

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



Nachweis und Charakterisierung von RANK-Ligand und Osteoprotegerin in humanen Pankreaskarzinomzellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Wiebke Rennekamp

aus Hamm
Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
am 20.10.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: PD Dr. L. C. Hofbauer
Korreferent: Prof. Dr. R. Moll

Für meine Eltern

INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	5
1.1 Klinische Aspekte des Pankreaskarzinoms	5
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	5
1.1.2 Pathologie und Symptomatik	6
1.1.3 Therapie und Prognose	7
1.2 Zellbiologische Grundlagen des Pankreaskarzinoms	9
1.3 RANKL-OPG-System	10
1.3.1 Osteoprotegerin (OPG)	10
1.3.2 Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)	13
1.3.3 Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)	14
1.3.4 Effekte des RANKL-OPG-Systems	15
2. FRAGESTELLUNG	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Material	18
3.1.1 Zellen	18
3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	19
3.1.3 Lösungen und Puffer	21
3.1.4 Geräte	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Zellkultur	24
3.2.2 Stimulationsbedingungen	25
3.2.3 Isolierung zellulärer Gesamt-RNA	26
3.2.4 Isolierung von Poly-A-mRNA	27
3.2.5 Photometrische RNA-Quantifizierung	28
3.2.6 Northern Blot-Analyse	29
3.2.7 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden	31
3.2.8 Hybridisierung von Northern Blots	32
3.2.9 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese	34
3.2.10 Amplifizierung von cDNA mittels PCR	34
3.2.11 OPG-Proteinanalyse	35

4.	ERGEBNISSE	38
4.1	Charakterisierung der OPG-Produktion im Pankreasgewebe	38
4.1.1	OPG-Produktion im Pankreasgesamtgewebe	38
4.1.2	OPG-Produktion in endokrinen Zellen des Pankreas	40
4.1.3	OPG-Produktion in exokrinen Pankreaskarzinomzellen	40
4.2	Regulation der OPG-Produktion in Pankreaskarzinomzellen	43
4.2.1	Regulation von OPG durch Steroidhormone	44
4.2.1.1	Androgene und Antiandrogene	44
4.2.1.2	Östrogene	48
4.2.1.3	Glukokortikoide	49
4.2.2	Regulation von OPG durch Zytokine	51
4.2.2.1	Interleukin-1 β	51
4.2.2.2	Tumor necrosis factor- α	51
4.2.2.3	Interleukin-8	51
4.2.3	Regulation von OPG durch Medikamente	52
4.2.3.1	Statine	52
4.2.3.2	Proteinsynthesehemmer	57
4.2.3.3	Indometacin	58
4.2.4	Substanzen ohne regulierende Effekte auf die OPG-Produktion	60
4.3	RANKL-Produktion in Pankreaskarzinomzellen	61
5.	DISKUSSION	62
5.1	Bedeutung der TNF-Rezeptor-Superfamilie für das Pankreaskarzinom	62
5.2	Modulation von OPG in Pankreaskarzinomzellen	66
5.3	Mögliche klinische Relevanz von OPG für das Pankreaskarzinom	75
6.	ZUSAMMENFASSUNG	80
7.	LITERATUR	82
8.	ANHANG	98
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	98
8.2	Danksagung	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (Complementary DNA)
COX	Cyclooxygenase
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat (Diethyl pyrocarbonate)
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Acid)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Äthanol
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
IL	Interleukin
kb	Kilobase(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin ligand
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
SAW	Standardabweichung
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1 :	Zusammenspiel der TNF-Liganden und -Rezeptoren RANKL, RANK, OPG und TRAIL	12
Abb. 3.1 :	Stimulationsdiagramm	25
Abb. 4.1 :	OPG-Produktion im Pankreasgesamtgewebe	39
Abb. 4.2 :	PCR zur basalen OPG-Produktion in Pankreaskarzinomzelllinien	41
Abb. 4.3 :	OPG-mRNA-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien	42
Abb. 4.4 :	OPG-Proteinsekretion in Pankreaskarzinomzelllinien	43
Abb. 4.5 :	Dosis-Wirkungs-Beziehung von Testosteron auf die OPG-mRNA-Expression	45
Abb. 4.6 :	Zeitkinetik der OPG-mRNA-Expression nach Testosteronexposition	46
Abb. 4.7 :	Hemmung der OPG-mRNA-Expression durch Dexamethason	50
Abb. 4.8 :	Regulierender Effekt von Lovastatin auf die OPG-mRNA-Expression	53
Abb. 4.9 :	Hemmung der OPG-Proteinsekretion durch Lovastatin	54
Abb. 4.10:	Dosisabhängige Hemmung der OPG-mRNA-Expression durch Cerivastatin	55
Abb. 4.11:	Zeitkinetik der OPG-Produktion nach Cerivastatinexposition	56
Abb. 4.12:	Hemmung der OPG-Sekretion durch Cerivastatin	57
Abb. 4.13:	Cycloheximid als Hemmstoff der OPG-Produktion	58
Abb. 4.14:	Einfluss von Indometacin auf die OPG-mRNA-Expression	59
Abb. 4.15:	Hemmung der OPG-Sekretion durch Indometacin	60
Abb. 5.1 :	Interaktion von OPG, RANKL und TRAIL	77

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 4.1 :	Substanzen ohne regulierende Effekte auf die OPG-Produktion	60
------------	---	----

1. EINLEITUNG

1.1 Klinische Aspekte des Pankreaskarzinoms

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Adenokarzinom des Pankreas stellt die vierthäufigste Todesursache aller Krebserkrankungen in der männlichen und weiblichen Bevölkerung dar (Bardeesy & DePinoh, 2002; Lowenfels & Maisonneuve, 2005; Rocha Lima & Centeno, 2002). Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms zeigt weltweit große geographische Unterschiede und hat mit steigender mittlerer Lebenserwartung signifikant zugenommen (Lowenfels & Maisonneuve, 2005). Sie beträgt 9 von 100.000 Einwohnern pro Jahr in den meisten westlichen Ländern, wobei die schwarze Bevölkerung mit einer jährlichen Inzidenz von 15 auf 100.000 Einwohner häufiger betroffen ist. Das Pankreaskarzinom liegt in der Rangliste der Karzinomhäufigkeiten an 11. Position (Yeo et al., 2002). In Indien, Kuwait und Singapur beträgt die Erkrankungsrate 2 auf 100.000 Einwohner pro Jahr. In Japan ist die jährliche Inzidenz von 1,8 im Jahr 1960 auf 5,2 pro 100.000 Einwohner im Jahr 1985 stark angestiegen (Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992). Das Adenokarzinom des Pankreas zeigt eine länderspezifische Verteilung zwischen Männern und Frauen von 1,25 bis 1,75 zu 1. Das Durchschnittsalter bei der Diagnosestellung liegt zwischen 60 und 65 Jahren. Selten tritt es vor dem 40. Lebensjahr auf (Andrén-Sandberg et al., 1999; Bardeesy & DePinho, 2002; Lowenfels & Maisonneuve, 2005; Yeo et al., 2002).

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist in den meisten Fällen unbekannt. Nikotinkonsum gilt als der gesichertste Risikofaktor, da die Erkrankung zwei- bis dreimal häufiger bei starken Rauchern als bei Nichtrauchern auftritt (Lowenfels & Maisonneuve, 2005). Es ist ungeklärt, ob dieser Zusammenhang aufgrund des direkten mutagenen Effektes der Tabakmetabolite auf das Pankreas besteht oder ob eine nicht identifizierte Exposition ursächlich ist, die bei Rauchern häufiger auftritt (Mayer, 2001; Yeo et al., 2002). Das Risiko steigt proportional zur Anzahl der konsumierten Zigaretten und hat sein Maximum 10 bis 15 Jahre nach der Exposition (Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992). Patienten mit chronischer Pankreatitis und langjährige Diabetiker haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Ghadirian et al., 2003; Lowenfels & Maisonneuve, 2005). Die Ernährung spielt bei der Karzinogenese eine große Rolle, wobei das Risiko in direkter Relation zu

der Kalorienzufuhr steht. Große Anteile von Fett und Fleisch an der Ernährung sind mit der Entwicklung eines Karzinoms assoziiert, ein protektiver Effekt wird dagegen frischem Obst und Gemüse zugeschrieben (Ghadirian et al., 2003). Nicht als Risikofaktoren gelten Kaffeekonsum, Alkoholmissbrauch und Gallensteine (Mayer, 2001; Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992). Der Anteil an Patienten mit vererbter Prädisposition wird auf 10% der Pankreaskarzinompatienten geschätzt (Bardeesy & DePinho, 2002; Lowenfels & Maisonneuve, 2005).

1.1.2 Pathologie und Symptomatik

Adenokarzinome machen mehr als 90% und Tumoren der Inselzellen 5 bis 10% der Pankreaskarzinome aus. Im Pankreaskopf sind 70% der Tumoren lokalisiert, im Korpus 20% und im Schwanzbereich 10% (Mayer, 2001). Die Karzinome von Korpus und Kauda sind bei der Diagnosestellung größer als die im Kopfbereich, weil sie später Symptome verursachen (Porta et al., 2005). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind bereits 85% der Tumoren über das Pankreas hinaus infiltrativ gewachsen. Adenokarzinome breiten sich sowohl im Pankreasgewebe als auch im umgebenden Gewebe bevorzugt perineural aus. Zusätzlich kann die lymphatische Metastasierung zu frühen Metastasen in Lymphknoten führen. Die Leber, das Peritoneum und die Lunge zählen zu den Organen, in denen Fernmetastasen gefunden werden (Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992).

Die initialen Symptome des Pankreaskarzinoms sind mit Ausnahme der Cholestase sehr unspezifisch. Bei 75% der Patienten treten abdominale Schmerzen und Gewichtsverlust auf und diese Erstsymptome bestehen häufig länger als zwei Monate vor der Diagnosestellung (Mayer, 2001; Porta et al., 2005). Die Entwicklung von starken Schmerzen weist auf eine retroperitoneale Ausbreitung des Tumors mit Infiltration der Splanchnikusnerven hin. Schmerzen stellen ein größeres Problem bei Karzinomen im Korpus- und Kaudabereich dar, da diese zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sehr groß sein können (Mayer, 2001). Der Gewichtsverlust ist zum größten Teil auf Anorexie zurückzuführen, wobei in der initialen Phase der Erkrankung die Maldigestion eine Rolle spielen kann. Einen posthepatischen Ikterus, bedingt durch Obstruktion der ableitenden Gallenwege, zeigen über 80% der Patienten mit einem Pankreaskopfkarzinom. Er wird typischerweise von dunklem Urin, tonartigem Stuhl und Übelkeit begleitet (Mayer, 2001; Porta et al., 2005). Im Gegensatz zum „schmerzlosen Ikterus“,

wie man ihn bei Patienten mit Karzinomen der Gallenwege, des Duodenums oder der periampullären Region beobachten kann, geben Patienten mit einem Adenokarzinom des Pankreaskopfes und Ikterus belastendes abdominales Unbehagen an (Mayer, 2001). Zu den seltenen Erstsymptomen zählen Glukoseintoleranz, tastbare Gallenblasen, gastrointestinale Blutungen, rezidivierende Phlebothrombosen, Splenomegalie und Depressionen (Mayer, 2001).

Eine große Anzahl an Tumormarkern zur Diagnostik und Verlaufskontrolle des Pankreaskarzinoms wurde untersucht und vorgeschlagen, darunter Serumspiegel von Tumor assoziierten Antigenen, Enzymen und Hormonen. CA 19-9 – ein Tumor assoziiertes Antigen – ist der am besten untersuchte Tumormarker. Er ist nicht pankreasspezifisch, da hohe Spiegel auch bei Patienten mit anderen gastrointestinalen Tumoren gefunden werden. Zurzeit besitzt kein Tumormarker eine ausreichende Sensitivität und Spezifität, um zuverlässig im Rahmen von Früherkennungsuntersuchungen eingesetzt werden zu können (Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992).

1.1.3 Therapie und Prognose

Die einzige effektive Therapie eines Adenokarzinoms des Pankreas ist die komplette chirurgische Resektion (Mayer, 2001; Wagner et al., 2004; Wray et al., 2005). Sie schließt beim Pankreaskopfkarcinom den Pankreaskopf, den distalen Magenanteil, das Duodenum, die erste Schlinge des Jejunums und die distalen Gallenwege ein (partielle Duodenopankreatektomie nach Whipple). Bei Tumoren im Korpus- und Kaudabereich stellt die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie das Standardverfahren dar. Diese kurative Operation kommt für 10 bis 15% der Patienten in Frage, in der Regel Patienten mit Pankreaskopfkarcinomen, die durch einen extrahepatischen Verschlussikterus frühzeitig auffallen und bei denen keine lokale Infiltration und Metastasierung bestehen (Mayer, 2001; Schneider et al., 2005). Die peri- und postoperative Morbidität und Mortalität des Eingriffs konnte in den letzten 15 Jahren aufgrund verbesserter Techniken signifikant auf 2 bis 5% gesenkt werden (Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992; Wray et al., 2005). Nach erfolgreicher Resektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate insgesamt 20% und für Patienten mit einem kleinen Lymphknoten negativen Tumor annähernd 40% (Bardeesy & DePinho, 2002; Lockhart et al., 2005; Rocha Lima & Centeno, 2002). Die Gesamtüberlebensrate wird bedeutend von der

Radikalität der Resektion bestimmt (Wagner et al., 2004). Die Strahlentherapie hat bisher keinen signifikanten Beitrag zur Überlebenszeitverlängerung beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom geleistet. Die lokale Kontrolle nicht resezierbarer oder nicht kurativ resezierter Tumoren und die Indikation zur Schmerzbehandlung werden diskutiert. Mit der intraoperativen Radiotherapie können höhere Strahlendosen direkt am Tumor appliziert werden, während das umgebende Gewebe geschont wird. Die Resultate unterscheiden sich nicht von denen der hochdosierten externen Bestrahlung (Mayer, 2001). Die adjuvante postoperative Therapie verbessert das Überleben von Patienten nach einer Pankreaskarzinomresektion (Lockhart et al., 2005). Gemcitabine ein Deoxycytidin-Analogon bleibt ein Eckstein der Pankreaskarzinomtherapie (Lockhart et al., 2005). Die systemische Chemotherapie mit Gemcitabine verbessert die Lebensqualität bei Patienten mit fortgeschrittenem und metastasiertem Pankreaskarzinom und erzielt eine geringfügige Lebenszeitverlängerung. Die Kombination von Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und externer Strahlentherapie zeigte einen Überlebensvorteil für die behandelten Patienten (Mayer, 2001; Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992). Untersucht wird, ob eine neoadjuvante Radio- und Chemotherapie die Zahl der kurativ resezierbaren Pankreaskarzinome erhöht (Mayer, 2001; Wray et al., 2005). Bedingt durch die stark ausgeprägte Resistenz der Adenokarzinome des Pankreas gegenüber der gegenwärtigen Behandlung konzentriert sich das Therapiemanagement bei einem Großteil der Patienten auf Palliation (Bardeesy & DePinho, 2002). Signifikante Fortschritte der Erkenntnisse über die Entwicklung und Progression von Pankreaskarzinomen haben bislang nicht zu durchbrechenden Erfolgen in der Therapie dieser Erkrankung geführt (Lockhart et al., 2005).

Die Diagnosestellung eines Pankreaskarzinoms erfolgt in 90 bis 95% der Patienten in einem fortgeschrittenen, nicht mehr kurativ resezierbaren Stadium mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5% (Lowenfels & Maisonneuve, 2005; Schneider et al., 2005). Die mittlere Lebenserwartung für primär kurativ resezierte Fälle beträgt 10 bis 20 Monate und für nicht resezierbare 6 Monate. Die Diagnose eines Adenokarzinoms des Pankreas trägt demzufolge eine der schlechtesten Prognosen in der Medizin (Bardeesy & DePinho, 2002; Lockhart et al., 2005; Mayer, 2001). Es sind daher neue Therapiemodalitäten erforderlich, die aktuelle zell- und tumorbiologische Erkenntnisse berücksichtigen.

1.2 Zellbiologische Grundlagen des Pankreaskarzinoms

Für das Verständnis der Biologie von Tumorzellen sind die Mechanismen ihrer Interaktionen mit benachbarten Tumorzellen, Zellen des Wirtsgewebes sowie der extrazellulären Matrix wichtig. Das enge Zusammenspiel zwischen extrazellulären Signalen, wie Hormonen und Zytokinen, und intrazellulären Vorgängen, die eine Zellteilung zur Folge haben, wurde in diesem Zusammenhang besonders beleuchtet. Eine mögliche Konsequenz von Veränderung und Intervention in diesem System ist unkontrollierte Zellproliferation. Es setzt sich vermehrt die Sichtweise durch, dass Tumorzellwachstum von einer Kombination aus endokrinen (systemisch), parakrinen (lokal) und autokrinen (den Tumorzellen entstammend) Hormonen reguliert wird. Ein unkontrolliertes Tumorzellwachstum wird durch eine gestörte Homöostase dieses Systems ermöglicht. Des Weiteren unterstützt die Entstehung von Tumorzellen, die sehr stark auf Wachstumsstimulatoren ansprechen, enthemmtes Tumorwachstum. Dieses erlaubt die Schlussfolgerung, dass zirkulierende Hormone nur einen Faktor in dem komplexen System der Karzinogenese darstellen.

Pankreatische intraepitheliale Neoplasien, PanIN, gelten als Vorläufer von duktalem Pankreasadenokarzinomen. PanIN sind Läsionen, die sich aus Epithelien der kleinen Ausführungsgänge des Pankreas mit variierenden Stadien zytologischer und architektonischer Atypie zusammensetzen. Die Zellproliferationsrate steigt mit fortschreitendem PanIN Stadium, welches die Theorie unterstützt, dass es sich um progrediente Läsionen handelt (Bardeesy & DePinho, 2002; Yeo et al., 2002).

Der großzügige Einsatz von Zytostatika in der Tumorbehandlung, deren Vorläufer gegen Ende der 60er Jahre entwickelt worden waren, verdeutlicht, dass nur wenige Tumoren chemosensitiv sind. Die häufigsten Tumoren, darunter auch das Adenokarzinom des Pankreas, sind resistent gegenüber Chemotherapie (Krammer, 1999; Lowenfels & Maisonneuve, 2005). Darüber hinaus begrenzen Nebenwirkungen der Zytostatika die Entwicklung von Hochdosisprotokollen für Tumoren, die resistent gegenüber den konventionellen Zytostatikadosen sind (Krammer, 1999).

Der programmierte Zelltod, Apoptose, stellt einen physiologischen Prozess dar, welcher sowohl während der Entwicklung als auch der Erhaltung der Homöostase in einem Zellverband eine wichtige Rolle spielt. In humanen Pankreaskarzinomen sind die regulierenden Mechanismen der Apoptose häufig gestört. Veränderungen in Apoptose induzierenden und hemmenden Genen können zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Apoptose beitragen. Die Wirkung von Chemotherapie und Bestrahlung beruht auf der Induktion von Apoptose in Tumorzellen. Es liegt nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Apoptose und dem eingeschränkten Ansprechen bzw. Nichtansprechen von Pankreaskarzinomzellen auf Chemo- und Radiotherapie besteht (Ozawa et al., 2001).

1.3 RANKL-OPG-System

1.3.1 Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin (OPG) und *Osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF) wurden im Jahr 1997 als erste sezernierte Mitglieder der TNF-Rezeptor (TNFR)-Familie von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben (Simonet et al., 1997; Tsuda et al., 1997; Yasuda et al., 1998a). Dieses Protein wurde von weiteren Gruppen identifiziert und entsprechend seiner biologischen Wirkung benannt: *TNF receptor-related molecule-1* (TR1) bzw. *Follicular dendritic cell receptor-1* (FDCR-1) (Kwon et al., 1998; Tan et al., 1997; Yun et al., 1998). Eine Revision der Nomenklatur im Jahr 2000 ergab die einheitliche Bezeichnung OPG (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das menschliche OPG-Gen befindet sich auf dem Chromosom 8q23-24. Fünf Exons verteilen sich über 29 kb (Hilton et al., 2001). Die humane OPG-mRNA wird überwiegend als 2,9 kb lange Form exprimiert. Infolge einer partiellen oder kompletten Duplikation des Introns 2 entstehen zwei gering exprimierte 4,2 und 6,5 kb lange Formen (Morinaga et al., 1998). Das OPG-Gen von Mäusen wurde 1998 von Mizuno et al. kloniert (Mizuno et al., 1998).

OPG als sezerniertes Mitglied der TNFR-Familie zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu weiteren Proteinen dieser Gruppe, wie TNFR-2 und CD40 (Simonet et al., 1997). Die Existenz einer zellgebundenen OPG-Form wurde von Yun et al. dargestellt (Yun et al.,

1998). Eine hydrophobe Region, die einer klassischen Transmembranregion entspricht, konnte bislang auf der Genebene jedoch nicht identifiziert werden (Simonet et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998). Durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke entsteht aus der monomeren Form (60 kDa) von OPG die homodimere Variante (120 kDa), die vergleichbare biologische Aktivitäten zeigen (Abb. 1.1). Das OPG-Gen kodiert ein sezerniertes basisches Glykoprotein von 401 Aminosäuren mit einem Signalpeptid von 21 Aminosäuren (Baker & Reddy, 1998; Merewether et al., 2000; Tomoyasu et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998). Die 7 strukturellen Domänen von OPG besitzen jeweils spezifische Funktionen. Cystein reiche Domänen, die für TNFR-Mitglieder charakteristisch sind, werden in den N-terminalen Domänen 1 bis 4 gefunden und hemmen die Funktionen verschiedener Osteoklasten (Baker & Reddy, 1998; Simonet et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998; Yasuda et al., 1998a). Die "Death domain homologous" (DDH)-Regionen stellen Apoptose vermittelnde Proteinsequenzen dar. Diese Abschnitte wurden bei OPG in den Domänen 5 und 6 sowie bei anderen Mitgliedern der TNFR-Familie identifiziert (Baker & Reddy, 1998; Simonet et al., 1997). Die C-terminale Domäne 7 ermöglicht mit Hilfe einer Cysteinverbindung durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke die bereits beschriebene Dimer-Bildung. Zusätzlich enthält diese Domäne eine Heparin bindende Sequenz (Merewether et al., 2000; Simonet et al., 1997; Tomoyasu et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998).

OPG bindet als sezernierter Rezeptor sämtliche RANKL-Formen kompetitiv und inaktiviert auf diese Weise die biologische Wirkung von RANKL (Abb. 1.1) (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b). Gleichermäßen neutralisiert OPG die biologische Funktion des TNF-Liganden *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL; Abb. 1.1) (Emery et al., 1998). Der Nachweis von OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion gelang in zahlreichen normalen und malignen Zelltypen. Der Zahnhalteapparat, die Wände großer Arterien und die Schilddrüse gehören zu den Geweben starker OPG-Produktion (Hofbauer et al., 2002a; Rani & MacDougall, 2000; Sakata et al., 1999; Shiba et al., 2000; Simonet et al., 1997). Besonders die Zellen der osteoblastären Zellreihe produzieren innerhalb des Knochen-Knochenmark-Kompartments OPG (Kwon et al., 1998; Simonet et al., 1997; Tan et al., 1997; Tsuda et al., 1997; Yasuda et al., 1998a; Yun et al., 1998). Satoh et al. wiesen 2001 OPG in duktalem Adenokarzinomgewebe des Pankreas und Pankreskarzinomzelllinien nach. In gesundem Pankreasgewebe wurde OPG dagegen nicht gefunden (Satoh et al., 2001).

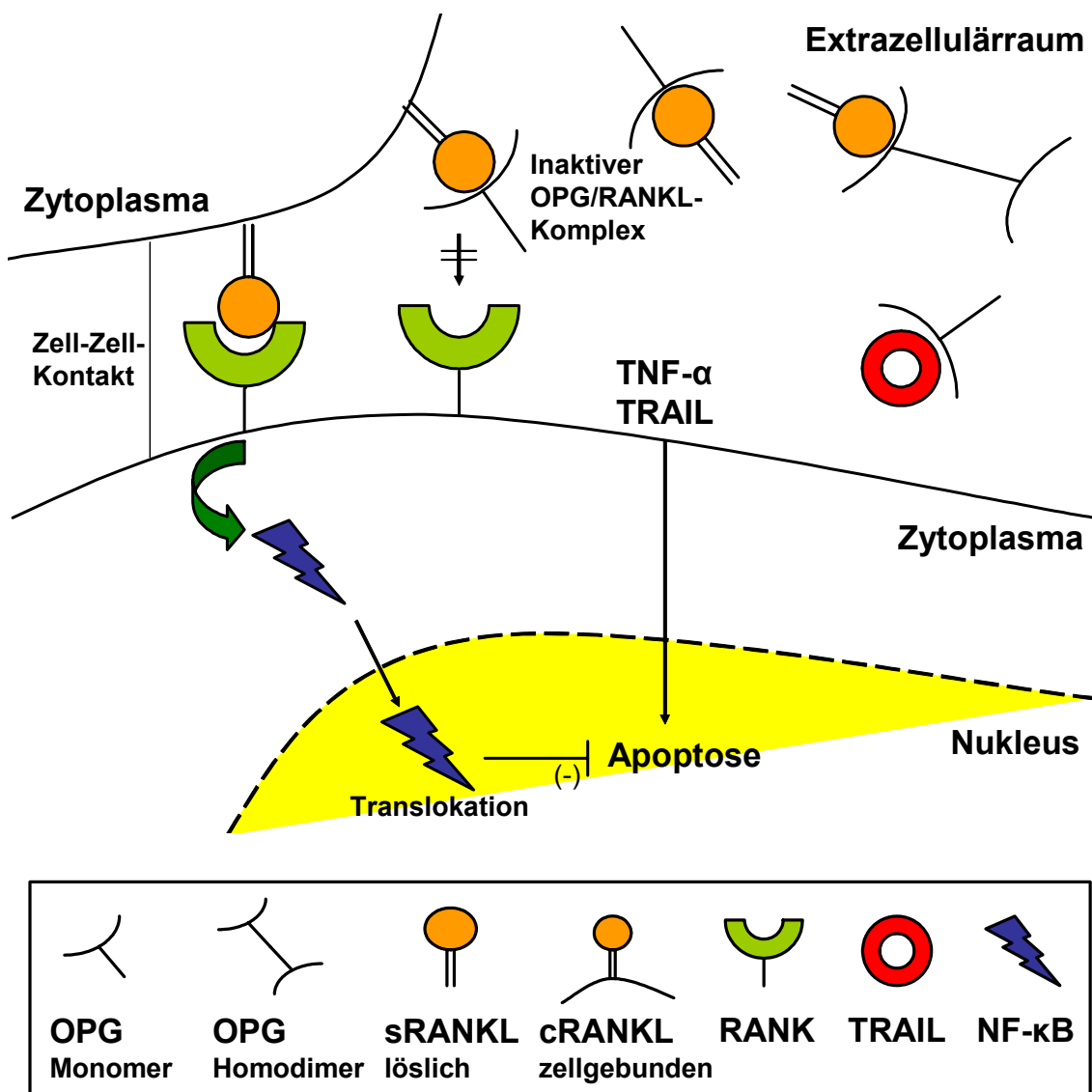


Abb. 1.1 Zusammenspiel der TNF-Liganden und -Rezeptoren RANKL, RANK, OPG und TRAIL
 RANKL kann an seine Rezeptoren in löslicher (sRANKL) und zellgebundener (cRANKL) Form binden, wobei die Letztere Zell-Zell-Kontakt benötigt. OPG und RANK konkurrieren um die Bindung von RANKL. Im OPG/RANKL-Komplex wird RANKL inaktiviert. OPG fungiert ebenfalls als neutralisierender Rezeptor für TRAIL. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch die Anlagerung von RANKL an seinen zellgebundenen Rezeptor RANK führt zur Translokation von NF-κB in den Zellkern. NF-κB ist ein positiver Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl antiapoptotisch wirkender Gene. Der Mechanismus, der zur Hemmung TNF-α oder TRAIL induzierter Apoptose führt, ist noch nicht im Detail aufgeklärt.

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

Osteoprotegerin ligand (OPGL) und *Osteoclast differentiation factor* (ODF) stellen spezifische Liganden von OPG dar. Sie wurden von Lacey et al. und Yasuda et al. im Jahr 1998 identifiziert (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b). Bereits 1997 war dieses Zytokin von anderen Gruppen als wichtiges immunologisches Zytokin unter den Bezeichnungen *Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL) bzw. *TNF-related activation-induced cytokine* (TRANCE) beschrieben worden. Dieses konnte durch eine Sequenzanalyse gesichert werden (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997). Auf Beschluss der "American Society for Bone and Mineral Research" soll künftig die einheitliche Bezeichnung RANKL verwendet werden (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das humane RANKL-Gen kodiert ein membrangebundenes Protein von 317 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 38 kDa mit einer hohen Sequenzhomologie zu anderen TNF-Liganden wie TRAIL, CD40-Ligand und Fas-Ligand (Abb. 1.1) (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997). Das menschliche RANKL-Gen ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert. Infolge verschiedener Polyadenylierungssignale entsteht eine RANKL-mRNA zwischen 2,2 und 2,4 kb Länge (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997). Die 5 Exons des RANKL-Gens der Maus verteilen sich über 40 kb des Mäuse-Genoms (Kodaira et al., 1999). Die extrazellulären Domänen des membranständigen Proteins RANKL sind in ihrer Quartärstruktur als Trimere angeordnet (Kong et al., 2000). Infolge einer posttranslationalen Prozessierung durch die *TNF- α -converting enzyme-like protease* (TACE) an den Aminosäuren 140 oder 145 entstehen aus dieser zellulären RANKL-Form kürzere Ektodomänvarianten (Lum et al., 1999). Darüber hinaus wurde eine primär sezernierte RANKL-Form in aktivierten T-Lymphozyten und einer Plattenepithelkarzinomzelllinie beschrieben (Abb. 1.1) (Kong et al., 1999; Nagai et al., 2000). Die detaillierte Analyse muriner Zellen ergab drei RANKL-Isoformen. Die klassische RANKL-Variante (RANKL-1) umfasst 316 Aminosäuren. Daneben existiert RANKL-2 (287 Aminosäuren), die sich von RANKL-1 durch eine kürzere Intrazellulärdomäne unterscheidet und vor allem innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates lokalisiert ist. RANKL-3 als lösliche Form ohne Transmembranregion besteht aus 199 Aminosäuren und wurde auch als sRANKL beschrieben (Abb. 1.1) (Ikeda et al., 2001; Kong et al.,

1999). Des Weiteren konnten die für die RANKL-RANK-Interaktionen spezifischen Aminosäuren identifiziert werden (Lam et al., 2001).

Unterschiedliche Zellsysteme exprimieren RANKL wie Tumorzellen, T-Lymphozyten, Endothelzellen und sowohl mesenchymale als auch epitheliale Zellen des Zahnhalteapparats (Collin-Osdoby et al., 2001; Josien et al., 1999; Kong et al., 1999; Nagai et al., 2000; Rani & MacDougall, 2000; Zhang et al., 2001). Zu den skelettalen Zellen mit nachgewiesener RANKL-Expression gehören mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Periostzellen und Chondrozyten (Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997; Yasuda et al., 1998b). Die RANKL-Expression zeigt sich daher vor allem in osteotropen Malignomen, lymphatischen Organen und sowohl im Knochen als auch im Knochenmark (Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997; Yasuda et al., 1998b; Xu et al., 2000; Zhang et al., 2001).

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

Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) wurde von Anderson et al. als TNF-Rezeptor identifiziert und nach einem seiner intrazellulären Zielgene – Nuclear factor- κ B (NF- κ B) – benannt (Anderson et al., 1997). RANKL stellt einen spezifischen Liganden von RANK dar (Anderson et al., 1997). Eine weitere Arbeitsgruppe prägte den Begriff *Osteoclast differentiation and activation receptor* (ODAR) (Hsu et al., 1999). Eine Revision der Nomenklatur ergab im Jahr 2000 die einheitliche Bezeichnung RANK (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

Das menschliche Gen von RANK kodiert ein membranständiges Polypeptid mit hoher Sequenzhomologie zu CD27 und CD40 (Abb. 1.1) (Anderson et al., 1997). RANK umfasst 616 Aminosäuren mit einem Signalpeptid (28 Aminosäuren), einer N-terminalen extrazellulären Liganden bindenden Domäne (184 Aminosäuren), einer Transmembranregion (21 Aminosäuren) und einer langen C-terminalen intrazellulären Domäne (383 Aminosäuren), die für die Signaltransduktion erforderlich ist (Anderson et al., 1997). Die extrazellulären Domänen von RANK enthalten ähnlich wie OPG die für TNFR charakteristischen Cystein reichen Domänen (Anderson et al., 1997; Simonet et al., 1997). Das humane RANK-Gen befindet sich auf dem Chromosom 18q22.1

(Anderson et al., 1997). Die menschliche RANK-mRNA ist 4,5 kb lang, die der Maus 5,5 kb (Anderson et al., 1997; Nakagawa et al., 1998). Neben diesen Hauptformen gibt es aufgrund unterschiedlicher Polyadenylierungssignale weitere humane RANK-mRNA-Formen von 3,0, 3,5 und 5,5 kb Länge (Anderson et al., 1997).

Das Knochengewebe und das lymphatische Gewebe zählen zu den Zellsystemen stärkster RANK-Expression. Funktionell aktives RANK-Protein findet sich vor allem auf Osteoklasten, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten und Fibroblasten (Anderson et al., 1997; Green & Flavell, 1999; Hsu et al., 1999; Myers et al., 1999; Nakagawa et al., 1998).

1.3.4 Effekte des RANKL-OPG-Systems

Seit der Identifizierung von RANKL und OPG als Mitglieder der TNF-Familie wurde diesem neuen Zytokinsystem in der Forschung in vielen Bereichen Aufmerksamkeit geschenkt, wobei die Bedeutung für das skelettale System in weiten Teilen aufgeklärt zu sein scheint. Die Ergebnisse können aufgrund der Vielfalt nur in Auszügen dargestellt werden (Abb. 1.1).

RANKL und OPG stellen als Agonist und Antagonist essenzielle Faktoren bei der Regulation der Differenzierung, Fusion, Aktivierung und Apoptose von Osteoklasten dar (Akatsu et al., 1998; Hakeda et al., 1998; Hofbauer et al., 2000; Kwon et al., 1998; Lacey et al., 1998; Suda et al., 1999; Tsuda et al., 1997; Yasuda et al., 1998b). RANKL steigert die Anzahl und Aktivität funktionsfähiger Osteoklasten durch Aktivierung des osteoklastären Rezeptors RANK und erhöht damit die Knochenresorption, während OPG durch Neutralisierung von RANKL die Knochenresorption hemmt. Auf endokrinologischer Ebene spielt RANKL eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Funktion der Brustdrüse (Fata et al., 2000). Aktuelle Erkenntnisse weisen auch auf einen regulierenden Effekt des RANKL-OPG-Systems auf die Funktion der Schilddrüse hin (Hofbauer et al., 2002a). Des Weiteren modulieren die Mitglieder der TNF-Familie RANKL, RANK und OPG Zellfunktionen des Immunsystems und sind hauptsächlich an der zellulären Immunantwort, der Antigenpräsentation und der Entstehung des Immunsystems beteiligt (Kong et al., 2000; Wong et al., 1999). Die Bedeutung für das vaskuläre System ist nur in Ansätzen geklärt, wobei ein Zusammenhang zwischen

Kalzifizierungsprozessen und OPG mit protektiver Wirkung zu bestehen scheint (Bucay et al., 1998; Min et al., 2000; Price et al., 2001).

In Bezug auf onkologische Effekte des RANKL-OPG-Systems konnten deren Einflüsse nicht nur auf osteotrope Tumoren identifiziert werden. Osteotrope Tumorzellen kommunizieren mit Osteoblasten und Osteoklasten. Des Weiteren produzieren die Zellen dieser Tumoren RANKL und OPG sowie exprimieren inadäquat RANK (Guise, 2000; Hofbauer et al., 2001; Roodman, 2001). Aufgrund eines gesteigerten RANKL/OPG-Quotienten wurde in Mammakarzinomzelllinien eine lokal vermehrte osteoklastäre Differenzierung und Aktivierung sowie eine Hemmung der Apoptose von Osteoklasten mit lokalen Osteolysen und systemischer Hyperkalzämie beobachtet (Hofbauer et al., 2001; Roodman, 2001). Auch Prostatakarzinomzellen exprimieren RANKL- und OPG-mRNA, wobei die Genexpression in malignen Prostatazellen etwa vierfach höher als in normalen Prostatazellen gemessen wurde (Brown et al., 2001; Lin et al., 2001). Die Bedeutung von RANKL für die primäre Tumorgenese ist bislang nicht geklärt, wengleich RANKL von Fata et al. im Jahr 2000 als antiapoptotischer Faktor für das Brustdrüsenepithel identifiziert wurde (Fata et al., 2000). Aufgrund der elementaren Funktion von RANKL bei der Entwicklung von Knochenmetastasen, Osteolysen, humoraler Hyperkalzämie, pathologischen Frakturen und Tumor assoziierten Knochenschmerzen 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., 2001; Roodman, 2001). Experimentell konnte dies im Tiermodell in mehreren Therapiestudien bei humoraler Hyperkalzämie, osteolytischer Knochendestruktion, Tumor assoziierten Knochenschmerzen und der Prävention einer skelettalen Metastasierung von Primärtumoren belegt werden (Capparelli et al., 2000; Honore et al., 2000; Luger et al., 2001; Morony et al., 2001; Oyajobi et al., 2001).

2. FRAGESTELLUNG

Basierend auf den bisherigen Befunden zur Pathogenese des Pankreaskarzinoms und den Vorarbeiten zum Thema RANKL-OPG-System war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Bedeutung von OPG und RANKL für Pankreaskarzinomzellen zu analysieren. Im Einzelnen wurden die Expression und Modulation untersucht. Die spezifischen Einzelprojekte umfassten:

- die Charakterisierung der OPG-Produktion im Pankreasgewebe und anderen endokrinen und nichtendokrinen Geweben
- die Analyse der Expression von OPG und RANKL in humanen Pankreaskarzinomzelllinien
- die Evaluierung der Regulation der OPG-Produktion durch:
 - Steroidhormone
 - Androgene und Antiandrogene (Testosteron, 5 α -DHT, DHEA, Hydroxyflutamid)
 - Östrogene, Phytoöstrogene und Antiöstrogene (17 β -Östradiol, Genistein, Tamoxifen)
 - Glukokortikoide (Dexamethason)
 - proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-8)
 - Medikamente
 - Statine (Lovastatin, Cerivastatin)
 - Proteinsynthesehemmer (Cycloheximid)
 - Bisphosphonate (Pamidronat, Zoledronat)
 - Kalziumantagonisten (Diltiazem)
 - Indometacin, Thalidomid, 9-cis Vitamin A-Säure

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

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien PaTu 8988t, PaTu 8988s und Capan-2 stammten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). Die Zelllinie PC-2 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Babette Simon (Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg) zur Verfügung gestellt. Die MG-63-Osteosarkomzellen waren von ATCC (Manassas, USA) (Heremans et al., 1978).

PaTu 8988t und PaTu 8988s: Die Zelllinien PaTu 8988t und PaTu 8988s wurden 1985 aus der Lebermetastase eines primären Adenokarzinoms des Pankreas einer 64-jährigen Frau etabliert (Elsässer et al., 1992). Diese aus einem Primärtumor stammenden Zellen besaßen jedoch unterschiedliche morphologische, chromosomale und funktionale Merkmale. Die PaTu 8988t-Zellen zeigten einschichtiges, adhärentes und konfluierendes Wachstum. In der Rasterelektronenmikroskopie konnten zwei Zelltypen besonders deutlich beobachtet werden: spindelförmige, fest auf dem Boden der Zellkulturflasche wachsende Zellen und runde Zellen, die in losem Kontakt zu den erstgenannten standen und auf ihnen wuchsen. Die Zelllinie PaTu 8988s bestand aus kleinen Zellen, die ebenfalls adhärent und einschichtig, aber im Gegensatz zu PaTu 8988t in Zellverbänden wuchsen. Innerhalb und zwischen den Zellverbänden zeigten sich unbewachsene Areale. Die morphologischen Unterschiede in der Gewebekultur ließen nicht auf verschiedene Grade der Tumorzelldifferenzierung der beiden Zelllinien PaTu 8988t und PaTu 8988s schließen (Elsässer et al., 1992).

Die Analyse von Nacktmaustransplantaten aus einem Xenotransplantationsmodell mittels Licht- und Elektronenmikroskopie erbrachte die Erkenntnis weiterer Unterschiede zwischen den Zelllinien. PaTu 8988t-Zellen wuchsen in tubulären Strukturen, wohingegen Zellen von PaTu 8988s in den Xenotransplantaten ein solides Wachstum mit nur geringfügigen kleinen Zwischenräumen zeigten. Aus diesem Charakteristikum leiteten sich die Bezeichnungen PaTu 8988t (t für tubulär) und PaTu 8988s (s für solide) ab (Elsässer et al., 1992). In den Nacktmaustransplantaten zeigte

PaTu 8988t alle strukturellen Charakteristika eines hochdifferenzierten (Grad I) primären Adenokarzinoms des Pankreas, während PaTu 8988s eine niedrigere Differenzierung (Grad II-III) aufwies (Klöppel et al., 1985). Im Gegensatz zu PaTu 8988t besaß PaTu 8988s nach intravenöser Injektion das Potential, Metastasen in der Lunge von Nacktmäusen zu setzen. Die Verdopplungszeit betrug bei PaTu 8988t-Zellen 125 h und bei PaTu 8988s 62 h. Die Analyse der Chromosomenzahl in der Metaphaseplatte ergab bei PaTu 8988s zwischen 45 und 55, bei PaTu 8988t 110 bis 120 Chromosomen (Elsässer et al., 1992).

PC-2: PC-2 wurde als eine humane exokrine Adenokarzinomzelllinie des Pankreas charakterisiert. Die Zelllinie PC-2 wurde aus dem Nacktmaustransplantat eines metastasierten Pankreaskarzinoms etabliert. Die Zellen wuchsen in Kultur einschichtig adhärent bei einer Verdopplungszeit von 58 h. Tumoren, die in Nacktmäusen nach der Transplantation von Zellen wuchsen, zeigten die histologischen und ultrastrukturellen Eigenschaften des ursprünglichen Tumors. Die Chromosomenanalyse ergab 66 Chromosomen mit humanen aneuploiden karyotypischen Charakteristika (Chen et al., 1990).

Capan-2: Die Zelllinie Capan-2 wurde am Sloan-Kettering Krebsinstitut (Rye, USA) von Dr. J. Fogh und J. D. Loveless 1975 aus dem Adenokarzinom des Pankreas eines 56-jährigen Mannes etabliert (Kyriazis et al., 1986). Histopathologisch wurde der Tumor als ein Pankreaskopfkarzinom vom duktalem Typ charakterisiert. Die Zellen Capan-2 wuchsen in der Zellkultur einschichtig und besaßen unabhängig von der Passage morphologisch Epithel ähnliche Charakteristika bei einer Verdopplungszeit von 96 h. Im Nacktmausmodell subkutan wachsende Tumoren zeigten mikroskopisch das Wachstumsmuster eines gut differenzierten Adenokarzinoms. Sie wiesen glanduläre Strukturen auf, die von fibrovaskulärem Gewebe gestützt wurden. Die Chromosomenanzahl von Capan-2 variierte zwischen 45 und 68 Chromosomen (Kyriazis et al., 1986).

3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Zellkultur: Die in der Zellkultur verwendeten Zellkulturflaschen in den Größen 50 ml, 250 ml, 550 ml, 6-Loch-Zellkulturplatten, Cryo-Gefäße und Einmalzellschaber wurden von der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen. DMEM, Penicillin (10.000 Units/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) und $1 \times$ Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin

und 0,2 g/l EDTA in $1 \times$ PBS) waren von PAA Laboratories (Linz, Österreich). Die Firma PAN Biotech (Aidenbach) lieferte das fetale Kälberserum (FCS) und das Medium RPMI 1640. Das Pferdeserum stammte von Gibco BRL (Paisley, Schottland).

Die als Stimulanzien eingesetzten Hormone und deren Antagonisten Testosteron, 17β -Östradiol, 5α -DHT, DHEA und Tamoxifen sowie Cycloheximid und 9-cis Vitamin A-Säure wurden bei Sigma (Steinheim) bestellt. Die Zytokine IL- 1β , IL-8 und TNF- α waren von R&D (Wiesbaden-Nordenstadt). Die Substanzen Thalidomid, Lovastatin und Diltiazem wurden von Merck (Darmstadt) und das Phytoöstrogen Genistein von Roth (Karlsruhe) bezogen. Bayer (Leverkusen) stellte Cerivastatin und Novartis (Basel, Schweiz) die Bisphosphonate Pamidronat und Zoledronat zur Verfügung. Hydroxyflutamid wurde freundlicherweise von Dr. R. Neri der Firma Schering-Plough (Klenisworth, USA) bereitgestellt. Als Lösungs- und Verdünnungsmittel der Stimulanzien dienten Äthanol, Bovines-Serum-Albumin (BSA) und DMSO der Firma Sigma (Steinheim) sowie Phosphat buffered saline (PBS) und NaOH (Merck, Darmstadt).

RNA-Isolierung: Bei der Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy-Mini-Kit und der QIAshredder der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Promega (Madison, USA) lieferte das PolyATtract®-System zur Isolierung von Poly-A-mRNA. Äthanol und β -Mercaptoäthanol waren von Sigma (Steinheim).

Northern Blot: Für das Agarosegel und den Auftragspuffer im Rahmen der Gelelektrophorese wurden Agarose (Gibco BRL, Paisley, Schottland), Formamide und Formaldehyd Lösung (Sigma, Steinheim) eingesetzt. Es wurden verwendet: Chromatographiepapier der Firma Whatman (Maidstone, England), Nylonmembranen von Amersham (Little Chalfont, England) und Saugpapier der Firma Kimberly-Clark (Reigate, England).

Radioaktive Markierung von cDNA und Northern Blot-Hybridisierung: Das Wizard-DNA-purification-Kit war von der Firma Promega (Madison, USA) und das Restriktionsenzym *EcoRI* war von Boehringer-Mannheim (Mannheim). Bei der radioaktiven Markierung wurde das DECAprime-II-DNA-Labeling-Kit der Firma Ambion (Austin, USA) verwendet. Die [$\alpha^{32}\text{P}$]-Nukleotide wurden von Amersham

(Little Chalfont, England) bezogen. Stratagene (La Jolla, USA) lieferte die Strahlenschutzvorrichtung und die Reinigungssäulen für radioaktive Sonden. Die Hybridisierungslösung und die humane β -Aktin-cDNA stammten von der Firma Clontech (Palo Alto, USA). Die Hybridisierungsbeutel waren von Gibco BRL (Paisley, Schottland). Die Kassetten mit Verstärkerfilmen in der Größe 20 cm \times 25 cm wurden von Rego (Augsburg) und die passenden Röntgenfilme von Kodak (Rochester, USA) bezogen.

RT-PCR: Der 5 \times First Strand Puffer, 0,1 M Dithiothreitol (DTT) und Super Script waren von Gibco BRL (Paisley, Schottland). Roche (Mannheim) lieferte den Primer p(DT), den PCR-Reaktionspuffer und die Taq-DNA-Polymerase. Der Längenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, der 10 mM dNTP Mix und der 6 \times Farbstoff wurden bei Fermentas (St. Leon-Roth) bestellt.

Der OPG-ELISA stammte von der Firma Immundiagnostik (Bensheim).

Die verwendeten Reaktionsgefäße wurden von Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg; 2 ml und 1,5 ml) und von Perkin Elmer (Foster City, USA; 0,5 ml) bezogen. Pipettenspitzen waren von Greiner Bio-One (Frickenhausen) und von Eppendorf (Hamburg). Bei Merck (Darmstadt) wurde Wasserstoffperoxid bestellt.

3.1.3 Lösungen und Puffer

BSA in PBS

1 \times PBS (*Phosphat buffered saline*)

0,1% BSA (*Bovines-Serum-Albumin*)

DEPC behandeltes Wasser

destilliertes Wasser mit 0,1% DEPC

nach 24 h 30 min autoklavieren

Farbstoffpuffer für RNA-Gele

50% Glyzerin

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

1 mM EDTA pH 8,0

Methylenblau-Lösung

0,04% Methylenblau

0,8 M Natriumacetat pH 4,0

10 × MOPS

20 mM MOPS (3-(N-morpholino) propansulfonsäure)

5 mM Natriumacetat

0,1 mM EDTA

mit NaOH pH-Wert 7,0 einstellen

PBS-Puffer

136 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

12,1 mM Na₂HPO₄

1,5 mM K₂HPO₄

mit 1 M HCl pH-Wert 7,4 einstellen

20 × SSC (Standard sodium citrate)

3 M Natriumchlorid

0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

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

100 mM Natriumchlorid

20 mM Tris-HCl pH 7,5 (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)

10 mM EDTA pH 7,0

0,5 × TBE (Tris-Borat-EDTA)

44,5 mM Tris-HCl pH 8,0

44,5 mM Borsäure

1 mM EDTA pH 8,3

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

3.1.4 Geräte

In der Zellkultur wurde ein Sterilflow Modell Lamin Air HB 2448 der Firma Heraeus Instruments (Hanau) verwendet. Ebenfalls von Heraeus Instruments (Hanau) waren ein CO₂ begaster Brutschrank und eine Zentrifuge. Das Wachstum der Zellen wurde mit einem Mikroskop von Olympus (Japan) beurteilt. Die RNA-Isolierung wurde in einer Zentrifuge der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg) durchgeführt und die Quantifizierung der RNA erfolgte in einem Spektralphotometer Gene Quant von Pharmacia (Biochrom, England). Zum Trocknen der RNA-Proben im Rahmen des Northern Blot wurde eine Kühlfalle Alpha I-5 der Firma Christ (Osterode) mit angeschlossener Zentrifuge von Bachofer (Reutlingen) und Vakuumpumpe von Pfeiffer (Asslar) eingesetzt. Die horizontale Gelelektrophorese lief in einer Kammer mit passendem Netzgerät Power Pac 200 der Firma Biorad Laboratories (Richmond, USA). Die RNA wurde mit Hilfe des UV Stratalinker™ 2400 von Stratagene (La Jolla, USA) auf der Nylonmembran fixiert. Bei der Hybridisierung wurde ein Hybridisierungsöfen der Firma Bachofer (Reutlingen) verwendet. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einem Filmautomat Curix 60 von Agfa (Köln). Die reverse Transkription und die Polymerasekettenreaktion fanden in einem Thermocycler Genius Operator's Manual der Firma Labtech International (Burkhardtsdorf) statt. Die zur OPG-Proteinmessung eingesetzten Mikrotiterplatten wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer MRX von Dynatech Laboratories (Guernsey, UK) gelesen. Es wurden Pipetten von Eppendorf (Hamburg; Multipette plus) und von Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt; Pipetus-akku) verwendet. Die Tischzentrifuge war von Stratagene (La Jolla, USA) und der Autoklav war von Fritz Gössner (Hamburg).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

PaTu 8988t und PaTu 8988s wurden in 90% DMEM, 5% FCS, 5% Pferdeserum, 2 mM L-Glutamine und Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/10 mg/ml) kultiviert. Das Kulturmedium von PC-2 bestand aus 90% RPMI 1640, 10% FCS und Penicillin/Streptomycin. Capan-2 erhielten 85% RPMI 1640 mit 15% FCS und Penicillin/Streptomycin. Die Osteosarkomzelllinie MG-63 wurde in 90% DMEM, 10% FCS und Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die Inkubationsbedingungen des Brutschrankes wurden auf eine Temperatur von 37°C und einen CO₂-Anteil von 5% adjustiert. Die in 250 und 550 ml Flaschen kultivierten Zellen wurden bei normalem Wachstum einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurden das Zellkulturmedium abgesaugt und 5 ml bzw. 10 ml 1 × Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA in 1 × PBS) verwendet, um die adhärent wachsenden humanen Pankreaskarzinomzelllinien und MG-63 abzulösen und zu suspendieren. Bei beginnender Ablösung des Zellrasens nach ca. 3 bis 5 min wurden die Zellen durch Spülen mit einer Pipette von dem Kulturgefäß gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1.200 g zentrifugiert. Der Überstand konnte von den Zellen abgenommen werden und diese konnten in einem neuen Medium resuspendiert werden. Die Zellen wurden anschließend in Kulturflaschen oder auf 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und dabei 1 zu 3 geteilt. Das Passagieren der Zelllinien und deren Medienwechsel wurden unter einem Sterilflow durchgeführt, um die Kontamination der Zellen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden.

Die Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff erfolgte in Cryo-Gefäßen mit 70% Medium, 20% FCS und 10% DMSO. Die Cryo-Gefäße wurden bei -20°C und -80°C jeweils 24 h zwischengelagert, bevor sie in einem Stickstofftank bei -196°C eingefroren wurden. Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C in einem Wärmebad, wonach sie in einem vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert wurden. Die Zellen wurden zunächst in 50 ml Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.2 Stimulationsbedingungen

Die Zellen wurden 48 h vor der Stimulation auf 6-Loch-Zellkulturplatten gesät. Dadurch waren sie zum Zeitpunkt der Stimulation adhärent und konfluierend gewachsen (Abb. 3.1). Zu 2 ml frischem Medium wurden 2 µl der Stimulans oder der Kontrolle bei einem Lochdurchmesser von 3,5 cm hinzugefügt. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel der Stimulans. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, bei der das Lösungsmittel der Stimulans als Verdünnungsmittel eingesetzt wurde. Die Konzentrationen lagen substanzabhängig zwischen 10^{-12} und 10^{-5} M sowie 1 pg/ml und 10 µg/ml. Die Stimulation wurde durch die Abnahme des Mediums und die Isolierung der RNA nach mindestens 24 h und höchstens 48 h beendet (Abb. 3.1). Bei zeitkinetischen Untersuchungen einer Substanz wurden die Zellen einer bestimmten Konzentration für unterschiedliche Zeiträume ausgesetzt. Die Konzentration wurde anhand beginnender Effekte der Substanz in der Dosis-Wirkungskurve festgelegt. Die Behandlungsdauer umfasste 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 0 h als Kontrolle.

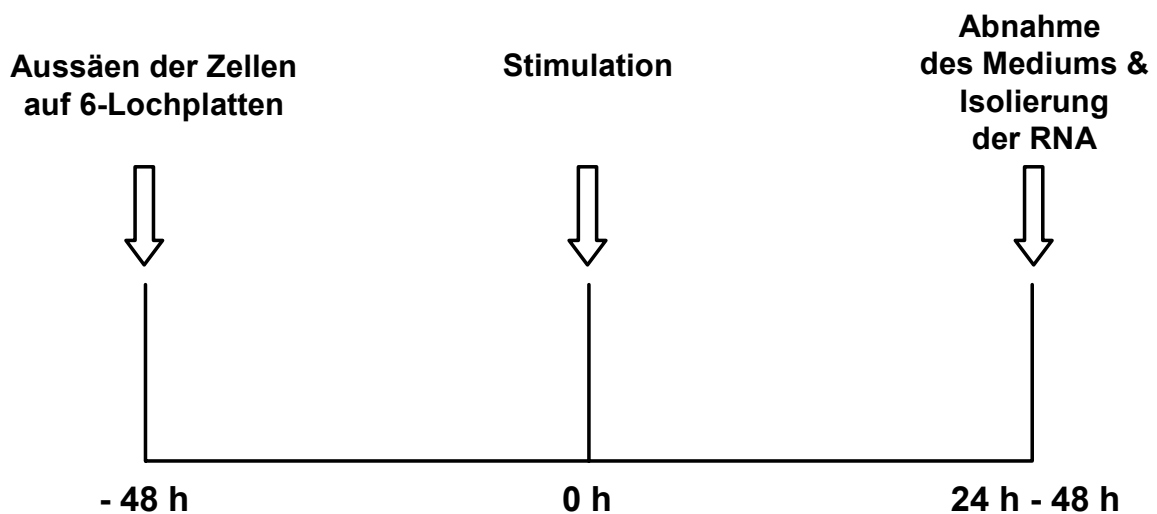


Abb. 3.1 Stimulationsdiagramm

Die Zellen wurden 48 h vor der Stimulation auf 6-Loch-Zellkulturplatten gesetzt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden das Zellkulturmedium erneuert und die zu testende Substanz bzw. die Kontrollsubstanz hinzugefügt. Das Diagramm bezieht sich auf Stimulationen mit verschiedenen Konzentrationen über einen festgelegten Zeitraum. Bei Untersuchungen zur Zeitkinetik wurden die Zellen mit einer bestimmten Konzentration über verschiedene Zeiträume behandelt. Beendet wurde die Stimulation nach mindestens 24 h und höchstens 48 h jeweils durch die Abnahme und Tiefgefrieren des Mediums und Isolierung der RNA.

3.2.3 Isolierung zellulärer Gesamt-RNA

Die Arbeiten mit RNA müssen äußerster Sorgfalt unterliegen, da RNA durch Abbau von RNasen und Brechen bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren gefährdet ist. Quellen der RNasen sind die Bakterienflora der menschlichen Haut und Pilzsporen die mit Staubpartikeln in das Arbeitsgebiet getragen werden können. Bei allen RNA-Versuchen wurden deshalb Einmalhandschuhe getragen und diese auch häufig gewechselt. Sämtliche Materialien und Reagenzien wurden ausschließlich für Versuche mit RNA verwendet, als solche gekennzeichnet und isoliert von anderen Chemikalien gelagert. Einmal verwendbare Gefäße und Pipettenspitzen wurden bevorzugt eingesetzt und durch Autoklavierung sterilisiert. Wiederverwendbare Glas- und Kunststoffgefäße wurden ebenfalls präpariert, um RNase freie Bedingungen zu gewährleisten. Glasgefäße wurden über Nacht bei 200°C gebacken, während Gefäße aus Kunststoff mit 0,03% Wasserstoffperoxid und anschließend mit destilliertem Wasser behandelt oder die RNasen mit Hilfe eines RNase-Erase-Sprays der Firma Biomedicals (Aurora, USA) entfernt wurden. Zur effektiven RNase-Hemmung wurden alle Lösungen und Puffer mit DEPC-Wasser in gebackenen Gefäßen angesetzt und autoklaviert (20 × SSC, 10 × MOPS, Methylenblau-Lösung, Farbstoffpuffer für RNA-Gele). Um die Stabilität der RNA zu gewährleisten, wurden die Arbeiten mit RNA grundsätzlich auf Eis durchgeführt.

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy-Mini-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Das angewendete Prinzip kombiniert die selektiven Bindungskapazitäten einer auf Silikatgel basierenden Membran mit der Geschwindigkeit der Zentrifugaltechnik. Biologische Proben werden zuerst lysiert und homogenisiert in der Anwesenheit eines denaturierenden, Guanidine Isothiocyanate (GITC) enthaltenden Puffers (RLT Puffer), der unverzüglich RNasen inaktiviert. Auf diese Weise wird die Isolierung von intakter RNA gesichert. Die Zugabe von Äthanol stellt die benötigten Bedingungen für die Bindung her, bevor die Proben auf die RNeasy-Säulen geladen werden. Die Gesamt-RNA wird an die Membran der Säulen gebunden, Verunreinigungen ausgewaschen und anschließend wird die RNA mit Wasser eluiert. Mit Hilfe des RNeasy-Verfahrens werden RNA Moleküle mit einer Mindestlänge von 200 Nukleotiden isoliert. Dieses hat die Anreicherung von mRNA zur Folge, da ein Großteil der RNA mit weniger als 200 Nukleotiden, wie 5,8S rRNA, 5S rRNA und

tRNA, die zusammen einen Anteil von etwa 15 bis 20% an der Gesamt-RNA haben, selektiv ausgeschlossen werden.

In Vorbereitung auf die Isolierung wurden dem RLT Puffer 14,3M β -Mercaptoäthanol (10 μ l β -Mercaptoäthanol/1 ml RLT Puffer) und dem RPE Puffer das vierfache Volumen an 100%igem Äthanol zugegeben. Das Kulturmedium wurde von den Zellen abgenommen und für die Proteinanalyse bei -20°C tiefgefroren. Mit Hilfe von 700 μ l RLT Puffer mit β -Mercaptoäthanol wurden die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturplatte gelöst und deren Zellwände zerstört. 700 μ l 70%iges Äthanol wurden durch Pipettieren mit dem Ansatz vermischt. Das Zelllysate wurde in Etappen ($2 \times 700 \mu$ l) auf eine RNeasy-Säule geladen und 1 min bei 9.300 g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 500 μ l RW1 Puffer gewaschen (15 s bei 9.300 g) und auf ein neues Hüchchen gesetzt. Zwei weitere Waschgänge wurden mit 500 μ l RPE Puffer durchgeführt (15 s bei 9.300 g). Zur vollständigen Entfernung des RPE Puffers aus der Säule wurde diese 2 min bei 15.700 g zentrifugiert. Daraufhin wurde die RNA mit 50 μ l RNase freiem Wasser in ein Eppendorf Gefäß eluiert (1 min bei 9.300 g) und bei -80°C tiefgefroren.

3.2.4 Isolierung von Poly-A-mRNA

In eine 550 ml Zellkulturflasche wurden 4 ml RLT Puffer und 40 μ l β -Mercaptoäthanol gegeben, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren und mit Hilfe eines Einmalzellschabers gelöst, das Lysat auf Säulen des QIAshredder gegeben und 2 min bei 15.700 g zentrifugiert. Dem Zentrifugat wurde zu gleichem Teil 70%iges Äthanol zugegeben und mit diesem vermischt. Mit der Beladung der RNeasy-Säule schloss sich das bereits in Kapitel 3.2.3 beschriebene Verfahren der RNA-Isolierung mit dem RNeasy-Mini-Kit an. Die RNA wurde ebenfalls einmalig mit 500 μ l RW1 Puffer und zweimalig mit 500 μ l RPE Puffer gereinigt. Es folgte eine zweimalige Eluierung mit 50 μ l RNase freiem Wasser, so dass ein maximales Gesamtvolumen von 100 μ l RNase freiem Wasser mit eluierter RNA erzielt wurde.

Mit Hilfe des PolyATtract® mRNA-Isolierungssystems von Promega (Madison, USA) wurde die Isolierung von Poly-A-mRNA aus Gesamt-RNA durchgeführt. 1 μ g Gesamt-RNA wurde in RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l gebracht und 10 min bei 65°C in einen Heizblock gesetzt. Daraufhin wurden 3 μ l biotinyliertes Oligo-dT und 13 μ l $20 \times$ SSC hinzugefügt und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur

10 min abgekühlt. Die mit Streptavidin beladenen, paramagnetischen Partikel wurden vorbereitet, indem diese resuspendiert und dreimalig mit jeweils 0,3 ml $0,5 \times$ SSC gewaschen wurden. Unter zur Hilfenahme eines Magneten konnte der Überstand vorsichtig von den Partikeln abgenommen werden, nachdem diese sich nach ca. 30 s an der dem Magneten zugewandten Seite des Gefäßes gesammelt hatten. Anschließend wurden die mit Streptavidin beladenen, paramagnetischen Partikel in 0,1 ml $0,5 \times$ SSC resuspendiert und der gesamte Ansatz der Anlagerungsreaktion zugeführt. Dieser wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und einmal pro min gewendet, um das Absetzen der Partikel zu verhindern. Die Partikel wurden magnetisch fixiert und nach Entfernung der Lösung viermal mit 0,3 ml $0,1 \times$ SSC gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschgang wurde so viel Überstand wie möglich abgenommen, ohne die mit Streptavidin beladenen, paramagnetischen Partikel zu irritieren. In RNase freiem Wasser wurden die Partikel gleichmäßig verteilt, welches durch Schnipsen der Gefäßspitze erleichtert wurde. RNase freies Wasser spaltet die Bindung zwischen dem Poly-A-Abschnitt der mRNA und dem Poly-T, welches an die mit Streptavidin beladenen, paramagnetischen Partikel geheftet ist. Die Eluierung der Poly-A-mRNA erfolgte in zwei Schritten mit 0,1 ml und 0,15 ml RNase freiem Wasser in ein RNase freies Gefäß. Im Falle von Übertragung einzelner Partikel in die Poly-A-mRNA-Lösung wurde diese bei 9.300 g und 4°C für 5 bis 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues RNase freies Gefäß überführt. Die Poly-A-mRNA wurde wie im Kapitel 3.2.5 beschrieben einer Konzentrations- und Reinheitsbestimmung unterzogen und bei -80°C gelagert.

3.2.5 Photometrische RNA-Quantifizierung

Die Konzentration und Reinheit der eluierten RNA wurden mit Hilfe der UV-Spektralphotometrie ermittelt. 5 μl RNA in wässriger Lösung wurden mit 95 μl RNase freiem Wasser verdünnt, das Absorptionsvermögen in einer Quarzküvette bei den Wellenlängen $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm gemessen und deren Verhältnis errechnet. Um die Konzentration abschätzen zu können, wird davon ausgegangen, dass eine RNA-Lösung von 40 $\mu\text{g/ml}$ 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:

$$C = A_{260} \times U \times V \text{ (in ng/}\mu\text{l)},$$

wobei C = Konzentration in $\mu\text{g/ml}$

U = Umrechnungsfaktor in $\mu\text{g/ml}$, entspricht bei RNA 40

V = Verdünnungsfaktor

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

entsprechen. Der Quotient aus A_{260} zu A_{280} gibt Aufschluss über den Grad der Kontaminierung der RNA mit Protein. Er sollte idealerweise zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

3.2.6 Northern Blot-Analyse

Der Northern Blot ist eine Methode zur vertikalen Übertragung von RNA aus einem Gel auf eine Membran, die es ermöglicht, die RNA mit komplementären Nukleinsäure-Sonden zu hybridisieren. Bei der Kapillar-Transfer-Methode wandert die RNA aufgrund von Kapillarkräften mit einem Flüssigkeitsstrom aus dem Gel heraus und lagert sich auf der Membran ab (Thomas, 1980; Wahl et al., 1987). Die relativen Positionen der RNA-Banden werden während des Transfers auf die Matrix beibehalten. Somit lässt sich die RNA quantitativ und qualitativ analysieren. Die Nukleinsäuren werden durch Quervernetzung (Crosslinking) auf einer reißfesten Nylonmembran immobilisiert.

In einer Vakuumzentrifuge, an die eine Kühlfalle angeschlossen war, wurden 10 bis 15 μg mRNA der Pankreaskarzinomzelllinien innerhalb von 30 min getrocknet (MG-63, 3-5 μg mRNA). Zur Resuspension wurden 14 μl eines Auftragspuffers aus 350 μl Formamid, 160 μl Formaldehyd-Lösung (37%) und 90 μl 10 \times MOPS verwendet. Die RNA-Proben wurden für 5 min auf 65°C erhitzt, um basengepaarte Nukleotidabschnitte zu denaturieren, bevor sie wieder auf Eis gestellt wurden. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Proben auf Eis gekühlt.

Bei der Gelelektrophorese macht man sich die Kraft zu Nutze, die ein elektrisches Feld auf geladene Teilchen ausübt und die abhängig ist von der Gesamtladung des Teilchens und der Stärke des elektrischen Feldes. Die einwirkende Kraft führt zur Wanderung des Teilchens, dessen Mobilität bei gegebener Ladung und Feldstärke von seiner Größe, Form und der Durchlässigkeit der Matrix bestimmt wird, da Reibung der Mobilität entgegenwirkt. Aufgrund unterschiedlicher Mobilität können Teilchen mit Hilfe der

Gelelektrophorese voneinander getrennt werden. Die Laufgeschwindigkeit von RNA- und DNA-Fragmenten in einem Spannungsfeld ist proportional zu deren Größe. Der Anteil an Agarose in einem Gel richtet sich nach der zu erwartenden Fragmentgröße. Je kleiner ein Fragment ist, desto höher sollte die Agarosekonzentration sein. Die Elektrophorese erfolgt unter denaturierenden Bedingungen mit einem formaldehydhaltigen Agarosegel, um die RNA an der Ausbildung von Sekundärstrukturen zu hindern, die sich nachteilig auf die Auftrennung auswirken würden (Lehrach et al., 1977).

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA diente ein 1,5%iges denaturierendes Agarosegel, zu dessen Herstellung 3 g Agarose in 144,5 ml DEPC-Wasser und 20 ml $10 \times$ MOPS durch Erhitzen schlierenfrei gelöst, daraufhin 35 ml Formaldehyd-Lösung hinzugefügt wurden und das flüssige Agarosegemisch in einen Gelträger gegossen wurde. Die Aushärtungszeit betrug bei Raumtemperatur 1 h. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurden den mRNA-Proben 6 μ l Farbstoffpuffer hinzugegeben, welcher diese beschwerte und in den Gelkammern hielt. Aufgrund der blauen Farbe des Puffers konnte das Stadium der Auftrennung beurteilt werden. Der Zyklus der Gelelektrophorese setzte sich zusammen aus 130 Volt für 1 h, gefolgt von 100 Volt für 2 h. Nach 1 h wurde begonnen, halbstündig den Gelträger in der horizontalen Kammer um 180° zu wenden, um die gleichmäßige Verteilung der Ionen in dem Laufpuffer zu gewährleisten. 140 ml $10 \times$ MOPS und 1 l DEPC-Wasser wurden als Laufpuffer verwendet. Das Gel äquilibrierte im Anschluss an die Auftrennung 25 min in $200 \text{ ml } 20 \times$ SSC auf einem Horizontalschüttler. Eine positiv geladene Nylonmembran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls 25 min in $20 \times$ SSC geschwenkt, nachdem diese 2 min gewässert worden war. Die Apparatur für den Blot über Nacht bestand aus einer mit $20 \times$ SSC gefüllten Glasschale, in die ein Glasblock gestellt und mit Chromatographiepapier bedeckt wurde. Das Chromatographiepapier war in $20 \times$ SSC getränkt und stand mit beiden Enden mit dem $20 \times$ SSC in der Glasschale in Verbindung. Das abgekühlte Gel wurde mit der Rückseite nach unten auf dem Chromatographiepapier zentral positioniert. Auf das Gel wurden die äquilibrierte Nylonmembran, vier Schichten Chromatographiepapier und 5 cm hoch Saugpapier gelegt und die Apparatur zusätzlich mit 1 kg beschwert. Zwischen dem Chromatographiepapier, dem Gel und der Nylonmembran wurden die Luftblasen entfernt. Um einen „Kurzschluss-Kontakt“ zwischen den ober- und unterhalb des Gels

befindlichen Papieren zu vermeiden, wurden die Gelränder ca. 1 cm breit mit Parafilm ausgelegt. Nach 24 h bei Raumtemperatur zeigte sich das Saugpapier mindestens 3 cm hoch mit $20 \times$ SSC durchzogen. Dieses wurde zusammen mit dem Chromatographiepapier entfernt und die Nylonmembran in 100 ml $2 \times$ SSC 1 min geschwenkt. Die RNA wurde anschließend auf der Nylonmembran mit Hilfe des UV-Crosslinkers bei 1.200 Joule fixiert. Um die RNA anzufärben, wurde die Nylonmembran zuerst 15 min in 100 ml 5%iger Essigsäure, dann 5 min in Methylenblau-Lösung geschwenkt und zuletzt zweimal 3 min mit DEPC-Wasser gewaschen. Die Anfärbung ermöglichte die Beurteilung der RNA vor der Hybridisierung mit radioaktiven cDNA-Sonden. Zur Photodokumentation wurde die Membran des Northern Blots mit Hilfe eines kommerziellen Kopiergerätes abgelichtet. Die Nylonmembran wurde getrocknet und in einem Hybridisierungsbeutel lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.7 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

Synthese von OPG- und RANKL-cDNA-Sonden: Als Sonde diente eine OPG-cDNA, die durch RT-PCR aus einer humanen Gesamt-cDNA (1.356 bp) von humanen primären Osteoblasten mit den Primerpaaren (sense: 5' ACCTTGAATTCAGTATATATAACGTGATGAGCG 3' und anti-sense: 5' ACCTTGAATTCATTATCATCCATGGGATCTCGC 3') unter Verwendung einer *EcoRI*-Schnittstelle amplifiziert und in den pGEM-T easy-Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert wurde. Ein 4,4 kbp pGEM-OPG Expressionsvektor wurde hergestellt, mit anschließender Amplifikation in *Escherichia coli* JM 109 und Präparation der Plasmide. Das pGEM-OPG wurde von *EcoRI* verdaut, bevor die OPG-cDNA-Sonde unter Verwendung des Wizard DNA purification Kit von Promega (Madison, USA) aufgereinigt wurde (Hofbauer et al., 1998). Diese OPG-cDNA wies drei OPG-mRNA-Formen (2,9 kb, 4,2 kb und 6,5 kb) nach. Die humane RANKL-cDNA wurde von Dr. David Lacey (Amgen, Thousand Oaks, USA) zur Verfügung gestellt und wies eine mRNA von 2,4 kb nach (Lacey et al., 1998), während das Housekeeping-Gen β -Aktin von Clontech (Palo Alto, USA) eine mRNA von 2,0 kb nachwies.

Radioaktive Markierung der cDNA-Sonde: Die radioaktive Markierung der cDNA erfolgte mit Hilfe des DECAprime II DNA Labelling Kit der Firma Ambion (Austin, USA). Doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge denaturiert, an die die "Decamer Primer" binden. Diese Primer-DNA-Komplexe dienen einer DNA-Polymerase I

(Klenow) mit fehlender 5'→3'-Aktivität als Initiationsstelle für die Synthese komplementärer DNA-Stränge, bei der das radioaktive Nukleotid [α -³²P]-dCTP eingebaut wird (Feinberg & Vogelstein, 1983; Kleppe et al., 1971). Die cDNA-Sonde ermöglicht in der Hybridisierung der Northern Blots die Detektierung spezifischer RNA-Sequenzen.

Ein Gemisch aus 10 μ l Nuklease freiem Wasser, 1 μ l cDNA und 2,5 μ l 10 \times Decamer wurde zentrifugiert, für 5 min bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dem Reaktionsansatz wurden 5 μ l 5 \times Puffer-dCTP zugefügt. Bis zu diesem Schritt wurde die Synthese im Labor durchgeführt, die Weiterführung erfolgte in einem speziell für die Arbeit mit [α -³²P]-Nukleotiden ausgestatteten Raum. 5 μ l [α -³²P] als dCTP und 1,5 μ l Klenow-Enzym wurden mit der Sonde vermischt und 60 bis 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reinigungssäulen für radioaktive Sonden wurden verwendet, um nicht inkorporierte Nukleotide von radioaktiv markierter cDNA zu trennen. Diese Reinigungssäulen beruhen auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Freie Nukleotide werden an ein Austauschharz gebunden, während DNA mit einer Länge von 17 bp bis 50 kbp dieses Harz unverändert passiert. Die Säulen wurden mit 70 μ l 1 \times STE Puffer äquilibriert, der unter zur Hilfenahme einer luftgefüllten 10 ml Spritze durch die Säule gedrückt wurde, bis er sich in Form eines kleinen Tropfens an deren unteren Ende zeigte. Innerhalb der folgenden 5 bis 10 min wurde dann die radioaktive Probe auf die Säule gegeben und mit einer 10 ml Spritze durchgedrückt. Um die Person während der Verwendung der Säulen vor radioaktiver Strahlung zu schützen, wurde mit einer Strahlenschutzvorrichtung aus Plexiglas gearbeitet. Es folgte ein weiterer Durchgang mit 70 μ l 1 \times STE Puffer und zweimaligem Aufdrehen der Spritze auf die Säule sowie langsamem Durchdrücken der Probe. Diese wurde bei -20°C in einem Isolationsgefäß für Radioaktivität aufbewahrt.

3.2.8 Hybridisierung von Northern Blots

Die Hybridisierung eines Northern Blot stellt ein sensitives Verfahren zum Nachweis geleelektrophoretisch aufgetrennter RNA dar. Dabei wird die zu untersuchende RNA durch die Zugabe von radioaktiver, komplementärer cDNA lokalisiert und durch Autoradiographie nachgewiesen (Alwine et al., 1977; Bonner, 1987; Meinkoth & Wahl, 1984; Thomas, 1980).

Der Hybridisierungssofen wurde auf 68°C vortemperiert. Die Nylonmembran wurde mit 10 ml Hybridisierungslösung in einer Hybridisierungsflasche 30 min bei 68°C im Ofen inkubiert, während durch kontinuierliche Rotation die gleichmäßige Benetzung der Membran gewährleistet wurde. Die radioaktive cDNA-Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach 30 min wurde die Hybridisierungslösung aus den Flaschen abgenommen und erneut 10 ml eingefüllt, die 10 µl der radioaktiven cDNA-Sonde enthielten. Dieses wurde 60 min wiederum bei 68°C und unter permanenter Rotation mit der Nylonmembran inkubiert. Die Entfernung der nicht hybridisierten cDNA-Sonde von der Nylonmembran erfolgte in drei Waschgängen. Die Membran wurde bei Raumtemperatur zweimal 10 min in jeweils 500 ml der Waschlösung 1 ($2 \times \text{SSC}$; 0,05% SDS, Sodium dodecylsulphate) auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. In dieser Zeit wurden die Hybridisierungsflaschen mit DEPC-Wasser ausgespült. Daraufhin wurde die Membran in den Hybridisierungsflaschen mit auf 50°C vortemperierter Waschlösung 2 ($0,1 \times \text{SSC}$; 0,1% SDS) im Ofen bei 50°C für 40 min gewaschen. Die Nylonmembran wurde kurz zwischen Chromatographiepapier getrocknet und in einem Hybridisierungsbeutel platziert. Dieser verhinderte das Austrocknen der Nylonmembran, das Verkleben von Röntgenfilm und Membran sowie eine radioaktive Kontaminierung der Kassette. Der Hybridisierungsbeutel wurde nach der Entfernung überflüssiger Luft verschweißt. In der Dunkelkammer wurde auf die Membran in einer Kassette mit zwei Verstärkerfolien ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser wurde über Nacht bei -80°C exponiert. Die Standardexpositionszeiten lagen abhängig von der Filmschwärzung für eine OPG-Hybridisierung bei vier Tagen bis zu einer Woche und bei einer Hybridisierung mit dem Housekeeping-Gen β -Aktin bei 1 h bis zu 4 h.

Housekeeping-Gene kodieren Struktur- und Funktionsproteine von Zellen und werden weitgehend unabhängig von einer exogenen Stimulation der Zellen in konstanter Höhe transkribiert. Sie können daher zur Quantifizierung der auf die Nylonmembran durch einen Northern Blot aufbrachten RNA verwendet werden. Die Quantifizierung spielt eine große Rolle bei der Analyse von stimulierenden oder hemmenden Effekten von Stimulanzien auf die Expression bestimmter Proteine.

Vor einer erneuten Hybridisierung wurde die radioaktive cDNA-Sonde von dem Northern Blot entfernt, indem dieser 10 min in einer 90°C heißen Lösung aus 500 ml

DEPC-Wasser und 12,5 ml 20% SDS geschwenkt wurde. Daraufhin wurde der Blot für weitere 10 min bei Raumtemperatur unter Horizontalschütteln in der Lösung belassen. Bis zur erneuten Hybridisierung wurde die Membran in einem Hybridisierungsbeutel bei 4°C gelagert.

3.2.9 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurde mittels des Enzyms reverse Transkriptase RNA in DNA umgeschrieben. Oligo-dT wurde hierbei als Primer eingesetzt. Mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kit von Qiagen (Hilden) wurde die RNA aus den Zellen isoliert, wie bereits im Kapitel 3.2.3 beschrieben. 2 µg RNA wurden mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 27 µl gebracht und 2 µl Oligo-dT hinzugefügt. Dieser Reaktionsansatz wurde 5 bis 10 min bei 70°C inkubiert, bevor er wieder auf Eis gestellt wurde. Die Erwärmung auf 70°C diente der Lösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA und der Anlagerung der Oligo-dT Primer an die Poly-A-Region der mRNA. RNA, Oligo-dT, 8 µl 5 × First strand-Puffer, 2 µl dNTP (10 mM) und 1 µl DTT wurden auf 42°C erwärmt, bevor mit der Zugabe von 2 µl Superscript die reverse Transkription gestartet wurde. Es wurde ein Zyklus wie folgt durchgeführt: 50 min bei 42°C und 15 min bei 72°C. Das reverse Transkriptat wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.2.10 Amplifizierung von cDNA mittels PCR

Dieses *in vitro* Verfahren wird zur selektiven Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen aus einer Vielzahl von Nukleinsäuren verwendet. Man nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zu einem Doppelstrang ergänzen zu können, wenn ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich zur Verfügung steht (Frohman et al., 1988). Der PCR dienten 2 µl des RT-Produktes als Template. Die folgenden sense und anti-sense Primersequenzen wurden verwendet:

für OPG	sense:	5' GAACCCAGAGCGAAATACA 3'
	anti-sense:	5' CGCTGTTTTACAGAGGTCA 3'
für GAPDH	sense:	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'
	anti-sense:	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

Mittels PCR wurden 2 µl cDNA amplifiziert in 19,05 µl destilliertem Wasser, 2,5 µl 10 × PCR-Puffer, 0,25 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl sense Primer, 0,5 µl anti-sense Primer und 0,2 µl Taq-Polymerase. Die PCR-Reaktion mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl wurde mit einem linearen Amplifikationsprofil durchgeführt, welches für OPG und für das Housekeeping-Gen GAPDH aus 2 min bei 94°C, 28 Zyklen [aus 30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C, 30 s bei 72°C] und 7 min bei 72°C bestand. Da der verwendete Thermocycler einen heizbaren Deckel besaß, der das Verdunsten des Ansatzes verhinderte, konnte auf eine Überschichtung der Ansätze mit Mineralöl verzichtet werden. Um eine Elongation der Primer unter unspezifischen Bedingungen vor Reaktionsbeginn zu erschweren, wurden die Reaktionsansätze auf Eis pipettiert. Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Proben bei 4°C gekühlt.

Die PCR-Produkte (12 µl OPG-Produkt, 6 µl GAPDH-Produkt und 4 µl 6 × Farbstoffpuffer für DNA-Gele von Fermentas, St. Leon-Rot) wurden mittels Elektrophorese in 1%igen und 2%igen Agarosegelen analysiert und unter UV-Licht photographiert, nachdem sie mit Ethidiumbromid gefärbt worden waren. Ethidiumbromid bindet an DNA und macht diese durch Fluoreszenz in UV-Licht sichtbar. Zur Herstellung der 1%igen und 2%igen Agarosegele wurden 2 g bzw. 4 g Agarose in 200 ml 0,5 × TBE durch Erhitzen gelöst und 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt. Als Laufpuffer wurde 0,5 × TBE eingesetzt und die Laufzeit betrug 1,5 h bei 120 Volt. Das Housekeeping-Gen GAPDH wurde als Standard verwendet, um die aufgetragene cDNA zu quantifizieren. Die Bedeutung von Housekeeping-Genen wurde bereits im Kapitel 3.2.8 erläutert. 5 µl des 100 bp DNA Ladder Plus der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) – gelelektrophoretisch aufgetrennt – ermöglichten die Größenbestimmung der PCR-Fragmente in Basenpaaren.

3.2.11 OPG-Proteinanalyse

Bei der Proteinanalyse von OPG in Zellkulturmedien wurde der von der Firma Immundiagnostik (Bensheim) entwickelte ELISA für OPG eingesetzt. Der ELISA beruht auf dem Prinzip der Sandwich-Technik. Hierzu wird ein Antikörper (Bindeantikörper), der gegen die zu testende Substanz gerichtet ist, an eine feste Phase – in diesem Fall eine Kunststoffoberfläche – gekoppelt. An diesen Antikörper bindet das zu quantifizierende Molekül aus der Probe. Ein zweiter biotinylierter Antikörper (Detektionsantikörper) lagert sich an spezifische Determinanten der analysierten

Substanz an und komplementiert somit das Sandwich. Nach einem Waschgang, der nicht spezifisch gebundenes Material entfernt, werden über ein Streptavidin-Peroxidase/TMB-System die Moleküle quantifiziert. Nach der Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb, wobei die Farbentwicklung zur nachgewiesenen Analysatmenge proportional ist. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden können.

Der OPG-ELISA der Firma Immundiagnostik besitzt eine Nachweisgrenze für OPG von 0,14 pmol/l und der Inter-Assay Variationskoeffizient beträgt $\leq 10\%$ bei $n=16$. Zur Erstellung der Standard-Verdünnungsreihe wurde die OPG-Stocklösung (500 pmol/l und 10 ng/ml) 1 zu 20 mit Assaypuffer verdünnt. Dieser Ansatz wurde als Standard mit der höchsten Konzentration (S1) verwendet und diente als Ausgangslösung einer Verdünnungsreihe mit 1 zu 2 Verdünnungsschritten mit Assaypuffer (S2 bis S5). Als Standard 0 pmol/ml wurde Assaypuffer eingesetzt. Das Zellkulturmedium der Zelllinie PaTu 8988t wurde verdünnt (1 zu 10 bis 1 zu 50), wobei das Medium der PaTu 8988s-, PC-2- und Capan-2-Zellen unverdünnt als Probe aufgetragen wurde. Die Mikrotiterplatte wurde mit 100 μ l Assaypuffer in jeder Vertiefung vorbereitet und 50 μ l des Standards in Doppelwerten und 50 μ l der Proben in Dreifachwerten pipettiert. Nach der Zugabe von 50 μ l des zweiten Antikörpers (anti-OPG, biotinyliert) wurde die Mikrotiterplatte 18 bis 24 h bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag konnte der Inhalt der Platte verworfen werden und die Vertiefungen wurden fünfmal mit jeweils 300 μ l des Waschpuffers gespült, der als Konzentrat vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1 zu 10 vorverdünnt worden war. Nach dem letzten Waschgang musste die Mikrotiterplatte auf Saugpapier ausgeschlagen werden, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen und den folgenden Reaktionsschritten ein optimales Milieu zu bereiten. Die Vertiefungen wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit 200 μ l Konjugat (Streptavidin-Peroxidase markiert) versetzt, anschließend erneut fünfmal mit 300 μ l Waschpuffer gespült und nach dem letzten Waschgang ausgeschlagen. 200 μ l TMB-Substratlösung (Tetramethylbenzidin) lösten die Quantifizierungsreaktion aus. Entsprechend der blauen Farbdifferenzierung wurde die Reaktion nach 15 bis 25 min durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung unterbrochen (Farbumschlag von blau nach gelb). Die Extinktion wurde nach kurzem Schütteln im Mikrotiterplattenphotometer bei $\lambda=450$ nm gegen eine Referenzwellenlänge $\lambda=690$ nm gemessen.

Statistische Analyse: Die numerischen Werte der OPG-Proteinmessungen wurden als Mittelwerte \pm SAW von Dreifachbestimmungen angegeben. Zeitkinetiken und Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Varianzanalyse für Vielfachmessungen (ANOVA) analysiert. In allen statistischen Verfahren wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Die Proben wurden in dreifacher Bestimmung analysiert, um den Fehler bei der Messung möglichst gering zu halten. Zur Auswertung der Ergebnisse gehörte ebenfalls das in Bezug setzen der Messwerte zum A_{260} -Wert. 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 bestimmt (Kapitel 3.2.5). Aus der Absorption konnte die Menge an eluierter RNA berechnet werden, welche wiederum Rückschlüsse auf die Zellzahl der einzelnen Löcher einer Zellkulturplatte zuließ. Es bestand eine direkte Korrelation zwischen der gemessenen Proteinkonzentration und der Anzahl OPG sezernierender Zellen. Die 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. Dadurch konnten unterschiedliche Zellzahlen als Fehlerquelle in der vergleichenden Analyse von Proteinkonzentrationen ausgeschlossen werden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der OPG-Produktion im Pankreasgewebe

4.1.1 OPG-Produktion im Pankreasgesamtgewebe

Ein kommerzieller Poly-A-mRNA Northern Blot der Firma Clontech (Palo Alto, USA) wurde zur Analyse der Expression von OPG-mRNA in verschiedenen humanen endokrinen und gastrointestinalen Geweben verwendet. Dabei zeigte sich, dass das Pankreas neben der Schilddrüse und der Nebenniere zu den Produzenten von OPG-mRNA zählte und das Pankreas unter allen untersuchten gastrointestinalen Geweben (Dünndarm, Magen) die höchsten OPG-mRNA-Spiegel aufwies (Abb. 4.1). Im Pankreasgewebe konnte OPG-mRNA der Länge 2,9 kb nachgewiesen werden. Dieses entsprach der exprimierten mRNA-Länge in Nebenniere, Hoden, Thymus, Dünndarm und Magen. Das Schilddrüsengewebe hingegen zeigte 3 OPG-mRNA-Spezies von 2,9, 4,4 und 6,6 kb Länge (Abb. 4.1). Die gleichmäßigen Signalintensitäten der β -Aktin-Banden nach der Hybridisierung bestätigten, dass gleiche RNA-Mengen aufgetragen und analysiert worden waren (Abb. 4.1).

Mit Hilfe eines kommerziellen Northern-Dot-Blot der Firma Clontech (Palo Alto, USA) konnte die Expression von OPG-mRNA durch das Pankreas bestätigt werden. Auf der Nylonmembran waren zwischen 53 und 780 ng Poly-A-mRNA verschiedener humaner Gewebe in Form von 1 mm großen Punkten aufgetragen worden. Im Auftragungsfeld des Pankreasgewebes zeigte sich nach Hybridisierung mit einer radioaktiven OPG-cDNA-Sonde ein schwaches Signal. Das aortale Gewebe und das der Schilddrüse demonstrierten unter den untersuchten Geweben die höchste OPG-Produktion. Die Niere, das Rückenmark, die fetale Niere und die fetale Leber gehörten zu den Organen mit starker OPG-mRNA-Expression. Mit dem Pankreas vergleichbare Signalintensitäten und dementsprechende OPG-Spiegel zeigten die folgenden Gewebe: Leber, Magen, Milz, Herz, Trachea, Lunge, Thymus, Lymphknoten, Plazenta und Prostata. Im Gegensatz zur Analyse des kommerziellen Northern Blot (Abb. 4.1) konnte mit Hilfe des kommerziellen Northern-Dot-Blot im Dünndarm und im Hoden keine OPG-mRNA nachgewiesen werden. Im Pankreasgewebe gelang ebenfalls der Nachweis von RANKL-Poly-A-mRNA. Im Lymphknoten zeigten sich die höchsten RANKL-Spiegel, schwächere im Wurmfortsatz und in der fetalen Leber. Vergleichbare Signalintensitäten

mit der des Pankreasgewebes wiesen Leber-, Dünndarm-, Schilddrüsen-, Hoden- und Thymusgewebe auf. Die Kontrollhybridisierung mit Ubiquitin bestätigte die gleichmäßige Auftragung der Poly-A-mRNA auf dem Northern-Dot-Blot und erlaubte die vergleichende Analyse. (Ergebnisse nicht dargestellt)

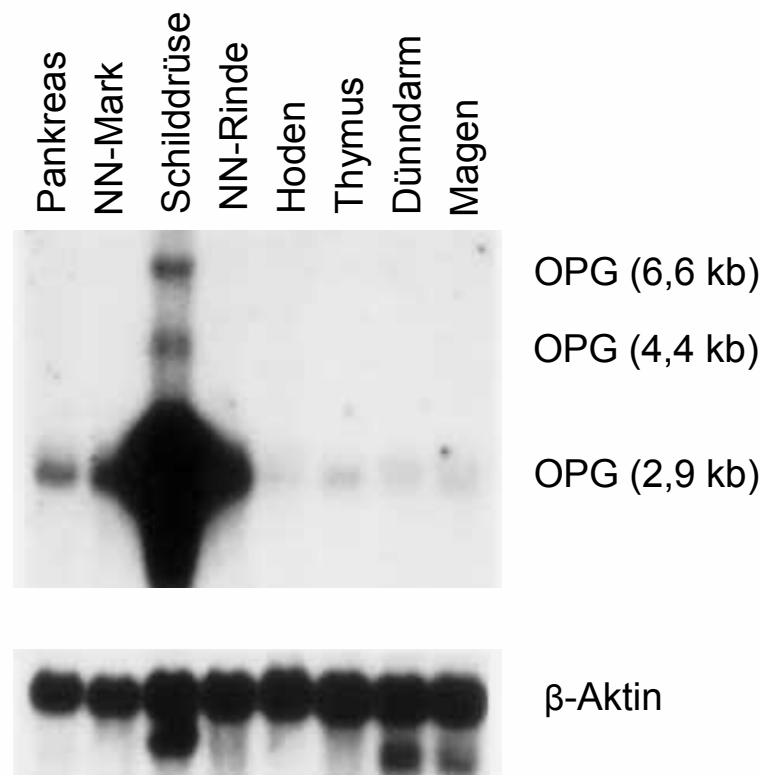


Abb. 4.1 OPG-Produktion im Pankreasgesamtgewebe

Der kommerzielle Poly-A-mRNA Northern Blot zeigt die OPG-mRNA-Expression in verschiedenen humanen endokrinen und gastrointestinalen Geweben. OPG-Poly-A-mRNA (2,9 kb, 4,4 kb, 6,6 kb) und β -Aktin-Poly-A-mRNA (2,0 kb). Das Gewebe der Nebenniere (NN) wurde differenziert in Mark (NN-Mark) und Rinde (NN-Rinde). Die Poly-A-mRNA-Mengen der verschiedenen Gewebe waren justiert, so dass die Signale der β -Aktin-Hybridisierung vergleichbare Intensitäten aufwiesen. Es waren durchschnittlich 2 μ g Poly-A-mRNA aufgetragen worden.

Da die analysierte Poly-A-mRNA aus dem Gesamtgewebe des Pankreas isoliert worden war und somit endokrine und exokrine Zellpopulationen enthielt, wurde im Folgenden anhand verschiedener endokriner (INS-1) und exokriner Zelllinien (PaTu 8988t, PaTu 8988s, PC-2, Capan-2) untersucht, welchen Ursprungs die im Pankreasgesamtgewebe nachgewiesenen OPG- und RANKL-mRNA-Spiegel waren.

4.1.2 OPG-Produktion in endokrinen Zellen des Pankreas

Das endokrine Pankreas besteht aus etwa einer Millionen Langerhans-Inseln, die bis zu 5.000 hormonproduzierende Zellen enthalten. Bei Erwachsenen umfassen die Langerhans-Inseln 2 bis 3% des Pankreasvolumens.

Zur Analyse der OPG-Produktion in endokrinem Pankreasgewebe diente die Zelllinie INS-1. Diese stammte aus Zellen, die aus einem durch Röntgenstrahlung induzierten Ratteninsulinom isoliert worden waren. INS-1-Zellen zeigten typische morphologische Charakteristika der β -Zellen der Langerhans-Inseln und einen hohen Grad an Differenzierung. Aufgrund dessen stellten sie ein geeignetes Modell für Untersuchungen des OPG-Systems an endokrinen Zellen des Pankreas dar. Insulin wurde von INS-1-Zellen synthetisiert und gespeichert, während die drei anderen wichtigen Hormone der Inselzellen – Glukagon, Somatostatin und pankreatisches Polypeptid – nicht nachgewiesen werden konnten (Asfari et al., 1992).

Die endokrine INS-1-Zelllinie exprimierte keine im Northern Blot nachweisbaren OPG-mRNA-Spiegel. Die Zytokine IL-1 β und TNF- α , denen in Schilddrüsengewebe eine stimulierende Wirkung in Bezug auf OPG nachgewiesen werden konnte (Hofbauer et al., 2002a), zeigten keinen Effekt auf die OPG-Produktion im Vergleich zur Kontrolle mit BSA in PBS. Dexamethason, Thalidomid und Lovastatin bewirkten ebenfalls keine nachweisbaren OPG-mRNA-Spiegel. (Ergebnisse nicht dargestellt)

4.1.3 OPG-Produktion in exokrinen Pankreaskarzinomzellen

Die basale OPG-Produktion der humanen Adenokarzinomzelllinien PaTu 8988t, PaTu 8988s, PC-2 und Capan-2 wurde mittels RT-PCR auf cDNA-Ebene, im Northern Blot auf mRNA-Ebene und per ELISA auf Proteinebene analysiert. Für diese Untersuchungen wurden die mRNA und das Medium aus Zellkulturbedingungen ausgewertet.

Die RT-PCR ermöglichte den Nachweis von OPG auf cDNA-Ebene bei den Zelllinien PaTu 8988t und PC-2, wobei eine unterschiedlich hohe OPG-Expression zu erkennen war. PaTu 8988t-Zellen demonstrierten drei- bis vierfach höhere OPG-Konzentrationen als PC-2-Zellen, bei geringfügig schwächeren GAPDH-Kontrollbanden von PC-2.

PaTu 8988s und Capan-2 zeigten keine Produktion von OPG (Abb. 4.2). Das Housekeeping-Gen GAPDH diente der Quantifizierung der cDNA. Die GAPDH-Banden von PaTu 8988t, PaTu 8988s, Capan-2 und MG-63 stellten sich mit gleichmäßiger Intensität dar (Abb. 4.2). Das OPG- und GAPDH-PCR-Produkt wurden gemeinsam in einer Geltasche auf das Agarosegel aufgetragen, um den direkten Vergleich von OPG-Expression und aufgetragener cDNA-Menge zu ermöglichen. Zum Ausschluss einer Überlagerung der OPG- und der GAPDH-Bande wurden die PCR-Produkte der MG-63-Zellen getrennt voneinander in zwei nebeneinander liegenden Geltaschen aufgetragen. Die Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t zeigten in Bezug auf die Expression von OPG vergleichbare Konzentrationen zur Kontrolle mit den Osteosarkomzellen MG-63. Die OPG-Banden stellten sich bei 300 bp und GAPDH bei 450 bp dar (Abb. 4.2).

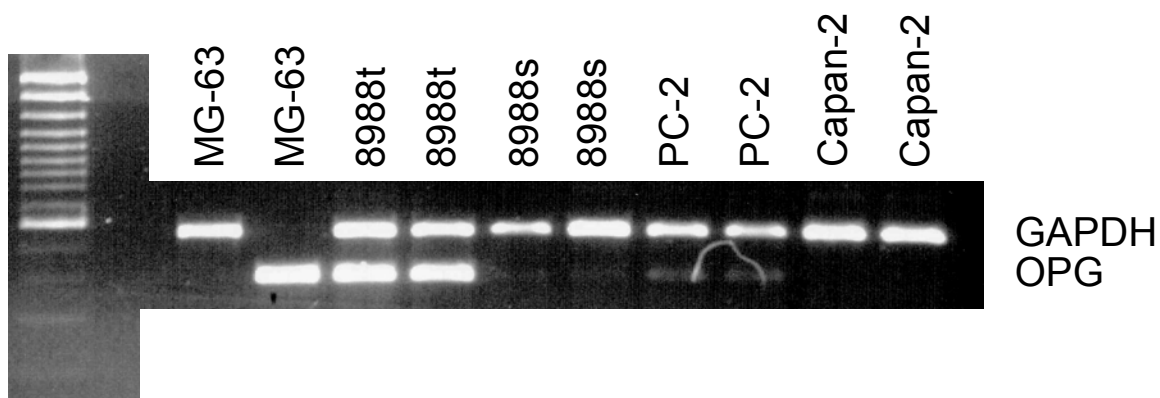


Abb. 4.2 PCR zur basalen OPG-Produktion in Pankreaskarzinomzelllinien
Die RNA wurde aus den unbehandelten Zelllinien PaTu 8988t (8988t), PaTu 8988s (8988s), PC-2, Capan-2 und MG-63 isoliert, in cDNA transkribiert und mittels PCR amplifiziert. In einem 2%igen Agarosegel stellten sich OPG (300 bp) und das Housekeeping-Gen GAPDH (450 bp) dar. Zum Ausschluss einer Überlagerung wurden bei der Kontrolle mit MG-63-Zellen das OPG- und das GAPDH-PCR-Produkt einzeln aufgetragen. Der Längenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus ermöglicht die Größenbestimmung der Banden. Die erste signalintensive Bande von unten entspricht 500 bp.

Im Northern Blot zeigte sich bei den PaTu 8988t-Zellen nach der Hybridisierung mit einer radioaktiven OPG-cDNA-Sonde und Autoradiographie für eine Woche ein Signal. Im Vergleich zur Kontrolle mit den Osteosarkomzellen MG-63 stellten sich die Banden von PaTu 8988t mit ungefähr halber Signalintensität – bei vierfach größerer RNA-Menge – dar. Auf die Nylonmembran waren 12 µg Gesamt-RNA von PaTu 8988t und

3 μg von MG-63 aufgetragen worden (Abb. 4.3). Die Kontrollhybridisierung mit β -Aktin verdeutlichte die Auftragsverhältnisse. Dagegen konnte bei PC-2-Zellen sowie bei PaTu 8988s- und Capan-2-Zellen mit Hilfe des Northern Blots keine OPG-mRNA dargestellt werden (Abb. 4.3).

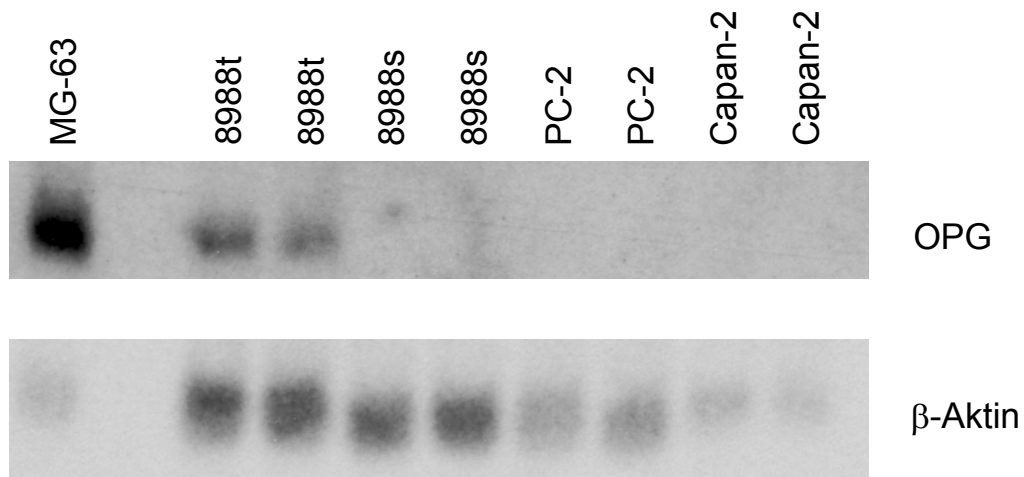


Abb. 4.3 OPG-mRNA-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien

Die Northern Blot-Analyse ergab die Expression von OPG-mRNA (2,9 kb) und β -Aktin-mRNA (2,0 kb). $2 \times 12 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA der Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t (8988t) und PaTu 8988s (8988s) wurden aufgetragen. Von der Zelllinie PC-2 standen $2 \times 5 \mu\text{g}$ und von Capan-2 $2 \times 3 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA zur Verfügung. Die Filme wurden 1 Woche (OPG) und 3 h (β -Aktin) exponiert. MG-63 diente als OPG-Kontrolle ($3 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA). Die Zellen waren unbehandelt.

Diese in der RT-PCR und im Northern Blot erhobenen Befunde konnten auf Proteinebene mittels eines ELISA bestätigt werden. Die OPG-Proteinsekretion von PaTu 8988t-Zellen betrug 250 bis 300 pmol/l, die der PC-2-Zellen 5 pmol/l (Abb. 4.4). Dieses ließ, wie bereits auf Genexpressionsebene beschrieben (Abb. 4.2), erneut eine erhebliche Variabilität der OPG-Produktion verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien erkennen (Abb. 4.4). Die Zelllinien PaTu 8988s und Capan-2 zeigten keine nachweisbare OPG-Proteinsekretion (Abb. 4.4). Dieses Ergebnis komplementierte die Untersuchungen auf cDNA- und mRNA-Ebene.

Die Osteosarkomzelllinie MG-63 diente bei allen Untersuchungen als Positivkontrolle für OPG (Hofbauer et al., 1999).

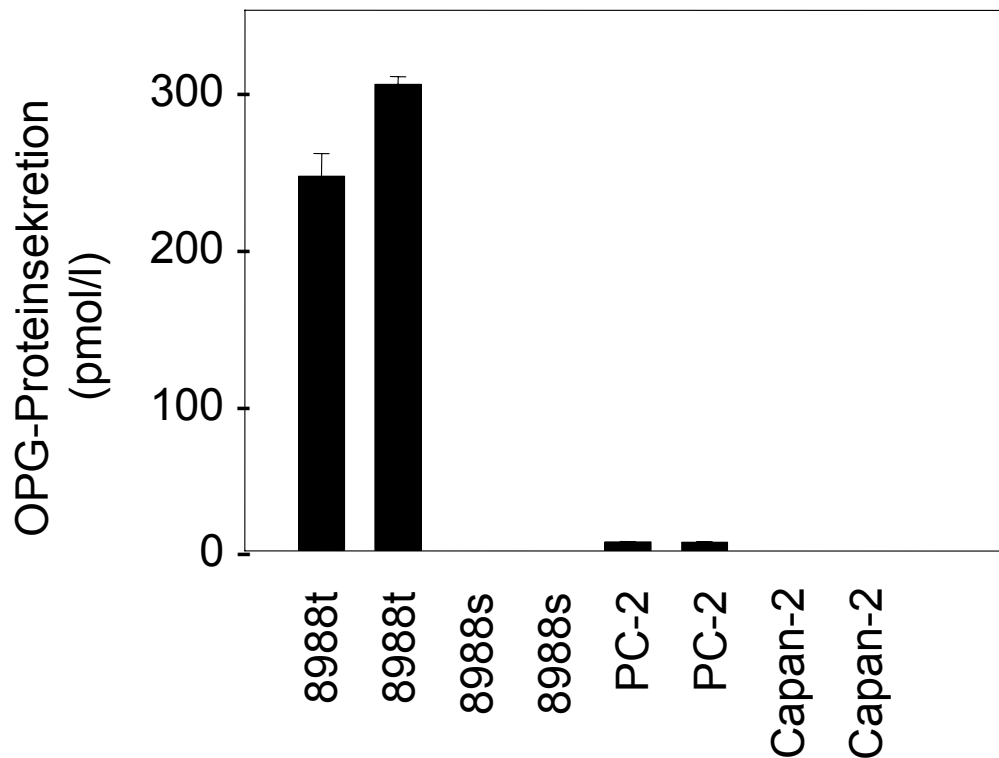


Abb. 4.4 OPG-Proteinsekretion in Pankreaskarzinomzelllinien

Die basale OPG-Proteinsekretion der humanen Pankreasadenokarzinomzellen PaTu 8988t (8988t), PaTu 8988s (8988s), PC-2 und Capan-2 wurde mittels ELISA gemessen. Mittelwerte der Dreifachbestimmungen in pmol/l: PaTu 8988t $242,5 \pm 14,7$ und $301,9 \pm 4,9$; PC-2 $5,7 \pm 0,3$ und $5,4 \pm 0,4$. In PaTu 8988s und Capan-2 konnte keine OPG-Proteinsekretion nachgewiesen werden.

4.2 Regulation der OPG-Produktion in Pankreaskarzinomzellen

Die weiterführenden Untersuchungen zur Regulation der OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion durch Zytokine, Hormone und Medikamente wurden aufgrund der Befunde zur basalen OPG-Produktion anhand der PaTu 8988t-Zellen und teilweise der Zelllinie PC-2 durchgeführt. Bei der Analyse der OPG-mRNA-Spiegel wurden der Northern Blot und zur Beurteilung der OPG-Proteinsekretion der ELISA eingesetzt. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mittels des Housekeeping-Gens β -Aktin. Die Osteosarkomzelllinie MG-63 diente bei allen Untersuchungen als Positivkontrolle (Hofbauer et al., 1999).

4.2.1 Regulation von OPG durch Steroidhormone

Das Pankreas wird primär nicht als Zielorgan von Sexualhormonen angesehen. Es gibt allerdings Erkenntnisse, aufgrund derer es notwendig erscheint, Sexualhormone auch in Bezug auf das Adenokarzinom des Pankreas in Untersuchungen einzuschließen. Zu diesen Erkenntnissen zählt der sexuelle Verteilungskoeffizient von Männern und Frauen von 1,25 bis 1,75 zu 1, der sich mit steigendem Alter annähert. Im Alter von 70 Jahren findet man keinen Unterschied mehr in der Verteilung des Pankreaskarzinoms zwischen Männern und Frauen (Andrén-Sandberg et al., 1999). Greenway et al. konnten 1981 erstmals hohe Konzentrationen des Östrogenrezeptors im Zytoplasma und im Kern eines Adenokarzinoms des Pankreas mit duktalem Ursprung messen (Greenway et al., 1981). 1986 war es dann Corbishley et al. möglich, Androgenrezeptoren nachzuweisen, nachdem dieses zuvor nicht gelungen war (Corbishley et al., 1986; Greenway, 1987). Neben Androgen- und Östrogenrezeptoren konnten auch Progesteronrezeptoren identifiziert werden, d. h. die Rezeptoren bedeutender Steroidhormone wurden im Karzinomgewebe des Pankreas gefunden. Folgerichtig muss das Pankreaskarzinom, zusammen mit den Karzinomen der Brust und der Prostata, als eine hormonsensible Neoplasie angesehen werden (Greenway, 1987).

4.2.1.1 Androgene und Antiandrogene

PaTu 8988t-Zellen wurden 24 bis 48 h mit Testosteron in den Konzentrationen 10^{-11} bis 10^{-6} M inkubiert. Mit Hilfe des Northern Blots konnte auf mRNA-Ebene die Hemmung von OPG durch Testosteron ab einer Konzentration von 10^{-7} M gezeigt werden. Die OPG-Bande von Testosteron 10^{-7} M stellte sich, bei gleichmäßigen Auftragsverhältnissen von Testosteron 10^{-10} bis 10^{-7} M in der Kontrollhybridisierung mit β -Aktin, mit deutlich geringerer Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle (K) und den höheren Verdünnungen 10^{-11} bis 10^{-8} M dar. Die Kontrolle mit Äthanol und Testosteron 10^{-11} M zeigten β -Aktin-Banden mit schwächeren Signalen (Abb. 4.5). Die unbehandelten Osteosarkomzellen MG-63 wiesen eine deutlich höhere OPG-mRNA-Expression verglichen mit PaTu 8988t auf (Abb. 4.5). Diese Hemmung konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Sie umfasste hemmende Effekte auf $30,3 \pm 3,1\%$ (Testosteron 10^{-7} M) in der ersten Messung¹ ($p < 0,0001$, ANOVA) und in der Zweiten² ($p < 0,0001$, ANOVA) auf $49,2 \pm 0,7\%$ (10^{-7} M) und $23,2 \pm 3,0\%$ (10^{-6} M) der Kontrolle ($100 \pm 0,9\%$ ¹ und $\pm 6,3\%$ ²). Die Kontrollproteinkonzentrationen als Bezugsgrößen

100% für die Messergebnisse und die SAW betragen $7.814,5 \text{ pg/ml}^1$ und $3.185,3 \text{ pg/ml}^2$. (Ergebnisse nicht dargestellt)

Die Hybridisierung mit einer radioaktiven β -Aktin-cDNA-Sonde ergab nach einer Exposition von 3 h ein deutlich schwächeres Signal bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-6} M im Vergleich zur Kontrolle mit Äthanol. Die PaTu 8988t-Zellen waren über einen Zeitraum von 24 h mit Testosteron 10^{-6} M behandelt worden. Dieses Ergebnis ist nicht graphisch dargestellt. Eine zytotoxische Wirkung von Testosteron 10^{-6} M auf PaTu 8988t-Zellen könnte ursächlich sein. Die Zytotoxizität hatte sich bereits bei der Isolierung der RNA in Form von teilweise abgelösten Zellen in dem entsprechenden Loch der Zellkulturplatte angedeutet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der mRNA-Isolierung zugeführt und im Zellkulturüberstand die Proteinkonzentration gemessen.

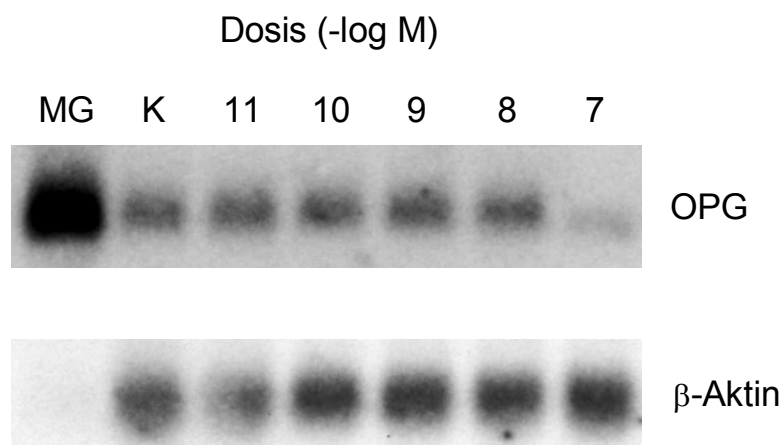


Abb. 4.5 Dosis-Wirkungs-Beziehung von Testosteron auf die OPG-mRNA-Expression

Die humanen Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t wurden über einen Zeitraum von 48 h mit Testosteron in den Konzentrationen 10^{-11} bis 10^{-7} M behandelt. OPG- (2,9 kb) und β -Aktin-mRNA (2,0 kb). EtOH diente als Lösungs- und Verdünnungssubstanz von Testosteron und wurde als Negativkontrolle eingesetzt (K). Von PaTu 8988t wurden im Northern Blot $12 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA aufgetragen. $5 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA unbehauelter MG-63-Zellen stellten eine Kontrolle für OPG dar. Die Filme wurden für 24 h (OPG) und 1 h (β -Aktin) exponiert.

Um zusätzlich zum Effekt der Testosterondosis den zeitlichen Zusammenhang zwischen Testosteron und der OPG-Produktion aufzuklären, wurden PaTu 8988t-Zellen über verschiedene Zeiträume (0 bis 48 h) mit Testosteron behandelt. In der Untersuchung zur Zeitkinetik wurde Testosteron in der Konzentration 10^{-7} M eingesetzt, da diese im

Dosis-Wirkungs-Versuch die ersten hemmenden Effekte hervorgerufen hatte (Abb. 4.5). Im Northern Blot deutete sich eine Hemmung der OPG-mRNA-Expression bei der Stimulation mit Testosteron über einen Zeitraum von mindestens 12 h an. Die OPG-Banden wiesen bei 12 h und viel deutlicher bei 48 h eine schwächere Signalintensität auf als die Kontrolle 0 h sowie 2 und 6 h (Abb. 4.6). Die Proteinspiegel verhielten sich im OPG-ELISA ähnlich. Nach 12 h zeigte sich eine Hemmung auf $69,4 \pm 6,1\%$ der Kontrolle ($100 \pm 0,7\%$), die nach 24 h bis auf $30,9 \pm 0,8\%$ ($p < 0,0001$, ANOVA) zunahm. Diese Tendenz setzte sich nach 48 h nicht fort. Die OPG-Proteinspiegel stiegen erneut auf $79,4 \pm 7,2\%$ der Kontrolle an. Die Messwerte und die SAW bezogen sich auf die Kontrollproteinkonzentration 100%, die 221,3 pmol/l betrug. Dieses Ergebnis ist nicht dargestellt.

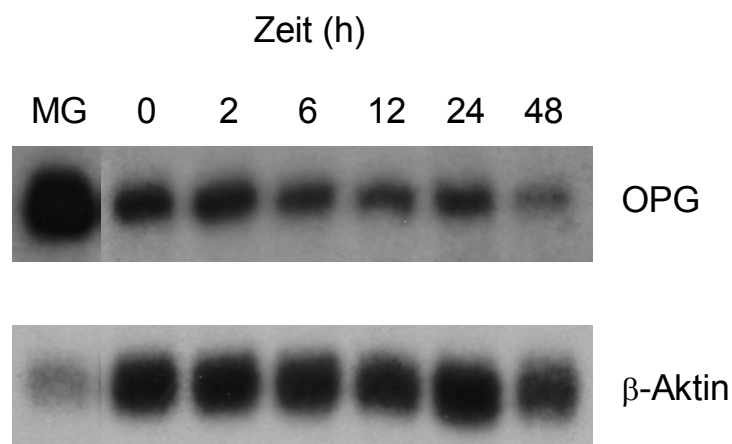


Abb. 4.6 Zeitkinetik der OPG-mRNA-Expression nach Testosteronexposition
 Der zeitkinetische Effekt von Testosteron 10^{-7} M auf die humanen Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t wurde im Northern Blot analysiert. OPG- (2,9 kb) und β -Aktin-mRNA (2,0 kb). Die Inkubationszeiträume wurden auf 48 h, 24 h, 12 h, 6 h, 2 h und 0 h als Kontrolle festgelegt. EtOH diente als Lösungsmittel von Testosteron. Auf das Agarosegel wurden $6 \times 15 \mu\text{g}$ (PaTu 8988t) sowie $3 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA (MG-63, unbehandelt) als Kontrolle aufgetragen. Die Filme wurden für 1 Woche (OPG) und 2 h (β -Aktin) exponiert.

Die hemmende Wirkung von Androgenen auf die OPG-Produktion in Pankreaskarzinomzellen wurde weitergehend charakterisiert, indem die Zelllinien PaTu 8988t und PC-2 mit verschiedenen Konzentrationen des hochpotenten Androgens 5α -DHT behandelt wurden. Im Gegensatz zu Testosteron kann 5α -DHT nicht durch Aromatasen zu Östrogen konvertiert werden. PaTu 8988t-Zellen zeigten nach einer Inkubationszeit von 24 h auf mRNA-Ebene keine Regulation der OPG-Expression durch 5α -DHT. Das

Androgen war in den Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-5} M eingesetzt und die Vergleichsbande war mit Äthanol erstellt worden. Im Gegensatz dazu deutete sich, beginnend mit der 5α -DHT-Konzentration 10^{-9} M und sich steigend bis zur Konzentration 10^{-7} M, im Northern Blot der PC-2-Zellen nach 48 h eine Hemmung an. Bei gleichmäßigen β -Aktin-Banden der Kontrollhybridisierung stellte sich die OPG-Bande von 5α -DHT 10^{-7} M mit halber Signalintensität zur Kontrolle dar. MG-63-Zellen (3 μ g) wiesen – verglichen mit PC-2 (15 μ g) – vielfach höhere OPG-mRNA-Spiegel auf. (Ergebnisse nicht dargestellt)

Androgene der Nebenniere üben bei Männern nur geringe Effekte aus. Die männlichen geschlechtsspezifischen Merkmale werden hauptsächlich durch gonadale Steroide bestimmt. Bei Frauen hingegen werden androgene Effekte, z. B. geschlechtsspezifische Behaarung, durch Nebennierenhormone reguliert. DHEA ist ein adrenales Androgen, dessen schwache androgene Wirkung durch Umwandlung zu Testosteron in extraglandulärem Gewebe potenziert wird (Williams & Dluhy, 2001). Durch die Verwendung von DHEA konnte die Hemmung der OPG-Produktion durch Testosteron in der Zelllinie PaTu 8988t bestätigt werden. Sowohl im Northern Blot als auch auf Proteinebene im ELISA stellte sich nach der Behandlung mit DHEA eine Hemmung der OPG-Produktion dar, wobei diese bei verschiedenen Konzentrationen deutlich wurde. Die OPG-mRNA-Expression und -Proteinspiegel wurden unter folgenden Kulturbedingungen analysiert, indem PaTu 8988t über einen Zeitraum von 24 h mit DHEA in den Konzentrationen 10^{-11} bis 10^{-7} M behandelt wurde, wobei Äthanol als Lösungsmittel und Kontrolle diente. Die mit radioaktiver OPG-cDNA hybridisierten Banden wurden im Vergleich zur Kontrolle und den höheren Verdünnungen von der DHEA-Konzentration 10^{-9} M an kontinuierlich schwächer. Der stärkste hemmende Effekt zeigte sich bei der höchsten eingesetzten DHEA-Konzentration 10^{-7} M. Die Kontrollbanden mit β -Aktin ließen gleichmäßige Signalintensitäten mit einer intensiveren Schwärzung der Bande DHEA 10^{-7} M erkennen. Dieses erlaubte die Schlussfolgerung einer stärkeren Hemmung der OPG-mRNA-Expression durch DHEA in der Konzentration 10^{-7} M, als es die OPG-Bande im Vergleich zur Kontrolle vermuten ließ. Im ELISA präsentierten sich die Proteinkonzentrationen unter der Behandlung mit DHEA im Vergleich zur Kontrolle durchgehend niedriger. Die OPG-Sekretion wurde um 22 bis 83% gehemmt. Im Einzelnen konnten die folgenden Proteinkonzentrationen in Bezug auf die Kontrolle mit Äthanol $100 \pm 5,7\%$ ($p < 0,0001$,

ANOVA) erhoben werden: DHEA 10^{-11} M $77,7 \pm 8,5\%$; 10^{-10} M $75,1 \pm 1,6\%$; 10^{-9} M $63,6 \pm 2,5\%$; 10^{-8} M $62,2 \pm 6,7\%$ und 10^{-7} M $17,4 \pm 1,7\%$. Die Kontrollproteinkonzentration als Bezugsgröße 100% für die Messwerte und die SAW betrug 2.453 pg/ml. (Ergebnisse nicht dargestellt)

Die Wirkung von Antiandrogenen beruht auf einem kompetitiven Antagonismus an den Androgenrezeptoren. Flutamid besitzt keine agonistische Wirkung und wird bei der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms im Rahmen einer Suppression der Testosteronwirkung wahlweise mit LH-RH-Analoga oder einer Orchiektomie eingesetzt (Gärtner & Haen, 2001). Hydroxyflutamid wurde als Antiandrogen in die Untersuchungen eingeschlossen und die OPG-Produktion unter folgenden Zellkulturbedingungen analysiert: PaTu 8988t-Zellen wurden 24 h mit Hydroxyflutamid in den Konzentrationen 10^{-11} bis 10^{-7} M inkubiert. Als Lösungs-, Verdünnungssubstanz und Kontrolle diente Äthanol. Auf mRNA-Ebene konnte Hydroxyflutamid in den eingesetzten Konzentrationen eine implizierte Steigerung der OPG-Produktion nicht nachgewiesen werden. Die OPG-Banden zeigten keine relevanten Unterschiede der Signalintensitäten. Die Proteinanalyse des Zellkulturmediums erlaubte bei Schwankungen der Konzentrationen keine eindeutige Aussage über einen regulierenden Effekt durch Hydroxyflutamid. (Ergebnisse nicht dargestellt)

4.2.1.2 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 von Testosteron entstehen (Gärtner & Haen, 2001). Östradiol stellt das wichtigste und potenteste Östrogen der Ovarien dar. Östrogene beeinflussen bei Frauen die Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale. 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).

Der Einsatz von 17β -Östradiol in den Konzentrationen 10^{-10} bis 10^{-6} M hatte nach 24-stündiger Inkubation keinen regulierenden Effekt auf die OPG-Produktion auf mRNA- und Proteinebene. Die Banden im Northern Blot demonstrierten nach

dreitägiger Exposition des Films eine gleichmäßige, von der Behandlung unabhängige Schwärzung. Die Kontrollhybridisierung mit β -Aktin zeigte ebenfalls gleichmäßige Signale. Mit Hilfe des ELISA konnte dieses Ergebnis verifiziert werden. Die Proteinschwankungen lagen zwischen $130,5 \pm 5,3\%$ und $87,9 \pm 1,1\%$ der Kontrolle ($100 \pm 2,7\%$), ohne einen Zusammenhang zur 17β -Östradiol-Konzentration erkennen zu lassen. Die Messwerte und die SAW bezogen sich auf die Kontrollproteinkonzentration 100%, die 453,8 pmol/l betrug. (Ergebnisse nicht dargestellt)

4.2.1.3 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 keiner mineralokortikoiden Wirkung (Gärtner & Haen, 2001). Relevant werden Glukokortikoide für die Untersuchungen des RANKL-OPG-Systems durch ihren Einfluss auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Der Glukokortikoid-Rezeptor-Komplex hemmt im Zellkern NF- κ B oder induziert die Transkription des Gens eines NF- κ B-Inhibitor-Proteins, z. B. im Rahmen von antiinflammatorischen Effekten (Williams & Dluhy, 2001). Bekannt sind hemmende Effekte des Glukokortikoids Dexamethason auf die OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion in humanen Osteoblastensystemen. Die Ergebnisse zeigten beispielsweise in MG-63-Zellen eine Hemmung der OPG-mRNA-Spiegel um 70 bis 90% in dosis- und zeitabhängiger Weise. Maximal hemmende Effekte stellten sich bei Dexamethason in der Konzentration 10^{-8} M nach einem Behandlungszeitraum von 24 h ein (Hofbauer et al., 1999).

Der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Zelllinien PaTu 8988t und PC-2 wurde anhand von Dexamethason in den Konzentrationen 10^{-12} bis 10^{-5} M untersucht. Die Behandlung wurde nach 24 h durch die Isolierung der RNA beendet. Bei der Anwendung von Dexamethason in den Konzentrationen 10^{-5} bis 10^{-7} M konnte in PaTu 8988t-Zellen ein signifikanter hemmender Effekt der OPG-mRNA-Spiegel um ca. 70% nachgewiesen werden (Abb. 4.7). Die Banden der höheren Verdünnungen stellten sich mit vergleichbaren Signalintensitäten zur Kontrolle dar. Die Hybridisierung

mit β -Aktin bestätigte gleichmäßige Auftragsverhältnisse. MG-63 verdeutlichte eine höhere basale OPG-Genexpression (Abb. 4.7). Auf Proteinebene deutete sich eine Hemmung der OPG-Expression bereits bei der Dexamethasonkonzentration 10^{-8} M an. In den Konzentrationen 10^{-8} und 10^{-7} M senkte Dexamethason in PaTu 8988t die OPG-Proteinkonzentration auf $79,6 \pm 3,9\%$ und $76,9 \pm 6\%$ der Kontrolle ($100 \pm 0,8\%$, $p < 0,0001$, ANOVA). Die Kontrollproteinkonzentration als Bezugsgröße 100% für die Messwerte und die SAW betrug 6.525,2 pg/ml. (Ergebnis der Proteinanalyse nicht dargestellt)

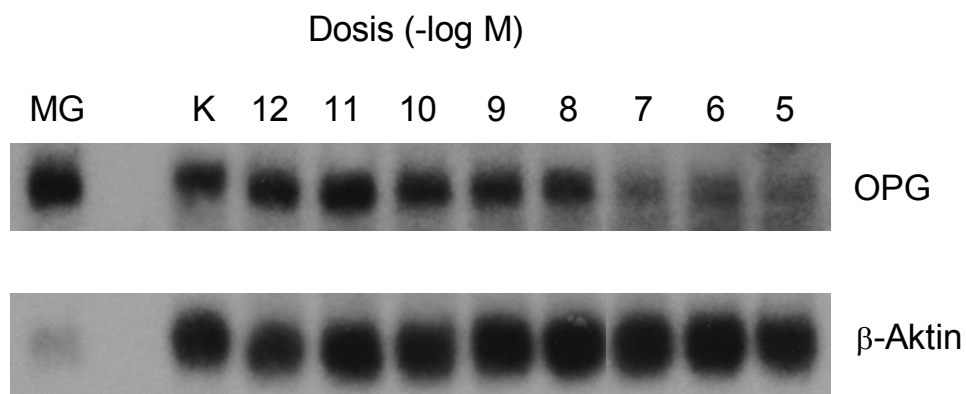


Abb. 4.7 Hemmung der OPG-mRNA-Expression durch Dexamethason
PaTu 8988t-Zellen wurden mit Dexamethason in den Konzentrationen 10^{-12} bis 10^{-5} M für 24 h inkubiert, als Negativkontrolle (K) wurde EtOH eingesetzt. Die Northern Blot-Analyse zeigte die Expression von OPG-mRNA (2,9 kb) und β -Aktin-mRNA (2,0 kb). Es wurden $9 \times 15 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA von PaTu 8988t und $3 \mu\text{g}$ der unbehandelten MG-63-Zellen als Kontrolle auf die Nylonmembran aufgetragen. Die Filme wurden 1 Woche (OPG) und 5 h (β -Aktin) exponiert.

Der Einfluss von Dexamethason auf PC-2-Zellen ist graphisch nicht dargestellt. Die schwachen Signale nach einwöchiger Exposition, bedingt durch eine niedrige OPG-Produktion, erlaubten nur eine bedingte Analyse. Unter zur Hilfenahme der Proteinkonzentrationen aus der Analyse des Zellkulturmediums konnte eine Modulation der OPG-Expression durch das synthetische Glukokortikoid Dexamethason weitgehend ausgeschlossen werden. Die Proteinkonzentrationen lagen im Bereich der Kontrollmittelwerte und deren SAW.

Die bereits im Kapitel 4.1.3 beschriebenen Abstufungen der OPG-Produktion in exokrinen Pankreaskarzinomzelllinien konnten in dieser Versuchsreihe bestätigt werden. Als möglichen Hinweis auf eine höhere OPG-Expression zeigten PaTu 8988t-

Zellen unter den gleichen Untersuchungsbedingungen deutlich stärkere Signale im Vergleich zur Zelllinie PC-2.

4.2.2 Regulation von OPG durch Zytokine

Die Zytokine wurden in BSA/PBS gelöst und verdünnt. BSA diente in den Untersuchungen zur Regulation der OPG-Produktion durch Zytokine in der Pankreas-karzinomzelllinie PaTu 8988t als Negativkontrolle.

4.2.2.1 Interleukin-1 β

IL-1 β wurde in den Untersuchungen in den Konzentrationen 0,001 bis 10 ng/ml eingesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation konnte IL-1 β in PaTu 8988t keinen regulierenden Effekt auf die OPG-Expression erzielen. Im Northern Blot zeigten sich nach der Hybridisierung mit radioaktiver OPG-cDNA gleichmäßige Schwärzungen. Die Kontrollhybridisierung mit β -Aktin ergab mengenproportionale Signale, so dass bei gleichen Signalintensitäten der OPG-Kontroll- und -Stimulationsbanden eine konkrete Aussage über den Einfluss von IL-1 β gemacht werden konnte. Auf Proteinebene konnte durch Analyse des Zellkulturmediums das Ergebnis des Northern Blot bestätigt werden. (Ergebnisse nicht dargestellt)

4.2.2.2 Tumor necrosis factor- α

TNF- α wurde in den Konzentrationen 0,001 bis 10 ng/ml in die Untersuchungen eingeschlossen und die Zelllinie PaTu 8988t über den Zeitraum von 24 h behandelt. Die Analyse der OPG-mRNA-Spiegel mittels Northern Blot ergab keinen regulierenden Effekt. Die Signalintensitäten der OPG-Banden verhielten sich proportional zu denen der β -Aktin Kontrollbanden. (Ergebnis nicht dargestellt)

4.2.2.3 Interleukin-8

IL-8 in den Konzentrationen 0,001 bis 10 ng/ml, eingesetzt über einen Zeitraum von 48 h, zeigte in PaTu 8988t-Zellen eine leichte Steigerung der OPG-Produktion. Im Northern Blot stieg die Signalintensität der OPG-Banden in den IL-8-Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml im Vergleich zur Negativkontrolle und den höheren Verdünnungen an. Die Kontrollhybridisierung mit β -Aktin ergab für die hohen

IL-8-Konzentrationen (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) schwächere Signale im Vergleich zur Kontrolle. (Ergebnis nicht dargestellt)

4.2.3 Regulation von OPG durch Medikamente

4.2.3.1 Statine

Statine sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die kompetitiv das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese hemmen. Sie haben eine bis zu zwanzigtausendfach höhere Affinität zu dem Enzym als das Substrat HMG-CoA. Statine hemmen die Cholesterinbiosynthese intrazellulär auf einer frühen Stufe der Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat. Lovastatin, eines der ersten klinisch eingesetzten HMG-CoA-Inhibitoren, wurde aus dem Bodenpilz *Aspergillus terreus* isoliert. Cerivastatin ist ein vollsynthetischer Enzyminhibitor. Die Wirkung von Lovastatin und Cerivastatin wird durch aktive Metabolite mitbedingt (Keller & Wolfram, 2001).

Lovastatin wurde für die Untersuchungen in den Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-5} M über einen Zeitraum von 24 h eingesetzt. In der Northern Blot-Analyse zeigte sich bei den Lovastatinkonzentrationen 10^{-6} und 10^{-5} M eine deutliche Hemmung der OPG-mRNA-Expression. Nach einer Behandlung mit Lovastatin 10^{-6} M stellte sich die OPG-Bande im Northern Blot mit ungefähr dreifach schwächerer Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle und den höheren Verdünnungen dar. Bei der Konzentration 10^{-5} M konnte nur ein sehr geringer OPG-Spiegel nachgewiesen werden (Abb. 4.8). Die Kontrollhybridisierung mit β -Aktin verdeutlichte, dass dieser hemmende Effekt durch eine zytotoxische Wirkung von Lovastatin auf PaTu 8988t-Zellen verstärkt wurde. Die β -Aktin-Banden waren nach der Behandlung mit Lovastatin 10^{-6} und 10^{-5} M zunehmend signalschwächer (Abb. 4.8). Die OPG-Kontrolle mit Hilfe von MG-63-Zellen fiel stark positiv aus (Abb. 4.8).

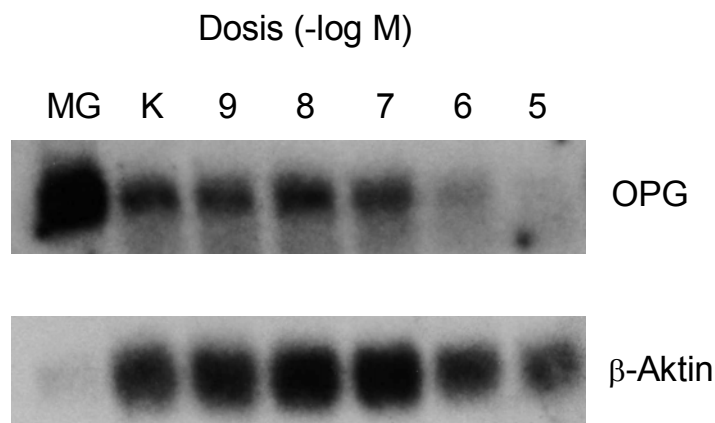


Abb. 4.8 Regulierender Effekt von Lovastatin auf die OPG-mRNA-Expression

Die Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t wurden mit Lovastatin in den Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-5} M für 24 h behandelt und $6 \times 15 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA mittels Northern Blot-Hybridisierung analysiert. OPG-mRNA (2,9 kb) und β -Aktin-mRNA (2,0 kb). EtOH wurde als Trägersubstanz von Lovastatin und als Negativkontrolle (K) eingesetzt. $3 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA un behandelter MG-63-Zellen stellten eine Kontrolle dar. Die Exposition der Filme betrug 3 d (OPG) und 5 h (β -Aktin).

Die Abb. 4.9 verdeutlicht den Einfluss von Lovastatin in PaTu 8988t-Zellen auf Proteinebene. Die Hemmung zeigte sich bereits bei 10^{-7} ($69,3 \pm 9,9\%$) und 10^{-6} M ($36,9 \pm 7,5\%$) und erreichte bei der Konzentration 10^{-5} M mit $9,7 \pm 6,8\%$ ($p < 0,0001$, ANOVA) der Kontrolle einen Höhepunkt (Abb. 4.9). Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss der zytotoxische Effekt von Lovastatin 10^{-6} und 10^{-5} M auf die Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t berücksichtigt werden, siehe die Northern Blot-Analyse (Abb. 4.8).

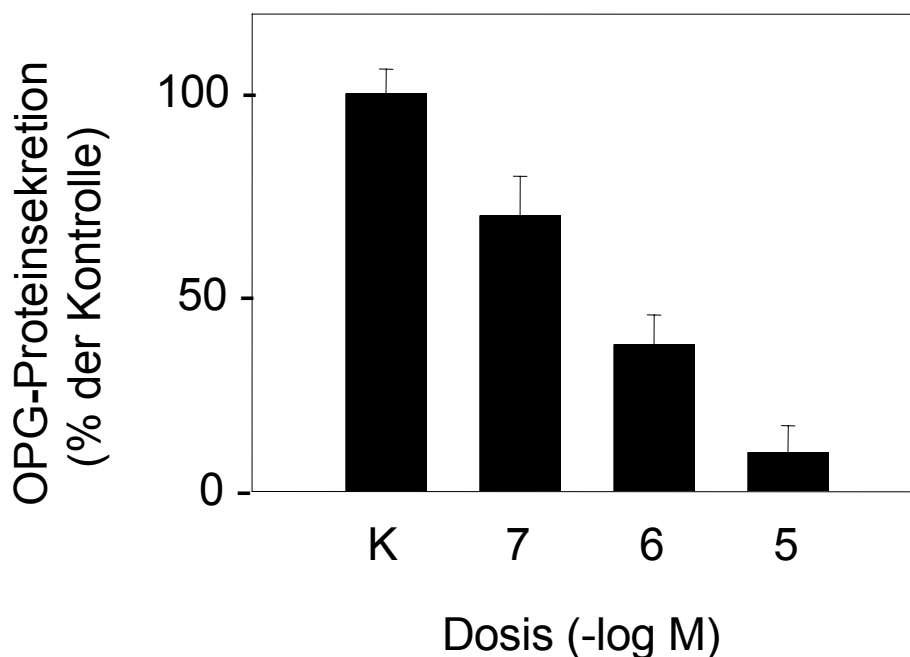


Abb. 4.9 Hemmung der OPG-Proteinsekretion durch Lovastatin

Die Analyse der OPG-Proteinsekretion in PaTu 8988t-Zellen erfolgte mittels ELISA. PaTu 8988t wurden mit EtOH oder Lovastatin in den Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-6} M und 10^{-5} M über einen Zeitraum von 24 h behandelt. Die Proteinkonzentrationen sind in % der Kontrolle (K) angegeben. Mittelwert der Dreifachbestimmung in pmol/l: Kontrolle $94,5 \pm 5,8$ (p-Wert < 0,0001, ANOVA).

Um einen Einblick in den Wirkmechanismus zu gewinnen, den Lovastatin auf Pankreaskarzinomzelllinien ausübt, wurde ein weiteres Statin, Cerivastatin, in die Untersuchungen eingeschlossen. Mit Hilfe von Cerivastatin in der Konzentration 10^{-6} M konnte der hemmende Effekt von Statinen reproduziert werden. Cerivastatin wurde für die Untersuchungen in den Konzentrationen 10^{-11} bis 10^{-5} M über einen Stimulationszeitraum von 24 h eingesetzt. Im Northern Blot konnte der hemmende Effekt von Cerivastatin 10^{-6} M auf die OPG-mRNA-Expression verdeutlicht werden. Die OPG-Bande stellte sich im Vergleich zur Kontrolle und den höheren Verdünnungen sehr schwach dar (Abb. 4.10). Die Kontrollhybridisierung mit β -Aktin wies bei sonst gleichmäßiger Signalintensität auf einen zytotoxischen Effekt von Cerivastatin in der Konzentration 10^{-5} M hin (Abb. 4.10). Auf Proteinebene ließ sich diese Hemmung bestätigen. Während höhere Verdünnungen eine Steigerung der OPG-Sekretion bedingten, senkte Cerivastatin 10^{-6} M die OPG-Proteinkonzentration auf $72,8 \pm 5,3\%$ (p < 0,0001, ANOVA) und 10^{-5} M auf $77,1 \pm 14\%$ der Kontrolle (100% entsprachen $356,7$ pmol/l). (Ergebnis der Proteinanalyse nicht dargestellt)

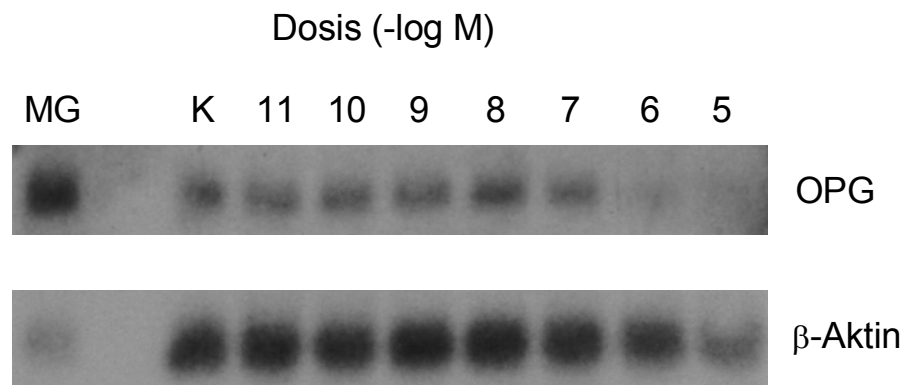


Abb. 4.10 Dosisabhängige Hemmung der OPG-mRNA-Expression durch Cerivastatin

Die OPG-mRNA-Expression in PaTu 8988t-Zellen wurde unter folgenden Kulturbedingungen analysiert: Cerivastatin in den Konzentrationen 10^{-11} bis 10^{-5} M mit einem Inkubationszeitraum von 24 h; EtOH diente Cerivastatin als Trägersubstanz und stellte die Negativkontrolle (K) dar. Im Northern Blot wurden $8 \times 15 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA aufgetragen. Die Hybridisierung mit radioaktiven cDNA-Sonden ergab OPG-mRNA (2,9 kb) und β -Aktin-mRNA (2,0 kb). $3 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA unbehandelter MG-63-Zellen dienten als Kontrolle. Die Filme wurden 1 Woche (OPG) und 2 h (β -Aktin) exponiert.

Die zeitkinetischen Aspekte der Hemmung durch Statine wurden anhand von Cerivastatin 10^{-6} M analysiert, da diese Konzentration in den Dosis-Wirkungs-Untersuchungen erste hemmende Effekte gezeigt hatte (Abb. 4.10). Eine schwache Hemmung der OPG-mRNA-Spiegel deutete sich bereits nach einem Expositionszeitraum von 12 h an und steigerte sich bis zur annähernd vollständigen Suppression nach 48 h (Abb. 4.11). MG-63 zeigte eine sehr starke OPG-Genexpression (Abb. 4.11). Mit Hilfe der Proteinanalyse des Zellkulturmediums konnten die Auswirkungen der Hemmung der OPG-mRNA-Expression auf die Spiegel des sezernierten OPG und deren zeitlicher Zusammenhang untersucht werden. Nach einem Zeitraum von 6 bis 24 h deutete sich zunächst eine Steigerung der OPG-Sekretion um ungefähr 10% im Vergleich zur Kontrolle von 0 h an. Ein Rückgang der OPG-Proteinkonzentration auf $69,2 \pm 5,3\%$ ($p < 0,0001$, ANOVA) des Vergleichswertes ($100 \pm 5,8\%$) zeigte sich nach 48-stündiger Exposition mit Cerivastatin 10^{-6} M. Die Messwerte und die SAW bezogen sich auf die Kontrollproteinkonzentration 100%, die $213,8 \text{ pmol/l}$ betrug. Dieses Ergebnis bestätigt mit einer zeitlichen Verzögerung von 24 bis 36 h die Hemmung der OPG-mRNA-Expression. (Ergebnis der Proteinanalyse nicht dargestellt)

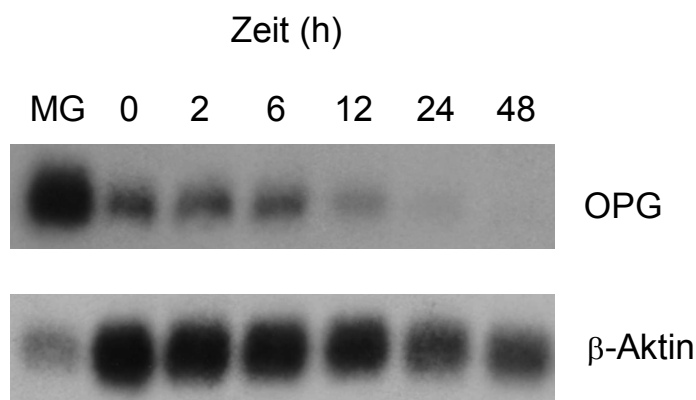


Abb. 4.11 Zeitkinetik der OPG-Produktion nach Cerivastatinexposition

Die Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t wurden über verschiedene Zeiträume mit Cerivastatin 10^{-6} M behandelt. Die Zeiträume wurden auf 48 h, 24 h, 12 h, 6 h, 2 h und 0 h als Kontrolle festgelegt und $6 \times 15 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA mittels Northern Blot-Hybridisierung analysiert. OPG-mRNA (2,9 kb) und β -Aktin-mRNA (2,0 kb). EtOH diente Cerivastatin als Trägersubstanz. $3 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA unbehandelter MG-63-Zellen dienten als OPG-Kontrolle. Die Filme wurden 3 d (OPG) und 2 h (β -Aktin) exponiert.

Um Erkenntnisse über den Einfluss der Statine auf eine weitere Adenokarzinomzelllinie zu erlangen, wurden PC-2-Zellen 24 h mit Cerivastatin in den Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-5} M inkubiert. Das Ergebnis der Proteinanalyse ist in der Abb. 4.12 dargestellt. Eine schwache Hemmung stellte sich bereits bei 10^{-8} M ($85,3 \pm 4,8\%$) dar. Diese wurde kontinuierlich stärker und bei 10^{-5} M konnte nur $61 \pm 2,2\%$ ($p < 0,0001$, ANOVA) der OPG-Proteinmenge der Kontrolle gemessen werden (Abb. 4.12).

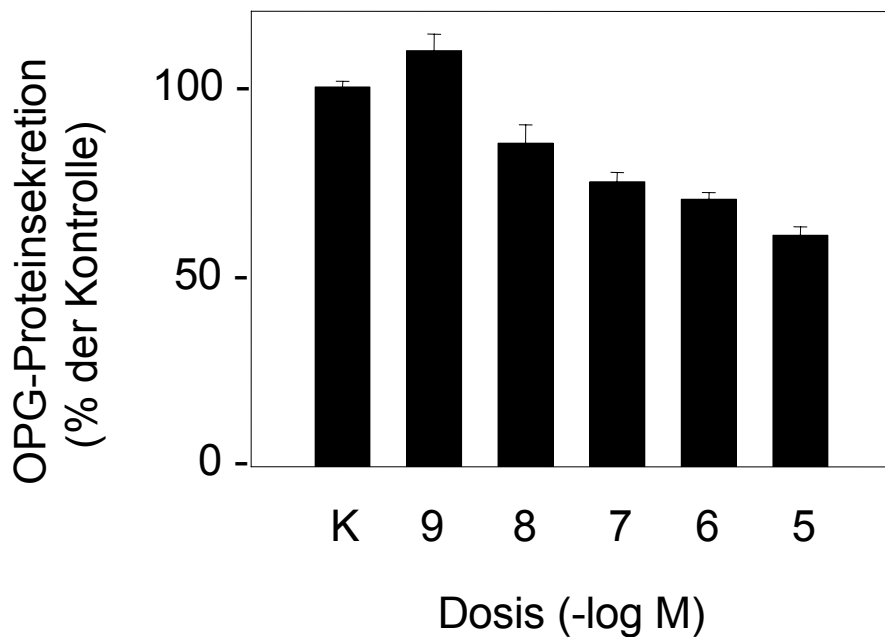


Abb. 4.12 Hemmung der OPG-Sekretion durch Cerivastatin

Die Analyse der OPG-Proteinsekretion in PC-2-Zellen erfolgte mittels ELISA. PC-2 wurden mit EtOH oder Cerivastatin in den Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-5} M über einen Zeitraum von 24 h behandelt. Die Werte der Proteinkonzentrationen sind in % der Kontrolle (K) angegeben. Mittelwert der Dreifachbestimmung in pmol/l: Kontrolle $33,3 \pm 0,5$ (p-Wert $< 0,0001$, ANOVA).

4.2.3.2 Proteinsynthesehemmer

Die komplexen Regulationsmechanismen der OPG-Transkription und -Synthese sind nur in Grundzügen aufgeklärt. Der Proteinsynthesehemmer Cycloheximid wurde im Rahmen der Identifizierung von möglichen Transkriptionsfaktoren des OPG-Gens in die Untersuchungen eingeschlossen. PaTu 8988t-Zellen wurden mit Cycloheximid in den Konzentrationen 0,001 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ über einen Zeitraum von 24 h behandelt und die OPG-Produktion auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Im Northern Blot konnte durch die Cycloheximidkonzentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Hemmung der OPG-mRNA-Spiegel ausgelöst werden (Abb. 4.13). Die OPG-Bande stellte sich mit ungefähr 30%iger Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle dar. Bei den eingesetzten stärkeren Konzentrationen zeigten sich vergleichbare bis ausgeprägtere Effekte (Abb. 4.13). Dieses Ergebnis legte die Schlussfolgerung eines regulierenden Transkriptionsfaktors im OPG-System nahe. Die Proteinanalyse des Zellkulturmediums ergab eine deutliche Hemmung der OPG-Sekretion ab der Cycloheximidkonzentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ($57,9 \pm 1,9\%$ der Kontrolle), während die höheren Verdünnungen im Bereich der Vergleichsgröße und deren Standardabweichung lagen. Mit Hilfe von Cycloheximid

1 µg/ml und 10 µg/ml konnten die OPG-Proteinkonzentrationen auf $19,1 \pm 0,6\%$ und $24,8 \pm 1,6\%$ der Kontrolle ($100 \pm 1,9\%$, $p < 0,0001$, ANOVA) gesenkt werden. Die Kontrollproteinkonzentration als Bezugsgröße 100% für die Messwerte und die SAW betrug 7.247,4 pg/ml. Möglicherweise spielten in diesem Zusammenhang die Faktoren der direkten Proteinsynthesehemmung und der verminderten mRNA-Transkription eine Rolle. (Ergebnis der Proteinanalyse nicht dargestellt)

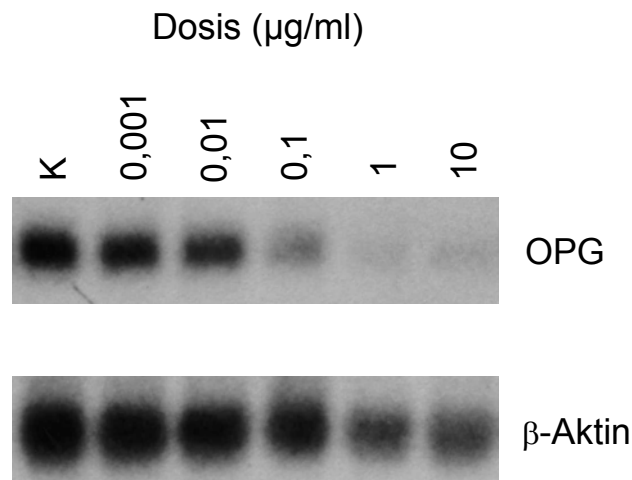


Abb. 4.13 Cycloheximid als Hemmstoff der OPG-Produktion

Die humanen Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t wurden mit Cycloheximid in den Konzentrationen 0,001 bis 10 µg/ml über einen Zeitraum von 24 h behandelt und 15 µg Gesamt-RNA mittels Northern Blot-Hybridisierung analysiert. OPG-mRNA (2,9 kb) und β-Aktin-mRNA (2,0 kb). EtOH diente Cycloheximid als Trägersubstanz und stellte eine Negativkontrolle (K) dar. Der Expositionszeitraum der Filme umfasste 24 h (OPG) und 1 h (β-Aktin).

4.2.3.3 Indometacin

Indometacin ist ein nicht-selektiver Antagonist der COX, dem Schlüsselenzym in der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen. Es existieren zwei Isoenzyme der COX: COX-1 wird in vielen Geweben exprimiert, in denen es Housekeeping-Funktionen vermittelt, und COX-2 stellt eine induzierbare Isoform dar, die nur vorübergehend als Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Zytokine im Rahmen von Entzündungen exprimiert wird (Smith et al., 2000). Tucker et al. veröffentlichten 1999 Ergebnisse der Expression von COX-2 auf mRNA- und Proteinebene in einer Vielzahl humaner Pankreaskarzinomzelllinien (Tucker et al., 1999). Basierend auf dieser Expression berichteten viele Studien von einer signifikanten Hochregulation der COX-2 in Karzinomgewebe im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe und benignen

Tumoren, unabhängig von den verschiedenen eingesetzten Evaluationsmethoden der Gruppen (Kokawa et al., 2001; Koshiba et al., 1999; Okami et al., 1999). Erste Anzeichen, dass COX möglicherweise an Prozessen der Karzinogenese beteiligt sein könnte, lieferten Untersuchungen mit nichtsteroidalen Antiflogistika (NSAIDs) in einem Tiermodell für Kolonkarzinome (Ding et al., 2001). In der Analyse der Regulation von OPG in Pankreaskarzinomzellen stellte demzufolge Indometacin – als nicht-selektiver Hemmstoff der COX – einen sehr interessanten Faktor dar.

Die Zelllinie PaTu 8988t wurde über einen Zeitraum von 24 h mit Indometacin in den Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-5} M inkubiert. In der Auswertung der Ergebnisse zu einer möglichen Regulation der OPG-Produktion durch Indometacin zeigte sich interessanterweise auf Proteinebene eine deutliche Hemmung bei 10^{-5} M (Abb. 4.15), während die OPG-mRNA-Expression nur eine geringfügige Beeinflussung erkennen ließ (Abb. 4.14). Die Banden im Northern Blot bei einer Indometacinkonzentration von 10^{-7} M, 10^{-6} M und 10^{-5} M zeigten schwächere Signalintensitäten im Vergleich zur Kontrolle und den höheren Verdünnungen 10^{-8} und 10^{-9} M (Abb. 4.14).

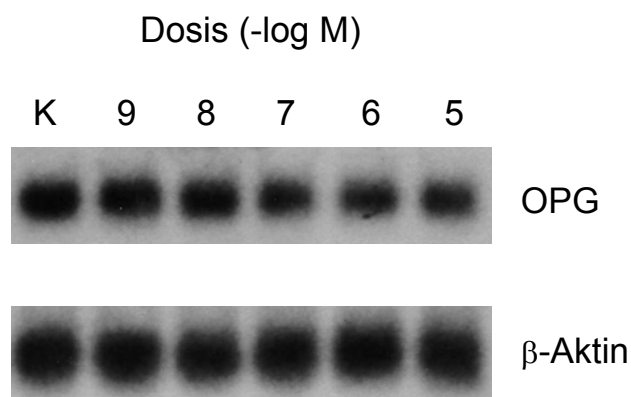


Abb. 4.14 Einfluss von Indometacin auf die OPG-mRNA-Expression

Die Zelllinie PaTu 8988t wurde 24 h mit Indometacin in den Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-5} M behandelt. EtOH diente als Lösungsmittel für Indometacin und gleichzeitig als Negativkontrolle (K). Von PaTu 8988t wurden 15 μ g RNA aufgetragen. Die Expositionszeit der Filme umfasste für OPG 18 h und β -Aktin 1 h. Die OPG-mRNA stellte sich bei 2,9 kb und β -Aktin-mRNA bei 2,0 kb dar.

Der hemmende Effekt auf die OPG-Proteinspiegel deutete sich bereits bei Indometacin in der Konzentration 10^{-6} M ($82,4 \pm 1,6\%$ der Kontrolle) an und steigerte sich auf $42,8 \pm 1,3\%$ der Kontrolle bei 10^{-5} M (Abb. 4.15).

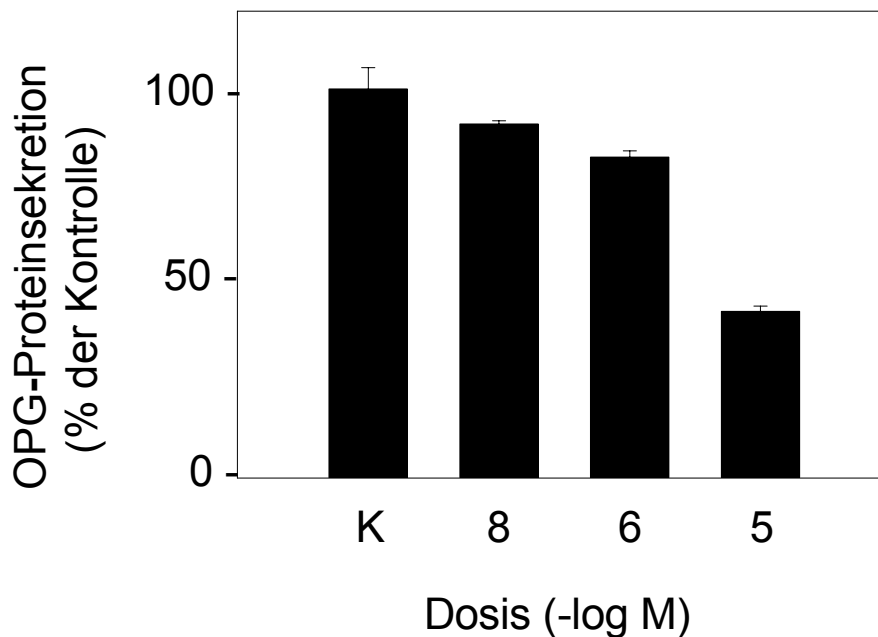


Abb. 4.15 Hemmung der OPG-Sekretion durch Indometacin

PaTu 8988t wurden mit Indometacin in den Konzentrationen 10^{-8} M, 10^{-6} M und 10^{-5} M über einen Zeitraum von 24 h behandelt. Die Werte der Proteinkonzentrationen sind in % der Kontrolle (K) angegeben. Mittelwert der Dreifachbestimmung in pmol/l: Kontrolle $437,9 \pm 23,9$ (p-Wert $< 0,0001$, ANOVA).

4.2.4 Substanzen ohne regulierende Effekte auf die OPG-Produktion

Substanz	Konzentrationsbereich	Lösungsmittel
Genistein*	10^{-11} M – 10^{-7} M	EtOH
Tamoxifen	10^{-10} M – 10^{-6} M	EtOH
Pamidronat	10^{-11} M – 10^{-7} M	NaCl
Zoledronat	10^{-11} M – 10^{-7} M	NaCl
Diltiazem	10^{-9} M – 10^{-5} M	H ₂ O
Thalidomid	10^{-11} M – 10^{-7} M	DMSO
9-cis Vitamin A-Säure*	10^{-10} M – 10^{-6} M	DMSO

Tab. 4.1 Substanzen ohne regulierende Effekte auf die OPG-Produktion

Die beschriebenen Hormone und Medikamente zeigten im Northern Blot keine nachweisbare Modulation der OPG-mRNA-Expression. Bei denen mit einem Stern (*) gekennzeichneten Substanzen wurde eine Regulation von OPG auch auf Proteinebene durch Analyse des Zellkulturmediums mittels ELISA ausgeschlossen. Die Behandlungsdauer der PaTu 8988t-Zellen lag substanzabhängig zwischen 24 und 48 h.

4.3 RANKL-Produktion in Pankreaskarzinomzellen

Die basale Produktion von RANKL in den humanen Pankreaskarzinomzellen PaTu 8988t, PaTu 8988s und PC-2 wurde auf mRNA-Ebene mittels Northern Blot untersucht. Es wurde ein Northern Blot mit Poly-A-mRNA angefertigt, der es ermöglichte, RANKL nachzuweisen. Dieser Northern Blot wurde mit radioaktiven OPG-, RANKL- und β -Aktin-cDNA-Sonden hybridisiert. PaTu 8988t-Zellen exprimierten RANKL. In PaTu 8988s und PC-2 gelang der Nachweis von RANKL mittels Poly-A-mRNA Northern Blot nicht. Die Kontrolle mit Gesamt-mRNA von MG-63 ließ ebenfalls kein Signal erkennen. Die Hybridisierung mit einer radioaktiven OPG-cDNA-Sonde bestätigte die bereits auf der Ebene von Gesamt-mRNA erhobenen Befunde. Die Pankreaskarzinomzelllinien PaTu 8988t und PC-2 produzierten OPG, wobei die Expression in PaTu 8988t um ein Vielfaches höher war als in PC-2. Bei PaTu 8988s-Zellen konnte auch auf Poly-A-mRNA-Ebene keine OPG-Produktion nachgewiesen werden. (Ergebnisse nicht dargestellt)

5. DISKUSSION

5.1 Bedeutung der TNF-Rezeptor-Superfamilie für das Pankreaskarzinom

Zelluläre Apoptosemechanismen sind neben normalem Zellwachstum und Zelldifferenzierung von fundamentaler Bedeutsamkeit für die Karzinogenese. Der Verlust von genetischem Material oder die funktionale Aberration zellulärer Kontrollmechanismen der Apoptose werden als kritisches Moment in der Initiierung, Promotion oder Progression von Tumoren erachtet (Kajino et al., 2000). Die Deregulierung der Apoptose könnte zur Unfähigkeit des Immunsystems führen, Tumorzellen *in vivo* zu eradizieren oder die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Radio- und Chemotherapie erklären. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den Tumoren, die auf konventionelle Chemo- und Radiotherapie nicht ansprechen (Krammer, 1999; Lowenfels & Maisonneuve, 2005). Die Ansprechraten fortgeschrittener Pankreaskarzinome blieben auch unter dem Einsatz erfolgsversprechender Substanzen in den letzten Jahrzehnten unverändert (Schneider et al., 2005).

Eine wichtige Gruppe von Molekülen, die als Aktivatoren und Inhibitoren der Apoptose agieren, stellt die TNF-Familie mit ihren Zytokinen und Rezeptoren dar (Liao et al., 2001). Die TNF-Liganden-Superfamilie umfasst Zytokine, die eine wichtige Rolle als Mediatoren von Immunregulation, Entzündung und Apoptose besitzen. Die Mitglieder der TNF-Liganden-Familie binden und interagieren mit spezifischen Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie. Die Bindung der Liganden an ihre charakteristischen Rezeptoren triggert diverse intrazelluläre Signalwege, welche die Aktivierung und nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach sich ziehen. Da die Stimulation jedes einzelnen Signalweges eine andere Zellantwort bewirkt, können TNF-Liganden sowohl Zelldifferenzierung und Apoptose als auch Zellproliferation modulieren (Ozawa et al., 2001).

TRAIL wurde 1995 von Wiley et al. als neues Mitglied der TNF-Superfamilie identifiziert (Wiley et al., 1995). Es induziert eine rasche Apoptose in einer großen Vielzahl transformierter Zelllinien, wobei nur ein geringfügiger bzw. kein nachweisbarer zytotoxischer Effekt auf normale Zellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden kann (Ozawa et al., 2001). TRAIL bindet und interagiert mit fünf

Rezeptoren: DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2/TRICK2 als Apoptose induzierende Membranrezeptoren mit zytoplasmatischer Todesdomäne; TRID/DcR1/TRAIL-R3, TRUNDD/DcR2/TRAIL-R4 und OPG als Rezeptoren, die Apoptose antagonisieren (Satoh et al., 2001). TRAIL-R3 und TRAIL-R4 hemmen die TRAIL vermittelte Apoptose. Entweder fungieren sie als Decoy-Rezeptoren ohne intrazelluläre Todesdomäne oder sie regen möglicherweise über die Aktivierung von NF- κ B antiapoptotische Effekte an (Liao et al., 2001). NF- κ B agiert als positiver Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von Genen und konnte als antiapoptotischer Regulator identifiziert werden. Der Mechanismus, mit dem NF- κ B Apoptose blockiert, ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Ferner wird NF- κ B eine Rolle in der Karzinogenese zugesprochen (Kajino et al., 2000). Die Expression von TRAIL-R3 und TRAIL-R4 konnte in den meisten gesunden humanen Geweben – einschließlich des Pankreas – nachgewiesen werden (Satoh et al., 2001). OPG bindet TRAIL mit geringfügig schwächerer Affinität im Vergleich zu den Rezeptoren TRAIL-R3 oder TRAIL-R2 und blockiert die TRAIL vermittelte Apoptose (Emery et al., 1998).

In Bezug auf das Pankreas konnte OPG in der vorliegenden Arbeit auf Poly-A-mRNA-, mRNA- und Proteinebene im Pankreasgewebe nachgewiesen werden. Satoh et al. entdeckten 2001 OPG-mRNA in 8 von 17 duktalem Pankreaskarzinomgeweben, wobei dieser Nachweis in gesundem Pankreasgewebe nicht gelang. Die Expression von OPG-mRNA zeigte sich regelmäßig im Pankreaskarzinomgewebe des Stadiums 4 (Satoh et al., 2001). PaTu 8988t und PC-2 – zwei der vier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien – exprimierten OPG auf mRNA- und Proteinebene. PaTu 8988s und Capan-2 zeigten dagegen keine Produktion von OPG. Des Weiteren wurde von Satoh et al. OPG-mRNA-Expression in den Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, BxPC-3 und ASPC-1 beobachtet, aber nicht in MIA PaCa-2 (Satoh et al., 2001). Interessanterweise differierte der OPG-Nachweis in den beiden aus einem Primärtumor stammenden Zelllinien PaTu 8988t und PaTu 8988s. Daraus ergeben sich gute Vergleichsmöglichkeiten im Hinblick auf differierende OPG-Expressionsmuster verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien.

Möglicherweise ist OPG bzw. dessen Produktion ein Ausdruck der Differenzierung von Pankreaskarzinomzellen. PaTu 8988t und PaTu 8988s besitzen unterschiedliche morphologische, chromosomale und funktionale Merkmale. Die morphologischen

Unterschiede in der Gewebekultur ließen nicht auf verschiedene Grade der Tumorzelldifferenzierung der beiden Zelllinien PaTu 8988t und PaTu 8988s schließen (Elsässer et al., 1992). In Nacktmaustransplantaten zeigte PaTu 8988t alle strukturellen Charakteristika eines hochdifferenzierten (Grad I) primären Adenokarzinoms des Pankreas, während PaTu 8988s eine niedrigere Differenzierung (Grad II-III) aufwies (Klöppel et al., 1985). Im Gegensatz zu PaTu 8988t besaß PaTu 8988s nach intravenöser Injektion das Potential, Metastasen in der Lunge von Nacktmäusen zu induzieren (Elsässer et al., 1992). Capan-2-Zellen zeigten im Nacktmausmodell in subkutan wachsenden Tumoren mikroskopisch ebenfalls das Wachstumsmuster eines gut differenzierten Adenokarzinoms (Kyriazis et al., 1986). Die Unterschiede der OPG-Produktion fanden sich also auch bei vergleichbarem Differenzierungsgrad von Capan-2 und PaTu 8988t. Es bleibt weiterhin unklar, warum zwei Zelllinien aus einem Primärtumor verschiedene OPG-Expressionsmuster zeigten. Ein Erklärungsansatz beinhaltet die Heterogenität der Zellen und eine zweite Mutation, die *in vitro* stattfand. Möglicherweise besitzen die Zellen eines Pankreaskarzinoms in diesem Zellverband differierende Aufgaben. Die Funktion von PaTu 8988t könnte beispielsweise der Schutz vor TRAIL induzierter Apoptose durch die Sekretion von OPG sein. Zusätzlich wird OPG eine Rolle besonders in der ossären Metastasierung von Karzinomen zugeschrieben (Holen et al., 2002). Widersprüchlich erscheint daraufhin die Fähigkeit von PaTu 8988s, Metastasen zu induzieren, wohingegen PaTu 8988t OPG exprimierte, aber nicht in der Lage war, nach intravenöser Injektion adhärent in Nacktmäusen zu wachsen (Elsässer et al., 1992). Hofbauer et al. beschrieben 1998 bereits signifikant höhere OPG-mRNA-Spiegel in fetalen Osteoblasten in einem differenzierten Stadium im Vergleich zum Proliferationsstadium, in dem die Zellen undifferenziert sind (Hofbauer et al., 1998).

Es konnte mit Hilfe von Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass das Pankreaskarzinom relativ unsensitiv gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose ist, unabhängig von der Expression von TRAIL und seiner Apoptose induzierenden Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Liao et al., 2001; Ozawa et al., 2001). Erklärungsansätze dieses Phänomens ergaben sich aus der Analyse der Verteilungsmuster der Apoptose hemmenden TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 auf mRNA- und Proteinebene im Gewebe von Pankreaskarzinomen und normalem Pankreas. Die Expression von TRAIL-R3-mRNA und -Protein war

gleichermaßen schwach im normalen und Pankreaskarzinomgewebe (Liao et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde TRAIL-R4-mRNA und -Protein in humanem Pankreaskarzinomgewebe in großen Mengen exprimiert, während es sich in normalen Pankreaszellen schwach bis nicht nachweisen ließ (Liao et al., 2001). Satoh et al. fanden im selben Jahr keine positive Relation zwischen dem Nachweis von protektiven TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R3, TRAIL-R4) und der Sensitivität von Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber TRAIL vermitteltem programmiertem Zelltod (Satoh et al., 2001). Ergänzend sollte erwähnt werden, dass der TNF-Ligand TRAIL und seine Apoptose induzierenden Rezeptoren sowohl in Pankreaskarzinomzellen als auch in den den Tumor umgebenden Zellen produziert bzw. exprimiert wurden. Die Rolle von TRAIL in diesem Zellverband ist nicht völlig aufgeklärt. Die Effekte von TRAIL könnten sich auf aktivierte Zellen des Immunsystems, welche die Tumorzellen angreifen, auswirken. Zusätzlich würden die Degeneration des an die Tumormasse angrenzenden Gewebes und damit das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors unterstützt (Ozawa et al., 2001). Satoh et al. formulierten 2001 die Vermutung, dass die Produktion von OPG zur Resistenz von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL induzierter Apoptose beiträgt (Satoh et al., 2001).

Die Aktivierung NF- κ B abhängiger, antiapoptotisch wirkender Gene könnte einen Faktor der Chemoresistenz von Pankreaskarzinomen darstellen. Im Vergleich zu proliferierenden, nicht malignen, intestinalen Zellen zeigten Pankreaskarzinomzelllinien erhöhte Spiegel von NF- κ B-Untereinheiten. Die NF- κ B-Aktivität schien jedoch mehr mit dem Differenzierungsgrad des Tumors, als der Expression der NF- κ B-Untereinheiten zu korrelieren (Chandler et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass NF- κ B-Aktivierung – eine von vielen Veränderungen in Pankreaskarzinomen – die Tumorgenese und die Metastasierung hemmt. Des Weiteren sensibilisierte es Pankreaskarzinomzellen für induzierte Apoptose (Schneider et al., 2005; Sclabas et al., 2003). Interessanterweise wurden die Moleküle, die eine Apoptoresistenz von Pankreaskarzinomzellen bedingen, zum größten Teil durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert. Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität führte zur Steigerung der Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber der Chemotherapie (Schneider et al., 2005). Die Blockierung der NF- κ B-Signalkaskade hemmte die *in vitro* und *in vivo* Expression der bedeutenden gefäßneubildenden Moleküle “Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und IL 8 und verringerte das Tumorgefäßnetz signifikant. Dieses

korrelierte mit verzögertem Tumorwachstum und Suppression von Metastasen (Xiong et al., 2004). Kajino et al. beschrieben 2000 die Potenz von IL-1 β als signifikanter Auslöser von NF- κ B-Aktivierung, TNF- α induzierte Apoptose zu blockieren. Dazu bedarf es in Pankreaskarzinomzelllinien keiner weiteren Proteinsynthese (Kajino et al., 2000). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass sowohl biochemische als auch genetische Interventionen der NF- κ B-Aktivierung eine rationale Strategie darstellen könnten, um Tumorzellen für Apoptose, die von verschiedenen Elementen der Krebstherapie induziert wird, zu sensibilisieren (Kajino et al., 2000; Sclabas et al., 2003). Pankreaskarzinomzellen haben vielfältige antiapoptotische Strategien entwickelt. Eine Frage bleibt: welche Faktoren induzieren den Selektionsdruck, ein antiapoptotisches Programm zu entwerfen (Schneider et al., 2005). Die NF- κ B-Aktivität war jedoch nicht Gegenstand dieser vorliegenden Arbeit.

Mangelnde Vergleichbarkeit der Studien zur Bedeutung von TRAIL für das Pankreaskarzinom ergab sich aus dem Einsatz verschiedener Zelllinien. Die Pankreaskarzinomzelllinien PaTu 8988t, PaTu 8988s, PC-2 und Capan-2 wurden in den hier zitierten Arbeitsgruppen nicht eingesetzt. PaTu 8988t, PaTu 8988s, PC-2 und Capan-2 repräsentierten im Zellmodell Pankreasadenokarzinome. Wie in allen Systemen sollte eine Extrapolation von *in vitro* Untersuchungen mit Zellmodellen auf die Situation *in vivo* mit Vorbehalt durchgeführt werden.

5.2 Modulation von OPG in Pankreaskarzinomzellen

Androgene werden hauptsächlich in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens gebildet. Zusätzlich findet ihre Produktion in der Nebenniere (*Dehydroepiandrosteron*; *DHEA*) und im Ovar statt. Das vorwiegend zirkulierende Androgen beim Mann ist Testosteron. In den Zielorganen, z. B. in der Prostata, ist die reduzierte Form des Testosterons – *5 α -Dihydrotestosteron* (*5 α -DHT*) – das biologisch wirksamste Androgen. Das Enzym *5 α -Reduktase* reduziert Testosteron zu DHT (Gärtner & Haen, 2001). Es existieren zwei Isoformen des Enzyms, *5 α -Reduktase 1* und *2*, wobei die Letztere in den Zielgeweben von Androgenen gefunden wird. Diese ist verantwortlich für viele differentielle, wachstumsfördernde und funktionale Aspekte der männlichen sexuellen Differenzierung und Virilisierung. Testosteron gelangt durch Diffusion in die Zielzelle und bindet im Zellkern entweder in Form von Testosteron oder *5 α -DHT* an das Androgen-

Rezeptorprotein. Der Hormonrezeptorkomplex lagert sich an spezifische DNA-Sequenzen an, um die Transkription von mRNA und sich daraus fortsetzend die Synthese von zellulären Proteinen zu regulieren. Obwohl Testosteron und 5α -DHT an den gleichen Rezeptor binden, unterscheiden sich ihre physiologischen Rollen. Der Testosteron-Rezeptor-Komplex spielt eine Rolle in der Gonadotropinsekretion, der Spermatogenese und während der sexuellen Differenzierung bei der Ausbildung des Wolf-Gang. Der Komplex aus 5α -DHT und dem Rezeptor hingegen ist verantwortlich für die äußeren männlichen Geschlechtsmerkmale während der Embryogenese und für die meisten androgenen Wirkungen während der sexuellen Entwicklung und beim Erwachsenen (Griffin & Wilson, 2001).

In Pankreaskarzinomen wurden zusätzlich zu den im Kapitel 4.2.1 beschriebenen Steroidhormonrezeptoren die Enzyme der Steroidbiosynthese Aromatase und 5α -Dehydrogenase nachgewiesen. Die Aktivität dieser Enzyme war in malignem Pankreasgewebe stärker als in fetalem und normalem Gewebe (Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001). Die Aromatase katalysiert die Reaktion von Testosteron zu Östradiol und die 5α -Dehydrogenase konvertiert Testosteron in seinen aktiveren Metaboliten 5α -DHT. Die Bedeutung dieser Ergebnisse könnte durch die niedrigen Serumtestosteronspiegel, die bei männlichen Pankreaskarzinompatienten gefunden wurden, deutlich werden. Frauen mit Pankreaskarzinomen zeigten Testosteronwerte im unteren Normbereich. Gewichtsverlust und Unterernährung erklärten diese niedrigen Testosteronspiegel nicht in ausreichendem Maße (Greenway et al., 1987). Nach der Resektion des neoplastischen Pankreasgewebes kam es bei den Patienten zu einem Anstieg der Testosteronspiegel (Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001).

Einen interessanten und frühen Marker des Pankreaskarzinoms stellt das Verhältnis von Testosteron zu DHT im Serum dar, welches normal bei 10 liegt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Verhältnis bei 91% der Männer mit Pankreaskarzinomen unter 5 sinkt (Warshaw & Fernández-Del Castillo, 1992; Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001). Der Testosteron/DHT-Quotient zeigte im Vergleich zu CA 19-9-Spiegeln eine entsprechende Sensitivität, aber eine höhere Spezifität für die Diagnostik des Pankreaskarzinoms. Zusätzlich war die Anzahl der diagnostizierten Tumoren im Stadium I höher als bei CA 19-9-Spiegeln, die häufig in frühen Tumorstadien im Normbereich liegen (Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001). Diese Veränderungen im

Androgenprofil des Serums unterschieden das Pankreaskarzinom von der chronischen Pankreatitis und humanen Tumoren des unteren Gallengangssystems und der Papille (Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001). Zusammenfassend weisen die beschriebenen Ergebnisse der Forschung zur Bedeutung von Steroidhormonen für das Pankreaskarzinom darauf hin, dass die 5α -Dehydrogenase im Pankreaskarzinomgewebe zur Konversion von Serumtestosteron zu 5α -DHT beiträgt und auf diesem Weg der Testosteronspiegel sinken und sich der Testosteron/DHT-Quotient verschieben könnte.

Hofbauer et al. demonstrierten 2002, dass 5α -DHT und Testosteron die OPG-Produktion verschiedener osteoblastischer Zelllinien dosisabhängig auf mRNA- und Proteinebene hemmen. Diese hemmende Wirkung konnte komplett durch das Antiandrogen Hydroxyflutamid aufgehoben werden, welches einzeln eingesetzt steigernd auf die OPG-Expression wirkte. Des Weiteren waren die hemmenden Effekte der Androgene auf die OPG-Produktion in Osteoblastenzelllinien gegenteilig zu denen von Östrogenen (Hofbauer et al., 2002b).

Die vorliegende Northern Blot- und ELISA-Analyse ergab die Hemmung der OPG-mRNA- und -Proteinexpression in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu 8988t durch Testosteron auf 30,3 bzw. 49,2% der Kontrolle. Zusätzlich zum Dosisseffekt demonstrierten PaTu 8988t-Zellen eine Abhängigkeit bezüglich der Expositionszeit mit Testosteron. Die hemmende Wirkung wurde auf mRNA-Ebene mit zunehmendem Behandlungszeitraum von 12 bis 48 h intensiver. Die OPG-Proteinspiegel betragen nach 12 h 69,4% und nach 24 h 30,9% der Kontrolle. PaTu 8988t-Zellen exprimierten OPG unabhängig von der Inkubation mit dem potenten Androgen 5α -DHT. Im Gegensatz dazu gelang im Northern Blot der PC-2-Zellen der Nachweis eines hemmenden Effektes von 5α -DHT auf die Produktion von OPG.

Die Tumorwachstumsrate humaner Pankreasadenokarzinome in einem Nacktmausmodell wurde durch Testosteron stimuliert und durch das Antiandrogen Cyproteronacetat gehemmt (Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001). Andrén-Sandberg et al. zeigten 1999, dass sowohl Glukokortikoide als auch Androgene die Proliferation pankreatischer Tumorzelllinien stimulieren. Östradiol führte bei einer der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien ebenfalls zu einer erhöhten Wachstumsrate. Die weiteren eingesetzten Zelllinien wurden durch die Behandlung mit Östrogen, Antiöstrogen,

Antiandrogen, Progesteron und Enzyminhibitoren des Steroidmetabolismus unterschiedlich stark in ihrem Wachstum gehemmt (Andrén-Sandberg et al., 1999). Ein Hemmstoff der 5 α -Dehydrogenase mit geringer Affinität zu Androgenrezeptoren minimierte das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen bis auf 40% der Kontrollen. Im Vergleich dazu konnten einem potenten Androgenrezeptorantagonisten ohne Einfluss auf die 5 α -Dehydrogenase nicht in allen Zelllinien hemmende Effekte nachgewiesen werden (Andrén-Sandberg et al., 1999). Diese zitierten Untersuchungen wiesen darauf hin, dass der steroidabhängige, wachstumsbegrenzende Mechanismus einiger Pankreaskarzinome sowohl Rezeptorantagonismus als auch direkte Hemmung der Oxidoreduktase involviert (Andrén-Sandberg et al., 1999). Die Bedeutung dieser hormonellen Einflüsse auf Pankreaskarzinomzellen *in vivo* sollte in klinischen Studien diskutiert werden. Möglicherweise erklären die Effekte von Testosteron und Östrogen die Verteilung des Pankreasadenokarzinoms zwischen Männern und Frauen von 1,25 bis 1,75 zu 1. Naturgemäß würde eine Veränderung im hormonellen Milieu keine Heilung von Pankreastumoren bewirken. Die Hormontherapie könnte dennoch wie beim Prostata- und Mammakarzinom einen großen Fortschritt in der Behandlung einer „nicht behandelbaren“ Erkrankung darstellen.

Die hemmende Wirkung von Androgenen auf die OPG-Produktion konnte in den eigenen Untersuchungen neben Testosteron auch für das adrenale Androgen DHEA bei der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu 8988t veranschaulicht werden. Sowohl im Northern Blot als auch auf Proteinebene im ELISA stellte sich eine Hemmung der OPG-Produktion dar, wobei sie bei verschiedenen Konzentrationen deutlich wurde. Im durchgeführten ELISA präsentierten sich die Proteinkonzentrationen unter der Behandlung mit DHEA im Vergleich zur Kontrolle durchgehend niedriger – zwischen 78 und 17% der Kontrolle –.

Melvin et al. beschrieben 1997 die hemmenden Effekte des adrenalen Androgens DHEA auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* und bei Untersuchungen in Nacktmäusen *in vivo* (Melvin et al., 1997). Oral substituiertes DHEA führte, nachdem es in der Gruppe von Melvin et al. 1997 täglich intraperitoneal injiziert worden war, ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung subkutan implantierter humaner Pankreaskarzinomzellen in Nacktmäusen (Muscarella et al., 1998). DHEA-Spiegel haben ihr Maximum in der Adoleszenz und nehmen im Alter ab.

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem zunehmenden Tumorrisiko im Alter und dem Rückgang der DHEA-Spiegel. Der genaue Mechanismus, der zur Hemmung durch DHEA führt, ist nicht aufgeklärt. DHEA ist ein direkter, nicht kompetitiver Antagonist des Enzyms Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und die Hemmung an dieser Stelle sollte als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym signifikant den Metabolismus des Hexosemonophosphatzyklus limitieren. Der Zyklus spielt eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Tumorzellen und ist in vielen Tumoren hochreguliert. Wahrscheinlich stellt der beobachtete antiproliferative Effekt von DHEA ein multifaktorielles Geschehen dar. DHEA führte nicht zum Absterben von Tumorzellen oder zur Regression von Tumorgröße, aber das Tumorwachstum wurde signifikant gehemmt (Melvin et al., 1997).

Bei der Verwendung von 17β -Östradiol in den präsentierten Untersuchungen ergaben sich keine regulierenden Effekte auf die OPG-Produktion. Das *in vivo* Wachstum einer 17β -Östradiol bindenden duktales Pankreaskarzinomzelllinie wurde in mit Östrogen behandelten Tieren deutlich gehemmt (Andrén-Sandberg et al., 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Östradiolbehandlung dosisabhängig hocheffektiv die Entwicklung und das Wachstum preneoplastischer Läsionen in Pankreasgewebe verhinderte. In klinischen Studien hat das Antiöstrogen Tamoxifen mehrfach keine signifikanten Effekte in Bezug auf das Pankreaskarzinom gezeigt (Andrén-Sandberg et al., 1999). Im Vergleich zu weiblichen Ratten traten preneoplastische azinäre Läsionen in größerer Anzahl in männlichen Tieren auf. Kastration reduzierte merklich preneoplastische Läsionen auf vergleichbare Werte zu ovariectomierten Weibchen. Diese Effekte konnten durch die Gabe von Östrogen dosisabhängig weiter potenziert werden. Die Vorbehandlung von Ratten mit Kastration und die Kombination mit einer Estradiolsubstitution hemmte das Wachstum transplantiertes, azinäres Rattenkarzinomzellen. Diese Effekte auf die pankreatische Tumorgenese konnten in Hamstern, die mit verschiedenen karzinogenen Substanzen spezifisch für die Induktion von duktales Karzinomen behandelt worden waren, nicht nachgewiesen werden (Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001). Folglich ist die Repräsentativität von Ratte und Hamster bzw. von azinärem und duktales Pankreaskarzinom nur bedingt gegeben. Es bleibt ebenfalls fraglich, inwieweit die Untersuchungen auf den Menschen übertragen werden können. Vor dem Hintergrund der beschriebenen Ergebnisse wurden klinische Studien zur Hormontherapie beim Pankreaskarzinom durchgeführt. Die gewonnenen Daten

sprachen nicht eindeutig für eine Manipulation durch Hormone (Robles-Diaz & Duarte-Rojo, 2001). Dennoch sollte dieser therapeutische Ansatz im Hinblick auf die mangelhaften Resultate, die von der aktuellen Therapie erreicht werden, mit anderen Medikamenten kombiniert und fortgeführt werden.

Das Glukokortikoid Dexamethason, das ergab die Auswertung der eigenen Daten, hemmte dosisabhängig die OPG-mRNA-Expression und die OPG-Proteinproduktion in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu 8988t. Lambert & Bui zeigten 1999, dass Dexamethason dosis- und zeitabhängig die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in einer in Ratten induzierten Pankreaskarzinomzelllinie reduzierte. Ferner reagierten diese Zellen auf die Behandlung mit Dexamethason in Form von Differenzierung und verringerter Proliferationsrate (Lambert & Bui, 1999). Hofbauer et al. gelang 1999 der Nachweis regulierender Effekte des Glukokortikoids Dexamethason auf OPG und RANKL in verschiedenen humanen osteoblastischen Zelllinien unabhängig vom Grad deren Differenzierung. Die mRNA- und Proteinspiegel von OPG wurden zeit- und dosisabhängig durch die Behandlung mit Dexamethason gehemmt (Hofbauer et al., 1999). Der Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid vermochte nicht diese Hemmung zu verhindern (Hofbauer et al., 1999). Die Expression von RANKL-mRNA wurde durch Dexamethason stimulierend beeinflusst (Hofbauer et al., 1999). Kajino et al. beschrieben 2000 Glukokortikoide als effektive Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Kajino et al., 2000).

Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort und zeigen ebenso eine Funktion in der Tumorphathogenese und Progression, wie die Expression einer Vielzahl von Zytokinen in Pankreastumoren verdeutlicht. Zytokine sind an der Attraktion von Entzündungszellen, Veränderung von Adhäsionsmolekülen und Chemotaxis beteiligt und vermitteln verschiedene Interaktionen zwischen Tumorzellen und der extrazellulären Matrix (Friess et al., 1999). Die Zytokine IL-1 β und TNF- α erzielten in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien keine regulierenden Effekte auf die Expression von OPG. IL-8 hingegen steigerte in der vorliegenden Arbeit diskret die OPG-Produktion in PaTu 8988t-Zellen. Bei Hofbauer et al. stimulierte die Behandlung einer folliculären Schilddrüsenzelllinie mit IL-1 β und TNF- α sowohl die OPG- und RANKL-mRNA- als auch die -Proteinsynthese (Hofbauer et al., 2002a). Die Induktion von RANKL und seinem Decoy-Rezeptor OPG durch diese Zytokine war zuvor in

humanen Stromazellen des Knochenmarks und osteoblastischen Zellen gezeigt worden (Hofbauer et al., 2002a).

IL-1 β und TNF- α induzierten differenzierte Adhäsionsmoleküle, die die Fähigkeit von Pankreaskarzinomzellen zu metastasieren modifizieren. Der klinische Einsatz von TNF- α und *Interferon- γ* (IFN- γ) in der Behandlung des Pankreaskarzinoms resultierte nicht in einer Prognoseverbesserung. Die Kombination der beiden Zytokine führte – von IFN- γ ausgehend – bei den Patienten zu ernsthaften Nebenwirkungen (Friess et al., 1999). Die Bestimmung der TNF- α -Spiegel im Serum von Pankreaskarzinompatienten ergab einen Zusammenhang zwischen dem Stadium der Erkrankung und der Nachweisbarkeit von TNF- α . Das Serum-TNF- α (sTNF- α) konnte im Gegensatz zu denen mit lokalisiertem, nicht metastasiertem Tumor regelmäßig bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom gemessen werden. Zusätzlich wurde eine Beziehung zwischen den TNF- α -Spiegeln und Mangelernährungszuständen von Pankreaskarzinompatienten beschrieben. Patienten mit nachweisbarem sTNF- α hatten ein signifikant niedrigeres Körpergewicht und BMI, einen niedrigeren Hämatokrit-, Hämoglobin-, Serumgesamtprotein- und Albuminwert im Vergleich zu denen ohne nachweisbares sTNF- α (Karayiannakis et al., 2001).

Die Statine Lovastatin und Cerivastatin zeigten in diesem Versuchsaufbau zum Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die OPG-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien dosisabhängige hemmende Effekte auf die OPG-mRNA- und -Proteinspiegel. Lovastatin als Statin der ersten Generation hemmte die OPG-mRNA und -Proteinsekretion um 90,3%. PC-2-Zellen erwiesen sich in den dargestellten Untersuchungen als besonders sensibel gegenüber Cerivastatin. Die Nachweisbarkeit von OPG-mRNA und -Protein wurden durch Cerivastatin signifikant auf 72,8% der Kontrolle in PaTu 8988t- und 61% in PC-2-Zellen gesenkt. Die Hemmung bewies zusätzlich Abhängigkeit vom Inkubationszeitraum mit Cerivastatin. Der hemmende Einfluss des Statins auf die Expression von OPG-mRNA präsentierte sich bereits nach 12 h und nahm mit zunehmendem Expositionszeitraum an Intensität zu. Der zeitlich verzögerte Ablauf von Transkription und Translation zeigte sich in der später – nach 48 h – eintretenden Hemmung auf Proteinebene (69,2% der Kontrolle).

Retrospektive Untersuchungen klinischer Studien der Statine ergaben eine möglicherweise niedrigere Karzinominzidenz in Zusammenhang mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Cerivastatin hemmte die Proliferation und Invasivität hochaktiver, aggressiver Mammakarzinomzelllinien, wobei die Effekte auf weniger aggressive Zelllinien schwächer ausfielen. Im Vergleich zur wachstum-inhibierenden Potenz von Lovastatin verdeutlichte Cerivastatin in einer Auswahl humaner Tumorzelllinien eine potentere und vielfach effektivere antiproliferative Aktivität (Siegel-Axel, 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass Statine die Apoptose von Tumorzellen triggern. In Bezug auf Apoptose war Cerivastatin ebenfalls signifikant potenter als Lovastatin. Die von Cerivastatin induzierten apoptotischen Effekte schienen spezifisch für transformierte Zellen zu sein, da nicht transformierte humane Knochenmarksvorläuferzellen nicht beeinflusst wurden (Siegel-Axel, 2003). Im August 2001 wurde Cerivastatin – Lipobay® (Europa) und Baycol® (USA) – von dem Pharmakonzern Bayer wegen des dringenden Verdachtes der Induktion von Rhabdomyolyse weltweit vom Markt genommen. Diese Klinik hatte sich besonders bei den Patienten, die das Statin in Kombination mit einem weiteren Lipidsenker – Gemfibrozil – eingenommen hatten, gezeigt (Marwick, 2003; Siegel-Axel, 2003).

Lovastatin hemmte die durch den “epidermal growth factor“ (EGF) vermittelte *in vitro* Invasion humaner Pankreaskarzinomzellen (Kusama et al., 2002). Hohe Lovastatindosen (25-40 mg/kgKG/d, oral) könnten über einen kurzen Zeitraum in der Tumorthherapie eingesetzt werden. Dennoch besitzt Lovastatin bereits eine gute antitumoröse Wirkung in einer Dosierung, die in der Langzeitbehandlung der menschlichen Hypercholesterinämie verabreicht wird (Kusama et al., 2002). Das lipophile Statin Atorvastatin zeigte in humanen Osteoblasten dosis- und zeitabhängige stimulierende Effekte auf die OPG-Expression. Gleichzeitig konnte die Hemmung der OPG-Produktion durch Dexamethason durch die simultane Behandlung der Zellen mit Atorvastatin aufgehoben werden (Viereck et al., 2005). Die RANKL-Genexpression wurde durch Atorvastatin nicht beeinflusst (Viereck et al., 2005). Zusammenfassend besitzt die Klasse der Statine pleiotrope Wirkungen – Anti-Tumoreffekte eingeschlossen –. Interessant erscheint die Rolle von OPG und TRAIL in diesem System der antiproliferativen Wirkung auf Karzinome.

Umfangreiche Studien haben verdeutlicht, dass die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in den unterschiedlichsten humanen Tumoren wie Pankreas-, Kolon-, Lungen-, Magen- und Ösophaguskarzinomen hochreguliert ist. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass Indometacin als nicht-selektiver Antagonist der COX in Abhängigkeit zu der verwendeten Konzentration signifikant die OPG-mRNA-Expression und die OPG-Proteinspiegel hemmte.

Der Vergleich von Yip-Schneider et al. von Tumorgewebe des Pankreas und normalem Pankreasgewebe in Bezug auf die Proteinproduktion von COX-2 ergab erhöhte Proteinspiegel im Tumorgewebe bei kaum nachweisbaren COX-2-Spiegeln im normalen Pankreasgewebe. Interessant erschien dieser Unterschied als Faktor der Karzinogenese (Yip-Schneider et al., 2000). Albazaz et al. bestätigten 2005 diese Ergebnisse. In pankreatischen intraepithelialen Neoplasien, PanIN, stieg die COX-2-Expression mit zunehmenden Veränderungen der Läsionen. Zusätzlich war die COX-2-Expression der PanIN erhöht im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe und Gewebe einer chronischen Pankreatitis (Albazaz et al., 2005). Nicht-selektive Inhibitoren der COX wie Indometacin aber auch selektive COX-2 Antagonisten hemmten die Tumorzellproliferation humaner Pankreaskarzinomzelllinien abhängig von der Konzentration und der Zeit. Beide Wirkstoffgruppen erzielten vergleichbare Potenzen, das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen zu hemmen. Dieses weist darauf hin, dass die Synthese von Eicosanoiden mittels COX-2 einen essenziellen Faktor für das Pankreaskarzinomwachstum darstellt (Ding et al., 2000; Ding et al., 2001). Die Hemmung des Zellwachstums durch Indometacin war sowohl in COX-2-positiven als auch in COX-2-negativen Pankreaskarzinomzelllinien nachweisbar (Yip-Schneider et al., 2000).

Die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit Indometacin und einem selektiven COX-2-Hemmer induzierte signifikant die Apoptose. Dieses wird als Hinweis dafür gewertet, dass die Hemmung des Zellwachstums vermittelt durch COX-Blockade zum Teil durch Apoptose bedingt ist. Die Hemmung der Proliferation in Kombination mit der Induktion von programmiertem Zelltod in Pankreaskarzinomzellen durch die COX deutet darauf hin, dass die COX und besonders die COX-2 potenzielle Ziele der Vorbeugung oder Therapie des Pankreaskarzinoms darstellen (Ding et al., 2000; Ding et al., 2001). Die kombinierte Therapie aus selektiven Hemmstoffen der COX-2 und der

Lipoxygenase-5 – ein Enzym der Leukotriensynthese, Mediatoren entzündlicher und allergischer Reaktionen – senkte signifikant die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen eines duktales Pankreasadenokarzinoms in Hamstern (Gregor et al., 2005). Diese Ergebnisse und Sichtweisen werden durch die Erkenntnisse von McDade et al. aus dem Jahr 1999 unterstrichen, dass Salizylate die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges blockierten. Salizylate gehören ebenfalls zu den nichtsteroidalen Antirheumatika und hemmen irreversibel, jedoch unspezifisch die COX (McDade et al., 1999). In einer Pankreaskarzinomzelllinie verstärkten Salizylate signifikant die TNF- α vermittelte Apoptose, während einzeln eingesetzt die apoptotischen Effekte sowohl von Salicylaten als auch von TNF- α nicht beeindruckend ausfielen (McDade et al., 1999). Ergänzende Untersuchungen zum Einfluss von nichtsteroidalen Antirheumatika auf die Expression von OPG könnten die Wirkstoffgruppe der selektiven COX-2-Hemmer einschließen.

Die Untersuchungen schlossen serumhaltiges Medium in der Zellkultur ein. Das Kälber- und Pferdeserum enthält endogenes Testosteron und andere Steroidhormone, Wachstumsfaktoren und große Mengen unspezifischer steroidbindender Proteine. Der Einsatz von Serum in der Zellkultur war zur Gewährleistung einer ausreichenden Zellvitalität erforderlich. Alle Untersuchungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt und jeweils eine Kontrolle angefertigt.

5.3 Mögliche klinische Relevanz von OPG für das Pankreaskarzinom

Serum-OPG-Spiegel steigen mit zunehmendem Alter sowohl bei gesunden Männern als auch bei gesunden Frauen an (Khosla et al., 2002; Kudlacek et al., 2003). Der steilste Anstieg wurde bei Frauen in der sechsten und bei Männern in der siebten Dekade beobachtet. Eine geringe Variabilität zeigten die Serum-OPG-Spiegel bei Frauen und Männern im Alter unter 50 Jahren. Bei älteren Menschen hingegen war die Variabilität ausgeprägter (Kudlacek et al., 2003). Die Angaben bezüglich eines Zusammenhanges der Serumspiegel von Steroidhormonen und OPG differieren. Kudlacek et al. beschrieben eine positive Korrelation von Testosteron und OPG im Serum von Männern als Hinweis einer möglichen Regulation von OPG durch Testosteron (Kudlacek et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Khosla et al. eine umgekehrte Korrelation von

OPG- und Testosteronspiegeln bei 50-jährigen und älteren Männern. Bei Frauen konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (Khosla et al., 2002; Kudlacek et al., 2003). In Untersuchungen mit Männern, die akut medikamentös-induziertem Hypogonadismus durch den Einsatz eines GnRH-Analogons und eines Aromataseinhibitors ausgesetzt wurden und mit Testosteron, Östrogen oder beiden Hormonen substituiert wurden, hemmte Testosteron die OPG-Spiegel im Serum während Östrogen diese steigerte (Khosla et al., 2002). Die Gründe des altersabhängigen Anstiegs der OPG-Spiegel sind noch nicht aufgeklärt und weitere Studien sind erforderlich, die erörtern, ob eine vermehrte Produktion oder eine eingeschränkte Ausscheidung im Alter dafür verantwortlich sind.

Prostatakarzinomzellen exprimierten *in vitro* OPG und sezernierten biologisch aktive Mengen dieses Moleküls ins Kulturmedium (Holen et al., 2002; Penno et al., 2002). Penno et al. beschrieben 2002 eine Hochregulation der OPG-Expression durch IL-1 und TNF- α . Die OPG-Sekretion nicht maligner Prostatazellen wurde im Gegensatz dazu durch die inflammatorischen Zytokine nicht beeinflusst (Penno et al., 2002). Holen et al. beschrieben 2002 die signifikante Protektion von Prostatakarzinomzellen vor TRAIL induzierter Apoptose durch rekombinantes OPG in einer Dosierung zwischen 1 und 10 ng/ml (Abb. 5.1). Das endogene OPG war zuvor ausgeschaltet worden. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch spätere Untersuchungen, in denen TRAIL induzierte Apoptose in Kulturen durch Medium, welches ca. 2 bis 2,5 ng/ml endogen produziertes OPG enthielt, gehemmt wurde. Der antiapoptotische Effekt von OPG konnte durch eine gleichzeitige Behandlung mit sRANKL komplett aufgehoben werden (Abb. 5.1). sRANKL alleine hatte keinen Einfluss auf die Apoptose der Zellen. Kulturen, die mit TRAIL und sRANKL behandelt worden waren, zeigten durchgehend höhere Apoptoseraten als nach einer alleinigen Behandlung mit TRAIL (Abb. 5.1) (Holen et al., 2002).

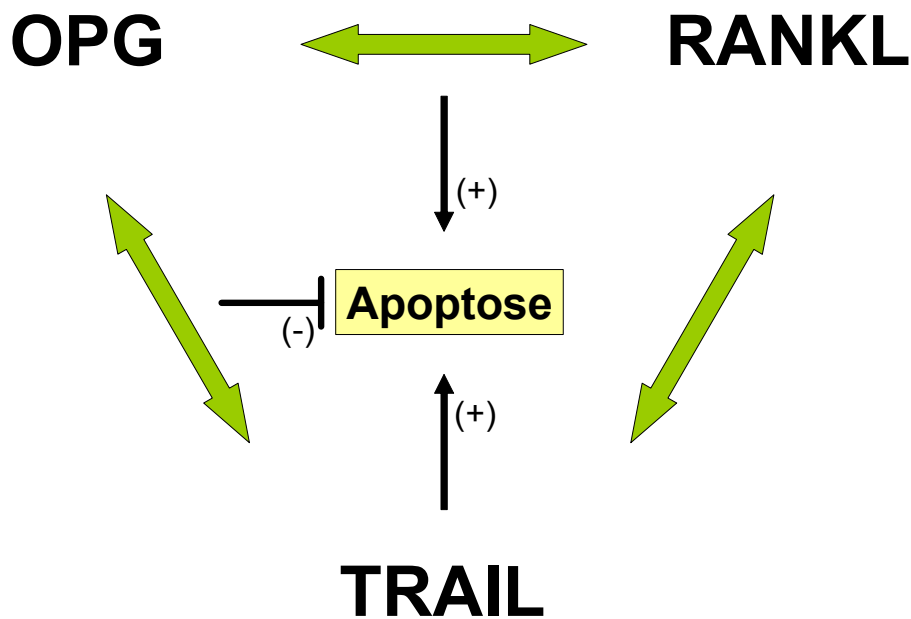


Abb. 5.1 Interaktion von OPG, RANKL und TRAIL

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.

Prostatakarzinomzellen zeigten in Bezug auf die OPG-Expression Parallelitäten zu unseren Untersuchungen mit Zellen des Pankreaskarzinoms. In zwei der vier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien konnten in der eigenen Arbeit OPG-mRNA und sezerniertes OPG nachgewiesen werden, wobei die Zelllinie PaTu 8988t deutlich höhere OPG-mRNA- und -Proteinspiegel exprimierte als PC-2. Satoh et al. beschrieben 2001 die Produktion von OPG-mRNA in 8 von 17 duktalem Pankreaskarzinomgeweben, wobei dieser Nachweis in gesundem Pankreasgewebe nicht gelang (Satoh et al., 2001). Auch die OPG-Expression in Prostatakarzinomzelllinien variierte. In den Untersuchungen von Holen et al. aus dem Jahr 2002 produzierten zwei Prostatakarzinomzelllinien deutlich höhere OPG-Mengen unter identischen Bedingungen im Vergleich zu einer dritten Zelllinie. Wenn man davon ausgeht, dass die Produktion von

OPG einen sehr wichtigen Mechanismus der Karzinomzellen darstellt, sich vor TRAIL induzierter Apoptose zu schützen, müssten Zellen, die weniger bzw. kein OPG exprimieren, sensitiver gegenüber TRAIL sein im Vergleich zu Zellen mit hoher OPG-Produktion (Abb. 5.1). Ferner stellt die Expression der Apoptose hemmenden TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 einen Faktor in der Interaktion von TRAIL und den Zielzellen dar. Für das Pankreaskarzinom sind weitere Studien erforderlich, um die Bedeutung von OPG und seinem Liganden TRAIL aufzudecken. Die oben beschriebene Theorie konnte in Bezug auf das Prostatakarzinom bereits zum Teil widerlegt werden, da die Zelllinie mit einer niedrigen OPG-Produktion sich resistent gegenüber TRAIL zeigte (Holen et al., 2002). Demzufolge werden von Tumorzellen multiple Mechanismen angewandt, um der Auslösung von Apoptose durch TRAIL zu entgehen. Inwieweit eine OPG-Produktion in Zellen, die TRAIL ausgesetzt werden, induziert werden kann, sollte ebenfalls Fokus zukünftiger Untersuchungen sein. Ansteigende OPG-Spiegel als Folge einer Exposition mit Tumornekrosefaktoren und anderen Zytokinen konnten bereits in anderen Zelllinien nachgewiesen werden (Holen et al., 2002). Es ist nahe liegend, dass die OPG-Expression feinregulatorischen Mechanismen unterliegt, die jeweils eine Anpassung auf das extrazelluläre Milieu ermöglichen. Zusammenfassend weisen Studien auf die Komplexität zellulärer Antworten auf apoptotische Signale von Mitgliedern der TNF-Familie hin. Des Weiteren sind diese Antworten und deren Modulation zellspezifisch und interagieren mit antiapoptotischen Signalen, die mit dem Mikromilieu, dem der Tumor ausgesetzt ist, assoziiert sind (Holen et al., 2002).

Die Ergebnisse von Hylander et al. aus dem Jahr 2005 wiesen auf eine heterogene Ansprechrate von Pankreaskarzinomen auf TRAIL unter klinischen Bedingungen hin. Diese umfassten hochsensitive Tumoren und solche, die resistent gegenüber TRAIL induzierter Apoptose waren (Abb. 5.1). Die molekularen Grundlagen dieser Heterogenität bedürfen weiterer Aufklärung (Hylander et al., 2005). Sehr erfolgsversprechend sind die Untersuchungen der therapeutischen Effizienz einer Kombination aus TRAIL und Gemcitabine. In den meisten Pankreaskarzinomen bewirkte die Kombination von Gemcitabine und TRAIL einen größeren Anti-Tumoreffekt als die Substanzen einzeln eingesetzt erzielten (Hylander et al., 2005).

Lipton et al. beschrieben 2002 erhöhte OPG-Werte im Serum von Patienten mit kolorektalen und Pankreaskarzinomen (Lipton et al., 2002). Unbehandelte Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom hatten signifikant höhere Serum-OPG-Spiegel als solche mit organbegrenzter Erkrankung. Zusätzlich waren die OPG-Spiegel bei Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom, die auf eine antiandrogene Therapie ansprachen, deutlich niedriger als in der Vergleichsgruppe mit klinisch progredienter Erkrankung (Eaton et al., 2004). Die OPG-Proteinexpression in dem Gewebe von Magenkarzinomen korrelierte signifikant mit der Tiefe der Tumordinvasion, Lymphknotenmetastasen und fortgeschrittenen Tumorstadien. Es zeigte sich, dass die Prognose der Patienten mit starker OPG-Produktion deutlich schlechter war im Vergleich zu denen mit schwacher oder ohne OPG-Expression (Ito et al., 2003). Abschließend sollte festgehalten werden, dass OPG möglicherweise einen Faktor der Karzinogenese, Invasion und Metastasierung darstellt und einen neuen molekularen Marker für die Aggressivität von Magen- und Prostata-, aber auch anderen Karzinomen darstellen könnte.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass das Pankreas sowohl eine Produktionsstätte als auch ein potenzielles Ziel des OPG-RANKL-Zytokinsystems darstellt. Zukünftige Studien sollten die genaue Interaktion von OPG und TRAIL in dem Zellverband eines Pankreaskarzinoms evaluieren. Die Erkenntnisse unserer Untersuchungen sollten in die Planung dieser Studien einfließen, um über die Regulation von OPG Einfluss auf TRAIL induzierte Apoptose in Pankreaskarzinomzellen zu nehmen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Modulation zellulärer Apoptoseprozesse ist nicht nur essenziell für die normale Zellphysiologie, sondern auch von fundamentaler Bedeutung in der Karzinogenese. Störungen zellulärer Kontrollmechanismen der Apoptose gelten als kritisches Ereignis in der Initiierung und Progression von Tumoren. Eine reduzierte Apoptoserate wird ferner als wichtiger Mechanismus für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber einer Radio- und Chemotherapie angesehen. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den Tumoren, die weitgehend resistent gegenüber einer konventionellen Chemotherapie sind. Basierend auf den bisherigen Befunden zur Pathogenese des Pankreaskarzinoms und den Vorarbeiten zum Thema RANKL-OPG-System war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression und Modulation der OPG-mRNA-Produktion und OPG-Proteinsekretion in humanen Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen.

Als Zellmodelle wurden die Adenokarzinomzelllinien PaTu 8988t, PaTu 8988s, PC-2 und Capan-2 analysiert und der Effekt von Steroidhormonen, Zytokinen und Medikamenten auf die OPG-Expression evaluiert. Die Genexpression wurde mittels Northern Blot und PCR, die Proteinsekretion mittels ELISA bestimmt. Osteoprotegerin (OPG) und Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) stellen spezifische Rezeptoren und Liganden der TNF-Superfamilie dar, deren Produktion bislang in verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen werden konnte. Im Anschluss an den Nachweis von OPG-mRNA im Pankreasgewebe mittels eines kommerziellen Northern Blots konnte OPG auf mRNA- und Proteinebene in zwei der vier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien (PaTu 8988t und PC-2) nachgewiesen werden. Die PaTu 8988s- und Capan-2-Zellen zeigten dagegen keine Produktion von OPG. Zusätzlich exprimierten PaTu 8988t-Zellen auf mRNA-Ebene RANKL.

Für Testosteron ergab sich eine dosis- und zeitabhängige Hemmung der OPG-mRNA- und -Proteinexpression in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu 8988t um 70 bis 77%, während 5 α -DHT und 17 β -Östradiol keine Effekte hatten. Das adrenale Androgen DHEA hemmte die OPG-Produktion um 83%. In den PC-2-Zellen hingegen senkte das gonadale Androgen 5 α -DHT die OPG-Expression. Nach der Exposition der Zelllinie PaTu 8988t durch das Glukokortikoid Dexamethason kam es ebenfalls zu einer

dosisabhängigen Hemmung der OPG-mRNA-Spiegel und der OPG-Proteinproduktion um 23%.

Aufgrund der wichtigen Rolle von Zytokinen im Rahmen der Tumorummunologie und der Modulation der Apoptose beim Pankreaskarzinom wurden unterschiedliche Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IL-8) hinsichtlich ihrer Regulation der OPG-Produktion untersucht. Im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen jedoch hatten diese Zytokine – IL-8 ausgenommen – keinen Einfluss auf die OPG-Expression. Die Behandlung mit IL-8 führte zu einer leichten Steigerung der OPG-mRNA-Produktion in PaTu 8988t-Zellen.

Die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin und Cerivastatin zeigten in Pankreaskarzinomzelllinien hemmende Effekte auf die OPG-mRNA- und OPG-Proteinexpression. Lovastatin als Statin der ersten Generation senkte die OPG-mRNA- und -Proteinsekretion in PaTu 8988t-Zellen um 90%. Des Weiteren wurden die OPG-mRNA- und OPG-Proteinspiegel durch Cerivastatin in PaTu 8988t-Zellen um 27% und in PC-2-Zellen um 39% gesenkt. Diese Hemmung durch Statine war dosis- und zeitabhängig. Die Hemmung der OPG-Produktion in Pankreaskarzinomzelllinien ist ein weiterer Beleg für die pleiotropen Wirkungen der Statine, die klinisch hinsichtlich ihrer Apoptose modulierenden Effekte auf Pankreaskarzinomzellen genauer untersucht werden sollten.

Zusammenfassend weisen die eigenen Ergebnisse in Zusammenschau mit den Arbeiten anderer Gruppen darauf hin, dass das Pankreas sowohl eine Produktionsstätte als auch ein potenzielles Ziel von OPG darstellt, einem wichtigen osteotropen und Apoptose modulierenden Zytokin der TNF-Rezeptorsuperfamilie. Zukünftige Studien sollten die genaue Interaktion von OPG und TRAIL sowie ihre Bedeutung für die Entstehung, Progression und Metastasierung des Pankreaskarzinoms analysieren. Diese Erkenntnisse könnten die Basis künftiger klinischer Studien sein, in denen die gezielte Modulation der Apoptose als therapeutisches Prinzip bei Patienten mit Pankreaskarzinomen eingesetzt werden kann.

7. LITERATUR

- Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, Ono K, Shinomiya N, Tsuda E, Mochizuki S-I, Yamaguchi K, Kinoshita M, Higashio K, Yamamoto M, Motoyoshi K, Nagata N. Osteoclastogenesis-inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:229-234.
- Albazaz R, Verbeke CS, Rahman SH, McMahon MJ. Cyclooxygenase-2 expression associated with severity of PanIN lesions: a possible link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatology* 2005;5:361-369.
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridisation with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1977;74:5350-5354.
- 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.
- Andrén-Sandberg A, Hoem D, Bäckman PL. Other risk factors for pancreatic cancer: hormonal aspects. *Ann Oncol* 1999;10:131-135.
- Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992;130:167-178.
- Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17:3261-3270.

- Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002;2:897-909.
- Bonner W. Autoradiograms: ³⁵S and ³²P. *Methods Enzymol* 1987;152:55-61.
- 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.
- 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.
- Capparelli C, Kostenuik PJ, Morony S, Starnes C, Weimann B, Van G, Scully S, Qi M, Lacey DL, Dunstan CR. Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 2000;60:783-787.
- 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.
- Chandler NM, Canete JJ, Callery MP. Increased expression of NF-kappa B subunits in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 2004;118:9-14.
- Chen J, Liu TH, Guo XY, Ye SF. Two new human exocrine pancreatic adenocarcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Chin Med J (Engl)* 1990;103:369-375.
- Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF-κB and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:20659-20672.

- Corbishley TP, Iqbal MJ, Wilkinson ML, Williams R. Androgen receptor in human normal and malignant pancreatic tissue and cell lines. *Cancer* 1986;57:1992-1995.
- Ding XZ, Tong WG, Adrian TE. Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20:2625-2632.
- Ding XZ, Tong WG, Adrian TE. Cyclooxygenases and lipoxygenases as potential targets for treatment of pancreatic cancer. Review *Pancreatology* 2001;1:291-299.
- Eaton CL, Wells JM, Holen I, Croucher PI, Hamdy FC. Serum osteoprotegerin (OPG) levels are associated with disease progression and response to androgen ablation in patients with prostate cancer. *Prostate* 2004;59:304-310.
- Elsässer HP, Lehr U, Agricola B, Kern HF. Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1992;61:295-306.
- Emery JG, McDonnell P, Brigham Burke M, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273:14363-14367.
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41-50.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132:6-13.
- Friess H, Guo XZ, Nan BC, Kleeff Ö, Büchler MW. Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1999;880:110-121.

- Frohman M, Dush M, Martin G. Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8998-9002.
- 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.
- Ghadirian P, Lynch HAT, Krewski D. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 2003;27:87-93.
- 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.
- Greenway BA, Iqbal MJ, Johnson PJ, Williams R. Oestrogen receptor proteins in malignant and foetal pancreas. *Br Med J* 1981;283:751-753.
- Greenway BA. Carcinoma of the exocrine pancreas: a sex hormone responsive tumor? *Br J Surg* 1987;74:441-442.
- Gregor JJ, Kilian M, Heukamp I, Kiewert C, Kristiansen G, Schimke I, Walz MK, Jacobi CA, Wenger FA. Effects of selective COX-2 and 5-LOX inhibition on prostaglandin and leukotriene synthesis in ductal pancreatic cancer in Syrian hamster. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:89-97.
- Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testes. 2143-2154. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds.), *HPIM*, 15th edition, McGraw-Hill, New York 2001.
- Guisse TA. Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 2000;88:2892-2898.
- Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, Miyata T, Kumegawa M. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:796-801.

- Heremans H, Billiau A, Cassiman JJ, Mulier JC, de Somer P. *In vitro* cultivation of human tumor tissues. II. Morphological and virological characterization of three cell lines. *Oncology* 1978;35:246-252.
- 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, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: Potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-4389.
- Hofbauer LC, Khosla S, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.
- Hofbauer LC, 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* 2001;92:460-470.
- 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 Endocrinology* 2002b;147:269-273.
- 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.

- 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.
- 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.
- Hylander BL, Pitoniak R, Penetrante RB, Gibbs JF, Oktay D, Cheng J, Repasky EA. The anti-tumor effect of Apo2L/TRAIL on patient pancreatic adenocarcinomas grown as xenografts in SCID mice. *Transl Med* 2005;3:22.
- 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.
- Ito R, Nakayama H, Yoshida K, Kuraoka K, Motoshita J, Oda N, Oue N, Yasui W. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003;443:146-151.
- 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.
- Kajino S, Suganuma M, Teranishi F, Takahashi N, Tetsuka T, Ohara H, Itoh M, Okamoto T. Evidence that de novo protein synthesis is dispensable for anti-apoptotic effects of NF- κ B. *Oncogene* 2000;19:2233-2239.
- Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K. Serum levels of tumor necrosis factor- α and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res* 2001;21:1355-1358.

- 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 extra skeletal tissues. *Bone* 1999;25:525-534.
- Keller C, Wolfram G. Fettstoffwechsel; Lipidsenker. 637-647. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann, Starke K (eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban und Fischer, München 2001.
- Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan C, Riggs BL. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002;13:394-399.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides: repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971;56:341-361.
- Klöppel G, Lingenthal G, von Bülow M, Kern HF. Histological and fine structural features of pancreatic ductal adenocarcinomas in relation to growth and prognosis. Studies in xenografted tumors and clinicohistopathologic correlation in a series of 75 cases. *Histopathology* 1985;9:841-856.
- 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.
- Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001;91:333-338.
- Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-309.

- Kong Y-Y, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: A regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 2000;21:495-502.
- Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Wada M, Lee JU, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Imamura M. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase- 2 expression in pancreatic tumors. *Int J Pancreatol* 1999;26:69-76.
- Krammer PH. CD95(APO/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999;99:163-210.
- Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003;32:681-686.
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Inoue M, Nakamura H. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002;122:308-317.
- 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.
- Kyriazis AA, Kyriazis AP, Sternberg CN, Sloane NH, Loveless JD. Morphological, biological, biochemical, and karyotypic characteristics of human pancreatic ductal adenocarcinoma Capan-2 in tissue culture and the nude mouse. *Cancer Res* 1986;46:5810-5815.
- 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.

- Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest* 2001;108:971-979.
- Lambert M, Bui ND. Dexamethasone-induced decrease in HMG-CoA reductase and protein-farnesyl transferase activities does not impair ras processing in AR 4-2 J cells. *Mol Cell Biochem* 1999;202:101-108.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical re-examination. *Biochemistry* 1977;16:4743-4751.
- Liao Q, Friess H, Kleeff J, Büchler MW. Differential expression of TRAIL-R3 and TRAIL-R4 in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3153-3160.
- 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.
- 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.
- Lockhart AC, Rothenberg ML, Berlin JD. Treatment for pancreatic cancer: current therapy and continued progress. *Gastroenterology* 2005;128:1642-1654.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P. Risk factors for pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2005;95:649-656.
- 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.
- Marwick C. Bayer is forced to release documents over withdrawal of cerivastatin. *BMJ* 2003;326:518.
- Mayer RJ. Pancreatic cancer. 591-593. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds.), *HPIM*, 15th edition, Mc Graw-Hill, New York 2001.
- McDade TP, Perugini RA, Vittimberga FJ Jr., Carrigan RC, Callery MP. Salicylates inhibit NK- κ B activation and enhance TNF- α -induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Surgical Res* 1999;83:56-61.
- Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acid immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 1984;138:267-284.
- Melvin WS, Boros LG, Muscarella P, Brandes JL, Johnson JA, Fisher WE, Schirmer WJ, Ellison EC. Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits pancreatic carcinoma cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Surgery* 1997;121:392-397.
- 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.
- Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000;192:463-474.

- Mizuno A, Murakami A, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin gene and its expression in embryogenesis. *Gene* 1998;215:339-343.
- 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, DL, 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.
- Muscarella P, Boros LG, Fisher WE, Rink C, Melvin WS. Oral dehydroepiandrosterone inhibits the growth of human pancreatic cancer in nude mice. *J Surgical Res* 1998;79:154-157.
- 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.
- Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujic M, Kondo M, Noura S, Oshima S, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Ishikawa O, Sakon M, Matsuura N, Nakamori S, Monden M. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 1999;5:2018-2024.

- Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, Mundy GR. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor κ B-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 2001;61:2572-2578.
- Ozawa F, Friess H, Kleeff J, Xu ZW, Zimmermann A, Sheikh MS, Büchler MW. Effects and expression of TRAIL and its apoptosis-promoting receptors in human pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2001;163:71-81.
- Penno H, Silfverswärd CJ, Frost A, Brändström H, Nilsson O, Ljunggren Ö. Osteoprotegerin secretion from prostate cancer is stimulated by cytokines, *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:451-455.
- Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jarrod M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Sola R, Salas A, Real FX. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 2005;7:189-197.
- Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1610-1616.
- Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:145-152.
- Robles-Diaz G, Duarte-Rojo A. Pancreas: a sex steroid-dependent tissue. *Isr Med Assoc J* 2001;3:364-368.
- Rocha Lima CMS, Centeno B. Update on pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 2002;14:424-430.
- Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3562-3571.

- 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.
- 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.
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 2005;128:1606-1625.
- Scwabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Evans DB, Chiao PJ. NF- κ B in pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33:15-26.
- 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.
- Siegel-Axel DI. Review Cerivastatin: a cellular and molecular drug for the future? *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2003;60:144-164.
- 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.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-182.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-357.

- 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.
- Thomas PS. Hybridisation of denatured RNA and small DNA-fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1980;77:5201-5205.
- 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.
- 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.
- Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;59:987-990.
- Viereck V, Gründker C, Blaschke S, Frosch KH, Schoppet M, Emons G, Hofbauer LC. Atorvastatin stimulates the production of osteoprotegerin by human osteoblasts. *J Cell Biochem* 2005; im Druck.
- Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Buchler MW. Curative resection is the most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2004;91:586-594.
- Wahl GM, Berger SL, Kimmel AR. Molecular hybridisation of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol* 1987;152:399-407.
- Warshaw AL, Fernández-Del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 1992;326:455-465.

- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-682.
- Williams GH, Dluhy RG. Disorders of the adrenal cortex. 2084-2105. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds.), *HPIM*, 15th edition, Mc Graw-Hill, New York 2001.
- 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.
- Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM. Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology* 2005;128:1626-1641.
- Xiong HQ, Abbruzzese JL, Lin E, Wang L, Zheng L, Xie K. NF-kappa B activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 2004;108:181-188.
- 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, Kinoshita 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.
- 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 (USA)* 1998b;95:3597-3602.
- Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Goggins M, Canto MI, Abrams RA, Laheru D, Jaffee EM, Hidalgo M, Yeo CJ. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002;26:176-275.
- Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilmann DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000;21:139-146.
- 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.
- 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.

8. ANHANG

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren

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

in Fulda: Arps, Bohner, Conze, Fassbinder, Feldmann, Günther, Hellinger, Jaspersen, Repp, Rüttger, Stegmann, Vogt, Wörsdörfer

in Edinburgh: Johnson, Pritchard, Shaw, Thomas, Wallace

8.2 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 Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort 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 Nele Brulez bedanke ich mich für die effektive Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Die Zelllinie PC-2 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Babette Simon (Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg) zur Verfügung gestellt.

Meinen Eltern danke ich für ihre stetige Unterstützung und Herrn Dirk Wiese gilt zuletzt mein Dank für seine Geduld und den Beistand bei der Formgebung dieser Arbeit.