet werden, dass die RNA nicht mit der exogenen Ribonuklease (RNase), die von der Bakterienflora der menschlichen Haut gebildet wird, in Kontakt kommt. Daher sollten beim Umgang mit RNA immer Einmalhandschuhe getragen werden, die häufig gewechselt werden sollten. Alle Reaktionsgefäße, Aufbewahrungsbehältnisse und Pipettiermaterialien sollten RNase frei sein. Dazu wurden die Gegenstände, mit denen die RNA in Berührung kommen konnte, autoklaviert und getrennt von den übrigen Labormaterialien gut als RNase-frei gekennzeichnet aufbewahrt.

3.2.3. Photometrische RNA-Quantifizierung

Um die Konzentration und Reinheit der eluierten RNA zu ermitteln, wurde diese mit Hilfe der UV-Spektralphotometrie analysiert. Dazu wurden 5 μl RNA in wässriger

Lösung mit 95 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, die Absorption in einer Quarzküvette bei den Wellenlängen $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm gemessen und deren Verhältnis errechnet. Um die Konzentration abschätzen zu können, wurde davon ausgegangen, dass eine RNA-Lösung von 40 µg/ml bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm eine Absorption von 1 hat.

Daraus ergibt sich die folgende Formel zur Errechnung der Konzentration von RNA in wässriger Lösung: $C = A_{260} \times U \times V$

wobei C = Konzentration in µg/ml

U = Umrechnungsfaktor in µg/ml, entspricht bei RNA 40

V = Verdünnungsfaktor

A_{260} = Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm

Der Quotient aus A_{260} zu A_{280} gibt Aufschluss über den Grad der Kontaminierung der RNA mit Protein. Er sollte idealerweise zwischen 1,5 und 1,7 liegen.

3.2.4. Northern-Gelelektrophorese und Northern-Blot

Die Northern-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von denaturierter RNA nach ihrer Molekülgröße. Bei der Gelelektrophorese macht man sich die Kraft zu Nutzen, die ein elektrisches Feld auf geladene Teilchen ausübt und die abhängig ist von der Gesamtladung des Teilchens und der Stärke des elektrischen Feldes. Die Laufgeschwindigkeit von RNA- und DNA-Fragmenten in einem Spannungsfeld ist proportional zu deren Größe. Um zu vermeiden, dass sich eine für die Auftrennung hinderliche Sekundärstruktur bildet, findet die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in einem formaldehydhaltigen Agarosegel statt (Lehrach et al., 1977).

Zuerst wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt, indem 3 g Agarose mit 144,5 ml DEPC-Wasser und 20 ml 10 x MOPS erhitzt und anschließend 35 ml Formaldehyd hinzugegeben wurde. Dann wurde das Gel in eine Elektrophorese-gelträgerkammer gegossen und dort für eine Stunde ausgehärtet. Nach dem Aushärten wurde das Gel auf dem Träger dann in die mit 1 x MOPS gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt.

Die in RNase freiem Wasser gelösten RNA-Proben wurden in berechneten gleichen Mengen für eine Stunde in einer Speed-Vac Zentrifuge getrocknet. Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden sie in jeweils 14 µl Resuspensionspuffer (350 µl Formamid, 160 µl Formaldehyd und 90 µl 10 x MOPS) gelöst und anschließend für 5 Minuten bei 65° C denaturiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurde zu jeder Probe 6 µl Auftragspuffer (24% Eisessig, 0,8 M Natrium-Acetat-3-Hydrat, 0,04% Methylblau und DEPC-Wasser) hinzugegeben, um die Proben zu beschweren und damit in den Gelkammern zu halten, und das Gel dann mit den Proben beladen. Insgesamt sollte die Gelelektrophorese 3 Stunden laufen.

Nach den 3 Stunden der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen, in 200 ml 20 x SSC gegeben und 25 Minuten auf einen Horizontalschüttler gestellt. Weiterhin wurde die positiv geladene Nylon Hybond Membran vorbereitet indem sie passend für das Gel zugeschnitten, kurz gewässert und anschließend in 20 x SSC gelegt wurde. Während dieser Zeit wurde die Apparatur für den Blot aufgebaut. In eine RNase-freie, mit 20 x SSC gefüllte Glasschale wurde ein Glasblock hinein gestellt und ein Stück Chromatographiepapier dann so über den Block gelegt, dass beide Enden in die Flüssigkeit der Schale eintauchen.

Northern – Blot:

Der Northern-Blot dient der Übertragung der in der Elektrophorese aufgetrennten RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran mittels Kapillarkraft. Die Nylonmembran wird dann in der Hybridisierung, einem sensitiven Verfahren zum Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA, verwendet.

Nach den 25 Minuten auf der Schüttelplatte wurde das Gel aus dem 20 x SSC genommen und mit den Kammeröffnungen nach unten auf das Chromatographiepapier in der Apparatur für den Blot gelegt. Die Ränder des Gels wurden auf allen Seiten ca. 0,5 bis 1 cm mit Frischhaltefolie bedeckt, anschließend die Membran über das Gel gelegt. Das Ganze wurde dann mit 4 Schichten Chromatographiepapier bedeckt, und einem ca. 5 cm dicken Stapel Papierhandtücher, der mit einem Gewicht beschwert wurde. Der Blot stand über Nacht. Durch Kapillarkraft wurde in dieser Zeit die RNA aus dem Gel auf die Nylonmembran übertragen.

Am folgenden Tag wurde die Blotting-Apparatur auseinander gebaut. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte mit Hilfe eines UV- Crosslinkers (1200 J x 100). Um die RNA anzufärben legte man die Membran nach der Fixierung für 15 Minuten in 100 ml 5% Essigsäure, anschließend für 5 Minuten in 100 ml Methylenblau. Danach wurde die Membran noch zweimal für jeweils 3 Minuten mit DEPC Wasser gewaschen, um die überschüssige Farbe zu entfernen. Nun ließ man die Membran 30 Minuten bei Lufttemperatur trocknen und lagerte sie anschließend lichtgeschützt in einem Hybridisierungsbeutel.

3.2.5. Radioaktive Markierung der cDNA (Random Priming)

Das Random Priming basiert auf einer Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg et al., 1983) und ermöglicht die schnelle Synthese von DNA-Sonden mit hoher spezifischer Aktivität bei geringem DNA-Bedarf. Dabei binden monomere 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 dient zum Nachweis der mRNA bei der Northern-Hybridisierung. Der „DECAPrime II DNA Labeling kit“ stammt von der Firma Ambion (Austin TX, USA), das [α -³²P] dCTP wurde von der Firma DuPont-NEN (Boston, USA) bezogen. Die β -Aktin-cDNA wurde verwendet, um eine m-RNA von 2.0 kb nachzuweisen, eine OPG-cDNA zum Nachweis von 2.9 kb, 4.2 kb und 6.5 kb mRNA, außerdem eine RANKL-cDNA zum Nachweis einer 2.4 kb mRNA Spezies.

In ein Eppendorfggefäß 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 denaturiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung sofort auf Eis gestellt und 5 μ l 5x-dCTP-Puffer hinzugegeben. Im Heißraum pipettierte man 5 μ l [α -³²P] dCTP und 1,5 μ l Klenow Enzym zu dem Ansatz, durchmischte und zentrifugierte ihn und ließ ihn bei 37°C 60 bis 90 Minuten inkubieren. Dasselbe Verfahren führten wir auch durch, um die oben beschriebenen Sonden für β -Aktin cDNA und RANKL-cDNA herzustellen.

3.2.6. Hybridisierung

Die Northern-Hybridisierung stellt ein sensitives Verfahren zum Nachweis geoelektrophoretisch getrennter RNA dar. Die zu untersuchende RNA wird durch die Zugabe von komplementärer radioaktiver cDNA lokalisiert und durch die Autoradiographie nachgewiesen (Alwine et al., 1977; Meinkoth et al., 1984; Thomas et al., 1980).

Für die Prähybridisierung werden 10 ml 68 °C warmer Hybridisierungslösung (Express Hybridisation Solution, Clontech, Palo Alto) in eine Hybridisierungsflasche zusammen mit der Nylon-Membran gegeben. Anschließend inkubiert man die Membran mit der Hybridisierungslösung bei 68°C für 30 Minuten im Hybridisierungssofen. Die zuvor durch das Random-Priming hergestellte DNA-Sonde wird 5 Minuten bei 95°C denaturiert, 10 µl davon mit 10 ml Hybridisierungslösung vermischt und nach den 30 Minuten auf die Membran in die Hybridisierungsflasche gegeben, aus der zuvor die Hybridisierungslösung entfernt wurde. Dann inkubiert man die Membran mit der Hybridisierungslösung, die die radioaktive Sonde enthält weitere 60 Minuten bei 68°C. Anschließend wird die Membran 2 mal 10 Minuten in einer Schale mit 300 ml der Waschlösung I (2 x SSC und 0,05% SDS) auf einer Schüttelplatte gewaschen. Dann wird die Membran wieder in saubere 50°C warme Hybridisierungsflaschen zurückgegeben und mit 200ml der Waschlösung II (0,1 x SSC und 0,1% SDS) 2 mal 20 Minuten bei 50°C gewaschen. Zum Schluss wird die Membran mit Chromatographiepapier (Whatman, Maidstone, UK) kurz abgetrocknet, wobei die Membran nicht austrocknen sollte, in einem Hybridisierungsbeutel (Hybridisation Bags, GibcoBRL Life Technologies) platziert und über Nacht auf einem Autoradiographiefilm bei -80°C exponiert. Die Hybridisierung mit dem House keeping-Gen β -Aktin dient der Quantifizierung, 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 House keeping-Gene weitgehend konstant. Das hier verwendete Housekeeping-Gen β -Aktin von der Firma Clontech (Palo Alto, USA) wies eine mRNA von 2,0 kb nach.

3.2.7. Entfernung radioaktive Probe

Um die mRNA Blots für eine erneute Hybridisierung mit OPG-cDNA, mit β -Aktin-cDNA oder RANKL-cDNA verwenden zu können, wurde die Radioaktivität mittels Dehybridisierung entfernt. Zuerst erhitzte man 200-300 ml 0,5% SDS in einer Schale bei 95°C, danach wurde die Membran 10 Minuten in diesem Bad geschüttelt und anschließend noch einmal 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde aus diesem Bad entfernt, und mit Hilfe eines Geigerzählers auf eventuell noch vorhandene Radioaktivität geprüft. Falls sich noch Radioaktivität nachweisen ließ, wurde die oben aufgeführte Dehybridisierung noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Blots bei -80°C gelagert.

Autoradiographie:

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

Die Filmexposition erfolgte in einer Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie auf Filmen von Kodak bei -80°C. Nach 24 Stunden Testexposition wurden die Filme im Filmautomat Curix 160 von Agfa entwickelt und anschließend in Abhängigkeit von der Signalstärke erneut exponiert.

3.2.8. OPG-ELISA

Mithilfe des Osteoprotegerin-ELISAs, einem Sandwich-Enzymimmunoassay, kann Osteoprotegerin direkt aus Patientenserum, Urin, Plasma oder konditioniertem Zellkulturmedium bestimmt werden (Hofbauer et al., 1999a). Wir verwendeten Überstände von Zellkulturen, die vor der RNA-Isolation asserviert, zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert wurden. Bei dem System von Immundiagnostik diente ein monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes humanes OPG (rhOPG) dazu, die biologische Wirkung des OPG zu neutralisieren. Als Nachweis-Antikörper diente ein biotinylierter polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen menschliches OPG. Im ersten Schritt wurde die Probe und der biotinylierte Antikörper gegen Osteoprotegerin in die Mikrotiterplatte überführt, es bildete sich ein „Sandwich“ in dem das gebundene

Osteoprotegerin zwischen dem Bindeantikörper (auf der Platte) und dem Detektionsantikörper (biotinyliert) eingefasst war. Nach einem Waschvorgang, der nicht spezifisch gebundenes Material entfernte, wurde über ein Streptavidin-Peroxidase/TMB-System OPG-Protein schließlich quantifiziert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselte die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung war dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Eine Standardkurve wurde erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt wurden. Die untere Nachweisgrenze dieses Systems beträgt 0,14 pmol/l. Der Intraassay - Varianzkoeffizient beträgt 8 - 10% (n = 16), der Interassay-Varianzkoeffizient < 10% (n = 16).

Zur Vorbereitung verdünnte man 100 ml des ELISA- Waschpufferkonzentrates mit 900 ml Aqua dest. (1:10). Ebenso wurden 50 µl der OPG-Stocklösung mit 950 µl Zellkulturmedium (1:20) vorverdünnt (S1) und daraus eine Standardkurve in 1:2 Verdünnungsschritten hergestellt (S2-S5). Als Standard 0 pg/ml wurde Zellkulturmedium verwendet. Die OPG-Protein Konzentration maß man in dreifacher Bestimmung. Zuerst wurde 100 µl mitgelieferter Assaypuffer in jede Vertiefung pipettiert, dann 50 µl des Standards und die Proben in einer Verdünnung von 1:20 bis 1:100. Anschließend wurden 50 µl des zweiten Antikörpers, des Detektionsantikörpers in jede Vertiefung hinzugegeben und der Blot dann über Nacht (18 – 24 h) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Platte verworfen, jedes Well jeweils fünfmal mit 300 µl Waschpuffer ausgewaschen und die Mikrotiterplatte auf Saugpapier ausgeklopft. Dann pipettierte man 500 µl des Konjugates (Streptavidin/Peroxidase) zur Quantifizierung von OPG in jede Vertiefung und ließ es bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubieren. Erneut wurde der Inhalt der Platte verworfen, fünfmal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und die Mikrotiterplatte auf Saugpapier ausgeschlagen. Von dem TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin) wurden 200 µl dazu gegeben und entsprechend der Farbdifferenzierung ca. 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem Zusatz von 50 µl Stopplösung wurde die Reaktion gestoppt und es vollzog sich ein Farbwechsel von blau nach gelb, wobei die Farbentwicklung der Analytmenge (Probe/Standard) proportional war. Umgehend wurde im Anschluss die Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620nm gemessen.

Statistische Analyse:

Die Zahlenwerte der OPG-Proteinmessungen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von Dreifachbestimmungen angegeben. Mittels Varianzanalyse für Vielfachmessungen (ANOVA) wurden Zeitkinetiken und Dosis-Wirkungs-Kurven analysiert. In allen statistischen Verfahren wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Die Proben wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt, um den Fehler bei der Messung möglichst gering zu halten. Zur Auswertung der Ergebnisse gehörte ebenfalls die Normalisierung der Messwerte zum A_{260} -Wert, um unterschiedliche Zellzahlen als Fehlerquelle in der vergleichenden Analyse von Proteinkonzentrationen auszuschließen. Die Absorption der mit RNase-freiem Wasser eluierten RNA bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm (A_{260} -Wert) wurde im Rahmen der RNA-Isolierung für den Northern Blot durchgeführt (Kapitel 3.2.3.). Aus ihr konnte die Menge an eluierter RNA berechnet werden, welche wiederum Rückschlüsse auf die Zellzahl der einzelnen Löcher einer Zellkulturplatte zuließ. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der gemessenen RNA-Konzentration und der Zellzahl. Die A_{260} -Werte wurden zur jeweiligen Kontrolle mit 1,0 ins Verhältnis gesetzt. Der Mittelwert der drei Messwerte und ihre Standardabweichung wurden durch diesen Wert dividiert.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis von OPG in der Schilddrüse

Bisher wurde das OPG/RANKL-System hauptsächlich im Bezug auf den Knochenstoffwechsel und das Immunsystem untersucht, daher untersuchten wir zunächst die OPG-Expression in verschiedenen Geweben.

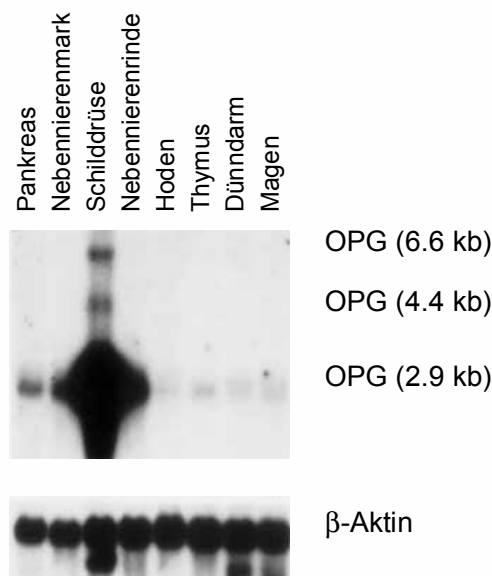


Abb. 3 Northern Blot Analyse aus Poly-A-RNA verschiedener humanen endokriner und gastrointestinaler Gewebe. OPG-Poly-A-mRNA (2,9 kb, 4,4 kb, 6,6 kb) und β -Aktin-Poly-A-mRNA (2,0 kb). Die Poly-A-mRNA-Mengen der verschiedenen Gewebe waren justiert, so dass die Signale der β -Aktin-Hybridisierung vergleichbare Intensitäten aufwiesen. Es wurden jeweils 2 μ g Poly-A-mRNA aufgetragen.

Es zeigte sich, dass in der Schilddrüse, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Geweben, drei verschiedene OPG-mRNA-Spezies (2,9 kb; 4,4 kb; 6,6 kb) exprimiert werden. Die Nebennieren mit Rinde und Kortex, sowie das Pankreas zeigten ein geringeres OPG-mRNA Vorkommen. Minimale OPG-RNA-Mengen ließen sich in Hoden, Thymus, Dünndarm und Magen nachweisen. Die gleichmäßigen Signalintensitäten der β -Aktin-Banden nach der Hybridisierung ermöglichten den Vergleich der OPG-Produktion. Die hohe OPG-mRNA-Genexpression in der Schilddrüse, veranlasste zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Rolle von RANKL und OPG in der Physiologie und Pathophysiologie der Schilddrüse.

4.2. Nachweis von OPG und RANKL in Schilddrüsenkarzinomzellen

Es konnte bisher im Bezug auf die Schilddrüse ein möglicher Zusammenhang des OPG/RANKL-Systems und Autoimmunerkrankungen wie dem M. Basedow gezeigt werden (Hofbauer et al., 2002a). Daher war es von weiterem Interesse zu untersuchen, welche Regulationsmechanismen dieses System bei malignen Erkrankungen der Schilddrüse beeinflussen würden. Dazu untersuchten wir die zwei Schilddrüsenkarzinomzelllinien SW579 und XTC auf ihre OPG-RNA-Expression.

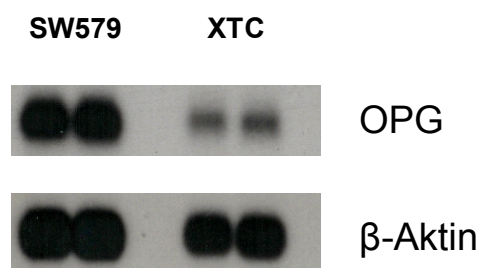


Abb. 4 Northern Blot Analyse verschiedener Schilddrüsenzellen. Die Analyse wurde mit jeweils 10 μ g RNA aus SW579 und XTC-Zellen in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Zellen waren unbehandelt und die RNA wurde isoliert nachdem die Zellen zu einem konfluenten Rasen gewachsen waren. Hybridisiert wurde mit OPG Gesamt-RNA und β -Aktin-cDNA.

Es zeigte sich, dass beide Zelllinien OPG-RNA produzieren. Die RNA-Expression war in SW579 Zellen stärker vorhanden als in XTC Zellen. Die Banden nach der Hybridisierung mit β -Aktin-cDNA ließen erkennen, dass die Mengen an Gesamt-RNA, die aufgetragen wurden, in etwa gleich waren. Zur genaueren Untersuchung dieser Zellen wurde Poly-A-RNA isoliert und eine Northern Blot Analyse mit Hybridisierung von RANKL, OPG und β -Aktin durchgeführt.

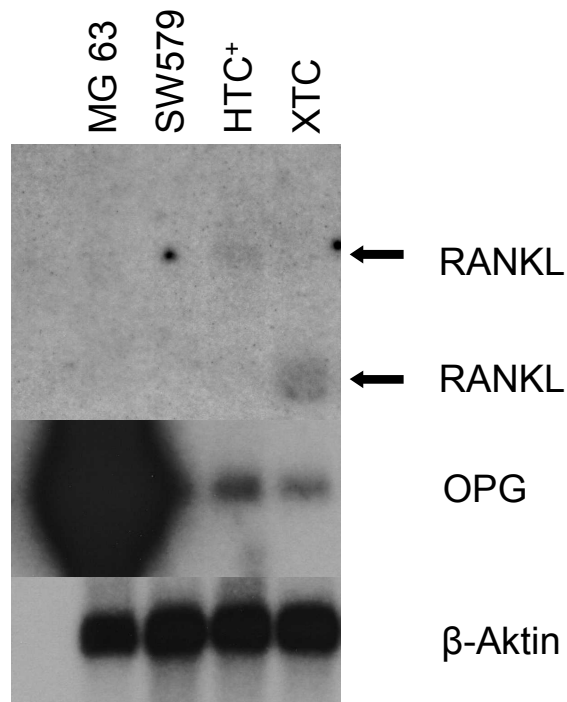


Abb. 5 Northern Blot Analyse verschiedener Zellen, Nachweis von RANKL und OPG. Die Analyse wurde mit jeweils 1 µg Poly-A RNA der Zellen SW579, HTC⁺ und XTC durchgeführt, außerdem wurde 1 µg Poly-A-RNA von MG63-Zellen als Positivkontrolle aufgetragen. Hybridisiert wurde mit RANKL- und OPG-Gesamt-RNA sowie mit β-Aktin-cDNA.

Bei der Northern Blot Analyse von Poly-A-RNA verschiedener Schilddrüsenzellen zeigt sich nach der Hybridisierung mit RANKL, dass HTC⁺ und XTC-Zellen RANKL-RNA exprimieren, jedoch in unterschiedlich langen Formen. HTC⁺ exprimiert vermutlich die normal lange Form und XTC eine Splice-Variante. In SW579 Zellen lässt sich kein RANKL nachweisen. Zu erwarten war eine RANKL-Expression in MG63-Zellen, die als Positivkontrolle dienten. OPG wurde von allen Zellen exprimiert, am stärksten war das Signal bei der Poly-A-RNA von MG63, die als Positivkontrolle diente. Die Banden bei der Hybridisierung mit β-Aktin wiesen alle eine gleiche Signalintensität auf, so dass sich die RANKL- und OPG-RNA-Expression der einzelnen Zellen gut vergleichen lässt. Da SW579-Zellen in allen Versuchen am meisten OPG produzierten, wurden diese für alle weiteren Versuche verwendet.

4.3. Regulation von OPG durch Sexualhormone

Da Schilddrüsenkarzinome wesentlich häufiger bei Frauen als bei Männern auftreten (Moser et al., 2002) und auch die Inzidenz von Östrogenrezeptoren in Schilddrüsenneoplasien signifikant höher als im normalen Schilddrüsengewebe ist (Miki et al., 1990; Mizukami et al., 1991), stellten wir uns als nächstes die Frage, ob die OPG-Expression in Schilddrüsenkarzinomzellen durch Sexualhormone reguliert wird. Deshalb erfolgte die Stimulation dieser Zellen mit sowohl weiblichen als auch männlichen Sexualhormonen.

4.3.1. Regulation von OPG durch Östrogene

Östrogene sind Steroidhormone, die im Ovar, in der Plazenta und in geringen Mengen in der Nebenniere und im Hoden gebildet werden. Sie können auch im Fettgewebe durch Aromatisierung aus Testosteron entstehen (Gärtner & Haen, 2001). Östradiol stellt das wichtigste und potenteste Östrogen dar. Die Wirkungsmechanismen von Östrogenen im Zielgewebe sind denen der anderen Steroidhormone sehr ähnlich und schließen intrazelluläre Rezeptoren (ER- α , ER- β) und die Beeinflussung der Transkription sowie zytoplasmatischer Proteine ein (Carr & Bradshaw, 2001).

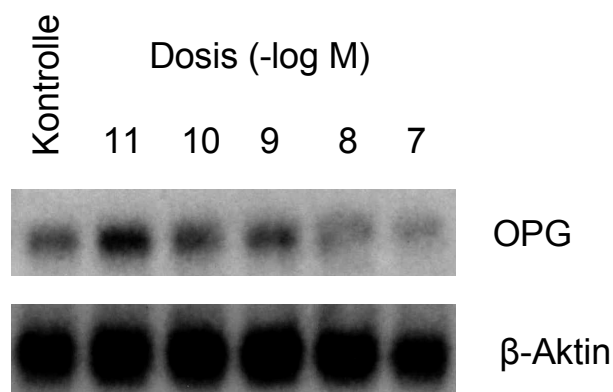


Abb. 6 Northern Blot Analyse mit 17 β -Östradiol stimulierten SW579-Zellen. Die Analyse wurde mit 6 μ g RNA aus SW579 Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit 17 β -Östradiol durchgeführt. Stimuliert wurde mit 17 β -Östradiol in den Konzentrationen 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M und 10⁻⁷ M. Als Negativkontrolle diente Ethanol, das Lösungsmittel von 17 β -Östradiol. Zur Kontrolle wurde mit β -Aktin-cDNA hybridisiert.

In der Analyse zeigt sich, dass 17β -Östradiol die OPG-RNA-Expression biphasisch beeinflusst. In Konzentrationen von 10^{-11} M, 10^{-10} M und 10^{-9} M kommt es zu einer dosisabhängigen Stimulation der OPG-Produktion. Ab einer Konzentration von 10^{-8} M wird die OPG-RNA-Expression gehemmt. Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene verifiziert werden.

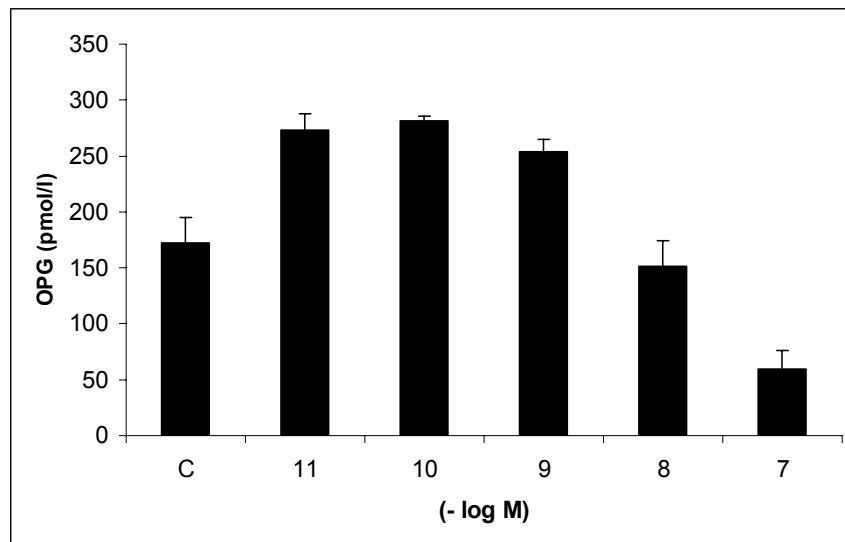


Abb. 7 ELISA aus dem Medium mit 17β -Östradiol stimulierten SW579-Zellen. Vor der Analyse wurde das Medium 1:50 verdünnt. Der ELISA wurde in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Konzentrationen von 17β -Östradiol mit denen stimuliert wurde waren 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M. Als Negativkontrolle diente Ethanol, das Lösungsmittel von 17β -Östradiol. ANOVA: $p < 0,001$.

Auch die Proteinanalyse mittels ELISA zeigt eine Steigerung der OPG-Proteinausschüttung bei der Stimulation mit 17β -Östradiol in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-10} M und 10^{-9} M sowie eine Hemmung der OPG-Proteinproduktion bei Konzentrationen von 10^{-8} M und 10^{-7} M 17β -Östradiol. Insgesamt zeigt sich also auf RNA- und Proteinebene ein biphasischer Effekt von 17β -Östradiol.

4.3.2. Regulation von OPG durch 5 α -DHT (5 α -Dihydrotestosteron) und Testosteron

Das wichtigste testikuläre Androgen ist Testosteron, das in den Leydig-Zellen gebildet wird. Als lipophiles Steroid diffundiert Testosteron aus der Leydig-Zelle in die testikulären Kapillaren. Es ist im Blut zu 98% an Transportproteine gebunden. Freies Testosteron diffundiert passiv in die Zielzelle und kann dort zu Östradiol aromatisiert oder zu 5 α -Dihydrotestosteron (5 α -DHT) reduziert werden. Testosteron und 5 α -DHT reagieren mit demselben Androgenrezeptor, wobei 5 α -DHT eine etwa 10fach höhere androgene Potenz besitzt (Allolio & Schulte, 1996).

Schon frühere Untersuchungen zeigten, dass durch 5 α -DHT in humanen fetalen Osteoblasten (hFOB) die OPG-mRNA-Spiegel gesenkt und die Proteinsekretion gehemmt werden konnten. Auch Testosteron führte dort zu einer Hemmung der OPG-RNA- und Proteinbiosynthese (Hofbauer et al., 2002a). In der Androgen-sensiblen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP induzierte 5 α -DHT OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion. Diese Induktion wurde auf transkriptionaler Ebene reguliert (Brown et al., 2004). Daher untersuchten wir ob auch die OPG-Produktion in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen durch 5 α -DHT oder Testosteron moduliert wird.

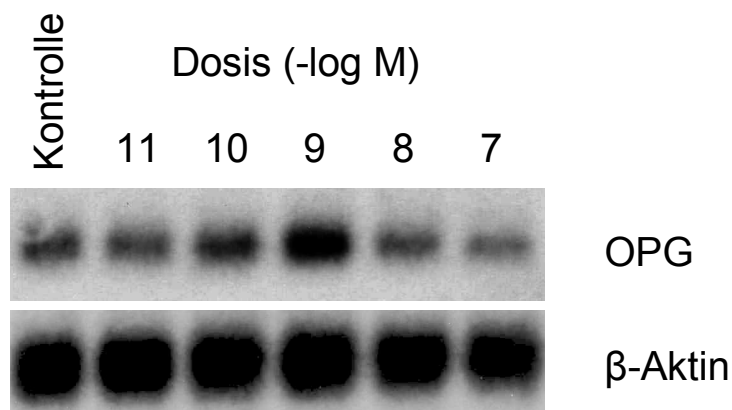


Abb. 8 Northern Blot Analyse mit 5 α -DHT (5 α -Dihydrotestosteron) stimulierten SW579-Zellen. Die Analyse wurde mit 8 μ g RNA aus SW579 Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit 5 α -DHT (5 α -Dihydrotestosteron) durchgeführt. Stimuliert wurde mit 5 α -DHT in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M. Als Negativkontrolle diente Ethanol, das Lösungsmittel von 5 α -DHT. Zur Kontrolle wurde mit β -Aktin-cDNA hybridisiert.

Bei der Stimulation von SW579-Zellen mit 5α -DHT (5α -Dihydrotestosteron) zeigt sich ein biphasischer Effekt auf die OPG-RNA-Expression. 5α -DHT (5α -Dihydrotestosteron) in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-10} M und 10^{-9} M führte zu einer Steigerung der OPG-RNA-Expression, wobei der stärkste Effekt bei einer Konzentration von 10^{-9} M erreicht wird. Ab einer Konzentration von 10^{-8} M kam es zu einer Hemmung der OPG-RNA-Expression. Die Hybridisierung mit β -Aktin-cDNA zeigte ähnliche DNA-Mengen.

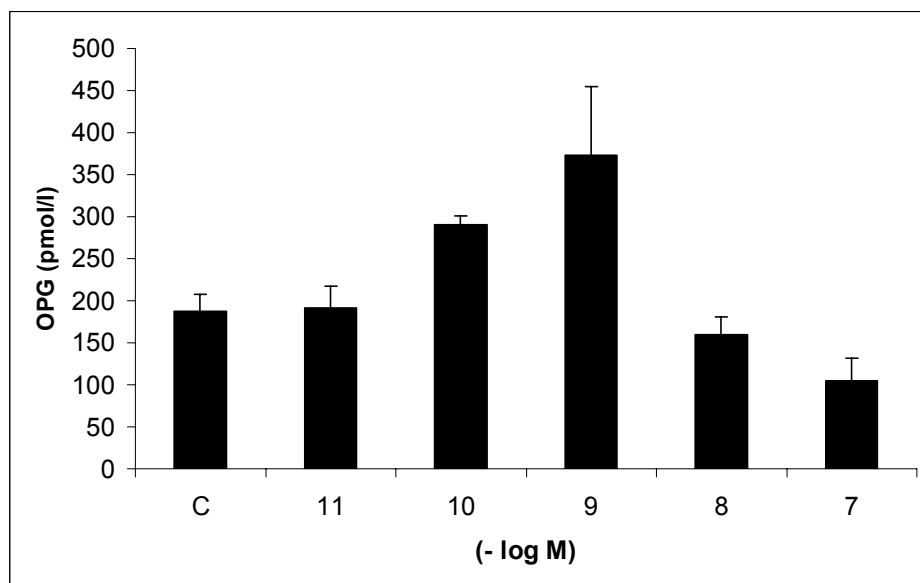


Abb. 9 ELISA aus dem Medium mit 5α -DHT (5α -Dihydrotestosteron) stimulierten SW579-Zellen. Vor der Analyse wurde das Medium 1:50 verdünnt. Der ELISA wurde in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Konzentrationen von 5α -DHT mit denen stimuliert wurde, waren 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M. Als Kontrolle diente Ethanol, worin 5α -DHT gelöst war. ANOVA: $p < 0,001$.

Auch auf Proteinebene konnte dieser Effekt bestätigt werden. Auch hier kommt es bei den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-10} M und 10^{-9} M 5α -DHT (5α -Dihydrotestosteron) zu einer Steigerung der OPG-Proteinausschüttung, mit dem deutlichsten Effekt bei 10^{-9} M. In den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-7} M führt 5α -DHT (5α -Dihydrotestosteron) auch hier zu einer Hemmung der OPG-Proteinproduktion.

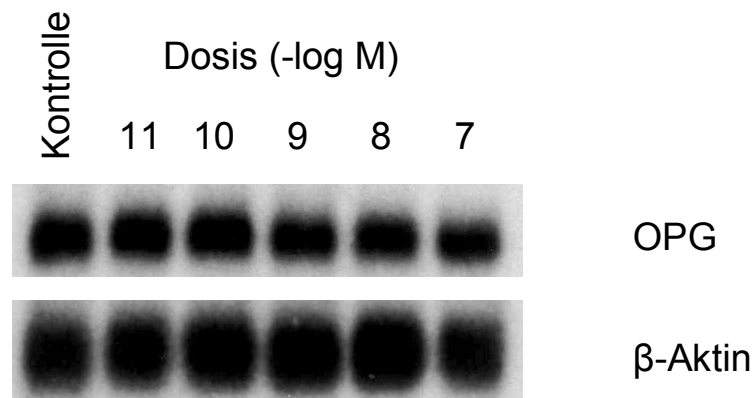


Abb. 10 Northern Blot Analyse mit Testosteron stimulierten SW579-Zellen. Die Northern Blot Analyse wurde mit 9 µg RNA aus SW579 Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit Testosteron durchgeführt. Stimuliert wurde mit Testosteron in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M. Als Kontrolle diente Ethanol, worin Testosteron gelöst war. Zur Kontrolle wurde mit β-Aktin-cDNA hybridisiert.

Die Banden bei der Hybridisierung mit OPG zeigen alle eine ähnliche Signalstärke, wie auch die Banden bei der Hybridisierung alle eine gleiche Signalintensität zeigen. Dies deutet darauf hin, dass Testosteron in diesen Dosen keinen Effekt auf die Expression von OPG-RNA hat. Auch im ELISA, der aus dem Medium der mit Testosteron stimulierten Zellen durchgeführt wurde, ergab sich, dass Testosteron in diesen Dosen keinen Effekt auf die Höhe der OPG-Proteinwerte hat (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.3.3. Regulation von OPG durch DHEA (Dehydroepiandrosteron)

Dehydroepiandrosteron (DHEA) und sein Sulfatester (DHEAS) sind quantitativ das Hauptprodukt der Steroidsynthese in der menschlichen Nebennierenrinde bei Frauen und Männern. DHEA und DHEAS, die zirkadian ähnlich dem Kortisol verlaufen, zeigen in Abhängigkeit vom Lebensalter stark unterschiedliche Serumspiegel. Sie steigen ab dem 6.-8. Lebensjahr bis zu ihrem Gipfel um das 20. Lebensjahr an und beginnen ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich um etwa 10% pro Dekade zu fallen (Allolio & Schulte, 1996).

Eine Untersuchung von Shibata et al. konnte zeigen, dass DHEA im Tiermodell und in pharmakologischen Dosen zu einer Senkung der Inzidenz von chemisch induzierten Schilddrüsenkarzinomen führt. Ob dieser Effekt auf der Beeinflussung der OPG-Produktion in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen beruhen könnte, war Gegenstand der nächsten Untersuchung.

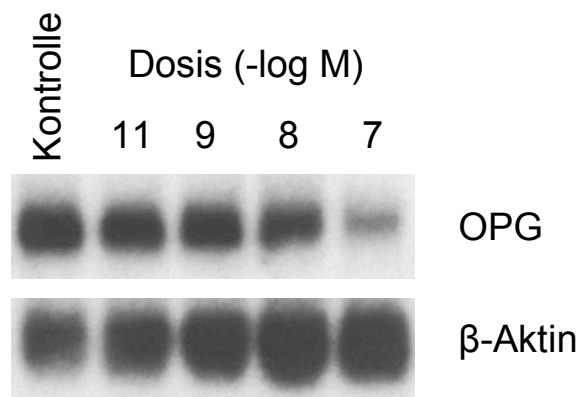


Abb. 11 Northern Blot Analyse mit DHEA (Dehydroepiandrosteron) stimulierten SW579-Zellen. Die Analyse wurde mit 8 μ g RNA aus SW579 Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit DHEA durchgeführt. Stimuliert wurde mit DHEA in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M. Als Kontrolle diente Ethanol, das Vehikel für DHEA. Zur Kontrolle wurde mit β -Aktin-cDNA hybridisiert.

Bei der Simulation mit DHEA zeigt sich eine deutliche Dosis-abhängige Hemmung der OPG-RNA-Expression, mit einer maximal effektiven Dosis von 10^{-7} M. Die Konzentrationen 10^{-11} M und 10^{-9} M zeigen noch keinen Effekt, die Banden entsprechen in ihrer Signalstärke, der der Kontrolle. Ab einer Konzentration von 10^{-8} M ist schon eine leichte Hemmung zu erkennen. Ganz deutlich wird dieser Effekt bei 10^{-7} M. Hier zeigt sich die Signalstärke der Bande etwa nur halb so stark wie die der Kontrolle.

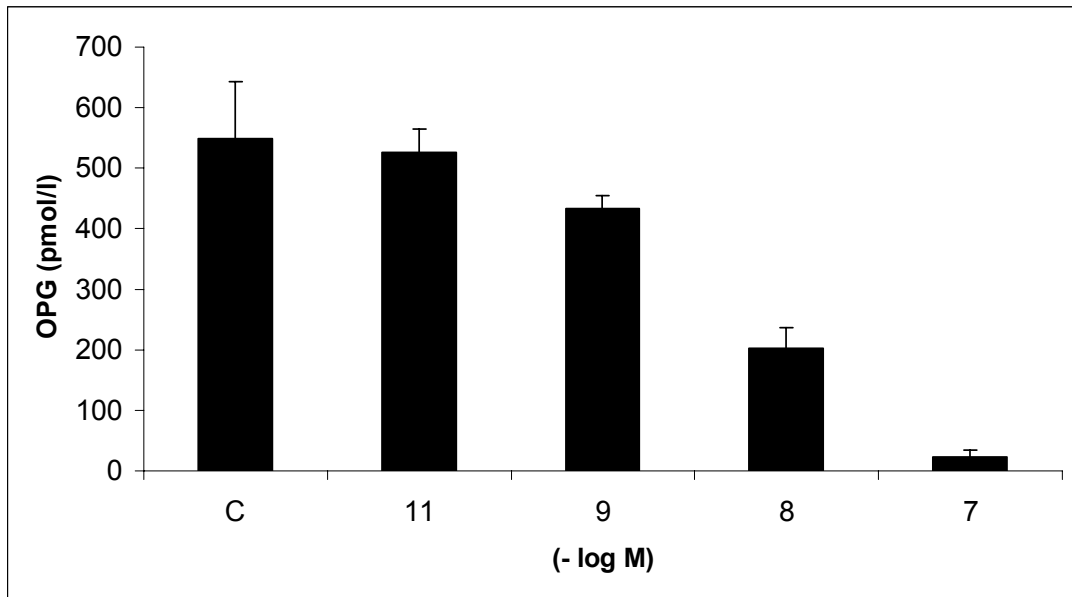


Abb. 12 ELISA aus dem Medium mit DHEA (Dehydroepiandrosteron) stimulierten SW579-Zellen. Vor der Analyse wurde das Medium 1:50 verdünnt. Der ELISA wurde in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Konzentrationen von DHEA, mit denen stimuliert wurde, waren 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M. Als Kontrolle diente Ethanol, das Vehikel für DHEA. ANOVA: $p < 0,001$.

Die Analyse des OPG-ELISA zeigt ein ähnliches Bild auf Proteinebene. Hier ist der hemmende Effekt von DHEA auf die OPG-Produktion jedoch schon ab einer Konzentration von 10^{-9} M zu erkennen. Die Stimulation mit 10^{-8} M DHEA führt zu einem Abfall der Proteinwerte um mehr als die Hälfte des vorhergehenden Wertes. Bei einer Stimulation mit 10^{-7} M DHEA ist im ELISA fast kein OPG mehr nachweisbar. Während im Northern Blot erst eine Hemmung der OPG-Expression ab einer Konzentration von 10^{-7} M DHEA nachweisbar ist, zeigt der ELISA schon ab einer Konzentration von 10^{-9} M DHEA eine Hemmung der OPG-Proteinproduktion, so dass der ELISA hier die sensitivere Methode darstellt.

4.4. Regulation von OPG durch Glukokortikoide

Glukokortikoide werden in der Zona fasciculata der Nebenniere gebildet und sind an der Regulation des Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsels beteiligt. Große therapeutische Bedeutung wird ihnen wegen ihrer antiphlogistischen Wirkung beigemessen, die wahrscheinlich durch immunsuppressive Eigenschaften der Glukokortikoide bedingt ist. Dexamethason ist ein orales, synthetisches Glukokortikoid mit einer relativen glukokortikoiden Potenz von 30 – bezogen auf Cortisol mit 1 – und fehlender mineralokortikoider Wirkung (Gärtner & Haen, 2001).

Bisher wurde bereits ein hemmender Einfluss von Dexamethason auf die OPG-Proteinsekretion in Prostatakarzinomzelllinien beschrieben (Penno et al., 2002). Eine klinisch-epidemiologische Untersuchung an Patienten mit nephrologischen Erkrankungen bestätigte, dass die hemmenden Wirkungen von Glukokortikoiden auf die OPG-Spiegel auch in vivo bestehen (Sasaki et al., 2001).

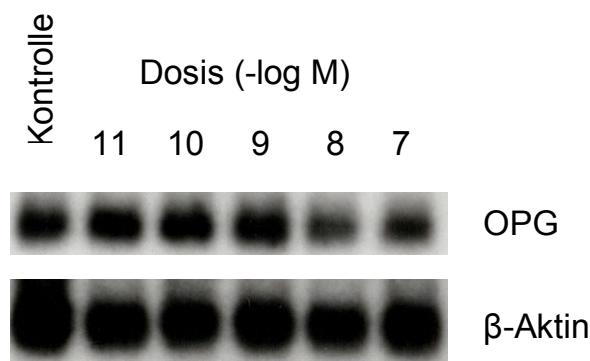


Abb. 13 Northern Blot Analyse mit Dexamethason stimulierten SW579-Zellen. Die Analyse wurde mit 10 µg RNA aus SW579 Zellen nach einer 24-stündigen Stimulation mit Dexamethason durchgeführt. Stimuliert wurde mit Dexamethason in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M. Als Kontrolle diente Ethanol, das Vehikel für Dexamethason. Zur Kontrolle wurde mit β -Aktin-cDNA hybridisiert.

Die Northern-Blot-Analyse zeigt eine Dosis-abhängige Hemmung der OPG-RNA-Expression durch Dexamethason. Dieser Effekt ist ab einer Konzentration von 10^{-8} M Dexamethason deutlich erkennbar.

4.5. Regulation von OPG durch Medikamente

4.5.1. Regulation von OPG durch Cycloheximid

Untersuchungen zeigten, dass Cycloheximid zusammen mit TRAIL in der Lage ist in SW579 Schilddrüsenkarzinomzellen Apoptose zu induzieren (Ahmad et al., 2000). Um zu prüfen ob der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid einen Einfluss auf die OPG-RNA-Expression und -Proteinausschüttung in SW579-Zellen hat, wurden diese Zellen von uns mit Cycloheximid in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert.

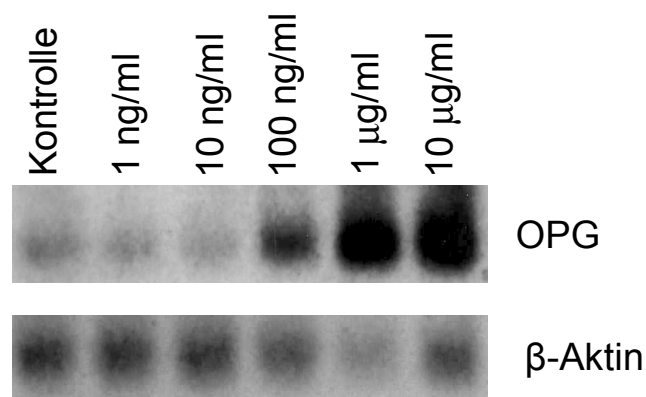


Abb. 14 Northern Blot Analyse mit Cycloheximid stimulierten SW579-Zellen. Die Analyse wurde mit 9 µg RNA aus SW579 Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit Cycloheximid durchgeführt. Stimuliert wurde mit Cycloheximid in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml. Als Kontrolle diente Ethanol, worin Cycloheximid gelöst war. Zur Kontrolle wurde mit β-Aktin-cDNA hybridisiert.

In der durchgeführten Northern-Blot-Analyse zeigt sich eine deutlich Dosis-abhängige Steigerung der OPG-RNA-Expression durch Cycloheximid. Dieser Effekt lässt sich ab einer Konzentration von 100 ng/ml gut erkennen und hat seine maximal-effektive Dosis bei 10 µg/ml.

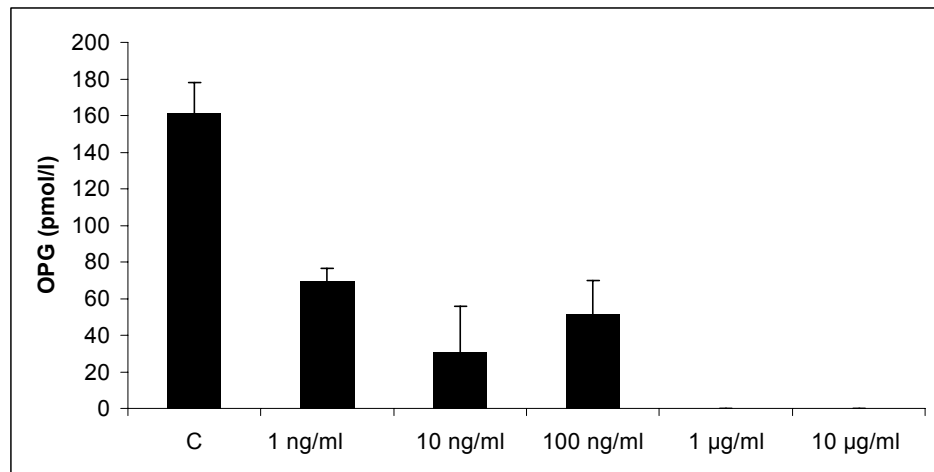


Abb. 15 ELISA aus dem Medium mit Cycloheximid stimulierter SW579-Zellen. Vor der Analyse wurde das Medium 1:50 verdünnt. Der ELISA wurde in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Konzentrationen von Cycloheximid, mit denen stimuliert wurde, waren 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml. Als Kontrolle diente Ethanol, worin Cycloheximid gelöst war. ANOVA: $p < 0,001$.

Der ELISA der mit den Cycloheximid-stimulierten SW579-Zellen durchgeführt wurde, zeigt eine deutliche Hemmung, bzw. vollkommene Unterdrückung der OPG-Proteinproduktion. Schon ab einer Konzentration von 1 ng/ml Cycloheximid zeigt sich ein Absinken der nachgewiesenen Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle. Die Proteinmengen von OPG liegen bei den Konzentrationen von 10 ng/ml und 100 ng/ml noch ein wenig niedriger als bei der Stimulation mit 1 ng/ml Cycloheximid. Untersucht man das Medium der mit 1 µg/ml und 10 µg/ml Cycloheximid stimulierten Zellen, so lässt sich kein OPG mehr nachweisen. Das Ergebnis des ELISA zeigt also das Gegenteil des Ergebnisses der Northern Blot Analyse. In der Northern Blot Analyse kann man eine Steigerung der OPG-RNA-Expression nachweisen. Die Steigerung der RNA-Expression ist umso stärker, je höher die Dosis des gegebenen Cycloheximid ist.

4.5.2. Regulation von OPG durch Lovastatin

Von Wang et al. wurde 2003 nachgewiesen, dass Lovastatin in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen Apoptose und eine Redifferenzierung induzieren kann (Wang et al., 2003). Da OPG eine wichtige Rolle in der Regulation von Apoptose spielt (Ahmad et al., 2000; Emery et al., 1998; Satoh et al., 2001), wurde durch Stimulation mit Lovastatin untersucht, ob es sich bei dem Apoptose-vermittelnden Faktor in Schilddrüsenkarzinomzellen um OPG handeln könnte.

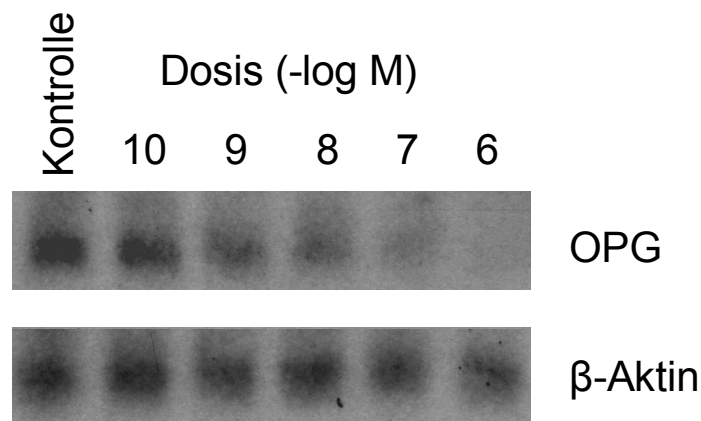


Abb. 16 Northern Blot Analyse mit Lovastatin stimulierter SW579-Zellen. Die Northern Blot Analyse wurde mit 10 µg RNA aus SW579 Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit Lovastatin durchgeführt. Stimuliert wurde mit Lovastatin in den Konzentrationen 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M. Als Kontrolle diente Ethanol, worin Lovastatin gelöst war. Zur Kontrolle wurde mit β-Aktin-cDNA hybridisiert.

Die Banden der Konzentrationen 10^{-10} M, 10^{-9} M und 10^{-8} M zeigen in etwa die gleiche Signalintensität. Bei einer Konzentration von 10^{-7} M ist nur ein sehr schwaches Signal sichtbar, bei der Bande mit der Konzentration 10^{-6} M ist überhaupt keine Bande mehr zu sehen. Die Signalstärke der β-Aktin Banden ist in allen Bahnen annähernd gleich. Die OPG-Expression wird also durch Lovastatin ab einer Konzentration von 10^{-7} M gehemmt.

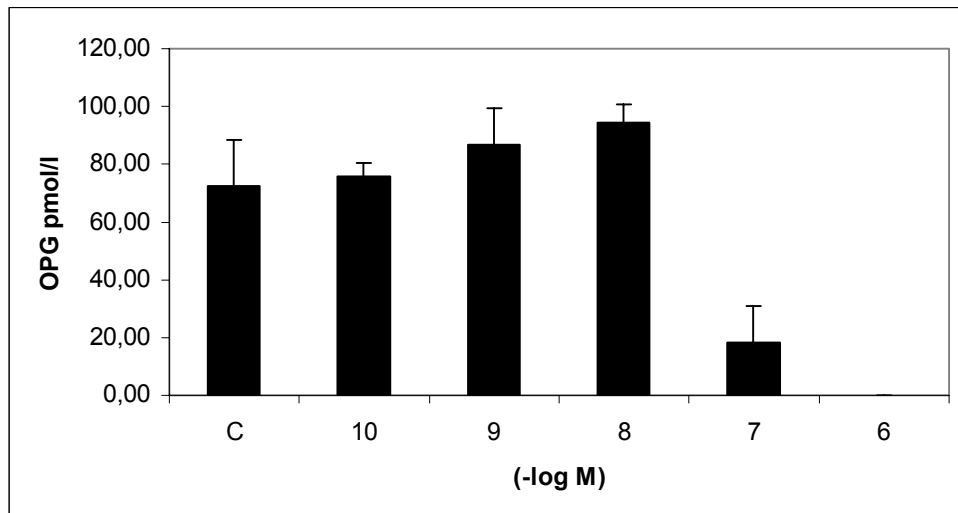


Abb. 17 **ELISA aus dem Medium mit Lovastatin stimulierter SW579-Zellen.** Vor der Analyse wurde das Medium 1:50 verdünnt. Der ELISA wurde in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Konzentrationen von Lovastatin, mit denen stimuliert wurde, waren 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M. Als Kontrolle diente Ethanol, worin Lovastatin gelöst war. Anova: $p < 0,001$.

Aus dem Medium der SW579-Zellen wurde nach der Stimulation mit Lovastatin ein ELISA durchgeführt. Es zeigt sich, dass die Konzentrationen von OPG bei den mit 10^{-10} M, 10^{-9} M und 10^{-8} M Lovastatin stimulierten Zellen in etwa im Bereich der Kontrolle liegen. Bei den mit 10^{-7} M Lovastatin stimulierten Zellen sieht man dann einen Abfall der OPG-Proteinwerte um fast 80% im Vergleich zu der Stimulation mit 10^{-8} M Lovastatin. Stimuliert man die Zellen mit 10^{-6} M Lovastatin, ist im ELISA kein OPG mehr nachweisbar. Man kann also daraus erkennen, dass die OPG-Protein-Produktion in diesen Schilddrüsenkarzinomzellen durch die Gabe von Lovastatin ab einer Konzentration von 10^{-7} M gehemmt wird.

4.6. Regulation von OPG durch Zytokine

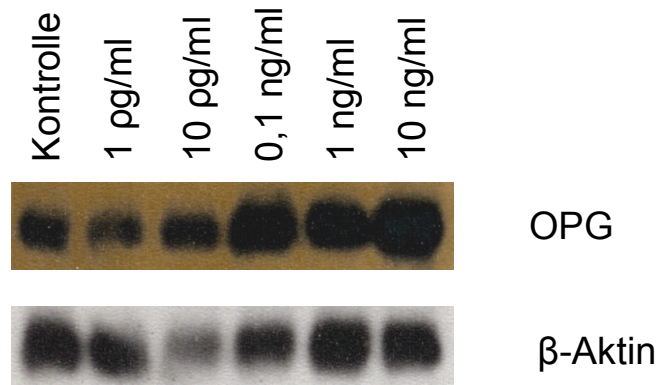


Abb. 18 Northern Blot Analyse mit Interleukin-1 β stimulierten SW579-Zellen. Die Northern Blot Analyse wurde mit 8 μ g RNA aus SW579 Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit Interleukin-1 β durchgeführt. Stimuliert wurde mit Interleukin-1 β in den Konzentrationen 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml. Als Kontrolle diente PBS/BSA, worin Interleukin-1 β gelöst war. Zur Kontrolle wurde mit β -Aktin-cDNA hybridisiert.

Die Northern-Blot-Analyse der mit Interleukin-1 β stimulierten SW579-Zellen zeigt eine deutliche Dosis-abhängige Steigerung der OPG-RNA-Expression. Ab einer Konzentration von 0,1 ng/ml Interleukin-1 β ist dieser Effekt zu beobachten. Bei den mit 1 μ g/ml und 10 μ g/ml stimulierten Zellen entsprechen die Banden in der Northern-Blot-Analyse in etwa der der Kontrolle. Die größte Steigerung der OPG-RNA-Expression konnte bei einer Konzentration von 10 ng/ml Interleukin-1 β erreicht werden. Die β -Aktin Banden zeigen bis auf die 3. Bande eine annähernd gleiche Signalintensität.

5. Diskussion:

5.1. Bedeutung des OPG/RANKL-Systems bei Malignomen

Bisher wurde das OPG/RANKL-System hauptsächlich im Bezug auf den Knochenstoffwechsel und das Immunsystem untersucht. OPG bindet dort, als sezernierter Rezeptor, kompetitiv an RANKL und neutralisiert so alle biologischen Wirkungen von RANKL, indem dessen Bindung an seinen Rezeptor RANK verhindert wird (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b).

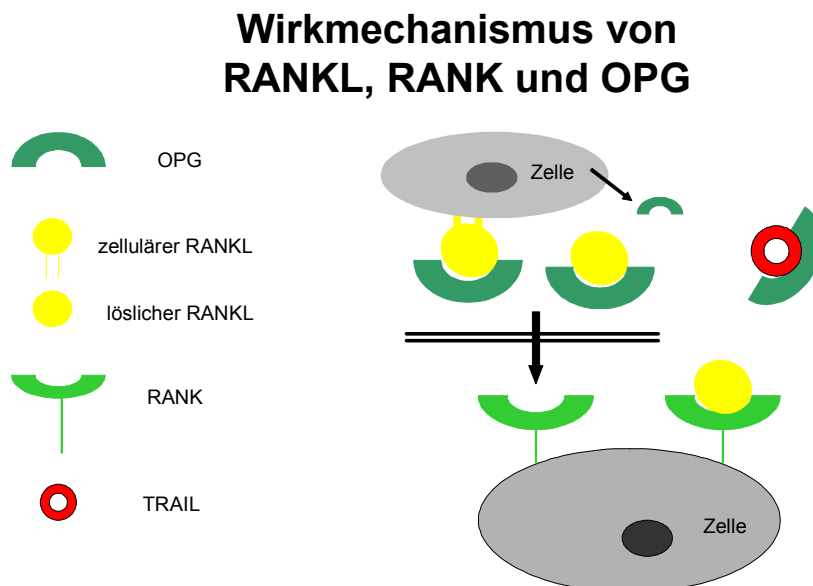


Abb. 19 **Zusammenspiel der TNF-Liganden und -Rezeptoren RANKL, RANK, OPG und TRAIL.** RANKL kann an seine Rezeptoren in löslicher und zellgebundener Form binden. OPG und RANK konkurrieren um die Bindung von RANKL. Im OPG/RANKL-Komplex wird RANKL inaktiviert. OPG fungiert ebenfalls als neutralisierender Rezeptor für TRAIL.

Auch in anderen Geweben wurde OPG nachgewiesen (Simonet et al., 1997). Wir konnten zeigen, dass die Schilddrüse ebenfalls ein Ort starker OPG-Produktion ist. In dem von uns untersuchten Schilddrüsengewebe wurde hauptsächlich die 2,9 kb lange Form von OPG-RNA gebildet. Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchungen von Morinaga et al. und Yasuda et al. gestützt, die schon 1998 zeigten, dass die humane OPG-mRNA hauptsächlich als 2,9 kb lange Form vorliegt.

Bisher konnte für die Schilddrüse ein möglicher Zusammenhang des OPG/RANKL-Systems und Autoimmunerkrankungen wie dem M. Basedow aufgezeigt werden (Hofbauer et al., 2002a). Daher war es von besonderem Interesse zu untersuchen, welchen Regulationsmechanismen dieses System bei malignen Erkrankungen der Schilddrüse unterliegt und welche Faktoren das System beeinflussen würden.

Dazu untersuchten wir die zwei Schilddrüsenkarzinomzelllinien SW579 und XTC auf ihre basale OPG-RNA-Expression mittels Northern-Blot Analyse und ELISA. Die OPG-Produktion in den SW579-Zellen war deutlich stärker ausgeprägt als in den XTC-Zellen. Daher wurden von uns in den weiteren Versuchen hauptsächlich SW579-Schilddrüsenkarzinomzellen verwendet. Diese Zelllinien wurden weiterhin auch auf ihre RANKL-RNA-Expression untersucht. Es zeigte sich, dass XTC-Zellen nur sehr schwach und SW579-Zellen gar kein RANKL produzierten. Auch dieses Ergebnis passt zu anderen Forschungsergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass RANKL in der Schilddrüse nur sehr schwach gebildet wird. Da RANKL in nur sehr geringem Ausmaß in den von uns untersuchten Zellen gebildet wurde, konzentrierten wir uns in weiteren Versuchen auf die OPG-RNA-Expression und -Proteinproduktion und deren Regulierbarkeit in Schilddrüsenkarzinomzellen.

Zu der Charakterisierung des OPG/RANKL/RANK-Systems bei anderen malignen Tumoren gibt es bereits einige Arbeiten anderer Gruppen. Es konnte dargelegt werden, dass die Regulation der basalen OPG-Expression in Osteosarkomzellen die Proteinkinase C- und cAMP-Signalwege involviert (Yang et al., 2002). Von einer anderen Forschungsgruppe wurden die Serum-OPG-Spiegel bei gesunden Kontrollen und Krebspatienten gemessen. Man konnte erhöhte Serum-OPG-Spiegel bei Patienten mit Pankreaskarzinom, kolorektalem Karzinom, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen nachweisen (Lipton et al., 2002). Bei Analyse der metastasierten soliden Karzinome zeigten nur solche mit Leber- oder Weichteilmetastasen, nicht jedoch welche mit Knochen- oder Lungenmetastasen, erhöhte OPG-Serumspiegel (Lipton et al., 2002).

Patienten mit multipltem Myelom zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe erniedrigte Serum-OPG-Spiegel. Die Expression von RANKL- und OPG-mRNA wurde

auch in Prostatakarzinomzellen nachgewiesen (Brown et al. 2001a; Lin et al. 2001), wobei die konstitutive Genexpression in malignen Prostatazellen etwa vierfach höher war als die normaler Prostatazellen (Brown et al., 2001a). Nach Xenotransplantation waren die RANKL-mRNA-Spiegel bei der Verwendung von PC-3-Prostatakarzinomzellen (die osteolytische Metastasen bilden) deutlich höher als die bei der Verwendung von LnCaP-Prostatakarzinomzellen (die bevorzugt osteoblastische Metastasen ausbilden) (Brown et al., 2001a). Die pathogenetische Bedeutung von RANKL und die mögliche therapeutische Anwendung von OPG bei der Genese von Knochenmetastasen durch Prostatakarzinomzellen wurde tierexperimentell belegt. Durch die gleichzeitige Gabe von OPG konnte nach Injektion von Prostatakarzinomzellen in die Tibia die Differenzierung von Osteoklasten und die Ausbildung osteolytischer Läsionen komplett verhindert werden (Zhang et al., 2001). Ein weiterer positiver Aspekt zeigte sich durch eine Therapie mit OPG bei Mäusen mit skelettal metastasierten Primärtumoren, hierbei konnten schmerzbedingte Verhaltensweisen blockiert werden (Honore et al., 2000, Luger et al., 2001).

Ein möglicher Nachteil von OPG in der Tumorthherapie ist, dass TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) durch OPG in seiner Wirkung ebenfalls gehemmt wird. Es wurde nachgewiesen, dass TRAIL in Krebszellen vermehrt Apoptose induziert. TRAIL wirkt über die Bindung an zwei Death-Rezeptoren (DR4 und DR5), die dann Caspase vermittelt Apoptose induzieren (Mitsiades et al., 2000).

In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass OPG als Überlebensfaktor für humane Prostatakarzinomzellen wirkt (Holen et al., 2002). Die untersuchten Prostatakarzinomzelllinien produzierten unterschiedliche Mengen von OPG. Wurden diese Zellen mit TRAIL stimuliert, konnte dosisabhängig Apoptose induziert werden. Setzte man diesen Zellen zusätzlich rekombinantes OPG zu, konnte die TRAIL-induzierte Apoptose in dosisabhängiger Weise antagonisiert werden. Dieser anti-apoptotische Effekt von OPG verschwand bei der gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit RANKL. Die Behandlung mit RANKL alleine hatte keinen Einfluss auf die Apoptoseraten dieser Zellen (Holen et al., 2002).

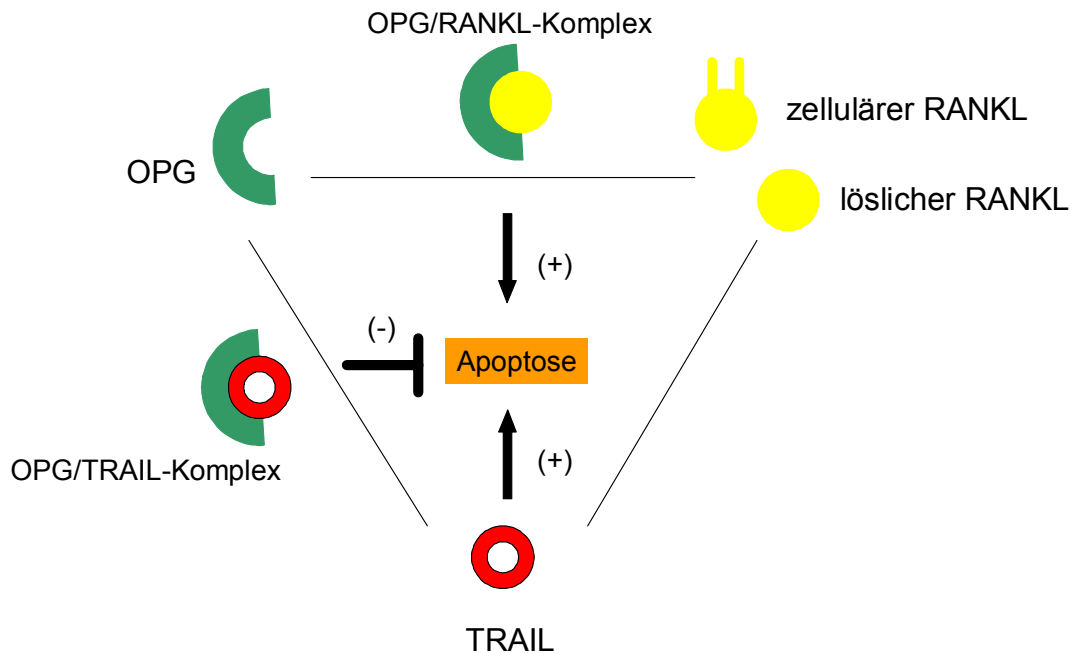


Abb. 20 Interaktion von OPG, RANKL und TRAIL

Die Abb. veranschaulicht den Zusammenhang von OPG, RANKL und TRAIL in Bezug auf Apoptose. TRAIL induziert durch die Bindung an spezifische Rezeptoren Apoptose. OPG hemmt Apoptose indem es TRAIL bindet und die apoptotische Wirkung verhindert. Die Einflüsse des OPG/RANKL-Komplexes auf das System bestehen hauptsächlich aus indirekten Faktoren. Durch die Bindung von RANKL an seinen Decoy-Rezeptor OPG wird dieses inaktiviert und eine weitere Interaktion von RANKL und seinem Rezeptor RANK sowie die Induktion Apoptose hemmender Mechanismen wird verhindert. Zusätzlich wird durch die Inaktivierung von OPG im OPG/RANKL-Komplex OPG aus dem Gleichgewicht entfernt und TRAIL liegt vermehrt frei vor.

5.2. Regulation von OPG durch Steroidhormone

5.2.1. Regulation von OPG durch Östrogene und Phyto-Östrogene

Aufgrund der höheren Prävalenz von Schilddrüsenkarzinomen bei Frauen gibt es bereits einige Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von Hormonen auf die Entstehung und das Wachstum von Schilddrüsenkarzinomen beschäftigen. Die von uns untersuchten Schilddrüsenkarzinomzellen ließen sich durch die Zugabe von 17 β -Östradiol in ihrer OPG-RNA- und Proteinsynthese modulieren. Durch die Stimulation mit 17 β -Östradiol zeigte sich eine Hemmung sowohl der mRNA-Synthese als auch der OPG-

Proteinbiosynthese ab einer Konzentration von 10^{-8} M 17- β -Estradiol. In den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-10} M und 10^{-9} M steigerte 17 β -Östradiol hingegen die OPG-RNA- und Proteinsynthese.

Von anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Sexualhormon-Rezeptoren nur in neoplastischem Schilddrüsengewebe nachweisbar sind (Miki et al., 1990). Im Zytosol normalen Schilddrüsengewebes ließen sich weder Androgen- noch Östrogen- oder Progesteronrezeptoren nachweisen (Miki et al., 1990). In neoplastischem Schilddrüsengewebe konnten in 22% der Gewebe Androgenrezeptoren, in 29% Östrogenrezeptoren und in 18% Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden (Miki et al., 1990).

Eine Untersuchung von Gewebe aus papillären Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich mit normalen Schilddrüsengewebe und Schilddrüsengewebe von M. Basedow Patienten zeigte ähnliche Ergebnisse (Mizukami et al., 1991). Hier wurde jedoch noch eine Differenzierung im Bezug auf das Geschlecht der Gewebespender vorgenommen. Die Geschlechtsdifferenzierung zeigte, dass das Schilddrüsenkarzinomgewebe der Männer interessanterweise eine höhere Konzentration an Östrogenrezeptoren aufwies als das der Frauen (Mizukami et al., 1991). Weiterhin wurden die Gewebe auf ihren Gehalt an Hormonen untersucht. Dabei zeigte sich, dass insgesamt 76% der papillären Schilddrüsenkarzinomgewebe einen positiven Nachweis für Östradiol erbrachten. In 73% der männlichen und 91% der weiblichen Schilddrüsenkarzinomgewebe wurde Östradiol nachgewiesen (Mizukami et al., 1991). Von einer weiteren Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Östrogenrezeptoren in Schilddrüsentumoren stark ausgeprägt sind (Manole et al., 2001). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte, dass eine Stimulation von differenzierten und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen mit Östrogenen zu einem vermehrten Wachstum dieser Zellen führte. Das Antiöstrogen ICI 182780 blockte diesen Effekt. Wurde es alleine zu der Schilddrüsenzellkultur gegeben, reduzierte es die Proliferationsrate der Zellen (Manole et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass es einen möglichen Zusammenhang zwischen Sexualhormonen und der Entstehung bzw. dem Wachstum von Schilddrüsenkarzinomen gibt.

Der Einfluss von Östrogenen auf das OPG/RANKL/RANK-System ist bisher von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden. Es gibt Arbeiten über die

Beeinflussbarkeit der Serumparameter des OPG/RANKL-Systems durch Östrogene und Arbeiten, die den Einfluss auf zellulärer Ebene untersuchten.

Durch eine 6-monatige Gabe von GnRH-Agonisten sank bei allen untersuchten Frauen in der Prämenopause wie erwartet der Serumöstrogenspiegel (Uemura et al., 2003). Gleichzeitig wurden steigende OPG-Spiegel im Serum gemessen. Die Erhöhung der OPG-Serumspiegel wurde als möglicher Kompensationsmechanismus für den durch die Behandlung mit GnRH-Analoga hervorgerufenen Knochenabbau gesehen (Uemura et al., 2003).

Eine weitere Untersuchung zeigte, dass das Phyto-Östrogen Genistein nach einer einjährigen Behandlung von postmenopausalen Frauen zu einer Erhöhung der Serum-OPG-Spiegel und zu sinkenden RANKL-Serumspiegeln führte (Crisafulli et al., 2004). In der Vergleichsgruppe, die ein Jahr lang mit 1 mg/d 17 β -Östradiol und Norethisteronazetat behandelt wurden, kam es zu sinkenden OPG-Serumspiegeln und sinkenden RANKL-Serumspiegeln. Dies wurde erklärt durch die Zugabe von Norethisteron (partielle androgene Eigenschaften). In der Placebogruppe konnte man beobachten, dass die behandelten postmenopausalen Frauen ansteigende OPG- und RANKL-Serumspiegel aufwiesen (Crisafulli et al., 2004). Dies würde zu den Ergebnissen von Uemura passen.

Von Khosla et al. konnte gezeigt werden, dass prämenopausale Frauen höhere OPG-Serumspiegel als Männer unter 50 Jahren haben, bei postmenopausalen Frauen und Männern über 50 Jahren konnten vergleichbar hohe OPG-Serumspiegel bestimmt werden. Sowohl Frauen als auch Männer wiesen mit dem Alter ansteigende OPG-Serumspiegel auf (Khosla et al., 2002b). Frauen, die orale Kontrazeptiva nahmen, hatten -wie erwartet- niedrigere 17 β -Östradiol- und Progesteron-Serumspiegel als Frauen, die keine oralen Kontrazeptiva nahmen. Bei den Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, ließen sich erhöhte OPG-Serumspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Hofbauer et al., 2004). sRANKL-Serumspiegel unterschieden sich in beiden Gruppen jedoch nicht (Hofbauer et al., 2004). Kontrovers dazu steht die Untersuchung von Han et al.. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass der OPG-Serumspiegel bei gesunden postmenopausalen Frauen nach einer einjährigen Hormonersatztherapie Behandlung deutlich abfiel (Han et al., 2005). In beiden Untersuchungen zeigt sich,

dass es sich bei dem OPG/RANKL-System in vivo um ein Sexualhormon-sensibles Zytokinsystem handelt.

Betrachtet man unsere Ergebnisse, die in niedrigen Konzentrationen von 17β -Östradiol eine Steigerung der OPG-RNA- und -Proteinsynthese und in hohen Konzentrationen eine Hemmung sowohl der OPG-RNA- als auch der -Proteinsynthese zeigen, lässt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse erkennen, wobei sich die im Serum gemessenen OPG-Spiegel nicht komplett auf das zelluläre System bei Schilddrüsenkarzinomen übertragen lassen.

Betrachtet man das OPG/ TRAIL-System als einen möglichen Regulationsmechanismus des Tumorwachstums, könnte eine Steigerung der OPG-Produktion durch Östrogene einen möglichen Wachstumsfaktor für Schilddrüsenkarzinome darstellen. Erhöhte OPG-Spiegel in Schilddrüsenkarzinomen könnten die Zellen vor TRAIL induzierter Apoptose schützen, indem sie an TRAIL binden und so dessen Wirkung blockieren (Mitsiades et al., 2000). Da wir uns in unseren Untersuchungen hauptsächlich auf den Nachweis und die Beeinflussung der OPG-RNA- und Proteinspiegel konzentrierten, bleibt die Frage offen, wie sich die RANKL-RNA- und Proteinspiegel in Schilddrüsenkarzinomzellen durch Östrogene beeinflussen lassen.

Einen Hinweis, dass auch erniedrigte oder sinkende Östrogenspiegel das Wachstum von Schilddrüsenkarzinomen fördern könnten, liefert eine Studie, die zeigt, dass bei ovariectomierten Frauen das Risiko an einem Schilddrüsenkarzinom zu erkranken steigt (Mack et al., 1999). In einer Fall-Kontroll-Studie konnte festgestellt werden, dass es durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva zu einer Reduktion des Erkrankungsrisikos für papilläre Schilddrüsenkarzinome bei Frauen unter 45 Jahren kam (Rossing et al., 1998). Keine Assoziation gab es bei Frauen über 45 Jahren zwischen der Einnahme oraler Kontrazeptiva und dem Risiko, an einem papillären Schilddrüsenkarzinom zu erkranken (Rossing et al., 1998). Gegensätzlich dazu steht die Untersuchung von Thiruvengadam et al., die an einem Karzinom-Modell der Ratte zeigten, dass Ovariectomie die Inzidenz von Schilddrüsentumoren senkte, im Vergleich zu Ratten mit intakter Ovarialfunktion. Die Zugabe von Östradiol und Testosteron steigerte die Inzidenz (Thiruvengadam et al., 2003). Auch von dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl die

Östradiol-Spiegel als auch dessen Rezeptorzahl in Schilddrüsentumorgewebe verstärkt vorliegen (Thiruvengadam et al., 2003).

Um die Wirkung von Östrogenen auf die OPG-RNA-Expression in Knochen und auf die Knochendichte zu untersuchen, wurde ein Mausmodell genutzt. Ovariectomisierte Mäuse wurden 2 Wochen lang mit Östradiol behandelt. Dies führte zu einer verstärkten trabekulären Knochendichte und einem erniedrigten OPG/RANKL-Quotienten (OPG-RNA-Spiegel sanken, RANKL-Spiegel stiegen) (Lindberg et al., 2001). Dieses Ergebnis unterstreicht auch unsere Erkenntnisse, dass Östrogene in Schilddrüsenkarzinomzellen die OPG-RNA- und Proteinsynthese hemmen können. Gestützt wird die These, dass Östrogene zu sinkenden OPG-RNA-Spiegeln führen können, auch durch die Untersuchungen von Yano et al., 1999, der erhöhte OPG-Serumspiegel bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose beobachtete.

Um herauszufinden, über welchen Östrogenrezeptor das OPG/RANKL-System im Knochen beeinflusst wird, wurden intakte männliche Mäuse mit fehlendem ER (Östrogenrezeptor)- α , ER- β und Fehlen von beiden ER untersucht. Man sah, dass Mäuse mit fehlendem ER- α und Mäuse mit Fehlen von beiden ER, nicht aber Mäuse mit fehlendem ER- β erhöhte OPG/RANKL-Quotienten aufwiesen. Dies zeigte, dass nur ER- α nicht aber ER- β in die Regulation des vertebrealen OPG/RANKL-Quotienten involviert ist (Lindberg et al., 2001).

An zellulären Modellen ist die Wirkung von Östrogenen auf das OPG/RANKL-System mehrfach untersucht worden. Die Zugabe von Östradiol zu Thyreozyten induzierte eine erhöhte Proliferationsrate *in vitro* (Thiruvengadam et al., 2003). 17β -Östradiol führte in humanen Osteoblasten zu einem gesteigerten OPG-RNA- und Proteinspiegel. Progesteron hatte dagegen keinen Effekt (Liao et al., 2002). Wurden Maus-Stromazellen mit 17β -Östradiol stimuliert, kam es ebenfalls zu einer Steigerung der OPG-RNA-Expression und -Proteinausschüttung (Saika et al., 2001). Neben der Hemmung von RANKL und der Stimulation von OPG in Osteoblasten modulieren Östrogene auch die dritte Komponente dieses Zytokinsystems im Knochen, den Rezeptor RANK. Dabei wird die RANK-Empfindlichkeit gegenüber RANKL herabgesetzt, wodurch nachgeschaltete Signalkaskaden wie die c-jun-N-terminale Kinase gehemmt werden (Shevde et al., 2000; Srivastava et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bedeutung von Östrogenen und Östrogenrezeptoren für die Ausbildung und das Wachstum von Schilddrüsenkarzinomen bislang noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Für zukünftige Untersuchungen wäre eine Analyse der RANKL-RNA-Expression und -Proteinproduktion sowie der TRAIL-OPG-Interaktion in Schilddrüsenkarzinomzellen nach einer Behandlung mit Östrogenen interessant.

5.2.2. Regulation von OPG durch Testosteron und 5 α -DHT

Androgene können aufgrund ihrer Lipophilie die Plasmamembran und den Zellkern durch Diffusion durchdringen, und an den, in der peri- und intranukleären Zellregion gelegenen Androgenrezeptor (AR) binden. Die Bindung von Liganden an den AR induziert eine Kaskade nukleärer Ereignisse, wie die Dissoziation von AR-assoziierten Proteinen (Hitze-Schock Proteine), die Phosphorylierung des AR sowie eine Dimerisation mit anderen Rezeptormonomeren. Dieser aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex agiert als nukleärer Transkriptionsfaktor, welcher mit seiner DNA-bindenden Domäne an DNA-Sequenzen bindet, die in der Promotorregion von Androgen-abhängigen Genen gelegen sind. Dort steigert oder hemmt er deren Transkription (Hofbauer et al., 1999b). Es konnten zwei Formen von AR nachgewiesen werden, AR A (87 kDa) und AR B (110 kDa) (Hofbauer et al., 1999b).

Möglicherweise spielen Androgene auch eine Rolle in der Karzinogenese der Schilddrüse. Bei Frauen lässt sich sowohl in normalem Schilddrüsengewebe als auch in papillären Karzinomen weder das Hormon Testosteron noch Dihydrotestosteron nachweisen (Onitsuka, 1994). Bei Männern lassen sich Testosteron und DHT ausschließlich in normalem, jedoch nicht in Karzinomgewebe nachweisen. Das Hormon Östradiol findet sich sowohl bei Männern als auch bei Frauen in normalem Schilddrüsengewebe und in Gewebe aus papillären Karzinomen (Onitsuka, 1994). Es könnte also die Möglichkeit bestehen, dass die erhöhte Schilddrüsenkarzinomrate bei Frauen auch auf das Fehlen von Testosteron, nicht nur auf den Überschuss von Östrogenen zurückgeführt werden kann oder das relative Verhältnis von Testosteron zu Östrogen eine Rolle spielt. Bei unseren Untersuchungen zeigte Testosteron nach Zugabe zur Schilddrüsenkarzinomzellkultur jedoch keinen Effekt in Bezug auf die OPG-RNA

oder -Proteinspiegel. Dass Testosteron jedoch eine Wirkung auf das OPG/RANKL-System hat, konnte anhand eines Versuchs gezeigt werden, in dem man normale ältere Männern (mittleres Alter 68 Jahre) über 3 Wochen mit Testosteron behandelte und feststellte, dass es zu einem Absinken der OPG-Serumspiegel kam (Khosla et al., 2002a).

Als weiteren Vertreter der Sexualhormone untersuchten wir die Wirkung von 5α -DHT (Dihydrotestosteron) auf die OPG-RNA und -Proteinspiegel von SW579. 5α -DHT entsteht aus Testosteron durch irreversible Reduktion, es stellt die biologisch wirksame Form des Testosterons auf zellulärer Ebene dar (Thomas et al., 1998). 5α -DHT führte in niedrigen Dosen (bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M) zu einer Steigerung der OPG-RNA und -Proteinproduktion. In höheren Konzentrationen (ab einer Konzentration von 10^{-8} M) wurden die OPG-RNA-Expression und -Proteinproduktion gehemmt.

In humanen fötalen Osteoblasten (hFOB) senkte 5α -DHT den OPG-mRNA-Spiegel und hemmte die Proteinsekretion. Auch Testosteron führte dort zu einer Hemmung der OPG-RNA-Expression und Proteinbiosynthese (Hofbauer et al., 2002a). In der Androgen-sensiblen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP induzierte 5α -DHT hingegen die OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion. Diese Induktion wurde auf transkriptionaler Ebene reguliert (Brown et al., 2004).

Es zeigt sich, dass 5α -DHT bei der Entstehung und dem Wachstum von Schilddrüsenkarzinomen durch die Beeinflussung des OPG/RANKL-Systems eine Rolle spielen könnte. Auch hier wäre eine nähere Betrachtung der Beeinflussbarkeit der RANKL-RNA-Expression und -Proteinproduktion sowie der TRAIL-OPG-Interaktion durch 5α -DHT interessant.

5.2.3. Regulation von OPG durch DHEA (Dehydroepiandrosteron)

Ein weiteres von uns auf seine Wirkung bezüglich des OPG/RANKL-Systems untersuchtes Sexualhormon war DHEA. DHEA, das beim Menschen hauptsächlich in der Nebenniere produziert wird, bildet die Vorstufe für Östrogene und Androgene. Es sinkt bei Frauen genau wie Östrogene in der Postmenopause ab. Bei Männern lassen

sich höhere DHEA Werte als bei Frauen nachweisen, die jedoch auch mit dem Alter um etwa 10% pro Dekade abnehmen (Thomas et al., 1998). Die Stimulation der Schilddrüsenkarzinomzellen mit DHEA führte zu einer Unterdrückung der OPG-RNA und -Proteinbiosynthese. Geht man vom OPG/TRAIL-Apoptosemodell aus, führt dies möglicherweise zu einer Induktion von Apoptose, indem TRAIL durch fehlendes OPG nicht mehr blockiert werden kann. Damit wäre ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt in der Therapie der Schilddrüsenkarzinome die Behandlung mit DHEA. Diese These wird gestützt durch die Untersuchungen von Shibata et al. die zeigen, dass DHEA im Tiermodell und in pharmakologischen Dosen zu einer Senkung der Inzidenz von chemisch induzierten Schilddrüsenkarzinomen führt (Shibata et al., 1995). Die Behandlung mit DHEA führte jedoch in der Leber der untersuchten Ratten zu einer erhöhten Karzinogenese (Shibata et al., 1995). In einer Fall-Kontrollstudie wurde gezeigt, dass DHEA-S in physiologischen Mengen nicht das Schilddrüsenkarzinomrisiko senkt (Berg et al., 1999).

Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls einen hemmenden Effekt von DHEA auf das Tumorstadium an einem Mammakarzinom-Modell der Maus auf (Green et al., 2001). Durch die Behandlung mit DHEA erzielte man, als in diesem Fall negativen Nebeneffekt, eine Erhöhung der Östrogenserumspiegel auf das 2-3 fache des basalen Spiegels (Green et al., 2001).

Auch *in vitro* konnte der antiproliferative Effekt von DHEA nachgewiesen werden. Die Behandlung mit DHEA führte bei malignen HepG2-Zellen (humane Hepatoblastomzellen) und HT-29-Zellen (Kolonkarzinomzelllinie) zu einem verminderten Zellwachstum. Dieser Effekt war Dosis- und Zeit-abhängig (Jiang et al., 2005). Es zeigte sich, dass es in beiden Zelllinien zu einer Akkumulation in der G0/G1-Phase kam. Verstärkte Apoptose konnte jedoch nur in HepG2-Zellen nachgewiesen werden (Jiang et al., 2005).

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem zunehmenden Tumorrisiko im Alter und dem Rückgang der DHEA-Spiegel. Die genaue Wirkungsweise von DHEA auf das Tumorstadium ist bisher nicht aufgeklärt. DHEA ist ein direkter, nicht kompetitiver Antagonist des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und die Hemmung an dieser Stelle limitiert als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym signifikant den Metabolismus des Hexosemonophosphatzyklus. Der Zyklus spielt eine

wichtige Rolle im Energiehaushalt von Tumorzellen und ist in vielen Tumoren hochreguliert. Wahrscheinlich stellt der beobachtete antiproliferative Effekt von DHEA ein multifaktorielles Geschehen dar.

5.2.4. Regulation von OPG durch Glukokortikoide

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass das RANKL-OPG-System in Schilddrüsenkarzinomzellen ebenfalls zu den Zielen von Glukokortikoiden zählt. Die OPG-RNA und Proteinspiegel fiel nach Glukokortikoidexposition deutlich ab. Diese Befunde konnten von anderen Arbeitsgruppen für das OPG/RANKL-System in Knochenzellen bestätigt werden (Brändström et al., 2001; Vidal et al., 1998b; Hofbauer et al., 1999a). Im RANKL-Genpromoter konnten Bindungsstellen für Glukokortikoide nachgewiesen werden (Kitazawa et al., 1999; Kodaira et al., 1999). Für den OPG-Genpromoter liegen noch keine gesicherten Daten vor, obwohl auch angesichts des transkriptionellen Mechanismus der Glukokortikoid-induzierten Hemmung der OPG-Expression (Hofbauer et al., 1999a) eine Regulation über Bindungsstellen für Glukokortikoide wahrscheinlich ist. Eine weitere Arbeitsgruppe beschrieb den hemmenden Einfluss von Dexamethason auf die OPG-Proteinsekretion in Prostatakarzinomzellen (Penno et al., 2002). Eine klinisch-epidemiologische Untersuchung an Patienten mit nephrologischen Erkrankungen konnte bestätigen, dass die hemmenden Wirkungen von Glukokortikoiden auf die OPG-Spiegel auch in vivo bestehen (Sasaki et al., 2001).

Es zeigt sich, dass der antiproliferative Effekt von Glukokortikoiden möglicherweise zumindest teilweise auf das OPG/RANKL/TRAIL-System zurückgeführt werden kann. Dazu sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig die nach OPG, die anderen Komponenten dieses Systems und deren Interaktionen unter einer Behandlung mit Glukokortikoiden betrachten.

5.3. Regulation von OPG durch Medikamente

5.3.1. Regulation von OPG durch Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese, was auch die von uns durchgeführten Versuche wie erwartet zeigten. Die OPG-Proteinsekretion wurde in dosis abhängiger Weise durch Cycloheximid gehemmt bzw. ab einer Konzentration von 1 µg/ml Cycloheximid völlig unterdrückt. Einen umgekehrten Effekt konnte man auf der Ebene der RNA-Expression beobachten. Hier kam es durch die Stimulation mit Cycloheximid zu einer Steigerung der OPG-RNA-Expression. Diese Ergebnisse geben einen indirekten Hinweis darauf, dass Cycloheximid möglicherweise die Proteinsynthese eines Inhibitors der OPG-mRNA-Spiegel hemmt.

Es gibt Untersuchungen dazu, dass TRAIL in SW579 Schilddrüsenkarzinomzellen in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Ahmad et al., 2000). Gab man TRAIL allein in die Zellkultur, kam es nach 24 Stunden zu einer Apoptoserate von 50%. Durch gleichzeitige Zugabe von TRAIL und Cycloheximid konnte dieser Effekt auf eine Apoptoserate von 97% in 24 Stunden gesteigert werden. Cycloheximid allein hatte keinen Einfluß auf die Apoptoserate (Ahmad et al., 2000). Möglicherweise kam in diesem Fall die Steigerung der Apoptoserate durch den hemmenden Einfluß von Cycloheximid auf die OPG-Proteinbiosynthese zustande, denn OPG als bekannter Gegenspieler von TRAIL war nun nicht mehr in der Lage, die Wirkung von TRAIL zu inhibieren und dadurch die Apoptose zu verhindern. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte darlegen, dass TRAIL in Kombination mit Troglitazon, Paclitaxel und Cycloheximid in Schilddrüsenkarzinomzellen Apoptose induziert, die durch die Behandlung mit TRAIL alleine nicht erreicht werden konnten (Park et al., 2003).

5.3.2. Regulation von OPG durch Lovastatin

Lovastatin gehört zu den HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren und wird normalerweise zur Behandlung der Hypercholesterinämie eingesetzt um Arteriosklerose bedingten Herzerkrankungen vorzubeugen. Durch die Stimulation der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen mit Lovastatin kam es in unseren Versuchen in

dosisabhängiger Weise zu einer Hemmung der OPG-RNA-Expression und auch der Proteinbiosynthese.

Es wurde nachgewiesen, dass Lovastatin die Apoptose induzieren und eine Redifferenzierung in humanen anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen bewirken kann (Wang et al., 2003). Anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen wurden mit Lovastatin in den Dosierungen 50 mM und 25 mM behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass Lovastatin bei einer höheren Dosis (50 mM) Apoptose induzierte und es bei der niedrigeren Dosierung zu einer zytomorphologischen Redifferenzierung der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen kam (Wang et al., 2003). Durch die Induktion einer Redifferenzierung in Schilddrüsenkarzinomzellen könnten diese für eine Radioiod-Therapie, Chemotherapie oder perkutane Bestrahlung sensibilisiert werden, was eine mögliche klinische Relevanz für Lovastatin in der Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen aufzeigt (Zhong et al., 2003).

Weiterhin ließ sich zeigen, dass die durch Lovastatin induzierte Apoptose in ARO-Zellen (anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen) über Induktion von Cytochrome-c-Translokation aus den Mitochondrien in das Zytosol vermittelt wird (Zhong et al., 2003). Eine Vorbehandlung dieser Zellen mit Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, unterdrückte die Lovastatin-induzierte Apoptose (Zhong et al., 2003). Daher ist anzunehmen, dass eine *de novo* Proteinsynthese für den Lovastatin Effekt Apoptose in ARO-Zellen zu induzieren nötig ist (Zhong et al., 2003). Im Gegensatz zur Lovastatin-induzierten Apoptose benötigen TNF- α - und Fas-Signalmechanismen keine *de novo* Proteinsynthese (Zhong et al., 2003).

Di Matola veröffentlichte schon 2001 ähnliche Ergebnisse. In seinen Untersuchungen induzierte Lovastatin Apoptose in TAD-2-Zellen (humane fetale Schilddrüsenzellen) und normalen Schilddrüsenzellen. Dabei wurde eine Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol beobachtet, was zu einer Aktivierung des Caspaseweges führte (Di Matola et al., 2001). Schon bei Prostatakarzinomen wurde OPG als möglicher Überlebensfaktor für diese Zellen identifiziert (Holen et al., 2002). Durch gesteigerte OPG-Produktion ist es der Zelle möglich, sich vor TRAIL induzierter Apoptose zu schützen, indem es an TRAIL bindet und so dessen Wirkung an seinen Rezeptoren (DR4=death receptor und DR5) verhindert (Emery et al., 1998).

Fluvastatin hemmte *in vitro* das Wachstum von Nierenzellkarzinomzellen in Zeit- und Dosis-abhängiger Weise (Horiguchi et al., 2004). Atorvastatin und Fluvastatin waren in der Lage, die Proliferation von MCF-7-Brustkrebszellen zu hemmen (Muck et al., 2004). Weiterhin konnte für Lovastatin bisher gezeigt werden, dass es in Melanomen (Felesko et al., 2002), Kolonkarzinomen (Swamy et al., 2002), Schwammzellkarzinomen (Dimitroulakos et al., 2002) und Myelom-Zellen (van de Donk et al., 2002) *in vitro* Apoptose induziert. Ebenso hemmte Lovastatin dosisabhängig das Zellwachstum von Mamma- und Prostatakarzinomzellen *in vitro* (Shibata et al., 2003). Dies war assoziiert mit p53-unabhängiger Apoptose (Shibata et al., 2003). Da 50% der humanen Krebsarten p53-Mutationen aufweisen, könnte die Tatsache, dass Lovastatin p53-unabhängig Apoptose induziert, von hoher Relevanz in der Hemmung vieler humaner Krebsarten sein (Shibata et al., 2003). Die Zytotoxizität von Lovastatin konnte darauf zurückgeführt werden, dass es zu einem Arrest des Zellzyclus in der G1 und G2-M-Phase kam (Holstein et al., 2001). Dieser Effekt wurde ebenfalls in einer gleichzeitigen Behandlung mit Paclitaxel (Taxol) erzielt (Holstein et al., 2001). Es zeigte sich, dass es durch die Behandlung mit Lovastatin zu einer Steigerung der Paclitaxel-induzierten Toxizität in synergistischer Weise kam (Holstein et al., 2001). Zusätzlich steigerte Lovastatin den Paclitaxel-induzierten G2-M Arrest in zwei Leukämiezelllinien und Paclitaxel-induzierte Apoptose in HL-60 Zellen (humane akute myeloische Leukämiezellen) (Holstein et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse zeigen auch die Untersuchungen von Sutter et al.. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Statine die Proliferation von HCC (Hepato-zelluläres Karzinom) -Zellen hemmten, indem sie Apoptose induzierten und zu einem Arrest der Zellen in der G1/S-Phase führten (Sutter et al., 2005).

Eine Fall-Kontroll Studie wies nach, dass eine Statintherapie *in vivo* mit einer 20 %igen Risikoreduktion an Krebs zu erkranken einhergeht (Blais et al., 2000; Graaf et al., 2004). Die Daten zeigten, dass Statine einen protektiven Effekt aufwiesen, wenn sie länger als 4 Jahre oder in mehr als 1350 definierten Tagesdosen eingenommen wurden (Graaf et al., 2004). Eine Hochdosis-Lovastatintherapie wurde in einer Phase II Studie an Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom getestet. Hierbei konnte jedoch keine Wirkung auf das Tumorwachstum beobachtet werden (Kim et al., 2003). Präklinische Studien demonstrierten hingegen das Potential von Statinen Neoplasien in Ratten hervorzurufen. In klinischen Studien erwiesen sich HMG-CoA-Reduktase-

Inhibitoren allerdings beim Menschen als nicht kanzerogen (McCord et al., 2000). In einem Mammakarzinom-Maus-Model konnte eine Hemmung des Tumorwachstums durch Lovastatin beobachtet werden (Shibata et al., 2004).

Mit unseren Ergebnissen ist ein weiterer möglicher Wirkungsmechanismus der Apoptoseinduktion durch Lovastatin über die Modulation der OPG-Produktion aufgezeigt worden. Es zeigt sich, dass Statine widersprüchliche Effekte hervorrufen, die von den Zelltypen, Umweltfaktoren oder den verwendeten Statinen abhängen könnten.

5.4. Regulation von OPG durch Zytokine

In den von uns untersuchten Zelllinien führte IL-1 β zu einer gesteigerten OPG-RNA-Expression. Bisher konnte gezeigt werden, dass IL-1 α und - β sowie TNF- α und - β die OPG-Produktion osteoblastärer Zellen induzieren (Hofbauer et al., 1998; Hofbauer et al., 1999a; Brändström et al., 2001; Vidal et al., 1998a). Es wurde nachgewiesen, dass die beiden proinflammatorischen und proresorptiven Zytokine IL-1 β und TNF- α die RANKL-Genexpression in humanen mesenchymalen Stammzellen und Osteosarkomzellen induzieren können (Hofbauer et al., 1999a). Dies konnte auch auf Proteinebene an einer murinen mesenchymalen Stammzelllinie bestätigt werden (Nakashima et al., 2000). Nach der Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen stiegen die Spiegel von OPG und RANKL auf etwa das Drei- bis Achtfache an (Hofbauer et al., 1999a). Die gleichsinnige Regulation des Liganden (RANKL) und des Rezeptorantagonisten (OPG) eines potenten Zytokinsystems stellt ein bekanntes biologisches Prinzip dar und wurde auch für das IL-1 β und das TNF- α -System beschrieben (Dinarello, 1996). Auch in Prostatakarzinomzellen wurde dieser Effekt nachgewiesen (Penno et al., 2002). Sowohl IL-1 β als auch TNF- α stimulierten die OPG-Sekretion in diesen Zellen (Penno et al., 2002).

6. Zusammenfassung

RANKL (Receptor activator of nuclear factor κ B ligand) und OPG (Osteoprotegerin), beides Mitglieder der TNF-Superfamilie, sind als Agonist und Antagonist eines neuen Zytokinsystems bisher in einer Vielzahl von Geweben und Zellsystemen beschrieben worden. Das RANKL/OPG-System spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Knochenstoffwechsels, und Störungen dieses Zytokinsystems wurden bei verschiedenen Knochenerkrankungen nachgewiesen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass das RANKL/OPG-System durch Interaktionen mit dem Apoptose-induzierenden Faktor TRAIL (Tumor necrosis factor- α -related apoptosis inducing ligand) möglicherweise auch bei malignen Erkrankungen von großer Bedeutung ist.

Basierend auf den bisherigen Befunden zur Pathogenese des Schilddrüsenkarzinoms und den Vorarbeiten zum RANKL-OPG-System war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression und Modulation der OPG-mRNA-Produktion und OPG-Proteinsekretion in humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien zu untersuchen. Die Genexpression wurde mittels Northern Blot, die Proteinsekretion mittels ELISA bestimmt.

Die Schilddrüse konnte als ein Ort starker OPG-Expression identifiziert werden. Die von uns untersuchten Schilddrüsenkarzinomzellen SW579 zeigten im Vergleich zu benignen Schilddrüsenzellen deutlich erhöhte basale OPG-RNA-Spiegel. Es zeigte sich, dass die OPG-mRNA- und -Proteinspiegel durch Sexualhormone unterschiedlich reguliert wurden. 17β -Östradiol führte zu einem biphasischen Effekt, niedrige 17β -Östradiol Konzentrationen führten zu einer Steigerung der OPG-RNA-Expression und -Proteinproduktion, hohe zu einer Hemmung. Das adrenale Androgen DHEA (Dehydroepiandrosteron) hemmte die OPG-RNA und -Proteinsynthese dosisabhängig, während das gonadale Androgen 5α -DHT (Dihydrotestosteron) ebenfalls einen biphasischen Effekt (Steigerung bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M, Hemmung bei höheren Konzentrationen) auf die OPG-Expression aufwies. Die unterschiedliche Regulation von OPG in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen könnte zum Teil die geschlechtsspezifischen Unterschiede im klinischen Verlauf dieser Erkrankung erklären.

Der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin führte in den Schilddrüsenkarzinomzellen zu einer verminderten OPG-RNA und -Proteinsynthese. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass Lovastatin in der Lage ist, bei Schilddrüsenkarzinomzellen Apoptose zu induzieren und zu einer Redifferenzierung anaplastischer Schilddrüsenkarzinomzellen führen kann. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β steigerte – wie auch in anderen Zellsystemen – in den Schilddrüsenkarzinomzellen, die OPG-Expression. Die Behandlung der Schilddrüsenkarzinomzellen mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid hemmte die OPG-Proteinsekretion, aber steigerte die OPG-mRNA-Spiegel.

Diese Befunde deuten auf eine fein-orchestrierte Regulation des RANKL/OPG-Systems durch Modulation der OPG-Komponente in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen hin. Dabei spielen Sexualhormone, Zytokine und Medikamente eine wichtige Rolle. Diese Substanzen konnten in präklinischen Versuchen als Modulatoren der Apoptose oder als Redifferenzierungsfaktoren identifiziert werden. Dadurch könnte sich gerade bei den anaplastischen, nicht Jod-speichernden Schilddrüsenkarzinomen die Möglichkeit ergeben, diese prognostisch sehr ungünstigen Tumoren nach einer Sensibilisierung einer Radiojodtherapie zuzuführen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Schilddrüse sowohl einen Ort der OPG-Produktion als auch ein potenzielles Ziel von OPG darstellt. Die detaillierte Untersuchung von OPG und TRAIL in *in vivo*-Tumormodellen könnte in der Zukunft zu neuartigen Therapiestrategien für Patienten mit fortgeschrittenem Schilddrüsenkarzinom beitragen.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmad M, Shi Y. TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells: potential for therapeutic intervention. *Oncogene* 2000;19:3363-3371.
- Allolio B, Schulte HM. *Praktische Endokrinologie*. Urban & Schwarzenberg, 1996.
- 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.
- 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.
- Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of C-Fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) Receptors. *J Exp Med* 1999;190:1741-1754.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert- Koch- Institut. *Krebs in Deutschland*. 4. Überarbeitete, Aktualisierte Ausgabe; Saarbrücken 2004.
- Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17:3261-3270.
- Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001;16:348-360.

- Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004;19:1059-1066.
- Berg JP, Engeland A, Jellum E, Glatte E. Serum dehydroepiandrosterone sulfate concentration and thyroid cancer risk: A matched case control study. *Thyroid* 1999;9:285-288.
- Blais L, Desgagne A, Leloirier J. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer. A nested case-control study. *Arch Intern Med* 2000;160:2363-2368.
- Body JJ, Greipp P, Coleman RE, et al. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 2003;97:887-892.
- Body JJ, Facon T, Coleman RE, Lipton A, Geurs F, Fan M, Holloway D, Peterson MC, Bekker PJ. A study of the biological receptor activator of nuclear factor- κ B ligand inhibitor, Denosumab, in patients with multiple Myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1221-1228.
- Brändström H, Bjorkman T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:831-835.
- Brown JM, Corey E, Lee ZD, True LD, Yun TJ, Tondravi M, Vessella RL. Osteoprotegerin and RANK ligand expression in prostate cancer. *Urology* 2001;57:611-616.
- Brown JM, Zhang J, Keller ET. OPG, RANKL, and RANK in cancer metastasis: expression and regulation. *Cancer Treat Res* 2004;118:149-172.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice

- develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-1268.
- Carr BR, Bradshaw KD. Disorders of the ovary and female reproductive tract. 2154-2168. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds.), *HPIM*, 15th edition, Mc Graw-Hill, New York 2001.
- Chikatsu N, Takeuchi Y, Tamura Y, Fukumoto S, Yano K, Tsuda E, Ogata E, Fujita T. Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:632-637.
- 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.
- Crisafulli A, Altavilla D, Squadrito G, Romeo A, Adamo EB, Marini R, Inferrera MA, Marini H, Bitto A, D'Anna R, Corrado F, Bartolone S, Frisina N, Squadrito F. Effects of the phytoestrogen genistein on the circulating soluble receptor activator of nuclear factor κ b ligand-osteoprotegerin system in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:188-192.
- Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, Brabbs AC, Van Beek EJ, Holen I, Skerry TM, Dunstan CR, Russell GR, Van Camp B, Vanderkerken K. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:3534-3540.
- Di Matola T, D'Ascoli F, Luongo C, Bifulco M, Fenzi G, Vita M. Lovastatin-induced apoptosis in thyroid cells: involvement of cytochrome C and lamin B. *Eur J Endocrinol* 2001;145:645-650.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147.

- Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ, Kamel-Reid S. Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia* 2002;4:337-346.
- 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.
- Farahati J, Geling M, Mäder U, Mörtl M, Luster M, Müller JG, Flentje M, Reiners C. Changing trends of incidence and prognosis of thyroid carcinoma in lower Franconia, Germany, from 1981-1995. *Thyroid* 2004;14:141-147.
- 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.
- Feleszko W, Mlynarczuk I, Olszewska D, Jalili A, Grzela T, Lasek W, Hoser G, Korczak-Kowalska G, Jakobisiak M. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. *Int J Cancer* 2002;100:111-118.
- Fiumara P, Snell V, Li Y, Mukhopadhyay A, Younes M, Gillenwater AM, Cabanillas F, Aggarwal BB, Younes A. Functional expression of receptor activator of nuclear factor- κ B in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 2001;98:2784-2790.
- Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998;188:997-1001.
- Gärtner R, Haen E. Endokrinpharmakologie. 671-737. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann, Starke K (eds.). *Allgemeine und spezielle*

- Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Urban und Fischer, München 2001.
- Gao Y-H, Shinki T, Yuase T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A. Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:697-702.
- Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts AC, Richel DJ, Guchelaar HJ. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 2004;22:2388-2394.
- 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.
- Guise TA. Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 2000;88:2892-2898.
- Han KO, Choi JT, Choi HA, Moon IG, Yim CH, Park WK, Yoon HK, Han IK. The changes in circulating osteoprotegerin after hormone therapy in postmenopausal women and their relationship with oestrogen responsiveness on bone. *Clin Endocrinol* 2005;62:349-353.
- Hilton MJ, Gutierrez L, Zhang L, Moreno PA, Reddy M, Brown N, Tan Y, Hill A, Wells DE. An integrated physical map of 8q22-Q24: use in positional cloning and deletion analysis of Langer-Giedion syndrome. *Genomics* 2001;71:192-199.
- 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, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-

- 1β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999a;25:255-259.
- Hofbauer LC, Khosla S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *Eur J Endocrinol* 1999b;140:271-286.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of osteoprotegerin and receptor activator of NF- κ b ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001a;44:253-259.
- Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of NF- κ b ligand and osteoprotegerin. Potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 2001b;92:460-470.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin: A link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001c;358:257-259.
- Hofbauer LC, Kluger S, Kühne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppet M, Zielke A, Heufelder AE. Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem* 2002a;86:642-650.
- Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 2002b;147:269-273.
- Hofbauer LC, Schoppet M, Schuller P, Viereck V, Christ M. Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clin Endocrinol* 2004;60:214-219.
- Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:1619-1623.
- Holstein SA, Hohl RJ. Synergistic interaction of Lovastatin and Paclitaxel in human Cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2001;1:141-149.

- 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.
- Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, Asano T, Asano T, Hayakawa M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitor, fluvastatin, as a novel agent for prophylaxis of renal cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2004;10:8648-8655.
- Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan H-L, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia X-Z, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1999;96:3540-3545.
- Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res* 2004;19:235-244.
- Huang L, Xu J, Wood DJ, Zheng MH. Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerin and receptor activator of NF- κ b in giant cell tumor of bone: possible involvement in tumor cell-induced osteoclast-like cell formation. *Am J Pathol* 2000;156:761-767.
- 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.
- Jiang Y, Miyazaki T, Honda A, Hirayama T, Yoshida S, Tanaka N, Matsuzaki Y. Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling

- pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. *J Gastroenterol* 2005;40:490-497.
- Jono S, Ikari Y, Shioi A, Mori K, Miki T, Hara K, Nishizawa Y. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:1192-1194.
- 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.
- 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.
- Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrisons Innere Medizin Band 2*. ABW Wissenschaftsverlag 2005.
- Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O'Fallon WM. Effects of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002a;87:1550-1554.
- Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan CR, Riggs BL. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporosis Int* 2002b;13:394-399.
- Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochem Biophys Acta* 1999;1445:134-141.
- Kodaira K, Kodaira K, Mizuno A, Yasuda H, Shima N, Murakami A, Ueda M, Higashio K. Cloning and characterization of the gene encoding mouse osteoclast differentiation factor. *Gene* 1999;230:121-127.

- 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* 1999a;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* 1999b;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.
- Kubota A, Hasegawa K, Suguro T, Koshihara Y. Tumor necrosis factor- α promotes the expression of osteoprotegerin in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 2004;31:426-435.
- 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.

- Liao EY, Luo XH, Su X. Comparison of the effects of 17beta-E2 and progesterone on the expression of osteoprotegerin in normal human osteoblast-like cells. *J Endocrinol Invest* 2002;25:785-790.
- Lin DL, Tarnowski CP, Zhang J, Dai J, Rohn E, Patel AH, Morris MD, Keller ET. Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes in vitro. *Prostate* 2001;47:212-221.
- Lindberg MK, Erlandsson M, Alatalo SL, Windahl S, Andersson G, Halleen JM, Carlsten H, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor A, but not estrogen receptor B, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (Osteoprotegerin/Receptor activator of NF- κ b ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *J Endocrinol* 2001;171:425-433.
- Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Chinchilli V, Witters L, Engle L, Holloway D, Bekker P, Dunstan CR. Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:2306-2310.
- Luger NM, Honore P, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, Clohisy DR, Mantyh PW. Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer Res* 2001;61:4038-4047.
- 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.
- Mack W J, Preston-Martin S, Bernstein L, Qian D, Xiang M. Reproductive and hormonal risk factors for thyroid cancer in Los Angeles county females. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999;8:991-997.

- Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E, Derwahl M. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrin Metabol* 2001;86:1072-1077.
- McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH, Lain D, Kivitz AJ, Holloway DL, Zhang C, Peterson MC, Bekker PJ. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2006;354:821-831.
- McCord EL, Goenka S. Development of thyroid follicular adenoma on simvastatin therapy. *Tenn Med* 2000;93:210-212.
- Merewether LA, Le J, Jones MD, Lee R, Shimamoto G, Lu HS. Development of disulfide peptide mapping and determination of disulfide structure of recombinant human osteoprotegerin chimera produced in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 2000;375:101-110.
- Michigami T, Ihara-Watanabe M, Yamazaki M, Ozono K. Receptor activator of nuclear factor κ b ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma. *Cancer Res* 2001;61:1637-1644.
- Miki H, Oshimo K, Inoue H, Morimoto T, Monden Y. Sex hormone receptors in human thyroid tissues. *Cancer* 1990;66:1759-1762.
- Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Stamenkovic I. Thyroid carcinoma cells are resistant to Fas-mediated apoptosis but sensitive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000;60:4122-4129.
- Mizukami Y, Michigishi T, Nonomura A, Hashimoto T, Noguchi M, Matsubara F. Estrogen and estrogen receptors in thyroid carcinomas. *J Surg Oncol* 1991;47:165-169.

- Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:610-615.
- Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem* 1998;254:685-691.
- Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Dunstan CR, Kostenuik PJ. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 2001;61:4432-4436.
- Moser E, Barke A, Digel W, Freudenberg N, Räddecke J, Reincke M. *Schilddrüsenkarzinom (3. Auflage)*; Tumorzentrum Freiburg 2002.
- Muck AO, Seeger H, Wallwiener D. Inhibitory effect of statins on the proliferation of human breast cancer cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42:695-700.
- Murakami T, Yamamoto M, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K, Akatsu T. Transforming growth factor- α 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:747-752.
- Myers DE, Collier FM, Minkin C, Wang H, Holloway WR, Malakellis M, Nicholson GC. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett* 1999;463:295-300.

- Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:532-536.
- Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:395-400.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi 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.
- Nosaka K, Miyamoto T, Sakai T, Mitsuya H, Suda T, Matsuoka M. Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand on adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2002;99:634-640.
- Onitsuka T. Sex hormones in papillary carcinoma of thyroid gland and pleomorphic adenoma of parotid gland. *Acta Otolaryngol* 1994;114:218-222.
- Onkologischer Arbeitskreis Des Tumorzentrums Der Universität Würzburg. Schilddrüse; www.uni-wuerzburg.de/Tumorzentrum/Grundsätze/Schilddruese.
- Park JW, Wong MG, Lobo M, Hyun WC, Duh QY, Clark OH. Modulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by chemotherapy in thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 2003;13:1103-1110.
- Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, Michaeli J, Epstein J, Choi Y. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to stimulate bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2001;98:11581-11586.

- Penno H, Silfversward CJ, Frost A, Brandstrom H, Nilsson O, Ljunggren O. Osteoprotegerin secretion from prostate cancer is stimulated by cytokines, in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:451-455.
- Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Koutras DA, Mitsiades N. Regulation of Apo2L/ tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:643-654.
- Quinn JMW, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1998;139:4424-4427.
- Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:145-152.
- Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3562-3571.
- Rossing MA, Voigt LF, Wicklund KG, Williams M, Daling JR. Use of exogenous hormones and risk of papillary thyroid cancer. *Cancer Causes Control* 1998;9:341-349.
- Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17β -estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stroma cell line, ST-2, via estrogen receptor- α . *Endocrinology* 2001;142:2205-2212.
- Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H, Kurihara H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1486-1492.

- Sasaki N, Kusano E, Ando Y, Yano K, Tsuda E, Asano Y. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:479-482.
- Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2001;23:251-258
- Sezer O, Heider U, Jakob C, Eucker J, Possinger K. Human bone marrow myeloma cells express RANKL. *J Clin Oncol* 2002;20:353-354.
- Shaha AR. Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope* 2004;114:393-402.
- Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving C-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2000;97:7829-7834.
- Shiba H, Nakanishi K, Sakata M, Fujita T, Uchida Y, Kurihara H. Effects of ageing on proliferative ability, and the expressions of secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) and osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human periodontal ligament cells. *Mech Ageing Dev* 2000;117:69-77.
- Shibata M, Hasegawa R, Imaida K, Hagiwara A, Ogawa K, Hirose M, Ito N, Shirai T. Chemoprevention by dehydroepiandrosterone and indomethacin in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Res* 1995;55:4870-4874.
- Shibata MA, Ito Y, Morimoto J, Otsuki Y. Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: a P53-independent mitochondrial mediated apoptotic mechanism. *Carcinogenesis* 2004;25:1887-1898.

Siewert JR, Harder F, Rothmund M (Hrsg.). Praxis der Visceralchirurgie. Springer-Verlag, Berlin 2000.

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.

Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem* 2001;276:8836-8840.

Sutter AP, Maaser K, Hopfner M, Huether A, Schuppan D, Scherubl H. Cell cycle arrest and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma cells by HMG-CoA reductase inhibitors. Synergistic antiproliferative action with ligands of the peripheral benzodiazepine receptor. *J Hepatol* 2005;43:808-816.

Swamy MV, Cooma I, Reddy BS, Rao CV. Lamin B, caspase-3 activity, and apoptosis induction by a combination of HMG-CoA reductase inhibitor and COX-2 inhibitors: a novel approach in developing effective chemopreventive regimens. *Int J Oncol* 2002;20:753-759.

Sywak M, Pasiaka JL, Ogilvie T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation. *J Surg Oncol* 2004;86:44-54.

Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:259-269.

- Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J, Moore G, Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997;204:35-46.
- Teng Y-TA, Nguyen H, Gao X, Kong Y-Y, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP, Penninger JM. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:R59-R67.
- Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, Viniou N, Yataganas X, Goldman JM, Rahemtulla A. Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio predicts survival in multiple myeloma. Proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003;102:1064-1069.
- Thiruvengadam A, Govindarajulu P, Aruldas MM. Modulatory effect of estradiol and testosterone on the development of N-nitrosodiisopropanolamine induced thyroid tumors in female rats. *Endocr Res* 2003;29:43-51.
- Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, Gillespie MT. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999;140:4451-4458.
- Thomas L (Herausgeber). *Labor und Diagnose* 5. Auflage, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main 1998.
- Tomoyasu A, Goto M, Fujise N, Mochizuki S, Yasuda H, Morinaga T, Tsuda E, Higashio K. Characterization of monomeric and homodimeric forms of osteoclastogenesis inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:382-387.
- Tsatsoulis A. The Role of apoptosis in thyroid disease. *Minerva Med* 2002;93:169-180.

- 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.
- Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF- κ B ligand. *Bone* 1999;25:517-523.
- Uemura H, Yasui T, Umino Y, Niki H, Takikawa M, Saito S, Furumoto H, Irahara M. Circulating osteoprotegerin in women during GnRH-agonist treatment and their relationships with mineral components and biomarkers of bone turnover. *Bone* 2003;3:860-866.
- Van De Donk NW, Kamphuis MM, Lokhorst HM, Bloem AC. The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 2002;16:1362-1371.
- Vidal ON, Sjögren K, Eriksson BI, Ljunggren Ö, Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 β in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998a;248:696-700.
- Vidal ON, Brändström H, Jonsson KB, Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* 1998b;159:191-195.
- Wang CY, Zhong WB, Chang TC, Lai SM, Tsai YF. Lovastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, induces apoptosis and differentiation in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3021-3026.

- 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, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leuko Biol* 1999;65:715-724.
- 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.
- Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998;273:5117-5123.
- Yamane T, Kunisada T, Yamazaki H, Nakano T, Orkin SH, Hayashi SI. Sequential requirements for SCL/Tal-1, GATA-2, macrophage colony-stimulating factor, and osteoclast differentiation factor/osteoprotegerin ligand in osteoclast development. *Exp Hematol* 2000;28:833-840.
- Yang X, Halladay D, Onyia JE, Martin TJ, Chandrasekhar S. Protein kinase C is a mediator of the synthesis and secretion of osteoprotegerin in osteoblast-like cells. *Biochem and Biophys Res Comm* 2002;290:42-46.
- Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14:518-527.
- 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* 1998a;139:1329-1337.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S-I, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* 1998b;95:3597-3602.

Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y. Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with RANKL-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinology* 2004;145:2384-2391.

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.

Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, Mizokami A, Fu Z, Westman J, Keller ET. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 2001;107:1235-1244.

Zhong WB, Wang CY, Chang TC, Lee WS. Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology* 2003;144:3852-3859.

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

Nele Brulez
Meistergasse 5
36037 Fulda

Persönliche Informationen

Geburtsort: Kiel
Geburtsdatum: 30.04.1978
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1984-1986: Grundschule in Warstein-Mühlheim
1986-1988: Grundschule in Kelkheim Ruppertshain/Eppenhain
1988-1994: Gymnasialzweig der Gesamtschule Kelkheim-Fischbach
1994-1997: Gymnasiale Oberstufe Immanuel-Kant-Schule Kelkheim
1997: Abschluss des Abiturs an der Immanuel-Kant-Schule

Universitäre Ausbildung

WS 1997/98: Beginn des Medizinstudiums an der Philipps-Universität Marburg
August 1999: Physikum

- Februar-März 2000: Famulatur an der Klinik für Innere Medizin (Prof. Hausmann, Kliniken des MTK, Bad Soden)
- August 2000: Erstes Staatsexamen
- September-Oktober 2000: Famulatur an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Prof. Möbus, Städtisches Klinikum Frankfurt Höchst)
- September-Oktober 2001: Famulatur in der Praxis für Innere Medizin, Sabine Papenberg-Ertl, Marburg
- August-September 2002: Famulatur in der Praxis für Dermatologie, Dr. Carola Sonnevendt, Marburg
- April 2003: Zweites Staatsexamen
- April 2003-März 2004: Praktisches Jahr am Klinikum Fulda
Wahlterial: Gynäkologie und Geburtshilfe
- Mai 2004: Drittes Staatsexamen am Klinikum Fulda

Ärztliche Tätigkeit

- Juli 2004-September 2004: Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik, Klinikum Fulda
- Seit Oktober 2004: Assistenzärztin in der Frauenklinik, Klinikum Fulda

8.2. 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, C. Görg, K. Görg, 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 Fulda: Arps, Bohner, Bonzel, Conze, Fassbinder, Günther, Hellinger, Jaspersen, Repp, Rüttger, Spätling, Stegmann, Wörsdörfer.

8.3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Lorenz C. Hofbauer für die jahrelange intensive Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit und die konstruktive Kritik bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Arnold, Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie des Universitätsklinikums Marburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Einrichtungen seines Institutes zu verwirklichen.

Den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Ute Niebergall, Frau Svaanhild Fischer (†) und Frau Manuela Kauß sei für die hervorragende Einarbeitung und die Assistenz bei den experimentellen Arbeiten gedankt. Bei Frau Wiebke Rennekamp bedanke ich mich für die effektive Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Die Zelllinie XTC wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. A. Zielke (Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Phillips-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

8.4. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Regulation von Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen im Med.Zentrum für Innere Medizin unter Leitung von PD Dr. Lorenz C. Hofbauer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den