

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki

Die Rolle von Receptor Activator of NF- κ B (RANK) und Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) beim humanen Pankreaskarzinom in vitro

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Natalie Sander
aus Aachen

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.08.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jakob Izbicki

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung	2
2.1 Pankreas	2
2.2 Pankreaskarzinom	3
2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie	3
2.2.2 Pathologie und Histologie	6
2.2.3 Symptome und Diagnostik	7
2.2.4 Klassifikation	8
2.2.5 Therapie	9
2.3 Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B	11
2.4 Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand	12
2.5 RANK und RANKL im onkologischen Kontext	13
2.6 Cyclooxygenase-2	14
3 Material und Methoden	16
3.1 Material.....	16
3.1.1 Chemikalien und Gebrauchsmaterialien	16
3.1.2 Kits	19
3.1.3 Puffer und Lösungen	19
3.1.4 Geräte	20
3.1.5 Software und Datenbanken	21
3.1.6 Antikörper	21
3.1.7 Oligonukleotide	22
3.1.8 Zelllinien	22
3.1.9 Nährmedien	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Zellkultur	24
3.2.2 Zellzählung	25
3.2.3 Stimulationsversuche	25
3.2.4 Herstellung von Gesamtzelllysaten	26
3.2.5 BCA Protein Assay	27
3.2.6 Western Blot	27
3.2.7 Lösen von Antikörperbindungen von einer Nitrocellulosemembran	30
3.2.8 RNA-Isolation	31
3.2.9 Transkription zu cDNA	32
3.2.10 Amplifizierung von cDNA mittels realtime PCR	32
3.2.11 MTT-Test	34
3.2.12 Apoptose Assay	35
3.2.13 Untersuchung des Mediums auf sRANKL	36
3.2.14 Immunpräzipitation mit unkonjugiertem primären Antikörper	37
3.2.15 Isotypkontrolle und Immunpräzipitation	38
3.2.16 Sandwich-ELISA	38
3.2.17 Plasmid-Präparation für Transfektionen	40
3.2.18 Transiente Transfektion	41
3.2.19 Ermitteln der Puromycin-Konzentration für Transfektionen	42

3.2.20	Stabile Transfektion.....	42
3.2.21	Kolonien picken (Transfektion)	43
3.2.22	Lentivirale Transduktion und Transfektion.....	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Nachweis von RANK in humanen Pankreaskarzinomzelllinien	45
4.1.1	Nachweis mittels Western Blot	45
4.1.2	Nachweis mittels qRT-PCR	45
4.2	Nachweis von RANKL in humanen Pankreaskarzinomzelllinien	46
4.2.1	Nachweis mittels Western Blot	46
4.3	Nachweis von löslichem RANKL (sRANKL) in humanen Serumproben mittels ELISA	47
4.4	RANK-Knockdown Versuche	49
4.4.1	Panc-1	49
4.4.2	BxPC3.....	51
4.5	Zellproliferationsversuche mit sRANKL-Stimulation	53
4.5.1	Native Zelllinien	53
4.5.2	Knockdown-Zelllinien	55
4.6	Nachweis von COX-2 in humanen Pankreaskarzinomzelllinien	57
4.7	COX-2 Nachweis nach sRANKL-Stimulation.....	58
4.7.1	COX-2 Nachweis nach sRANKL-Stimulation bei Knockdown-Zellen.....	59
4.8	Proliferationsassays mit COX-2-Inhibitor	60
5	Diskussion	65
5.1	RANK	65
5.2	RANKL	68
5.3	COX-2	72
6	Zusammenfassung	76
6.1	Summary.....	77
7	Abkürzungsverzeichnis	I
8	Abbildungsverzeichnis	IV
9	Literaturverzeichnis.....	VIII
10	Danksagung	XVIII
11	Anhang	XIX
12	Lebenslauf	XXII
13	Eidesstattliche Erklärung	XXIV

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob der Signalweg von Receptor Activator of NF- κ B (RANK) und Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) eine potenzielle Interaktionsmöglichkeit ist, um die Therapieoptionen für Patienten mit einem Pankreaskarzinom zu erweitern.

Hierfür wurde zunächst auf der Ebene von Proteinen und Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) die Expression von RANK und RANKL in insgesamt neun humanen Pankreaskarzinomzelllinien im Vergleich zu einer immortalisierten Kontrollzelllinie, Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells (HPDE), untersucht. Mit immunologischen Versuchen wurde die Serumkonzentrationen von RANKL von Patienten mit einem malignen Pankreasbefund und Serumkonzentrationen von gesunden Probanden verglichen.

Durch Stimulationsversuche mit löslichem RANKL wurde das Wachstumsverhalten der Karzinomzellen untersucht, um einen möglichen Nutzen der Blockade des RANK-RANKL-Signalwegs zu ermitteln.

RANK-Knockdown-Zellen wurden generiert, um deren Verhalten bezüglich des Zellwachstums zu untersuchen und einen möglichen Unterschied zwischen Karzinomzelllinien mit hoher und niedriger RANK-Expression zu analysieren.

Nach genauerer Betrachtung des RANK-RANKL-Signalweges auf intrazellulärer Ebene wurde das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) ausgewählt, um die basale Expression in unterschiedlichen Zelllinien zu bestimmen und die Auswirkungen auf die Zellen nach sRANKL-Stimulation zu eruieren.

2 Einleitung

2.1 Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) liegt im zentralen Oberbauch, projiziert sich auf Höhe des 1. bis 2. Lendenwirbels und wiegt im Durchschnitt etwa 70 g bei einer Länge von 14 bis 20 cm. Makroskopisch gliedert sich das Pankreas in den Kopf (Caput pancreaticus), den Hals (Collum pancreaticus), den Körper (Corpus pancreaticus) und den Schwanz (Cauda pancreatica). Der Kopf des Pankreas wird vom c-förmig verlaufenden Zwölffingerdarm (Duodenum) umschlossen, der Schwanz des Pankreas grenzt an die Milz.

Die Funktion des Pankreas besteht aus einem endokrinen und einem exokrinen Anteil, wobei der exokrine Anteil mit 85% deutlich überwiegt. In den Organisationsformen des exokrinen Anteils, den Pankreasläppchen, wird das Pankreassekret, welches zum Teil aus inaktiven Vorstufen von Verdauungsenzymen (Amylasen, Proteasen und Lipasen) besteht, gebildet und über den Pankreasgang (Ductus pancreaticus) im Bereich der Papilla Vateri in das Duodenum abgegeben (Fried et al., 2013; Young, 2012).

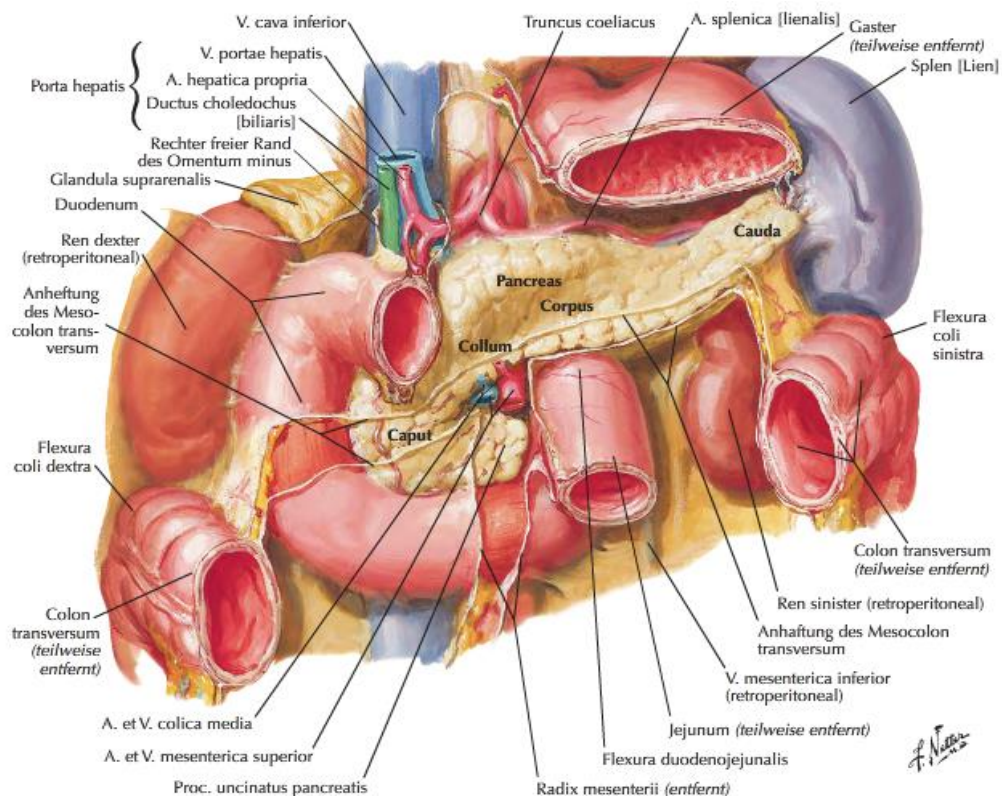


Abb. 1: Pancreas in situ. Quelle: Netter 2015

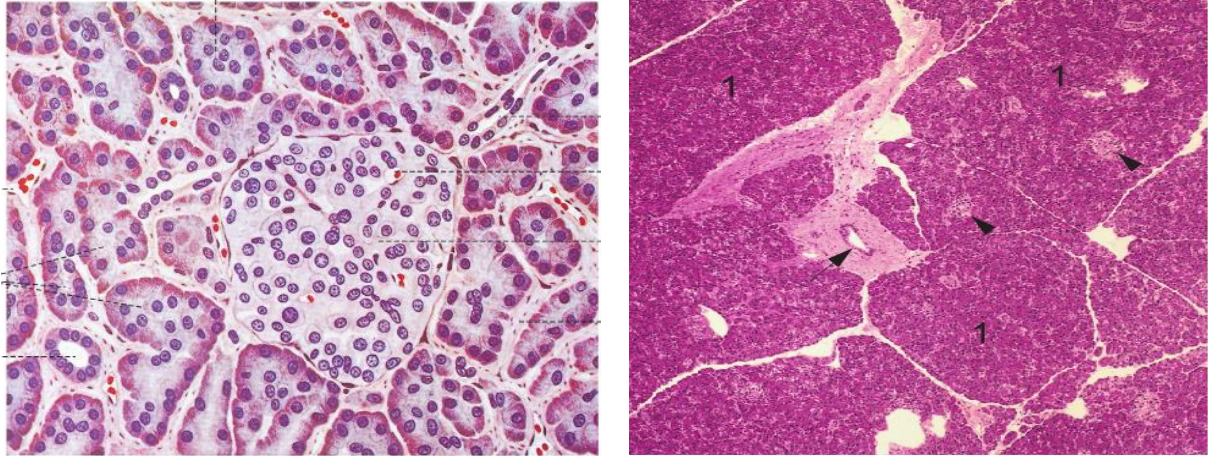


Abb. 2: Links: Langerhans-Inseln. Rechts: Übersicht Pankreas 1 Drüsenläppchen ▶ Langerhans-Insel, interlobulärer Ausführungsgang. Quelle: Welsch 2014

Endokrine Zellgruppen, die sogenannten Langerhans-Inseln, sind im ganzen Organ in den Azini verteilt, wobei sich jedoch der Großteil im Schwanzabschnitt befindet. Die Langerhans-Inseln schütten die Blutzucker regulierenden Hormone Glukagon und Insulin aus (Dintzis und Liggitt, 2012; Ellis, 2013).

Die arterielle Versorgung erfolgt aus zahlreichen Ästen der A. mesenterica superior und des Truncus coeliacus. Die A. gastroduodenalis, die der A. hepatica communis entspringt, versorgt den Pankreaskopf und Äste der A. splenica versorgen Körper und Schwanz des Pankreas. Der venöse Abfluss verläuft über die V. mesenterica superior und die V. splenica in die V. portae (Fried et al., 2013; Young, 2012).

2.2 Pankreaskarzinom

2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Pankreaskarzinom gehört zu den zehn häufigsten Tumorentitäten in Deutschland (s. Abb. 3). Wegen der äußerst ungünstigen Prognose ist es die vierthäufigste Ursache krebisbedingten Todesfälle. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate sowohl der Männer als auch der Frauen in Deutschland liegt bei etwa 8 % (Kaatsch et al., 2015). Dies liegt vor allem an einer späten Diagnose, einer frühen Metastasierung sowie einem relativ schlechten Ansprechen auf Chemotherapie (Seufferlein et al., 2012). Die Erkrankungsrate nimmt mit steigendem Alter stark zu, wobei das mittlere Erkrankungsalter von Frauen bei 75 Jahren und von Männern bei 71 Jahren liegt (Kaatsch et al., 2015). Allein in den USA wird aufgrund des demografischen Wandels

von einer Verdopplung der Inzidenz bis zum Jahr 2030 ausgegangen. Ebenso lassen Analysen vermuten, dass bis zu eben diesem Jahr das Pankreaskarzinom vermutlich die zweithäufigste Ursache der krebsbedingten Todesfälle sein und lediglich von der Mortalität des Bronchialkarzinoms übertroffen werden wird. Geschuldet ist dies überwiegend den besseren Früherkennungsmaßnahmen und Behandlungsmöglichkeiten vieler Krebserkrankungen, insbesondere bei kolorektalen Karzinomen (Rahib et al., 2014).

Die Inzidenz ist in den letzten drei Jahrzehnten im Vergleich zu anderen soliden Tumoren nicht wesentlich angestiegen, wobei sich die Überlebensaussichten nur geringfügig verbesserten (Kaatsch et al., 2015; Ryan et al., 2014). Tab. 1 zeigt die Anzahl der Krebsneuerkrankungen und -sterbefälle in Deutschland, die 2013 vom Statistischen Bundesamt erhoben wurden. Die Erkrankungsrate ist bei Männern mit 14,3 pro 100.000 Einwohner etwas höher als bei Frauen, wo sie bei 10,4 auf 100.000 Einwohner liegt. Insgesamt erkranken in Deutschland jährlich etwa 17.000 Menschen an einem Pankreaskarzinom. Weltweit wird die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen auf ca. 338.000 Fälle geschätzt (Ferlay et al., 2015).

Tab. 1: Krebsneuerkrankungen und -sterbefälle in Deutschland sowie altersstandardisierte Raten, 2013. Quellen: Zentrum für Krebsregisterdaten, Statistisches Bundesamt

Diagnose	Anzahl Neuerkrankungen		Erkrankungsrate je 100.000 Einwohner		Anzahl Sterbefälle		Sterberate	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Pankreas-karzinom	8.480	8.660	10,4	14,3	8.328	8.273	9,7	13,4
Krebs gesamt	229.900	252.600	351,2	434,1	101.775	121.313	126,7	196,5

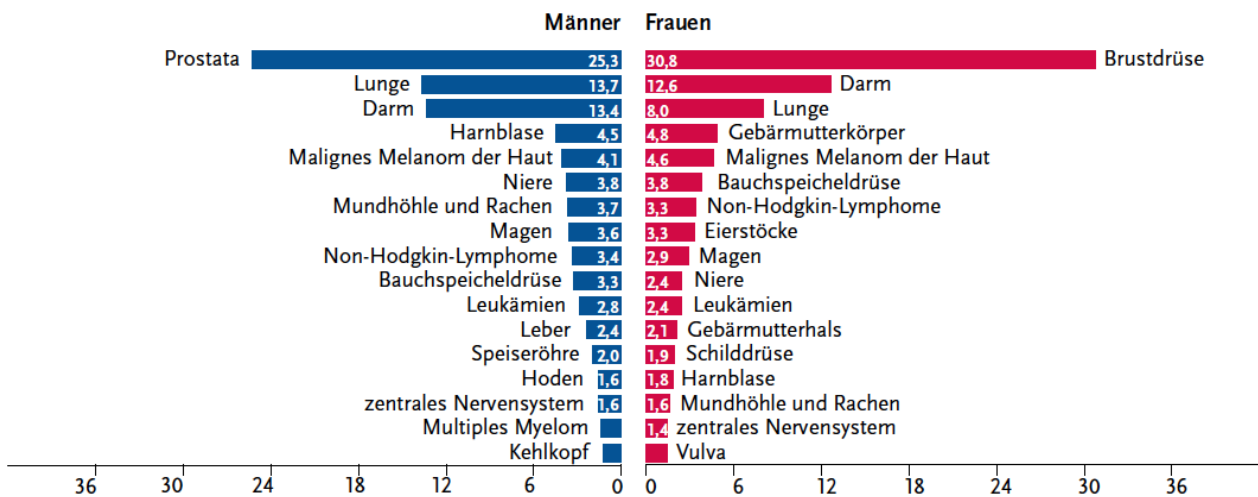


Abb. 3: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs). Quelle: Kaatsch et al., 2015.

Die genaue Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist komplex und bisher weitestgehend ungeklärt, jedoch konnten einige Risikofaktoren identifiziert werden. So sind etwa 20 % aller Pankreaskarzinome durch Rauchen bedingt (Lucenteforte et al., 2012; Vincent et al., 2011). Dabei ist das Erkrankungsrisiko abhängig von der Menge sowie der Dauer des Tabakkonsums. Erst nach 15 Jahren ohne Tabakkonsum sinkt das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, auf das eines Nichtrauchers (Bosetti et al., 2012).

Starkes Übergewicht im jungen Erwachsenenalter erhöht das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, signifikant, wobei der Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Erkrankungsrate bei Männern ausgeprägter zu sein scheint als bei Frauen (Li et al., 2009).

Auch die Ernährung spielt laut aktueller Studienlage eine Rolle. Menschen, die viel Fleisch und wenig Gemüse zu sich nehmen, haben ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Als weitere begünstigende Faktoren gelten ein hoher Alkoholkonsum sowie Diabetes mellitus und chronische Pankreatitis (Lucenteforte et al. 2012, Bosetti et al. 2012, Vincent et al. 2011). Eine positive Familienanamnese ist ebenfalls ein bedeutender Risikofaktor, da 7 bis 10 % der Patienten bereits einen Krankheitsfall in der Familie hatten. Ist bei einem Verwandten ersten Grades ein Pankreaskarzinom diagnostiziert worden, ist das Risiko für die Erkrankung um das Neunfache gesteigert (Vincent et al., 2011).

Zudem gehen einige weitere genetische Faktoren mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms einher. Dazu gehören unter anderem die hereditäre Pankreatitis, das Lynch-Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Peutz-Jeghers-Syndrom sowie hereditärer Brust- und Eierstockkrebs mit Keimbahnmutationen im BRCA1- oder BRCA2-Gen. Schätzungsweise spielen erbliche Faktoren bei 5 bis 10 % aller Pankreaskarzinome eine Rolle (Seufferlein et al., 2012).

Schon Rudolf Virchow konstatierte zudem eine Verbindung zwischen einem Karzinomgeschehen und chronischen Entzündungsprozessen. Entzündungsmediatoren wie COX-2 oder NF- κ B sind nachgewiesenermaßen an der Entstehung von malignen Veränderungen des Pankreas beteiligt (Balkwill und Mantovani, 2001; Cruz und Balkwill, 2015; Grivennikov et al., 2010).

2.2.2 Pathologie und Histologie

Der häufigste histologische Typ des Pankreaskarzinoms ist mit über 80 % das duktale Adenokarzinom, das überwiegend im Pankreaskopf auftritt (Seufferlein et al., 2012). Dieser Typ ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Pankreaskarzinome entwickeln sich meist aus nichtinvasiven Vorläuferläsionen, den sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Sie bestehen meist aus einer intraduktalen Epithelwucherung, die den Sekretabfluss behindert, wodurch eine epithelio-mesenchymale Transition provoziert wird (Riede und Blum, 2009). Diese bezeichnet eine Umwandlung von Epithel- zu Mesenchymzellen unter dem Einfluss bestimmter Signalmoleküle, was die Tumorigenese unterstützt (Riede und Brand-Saberi, 2009).

Die PanIN werden in drei Typen eingeteilt, wobei mit jeder Stufe die Anzahl an genetischen Mutationen steigt. Low-grade Typ 1 Neoplasien wurden auch in Autopsien auch in noch gesunden Bauchspeicheldrüsen nachgewiesen. Neben der Aktivierung von Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), mit über 90 %, sind die Inaktivierung einiger Tumorsuppressorgene wie cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A), tumor protein p53 (TP53), deleted in pancreatic cancer-4 (DPC4) und breast cancer 2 (BRCA2) typische Genmutationen, die überwiegend in Typ 2 und 3

Läsionen nachgewiesen werden können. In selteneren Fällen entstehen Karzinome aus intraduktalen, papillären, muzinösen Neoplasien oder muzinösen, zystischen Neoplasien. (Almoguera et al., 1988; Ryan et al., 2014; Vincent et al., 2011). Makroskopisch zeigt sich meist ein derb-weißlicher Tumor mit einer perifokalen Bindegewebsneubildung. Eine Unterscheidung zwischen Tumor und Entzündung ist kaum möglich.

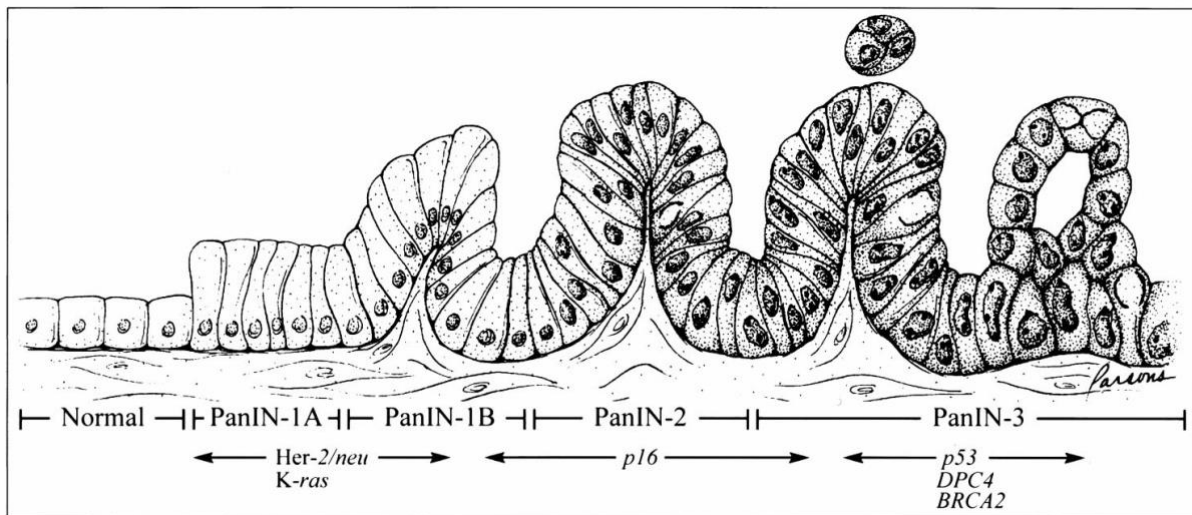


Abb. 4: Entstehungsmodell des Pankreaskarzinoms (Hruban et al., 2000).

2.2.3 Symptome und Diagnostik

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch das Fehlen von Frühsymptomen aus. Die ersten Beschwerden zeigen sich meist erst nach der Infiltration des umliegenden Gewebes (Vincent et al., 2011). Eines der ersten Symptome sind oftmals Rückenschmerzen. Im Allgemeinen ähneln die Beschwerden sehr denen einer chronischen Pankreatitis: unspezifische Oberbauchbeschwerden, Appetitverlust, Übelkeit und Gewichtsverlust. Insbesondere beim Pankreaskopfkarzinom kann auch ein schmerzloser Ikterus auftreten, welcher im Spätstadium meist vorhanden ist (Ryan et al., 2014; Vincent et al., 2011). Auch das Auftreten von tiefen oder oberflächlichen Venenthrombosen ist nicht untypisch und oftmals ein Hinweis für ein malignes Geschehen (Vincent et al., 2011).

Die erste Untersuchung bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom stellt der abdominale Ultraschall dar. Eine Endosonographie (EUS), kontrastmittelgestützte Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) zusammen mit einer Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) haben als

Folgeuntersuchungen die höchste Sensitivität in der Diagnostik einer bösartigen Raumforderung des Pankreas und liefern zudem weitere Informationen zu einer Beteiligung des Gallen- oder Pankreasganges (Seufferlein et al., 2012).

Tumormarker, wie das am häufigsten verwendete CA19-9 sind nicht pankreaskarzinomspezifisch und eignen sich daher lediglich als Verlaufsparemeter (Seufferlein et al., 2012).

Als Staging-Untersuchung sollten eine CT oder MRT plus MRCP durchgeführt werden. Auch eine Endosonografie kann Hinweise auf Gefäßinvasion oder Lymphknotenbeteiligung geben (Seufferlein et al., 2012). Eine computertomographische Untersuchung des Thorax ist hilfreich, um Lungenmetastasen zu detektieren. Dennoch ist eine genaue Beurteilung der Tumorausbreitung oft erst intraoperativ möglich. Bei hochgradigem Verdacht auf ein Karzinom und ein geplantes operatives Vorgehen ist eine vorherige histologische Sicherung des Befundes nicht notwendig (Vincent et al., 2011).

2.2.4 Klassifikation

Die Einteilung der Tumorstadien erfolgt nach der TNM(primary tumor, regional lymph nodes, distant metastasis)- und der UICC(union nationale contre le cancer)-Klassifikation und richtet sich nach der Ausbreitung des Primärtumors, dem Befall der regionalen Lymphknoten sowie der Fernmetastasierung, anhand derer sich Prognose und weitere Behandlungsmöglichkeiten ableiten lassen.

Als häufigster Manifestationsort von Fernmetastasen sind insbesondere Leber, Lunge und das Peritoneum zu nennen (Ryan et al., 2014).

Tab. 2: TNM-Klassifikation für Pankreaskarzinome; Quelle: frei übersetzt nach Seufferlein et al., 2012; Vincent et al., 2011.

Primärtumor	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>

T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, ≤ 2cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, > 2cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert den Truncus coeliacus oder die A. mesenterica superior (nicht-resektabler Primärtumor)

Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tab. 3: UICC-Klassifikation für Pankreaskarzinome; Quelle: frei übersetzt nach Seufferlein et al., 2012.

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0
III	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

2.2.5 Therapie

Die einzig kurative Option zur Behandlung des Pankreaskarzinoms ist ein operativer Ansatz mit dem Ziel einer R0-Resektion. Für diese ist eine genaue Evaluation der möglichen Gefäßinvasion notwendig (s. Abb. 5). Oftmals kommt dieser Ansatz jedoch nur bei Patienten in Stadium I oder II in Frage. In Analysen zeigte sich, dass sich lediglich etwa 20 % der Patienten einer primär operativen Therapie unterziehen (Spanknebel und Conlon, 2001; Stathis und Moore, 2010). Die Operationsmethode

der Wahl stellt hierbei die nicht-pyloruserhaltende partielle Pankreatikoduodenektomie (OP nach Whipple-Kausch) dar. Vergleichbare Operationsmethoden, wie die pyloruserhaltende nach Traverso-Longmire oder ausgedehntere Verfahren mit erweiterter Lymphadenektomie, verbessern das Outcome nicht. Tumore im Pankreasschwanz werden in der Regel mit einer Pankreaslinksresektion und simultaner Splenektomie behandelt. (Ryan et al., 2014; Seufferlein et al., 2012). In entsprechenden Zentren können diese Eingriffe bereits teilweise laparoskopisch durchgeführt werden (Bausch und Keck, 2017; Siech et al., 2017), wobei bereits 1992 von der ersten laparoskopischen pylorus-erhaltenden Pankreatikoduodenektomie berichtet wurde (Gagner und Pomp, 1994). Trotz oftmals angestrebter, primär chirurgischer Versorgung erfolgt die Behandlung des Pankreaskarzinoms stets durch ein interdisziplinäres Team (Vincent et al., 2011).

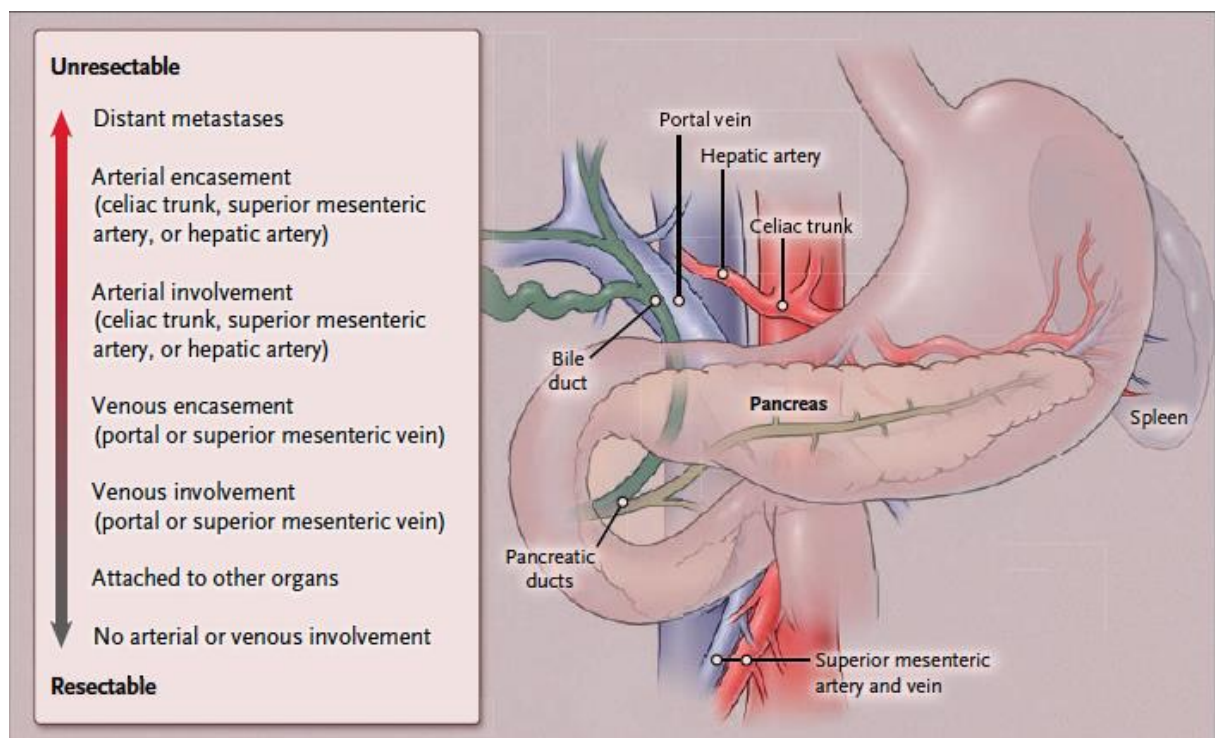


Abb. 5: Möglichkeit der Resektabilität in Abhängigkeit von der Infiltration benachbarter Organe und Strukturen (Ryan et al., 2014).

1 bis 2 Monate postoperativ folgt eine adjuvante Chemotherapie für 6 Monate mittels Gemcitabine oder 5-Fluoruracil (5-FU) (Seufferlein et al., 2012; Vincent et al., 2011). Auch Patienten mit einer R1-Resektion profitieren von einer adjuvanten Chemotherapie. Neoadjuvante Chemotherapie wird sowohl Patienten mit einem resektablen Tumor zur Vermeidung von Metastasenbildung als auch Patienten mit fraglich operablen oder inoperablen Tumoren zum „Downsizing“ und zur Herstellung

einer Resektabilität empfohlen. Bei inoperablen Tumoren ist das Behandlungsziel eine Verlängerung des Lebens, eine Linderung der durch den Tumor verursachten Beschwerden und eine Eindämmung des Tumor- und Metastasenwachstums.

Palliativ kann ebenfalls eine Chemotherapie mit Gemcitabine erfolgen. Patienten in Stadium IV zeigen bei Anwendung des FOLFIRINOX-Schemas (5-FU+Irinotecan+Oxaliplatin) ein medianes Überleben von 11,1 Monaten (bei Monotherapie mit Gemcitabine 6,2 Monate), jedoch ist dieses auch toxischer als die Behandlung mittels Gemcitabine. Bei Patienten unter 75 Jahren mit einem guten Performance-Status gilt diese Behandlung dennoch als Mittel der Wahl (Seufferlein et al., 2012).

2.3 Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B

Der Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (RANK) ist ein vor etwa 15 Jahren entdecktes Typ 1 Membranprotein, das eine hohe Ähnlichkeit zu CD40 aufweist (Hanada et al., 2011; Owen et al., 2013). Es besitzt eine große zytoplasmatische Domäne am C-terminalen Ende sowie eine extrazelluläre Domäne mit vier cysteinreichen Regionen und zwei Glykolisierungsstellen (Theoleyre et al., 2004).

Auch wenn RANK zunächst im Kontext des Knochenstoffwechsels bekannt wurde, konnten weitere Funktionen zum Beispiel im Immunsystem und bei Tumorerkrankungen nachgewiesen werden. RANK aktiviert die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung und nimmt zusammen mit seinem Liganden (RANKL) eine Schlüsselposition in der Regulation des Knochenumbaus ein. RANK-knockout Mäuse weisen eine schwere Osteopetrose auf und besitzen keine funktionsfähigen Osteoklasten. Zudem ist die Heranreifung von B- und T-Zellen deutlich beeinträchtigt (Dougall et al., 1999). Der intrazelluläre Signalweg nach Bindung seines Liganden an RANK ist komplex und bewirkt eine Rezeptortrimerisierung mit nachfolgender Rekrutierung von Adaptermolekülen wie c-src und TNF-receptor-associated factor 6 (TRAF6) (Teitelbaum, 2006). Durch die Interaktion mit RANKL reguliert RANK die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung (Duheron et al., 2011). Auch konnte RANK auf der Oberfläche von dendritischen Zellen nachgewiesen werden, wo es unter anderem antiapoptotisch

wirkt; genauere Funktionen sind bisher jedoch noch nicht ausreichend geklärt (Anderson et al., 1997; Hanada et al., 2011; Hofbauer, 2010).

2.4 Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand

Der Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und ist der bisher einzig bekannte Ligand von RANK (Owen et al., 2013). Bekannte Synonyme dieses Proteins sind tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE) und tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (TNRSF11). Ein kürzlich beschriebener neuer RANKL-Rezeptor, leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LGR4), scheint mit RANK zu konkurrieren und den kanonischen RANK-Signalweg während der Osteoklastendifferenzierung zu unterdrücken (Luo et al., 2016).

Entdeckt wurde RANKL 1997 von vier unabhängigen Arbeitsgruppen. Zwei von ihnen beschrieben die Rolle von RANKL bei der Osteoklastendifferenzierung (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998), während zwei andere die Expression im Immunsystem an der Oberfläche von aktivierten T-Zellen und dendritischen Zellen nachwiesen (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997).

Bisher wurden drei bekannte Isoformen identifiziert. Die Grundform ist ein Typ 1 Membranprotein. Während sowohl bei RANKL 2 und bei RANKL 3 die intrazelluläre Domäne fehlen, fehlt bei RANKL 3 zusätzlich die Transmembrandomäne, sodass diese Isoform in löslicher Form vorliegt (Ikeda et al., 2001). Die lösliche Form kann ebenfalls durch die enzymatische Spaltung durch Metalloproteinasen wie dem TNF- α konvertierenden Enzym (TACE) aus einer membrangebundenen Form entstehen (Lum et al., 1999).

Die überwiegende Funktion von RANKL ist zwar die Regulierung des Knochenstoffwechsels jedoch steht ihm ebenso eine Rolle im Immunsystem zu, wo RANKL dendritische und T-Zellen beeinflusst (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997). Neben der Expression auf Osteoklasten und Zellen des Immunsystems ließ sich RANKL auch in Leber, Lunge, Niere und Brustgewebe nachweisen (Kartsogiannis et al., 1999).

Im Bereich des Knochenstoffwechsels wirkt das lösliche Osteoprotegerin (OPG) als kompetitiver Bindungspartner sämtlicher Formen von RANKL, der dessen Wirkung neutralisiert. Somit wird eine Feinregulation des Knochenstoffwechsels erreicht. Bei OPG handelt es sich um ein lösliches Protein, das ebenfalls aus der tumor necrosis factor(TNF)-Rezeptor-Familie stammt und vor allem von osteoblastären Zellreihen, Stromazellen und Chondrozyten ausgeschüttet wird. (Hofbauer und Schoppet, 2004; Simonet et al., 1997; Teitelbaum, 2006).

RANKL hat ebenso eine entscheidende Bedeutung in der Brustdrüsenentwicklung. So konnte in Mausversuchen nachgewiesen werden, dass sowohl *rank*^{-/-} als auch *rankl*^{-/-} Mäuse nur eine rudimentäre Entwicklung der alveolären Brustdrüsenzellen aufwiesen (Kim et al., 2006).

2.5 RANK und RANKL im onkologischen Kontext

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluss von RANK und RANKL auf die Entstehung von Brustkrebs. In präklinischen Studien zeigte sich, dass die Blockade des RANK/RANKL-Signalweges im Mausmodell zu einer verringerten Bildungsrate von Brustkrebs führte (Gonzalez-Suarez et al., 2010).

Owen beschrieb 2013, dass sich etwa die gleiche quantitative RANK-Expression in allen untersuchten Brustkrebszelllinien zeigte, während die RANKL-Expression unterschiedlich war. Interessanterweise zeigten sich in der Follow-up-Untersuchung bei Patientinnen mit Knochenmetastasen signifikant niedrigere RANK-Transkriptionswerte als bei Patientinnen die krankheitsfrei blieben. Bei RANKL hingegen verhielt es sich genau andersrum. So ist die RANKL-Expression für die normale Funktionsweise der Brustdrüse zwar unerlässlich, erleichtert bei karzinomatösem Geschehen allerdings auch die Metastasierung in den Knochen. Überlebensanalysen zeigten jedoch, dass Patientinnen mit einer höheren RANK- und RANKL-Expression ein besseres medianes Überleben aufzeigten im Vergleich zu Patientinnen mit niedrigerer RANK- und RANKL-Expression, so dass dieser möglicherweise ein gewisser prognostischer Wert zugeschrieben werden könnte (Owen et al., 2013). In immortalisierten Brustkrebszelllinien wurde nach Herabsetzen der RANK-Expression durch einen Knockdown ein signifikanter Rückgang der pulmonalen Metastasierung nachgewiesen (Tan et al., 2011).

RANKL zeigte in Studien mit Brust- und Prostatakrebszellen keinen Einfluss auf die Zellproliferation, scheint jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Zellmigration zu haben. Mit RANK-Knockdown-Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass das Basislevel der Zellmigration unabhängig von der RANK-Expression zu sein scheint (Casimiro et al., 2013). In Zellen von Prostatakarzinomen ist die RANK- und RANKL-Expression um ein Vielfaches höher als in gesundem Gewebe, wobei es keinen Zusammenhang zum Tumorstadium oder dem Gleason Score zu geben scheint (Ohtaka et al., 2017; Vega et al., 2007).

Bei Magenkarzinomen konnte ebenfalls eine erhöhte RANK-Expression gezeigt werden, die einen Zusammenhang mit der EGFR-Expression zu haben scheint, die sich in den meisten untersuchten Zelllinien ebenfalls erhöht darstellt. Auch beim Magenkarzinom konnte kein eindeutiger Effekt auf die Zellproliferation gezeigt werden (Zhang et al., 2017).

Neben einem direkten Effekt auf Karzinomzellen trägt RANKL in der Tumorumgebung zusätzlich zur Neoangiogenese bei und begünstigt damit das weitere Wachstum des bösartigen Geschehens (Renema et al., 2016). Des Weiteren spielt RANKL in der Pathogenese von Knochenmetastasen eine bedeutende Rolle. Durch die erhöhte RANKL-Expression kommt es durch Knochenabbau zu einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, die wiederum das Tumorstadium begünstigen (Blair et al., 2007).

2.6 Cyclooxygenase-2

Die Cyclooxygenase ist ein Schlüsselenzym im Arachidonsäurestoffwechsel, wo es die Bildung von Prostaglandinen katalysiert (Dubois et al., 1998). Drei Isoformen sind bisher bekannt, wobei hier lediglich auf die Cyclooxygenase-2 (COX-2) eingegangen werden soll.

Es handelt sich um ein Membranprotein, das ein Molekulargewicht von 67 bis 72 kDa aufweist und als Homodimer vorliegt. COX-2 wird nur in sehr wenigen Geweben wie dem Gehirn und der Niere wesentlich exprimiert. Die Expression kann jedoch auch in anderen Gewebe durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 induziert werden (Garavito und Dewitt, 1999). Durch die Katalyse bei der Bildung von Prostaglandinen werden Entzündungsreaktionen verstärkt oder aufrechterhalten.

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten sich bereits mit der Expression von COX-2 in humanen Karzinomen. Eine erhöhte Expression konnte unter anderem bereits in malignen Geschehen des Kolons, der Lunge, des Magens und auch des Pankreas nachgewiesen werden, wo es das Zellwachstum und die -migration zu beeinflussen scheint (Eibl et al., 2005; Li et al., 2013; Yip-Schneider et al., 2000).

COX-2 wird nicht nur von den Tumorzellen selbst, sondern auch vom umliegenden Stroma induziert. Die gebildeten Prostaglandine beeinflussen sowohl das Tumorstroma als auch die Tumorzellen selbst auf unterschiedliche Arten (Ferrandina et al., 2002; Kazem et al., 2014; Oshima et al., 1996). Die Aktivierung von NF- κ B, beispielsweise durch die RANK-RANKL-Signalkaskade, führt zu einer vermehrten Expression von COX-2.

Eine regelmäßige Einnahme von Aspirin (unselektiver COX-Hemmer) oder anderen NSAID zeigte einen relevanten Rückgang des relativen Risikos, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, wobei der Effekt zwischen 50 und 90 % schwankte (Giovannucci et al., 1995, 1994; Kawamori et al., 1998).

Anfang der Nullerjahre wurde Celecoxib, ein selektiver COX-2 Hemmer bereits zur Prävention bei FAP zugelassen, wo die regelmäßige Einnahme zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Polypen führt (Steinbach et al., 2000). Generelle Empfehlungen zur protektiven Einnahme von COX-2-Hemmern für die Allgemeinbevölkerung gibt es jedoch nicht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Gebrauchsmaterialien

Chemikalien und Gebrauchsmaterialien des alltäglichen Laborbedarfs werden nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
0,25% Trypsin EDTA (1x)	Life technologies™ /GIBCO®
0,5 M Tris pH 6,8	Bio-Rad
1 M Tris pH 8,0	Bio-Rad
1,5 M Tris pH 8,8	Bio-Rad
100%ige Essigsäure	Merck
30% Acrylamid (19:1)	Bio-Rad
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad
Aqua bidest.	SIGMA-ALDRICH®
Blotting Grade Blocker	Bio-Rad
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA-ALDRICH®
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH®
Chloroform	Merck
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	SIGMA-ALDRICH®
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 1x)	Life technologies™/GIBCO®
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 1x)	Pan-Biotech
Epidermal Growth Factor (eGF)	Peppo Tech
Ethanol	Walter CMP
Fetales Kälberserum (FCS)	Life technologies™/GIBCO®
Basic Fibroblast Growth Factor (FGF, human)	Peppo Tech

Gemzar® (Gemcitabin)	Eli Lilly
Glycin	SIGMA-ALDRICH®
Halt™ Proteoase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Scientific
Insulin	SIGMA-ALDRICH®
Isopropanol	Roth
Keratinocyte Serum Free Media (SFM)	Life technologies™/GIBCO®
Laemmli-Puffer	Bio-Rad
Lipofectamine 2000	invitrogen
LB Broth	SIGMA-ALDRICH®
Methanol	J. T. Baker®
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SIGMA-ALDRICH®
Nitrocellulosemembran	Thermo Scientific
NS 398 (ab120295)	Abcam
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel	Novex
NuPage MES SDS Running Buffer (20x)	Novex
Opti-MEM® Reduced Serum Medium, GlutaMAX™ Supplement	GIBCO®
Penicillin-Streptomycin	Life technologies™/GIBCO®
peqGOLD TriFAST™	Peqlab
Ponceau S Solution for electrophoresis	Serva
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad
Protease™ Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
Protein Block Serum-Free	Dako
Puromycine dihydrochloride 10mg/ml	SIGMA-ALDRICH®
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Life technologies™/GIBCO®

Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA)-Puffer (R0278)	SIGMA-ALDRICH®
Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)	SIGMA-ALDRICH®
RNAlater	QIAGEN
Recombinant human TRANCE (sRANKL)	R&D Systems®
Recombinant mouse RANK Ligand/TRANCE	R&D Systems®
SeaKem LE Agarose	Lonza
TEMED	Bio-Rad
Transferrin	SIGMA-ALDRICH®
TRI Reagent®	SIGMA-ALDRICH®
Triton X-100	SIGMA-ALDRICH®
Trizma® Base	SIGMA-ALDRICH®
Trypanblau	Life technologies™/GIBCO®
Tween 20	Serva
Whatman® Cellulose Filter Paper	SIGMA-ALDRICH®
β-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH®

Tab. 5: Verwendete Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Centriprep® Centrifugal Filters	Merck Millipore
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche
Reaktionsgefäße, DNase-, RNase-frei	Sarstedt
Steriflip® Vacuum-driven Filtration System	Merck Millipore
Zellkulturgefäße	Thermo Scientific

3.1.2 Kits

Tab. 6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
PathScan® Cleaved Caspase-3 (Asp175) Sandwich ELISA Kit #7190	Cell Signaling Technology®
CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Plasmid Purification Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrat	Thermo Scientific
Total sRANKL (human) ELISA kit	Immundiagnostik
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche

3.1.3 Puffer und Lösungen

TBS-T, der Transfer- und SDS-Laufpuffer (Western Blot) wurden einfach-konzentriert eingesetzt und soweit nicht näher erläutert nur mit Aqua dest. verdünnt.

Blockierlösung Milchpulver (WB)

5g Blotting Grade Blocker
ad 100 ml TBS-T

Blockierlösung TBS-T (WB)

0,1 ml Tween-20
5 g BSA
100 ml TBS

Neutralisierungspuffer (WB)

1 M Tris
pH 8

Lysepuffer

990 µl RIPA-Puffer
10 µl Protease Inhibitor Cocktail

5 x Laemmli-Probenpuffer (WB)

31,2 ml Tris 0,5 M (pH 6,8)

2,5 g SDS

10 ml Glycerin

2 ml β -Mercaptoethanol

Bromphenolblau

ad 50 ml Aqua dest

10 x TBS-T (WB)

60,57 g Trizma Base

87,66 g 1,5 M NaCl

0,05% Tween 20

ph 7,4

10 x SDS-Laufpuffer (WB)

30,3 g Trizma Base

144 g Glycin

10 g SDS

ad 1 l Aqua dest.

10 x Transferpuffer (WB)

288 g Glycin

60,4 g Trizma Base

ad 2 l Aqua dest.

1 x Transferpuffer (WB)

100 ml 10 x Transferpuffer

200 ml Methanol

ad 1 l Aqua dest.

Stripping-Lösung (WB)

0,5M NaCl (29,22g)

29 ml 100%ige Essigsäure

ad 1 l Aqua dest.

Neutralisierungspuffer (WB)

1 M Tris

pH 8

3.1.4 Geräte

Geräte des alltäglichen Laborbedarfs werden nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 7: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5417R	Eppendorf
FLUOstar Omega	BMG LABTECH
Heraeus™ Multifuge™ X3R Centrifuge	Thermo Scientific
LAS-3000	Fujifilm

LightCycler 480	Roche
NanoDrop™ ND-1000	Peqlab
Olympus BH-2	Olympus
Olympus Camedia C-5050	Olympus
Rotina 35 R	Hettich Zentrifugen
Thermocycler	Biometra

3.1.5 Software und Datenbanken

Tab. 8: Verwendete Software

Name	Hersteller bzw. Internetadresse
Aida Image Analyzer V.3.44	Raytest
LightCycler® 480 Software V.1.5	Roche
Microsoft Office 2015	Microsoft Corporation
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Omega MARS V.2.41	BMG LABTECH

3.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-RANKL (1:500)	Abcam (ab9957)
Anti-RANK (1:500)	Abcam (ab22106)
Anti-GAPDH (1:500)	Abcam (ab9485)
HSC 70 (B-6) (1:500)	Santa Cruz (sc-7298)
Anti-COX2 (1:500)	Abcam (ab15191)

Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Stabilized peroxidase conjugated goat anti-mouse (H+L) IgG	Thermo Scientific
Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody	Cell Signaling
Goat anti-mouse IgG HRP	Santa Cruz
Goat anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz

3.1.7 Oligonukleotide

Primer (alle von Eurofins MWG Operon)

Name	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	Größe (bp)
RANK FW	ATGCGGTTTGCAGTTCTTCTC	57,9	189
RANK REV	AAGCCTCATTGATCCAGTGC	57,3	
RANKL FW	AAGCCACCAAAGAATTGCAG	55,2	
RANKL REV	TTCCTTTTGCACAGCTCCTT	55,2	
GAPDH FW	CAGAACATCATCCCTGCCTCT	59,8	319
GAPDH REV	GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG	60,3	

3.1.8 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden mehrere Zelllinien von humanen Adenokarzinomen untersucht. Die Zelllinien L3.6 pancreas-liver (L3.6pl) wurden durch vielfache Selektionierung aus der Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357 gewonnen und besitzen ein hohes Potential Lebermetastasen zu bilden (Bruns et al., 1999). Ausgehend von dieser Zelllinie haben Güngör et al. 2011 eine Subgruppe Gemcitabin-resistenter Zellen selektioniert, die als L3.6pl res aufgeführt sind. Die ursprüngliche Zelllinie wurde L3.6pl wt genannt.

Kommerziell wurden die Zelllinien Panc-1 (ATCC, Bestellnummer CLR-1469), Panc-2 (ATCC, Bestellnummer CRL-2553) sowie BxPC3 (ATCC, Bestellnummer CRL-1687) erworben.

Die Zelllinien 5061, 5072, 5156 und 5328 wurden aus Primärtumoren von Patienten der Abteilung für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (UKE) etabliert, bei denen ein Adenokarzinom des Pankreas nachgewiesen wurde. Für die Probeentnahme und die Verwendung liegt eine Bewilligung der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg vor (Nummer: PV3548). Alle Patienten wurden präoperativ eingehend mit ausreichender Bedenkzeit aufgeklärt; sämtliche schriftlichen Einwilligungen liegen vor. Die patientenbezogenen Daten sind anonymisiert. Als Referenzzelllinie wurde humanes pankreatisches Dukt epithel (HPDE) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine immortalisierte humane Zelllinie, welche aus duktalem Pankreasepithel gewonnen wurde.

Für lentivirale Transfektionen wurden als Hilfszellen HEK 293T-Zellen verwendet. Bei HEK-Zellen (Human Embryonic Kidney-Zellen) handelt es sich um mit Simivian-Virus 40 (SV40) transformiertes Nierenzellgewebe von Foeten, Neugeborenen und Säuglingen (Shein and Enders, 1962). Die verwendete Variante HEK 293T exprimiert zusätzlich das SV40 large T-Antigen, welches die intrazelluläre Vermehrung von Lentiviren möglich macht.

3.1.9 Nährmedien

Tab. 9: Nährmedien mit entsprechenden Zusätzen für die jeweiligen Zelllinien

Nährmedium + Zusätze	Zelllinie
Keratinocyten-SFM + 1 % P/S + 10 % FCS + 1 % eGF	HPDE
RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS	L3.6pl wt
RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS + 2 µM Gemzar	L3.6pl res
DMEM+1 % P/S+10 % FCS	Panc-1, Panc-2, BxPC3
DMEM + 1 % P/S + 10 % FCS + Puromycin	Transfizierte Panc1, BxPC3
RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS + 1 % eGF + 1 % FGF + 1 % Insulin + 0,5 % Transferrin	5061, 5072, 5156
Opti-MEM + GlutaMAX	HEK 293T

3.2 Methoden

Die folgenden Methoden sind in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie etabliert.

3.2.1 Zellkultur

Die oben genannten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflasche mit 75 cm² kultiviert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Inkubationsschritte bei Zellkulturversuchen unter diesen Bedingungen durchgeführt.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 bis 100 % erfolgte die Passage der Zellen in eine neue Zellkulturflasche. Bei jedem Überführen von Zellen in eine neue Flasche erhöhte sich die sogenannte Passagezahl um 1. Die Passagezahl wurde auf den Zellkulturflaschen vermerkt.

Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Flasche mit 10 ml DPBS gespült, um Rückstände des Mediums zu entfernen, da dieses die Wirkung des Trypsin-EDTAs verringert. Nach Absaugen des DPBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA für 5 bis 10 min im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin löste die Zell-Matrix-Verbindungen an und löste die Zellen dadurch von der Kulturunterlage ab, während das EDTA als Ca²⁺-Chelator die Zell-Zell-Verbindungen löste.

Nach Ablösung des Zellrasens wurden 8 ml Medium hinzugegeben und das Zell-Medium-Gemisch mehrmals auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. Je nach Bedarf wurde ein bestimmter Teil der Zellen (je nach Verdünnungsfaktor) in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium gegeben.

Wenn Zellen aktuell nicht mehr benötigt wurden oder ein Vorrat an Zellen aufgebaut werden sollte, erfolgte die Langzeitlagerung im Stickstofftank. Dazu wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und anschließend bei 1.250 g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das verbliebene Zellpellet in 0,8 ml speziellem Einfriermedium (Recovery Cell Culture Freezing Medium) resuspendiert und in ein speziell zum Einfrieren geeignetes Gefäß (Kryoröhrchen) überführt. In einer mit Isopropanol befüllten Kammer wurden die Zellen

bei -80 °C für mindestens 24 h zwischengelagert, sodass sie vorsichtig eingefroren und anschließend in einem Stickstofftank bei -196 °C gelagert werden konnten.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen kurz in ein auf 37 °C vorgewärmtes Wasserbad gehalten, der halbgefrorene Inhalt in eine mit Medium befüllte Zellkulturflasche überführt und anschließend im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 Zellzählung

Die Ermittlung der Zellzahl wurde mithilfe von Trypanblau durchgeführt. Dieser Zellviabilitätsfarbstoff färbte avitale Zellen blau an, sodass eine Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen unter dem Mikroskop erfolgen konnte. Die Zellsuspension wurde hierfür zu gleichen Teilen mit Trypanblau versetzt. 10 µl des Gemischs wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm²) und vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter diente folgende Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gesamtzellzahl in ausgezählten Großquadraten}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

3.2.3 Stimulationsversuche

Die durchgeführten Stimulationsversuche dienten dem Zweck, herbeigeführte Veränderungen im Proliferations- und Apoptoseverhalten sowie in der Proteinexpression aufzuzeigen.

Zur Untersuchung von Veränderungen der Proteinexpression wurden Zellen in 6 Napf-Platten (Nunc™ Thermo Scientific Nunclon™ 6-well MultiDish with lid, Thermo Scientific) ausgesät. Hierbei wurde vorgegangen, wie weiter oben beim Passagieren der Zellen beschrieben. 1 ml der mit Medium aufgefüllten Zellsuspension wurde mit 4 ml Medium in einen Napf der 6-Napf-Platte gegeben und anschließend inkubiert. Bei einer erreichten Konfluenz von 90 bis 100 % wurde das Medium abgesaugt und einmal mit DPBS gespült, Anschließend wurden 3 ml Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von löslichem rekombinanten humanem RANKL (rh sRANKL) zu den Zellen gegeben und für folgende Zeiträume inkubiert: 5 min, 10 min, 20 min, 30 min und 60 min. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen trypsinisiert und

Gesamtzelllysate zur weiteren Analyse aus den Zellen gewonnen. Ziel dieser Versuchsreihe war der Nachweis von Veränderungen bestimmter Proteinexpressionen.

Zum Aufzeigen von Veränderungen im Proliferations- und Apoptoseverhalten von Zellen (s. Kap. 3.2.10 und 3.2.11) wurde dem Medium sRANKL oder der COX2-Inhibitor NS 398 zugefügt. Dazu wurden die Zellen in einer 96-well-Platte bzw. in 10 cm Schalen ausgesät und dem Medium entsprechende Zusätze hinzugegeben. In einer ersten Versuchsreihe wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe angewendet, um die optimale Konzentration für das Ausführen weiterer Versuche zu ermitteln.

3.2.4 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Für das Gewinnen von Gesamtzelllysaten wurden zunächst Zellpellets benötigt. Es wurde vorgegangen wie beim Passagieren der Zellen. Hatten sich die Zellen nach Zugabe von Trypsin-EDTA vollständig vom Flaschenboden gelöst, wurde je nach benötigter Lysatmenge eine Teilmenge der Zellen verwendet oder der Inhalt mehrerer Zellkulturflaschen in einem 50 ml Falcon-Röhrchen zusammengeführt.

Nach Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1.250 g war am Boden des Falcon-Röhrchens das Zellpellet sichtbar. Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums wurde das Pellet in DPBS resuspendiert und erneut für 5 min zentrifugiert, um noch vorhandene Rückstände des Mediums auszuwaschen. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das Zellpellet auf Eis gelagert.

Je nach Pelletgröße wurden 30 bis 300 µl Lysepuffer verwendet, um das Pellet zu resuspendieren. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 5 bis 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 14.000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes bestand aus genomischer DNA, während der Überstand das Gesamtzelllysat beinhaltete. Dieses wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei -20 °C gelagert. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Test (Kap. 3.2.5) angewendet.

3.2.5 BCA Protein Assay

Der BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay diente der Quantifizierung des Proteingehaltes von Zelllysaten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Kit Pierce BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible verwendet. Die angewendete Methode beruht darauf, dass Peptidbindungen Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Dieses band mit dem BCA einen Farbkomplex, der sich photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm messen ließ. Zur Auswertung wurde eine Standardreihe mit BSA (Bovines Serumalbumin) erstellt, deren Proben eine definierte Menge an Protein enthielt. Je 10 μl der Proben für die Standardreihe und der zu messende Proben wurden in Doppelbestimmung auf eine 96-well-Platte auftragen. Sollte die Konzentration der Lysate die Konzentrationen der Proben der Standardreihe überschreiten, mussten die Proben mit Wasser verdünnt werden, da ansonsten die Aussagekraft der Messergebnisse unzuverlässig war.

Nach Zugabe von je 200 μl des Reaktionsgemisches pro Napf wurde die 96-well-Platte für 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 562 nm mithilfe des FLUOstar Omega und der dazugehörigen Software Omega analysiert.

Die Erstellung der Standardkurve sowie die Ermittlung des Proteingehalts in den Proben, ggf. unter Berücksichtigung etwaiger Verdünnungen, wurde mit Excel durchgeführt.

3.2.6 Western Blot

Die SDS-Gele für das Western Blot-Verfahren bestehend aus Trenn- und Sammelgel wurden nach im Folgenden beschriebenen Rezept selbst hergestellt und anschließend für einen Zeitraum von maximal 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Je nach Größe der nachzuweisenden Proteine wurden Gele mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen verwendet.

Trenngel (ergibt 2 Gele)

	8 %	10 %	12 %
Aqua dest.	5,7 ml	4 ml	3,35 ml
Acrylamid (19:1)	2,7 ml	3,3 ml	4 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	40 µl	40 µl	40 µl

Sammelgel (ergibt 4 Gele)

	4 %
Aqua dest.	6 ml
Acrylamid (19:1)	1,35 ml
0,5M Tris pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	50µl
TEMED	40µl

Der Western Blot, auch Immunoblot genannt, ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen nach Übertragung auf eine Trägermembran mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurden die Proteine im ersten Schritt ihrer Größe nach aufgetrennt und in einem zweiten Schritt auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wo sie anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden konnten.

Bei den unten genannten Volumenangaben wurde von einem Gel mit 10 Taschen zum Befüllen ausgegangen. Wurde ein Gel mit 12 oder 15 Taschen verwendet, musste das Gesamtvolumen der Probe entsprechend verringert werden.

Zunächst wurden die Proben für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Hierfür wurden je 40 µg Protein einer Probe mit Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und anschließend mit 5 µl fünffachem Lämmli-Puffer (Kap. 3.1.3) vermischt. Um eine Denaturierung der Proteine zu erzielen, wurden die Proben für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend zusammen mit einem Marker in die Taschen des Gels pipettiert. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (Kap. 3.1.3) befüllt und

die Gelelektrophorese für 1 bis 1,5 h bei einer Stromstärke von 60 mA durchgeführt, um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen.

Für den nächsten Schritt, den Transfer, wurde dieselbe Kammer mit Transferpuffer (Kap. 3.1.3) befüllt und eine Transferkassette nach unten stehendem Schema gebaut, um die Proteine für 90 min bei 100 V und 4 °C auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen.

Aufbau Transferkassette

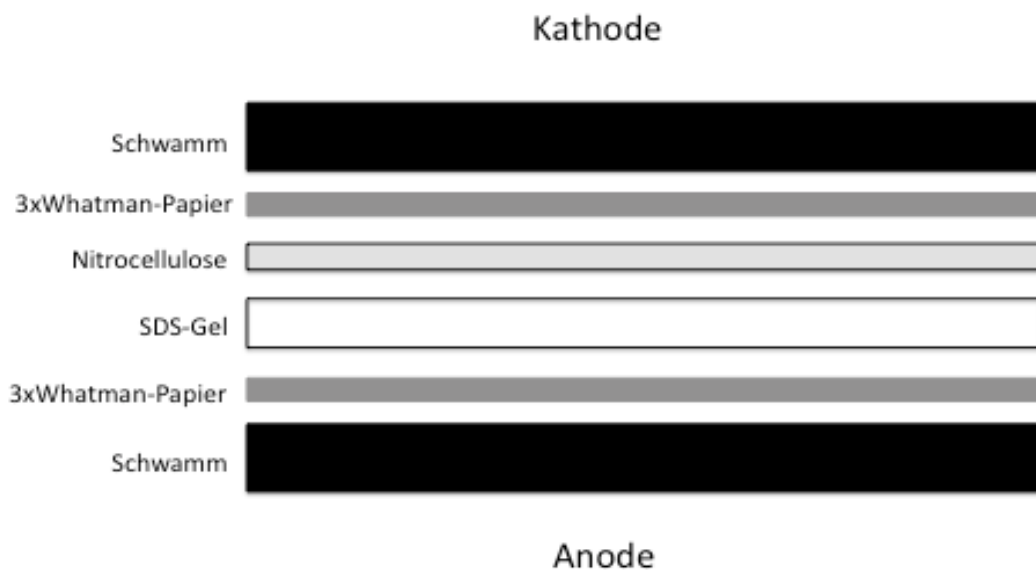


Abb. 6: Aufbau mit einzelnen Schichten der Transferkassette bei Durchführung eines Western Blots

Zur Erfolgskontrolle des Transfers wurde eine Ponceau-Färbung (Ponceau S Solution for electrophoresis) durchgeführt. Nach kurzer Einwirkzeit sollten die einzelnen Bahnen deutlich zu erkennen sein. Im Anschluss wurden die Farbrückstände durch die im TBS-T (Kap.3.1.3) enthaltenen Salze durch mehrmaliges kurzes Waschen der Membran entfernt. Die Membran wurde anschließend für 1 h mit 5%-Milchpulver (Kap. 3.1.3) blockiert, um sämtliche Bindungsstellen der Proteine auf der Membran zu besetzen.

Über Nacht erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers bei 4° C auf dem Schüttler, der 1:500 in 5%-Milchpulver verdünnt war. Einzig bei Verwendung des Phospho-Gab2-Antikörpers wurde Milchpulver durch TBS mit 0,1 % Tween-20 und 5 % BSA ersetzt. Durch die höhere Bindungsaffinität des Antikörpers an das Protein gegenüber der

Blockierlösung konnte der Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Protein binden.

Nach der nächtlichen Inkubation wurde die Antikörperlösung in ein Falcon-Röhrchen gefüllt, zur erneuten Benutzung eingefroren und die Membran für 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen, um Rückstände des Antikörpers zu entfernen. Antikörperlösungen mit primären Antikörper wurden maximal 5 Mal verwendet, ehe sie verworfen wurden, da dann von einer zu geringen Menge an Antikörpern auszugehen ist. Der Sekundärantikörper wurde im Mischverhältnis 1:2500 in Milchpulver bzw. TBS-T (bei Verwendung des Phosho-Gab2 Antikörpers) gelöst und für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Antikörperlösung mit dem Sekundärantikörper wurde verworfen und die Membran 4 x 15 min mit TBS-T gewaschen.

Um die Antikörperbindung sichtbar zu machen, wurde das ECL Western Blotting Substrate verwendet. Das HRP (Meerrettichperoxidase) am Sekundärantikörper reagierte mit dem HRP-Substrat in der ECL-Lösung und erzeugte dabei Licht. Diese Chemilumineszenz konnte mit bildnerzeugenden Geräten (LAS-3000) gemessen werden.

Zur genaueren Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Banden wurde bei jedem Western Blot eine Ladekontrolle durchgeführt. Hierzu wurden ubiquitär exprimierte Proteine wie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder heat shock cognate 71 kDa (HSC70) verwendet. Die Membran wurde in zwei Teile geschnitten, sodass sich auf einem Teil der Membran das nachzuweisende Protein befand und auf der anderen Hälfte das Protein, das der Ladekontrolle diente. Auf diese Weise war eine schnellere Auswertung möglich, da ansonsten die Membran zuerst von allen Antikörperbindungen befreit werden und eine erneute Antikörperinkubation zur Ladekontrolle hätte durchgeführt werden müssen.

3.2.7 Lösen von Antikörperbindungen von einer Nitrocellulosemembran

Um eine Membran ein zweites Mal zu verwenden, konnte die Bindung der Antikörper an die Membran gelöst („gestripped“) werden. Dazu wurde die Membran 10 min bei RT in einer sogenannten Stripping-Lösung (Kapitel 3.1.3) gebadet, danach kurz mit Aqua dest. gespült und für 10 min mit einer Neutralisierungslösung behandelt. Die

Membran konnte so erneut blockiert und mit weiteren Antikörperlösungen inkubiert werden.

3.2.8 RNA-Isolation

Bei der RNA-Isolation wurden Zellen zunächst lysiert, in einem zweiten Schritt RNAsen inaktiviert, sodass anschließend die RNA isoliert und aufgereinigt werden konnte. Bei der in dieser Arbeit angewendeten Methode handelte es sich um das Single-Step-Verfahren (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Die benötigten Zelllinien wurden am Tag vor der Anwendung in den Näpfen einer 6-Napf-Schale ausgesät, sodass zur Verwendung eine Konfluenz von 90 bis 100 % erreicht wurde. Nach Absaugen des Mediums und dem Waschen mit DPBS zur Beseitigung von Rückständen wurde jeder Napf mit 1 ml TriFast™ versetzt und mehrmals auf- und abpipettiert. Das in der TRI Reagenz enthaltene Trizol bewirkte neben der Lyse von Zellen die Inaktivierung verschiedener RNAsen sowie weiterer Enzyme, wobei das Phenol als Lösungsmittel für die RNA diente. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT und Überführen in ein Eppendorfröhrchen erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12.000 g. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zu den Proben gegeben und für 15 s kräftig geschüttelt und anschließend erneut für 10 min bei RT inkubiert. Das Chloroform bewirkte eine Phasentrennung der einzelnen Bestandteile, die sich nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4° C und 1.200 g darstellten. Die obere, farblose Phase enthielt RNA, die mittlere weiße Phase bestand aus DNA und die rote untere Phase aus Proteinen. Der RNA-Anteil wurde vorsichtig ohne Kontamination mit Anteilen der anderen Phasen in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und zu gleichen Teilen mit 70 %igem Ethanol gemischt.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy mini kit (Qiagen). Vom RNA-Ethanol-Gemisch wurden je maximal 700 µl auf eine Säule gegeben, die sich in einem Sammelröhrchen befand. Es folgte eine Zentrifugation für 20 sek bei 8.000 g; der Durchfluss wurde verworfen. Es schlossen sich insgesamt drei Waschschrte an; nach jedem erfolgte eine Zentrifugation für 20 sek bei 8.000 g und der Durchfluss wurde verworfen. Nach Wechsel des Sammelröhrchens folgte eine Zentrifugation für 30 sek bei maximaler Geschwindigkeit. Die Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser direkt

auf die Membran der Säule diente der Elution der RNA, welche durch Zentrifugation für eine Minute bei 8.000 g in einem neuen Sammelröhrchen gewonnen wurde. Um dem Abbau der empfindlichen RNA vorzubeugen, wurden die RNA Proben stets auf Eis gelagert. Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes und der Reinheit der Probe wurde die Probe spektrophotometrisch am Nano Drop gemessen. Die längerfristige Lagerung der RNA erfolgte bei -80° C.

3.2.9 Transkription zu cDNA

Complementary DNA (cDNA) bezeichnet eine DNA, die mittels reverser Transkriptase aus RNA synthetisiert wurde.

Zur Synthese der cDNA aus der isolierten RNA wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) verwendet. Alle Reagenzien wurden vor Benutzung aufgetaut, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert. 1 µg RNA wurde mit 1 µl Anchored-oligo(dT) Primer (50 pmol/µl) versetzt und mit Wasser auf 13 µl aufgefüllt.

Zur Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen sowie des Template-Primer Mixes wurde die Probe für 10 min im ThermoCycler auf 65 °C erhitzt. Um Evaporation zu vermeiden, wurde der Deckel auf 95 °C aufgeheizt. Nach sofortiger Kühlung der Probe auf Eis wurden nach Herstellerangaben RNase Inhibitor, reverse Transkriptase, dessen Reaktionspuffer sowie der Desoxynucleotide Mix dazugegeben, die Probe für 30 min auf 65 °C erhitzt und anschließend, um die Funktionsfähigkeit der reversen Transkriptase zu deaktivieren, für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die synthetisierte cDNA wurde mit 80 µl DNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

3.2.10 Amplifizierung von cDNA mittels realtime PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Bei der realtime PCR, auch quantitative realtime PCR (qRT-PCR) genannt, besteht die Möglichkeit, die Amplifizierung mittels Fluoreszenzmessung in Echtzeit zu bestimmen. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der in doppelsträngige DNA interkaliert.

In ein 1,5 ml-Eppendorfröhrchen wurde zunächst ein Gemisch bestehend aus 12,5 µl Maxima SYBR Green qPCR 2x Master Mix, 9,5 µl H₂O und jeweils 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (20 pmol) pro Probe vorbereitet. Um Pipettierungenauigkeiten bei solch kleinen Volumina auszugleichen, wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ansätze wurden in eine auf Eis gelagerte 96-well-Platte pipettiert und je 1 µg cDNA hinzugegeben. Der Einsatz spezifischer Primer erlaubte die Amplifizierung nur der gewünschten Strangabschnitte. Um eine Durchmischung der einzelnen Komponenten zu gewährleisten, wurde die Platte mit Folie verschlossen und für 5 min bei 100 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Die PCR wurde im LightCycler 480 nach unten beschriebenem Protokoll durchgeführt. Zur Erfassung der Messergebnisse diente die LightCycler 480 Software.

Tab. 10: Reaktionsschritte der rtPCR

Zyklen	Temperatur	Dauer	Reaktionsschritt
1	95°C	10 min	Aktivierung der Polymerase
45	95°C 60°C	15 sek 1 min	Schmelzen, Anlagerung und Verlängerung

Hierzu wurde mit dem Cycle of Threshold (Ct) gearbeitet. Diese Werte entsprachen dem Zyklus, in dem die Fluoreszenz der Probe die des Hintergrundes erstmals signifikant überstieg. Die Signifikanz war gegeben, sobald ein Schwellenwert (sog. Threshold) überschritten wurde. Bei der Auswertung der PCR wurden nur Ct-Werte unter 35 berücksichtigt, da höhere Werte als unspezifische Signale gewertet wurden.

Die von Livak und Schmittgen 2001 veröffentlichte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde zur Auswertung herangezogen. Mit ihr konnte die relative Expression des Zielgens bei unterschiedlichen Zellreihen in Bezug zu einem Referenzgen und einer -zelllinie berechnet werden. Als Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen GAPH verwendet. Im ersten Schritt wurde die Differenz der Ct-Werte von Zielgen und Referenzgen gebildet. Anschließend wurde auf eine Referenzzelllinie normalisiert, wodurch der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ermittelt wurde. Wie auch bei allen anderen Versuchen in dieser Arbeit, wurde als Referenz HPDE gewählt. Somit ergeben sich folgende Rechenschritte:

$$Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen} = \Delta Ct$$

$$\Delta Ct_{Zelllinie} - \Delta Ct_{Referenzzelllinie} = \Delta \Delta Ct$$

$$Relative\ Expression_{Zielgen} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Die Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Excel.

3.2.11 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Verfahren zur Erueirung des Zellwachstums und der Zellviabilität unter verschiedenen Bedingungen. Diese Methode wurde erstmals 1983 von Mosmann beschrieben. Beim MTT-Farbstoff handelt es sich um ein gelbes Tetrazoliumsalz, das in lebenden Zellen metabolisiert und zum violetten Formazan reduziert wird. Die photometrische Messung erfolgte nach Inkubationszeit mittels ELISA-Reader.

Der Inhalt einer Zellkulturflasche wurde trypsiniert und anschließend auf 10 ml mit Medium aufgefüllt. Davon wurden 2 ml entnommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach sorgfältiger Vereinzelnung der Zellen wurden 30 µl entnommen und mit der gleichen Menge an Trypan-Blau gemischt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer gegeben und die Anzahl der Zellen in allen vier Quadranten ermittelt sowie die Zellzahl/ml Zellsuspension nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{Zellzahl}{ml} = \frac{Summe\ aller\ vitalen\ Zellen\ in\ vier\ Großquadranten}{Anzahl\ der\ ausgezählten\ Großquadrate} \times 5000$$

Je nach gewünschter Zellzahl wurde das benötigte Volumen errechnet und pro Ansatz mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Das Aussäen der Zellen erfolgte in Vierfachbestimmung auf eine 96-well-Platte. Um eine wärmebedingte Verdampfung des Mediums zu verhindern, wurde für den Feuchtigkeitshaushalt um die bestückten Wells ein Rahmen aus je 200 µl PBS angelegt. Die Platten wurden in fünffacher Ausführung vorbereitet, je eine für folgende Messzeitpunkte: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h.

Nach einer Anwuchsphase über Nacht wurde von der ersten Platte das Medium aus allen Näpfen abgesaugt und vorsichtig mit DPBS gespült. Zur Messung der Zellviabilität wurde in allen bestückten Wells sowie in einen leeren Well zur Leerwertbestimmung 100 μ l Medium und 20 μ l MTT-Substrat zugegeben und nach einer und nach zwei Stunden Inkubationszeit im Brutschrank die Extinktion photometrisch bei 490 nm gemessen. Wenn die Auswirkung einer Substanz auf die Zellviabilität untersucht werden sollte, wurde der jeweilige Zusatz nach Messung des 0h-Wertes auf die restlichen Platten gegeben.

Die Auswertung erfolgte durch das Auftragen des relativen Wachstums in Abhängigkeit von der Zeit in Excel.

3.2.12 Apoptose Assay

Das verwendete Apoptose Assay Kit (Cell Signaling Technology) funktionierte nach dem Sandwich ELISA Prinzip über die Bestimmung der cleaved-Caspase-3 Konzentration in den Proben. Die Näpfe der Reaktionsplatte waren mit einem Antikörper gegen Caspase-3 beschichtet, sodass sich nach Zugabe von Zelllysaten eine Antikörper-Protein-Bindung bildete. Nach Zugabe eines weiteren Antikörpers, der sich an den gebundenen Caspase-3-Proteinen festsetzte, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und schließlich die photometrische Messung.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % wurde das Medium abgesaugt, mit DPBS gespült und frisches Medium ggf. mit einer apoptoseauslösenden/-hemmenden Substanz für einen definierten Zeitraum auf die Zellen gegeben.

Es wurden Gesamtzelllysate mit einem mitgelieferten Lysepuffer hergestellt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, mit kaltem DPBS gespült und der Lysepuffer für 5 Minuten auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellkratzers vom Boden der Platte geschabt und in ein auf Eis gelagertes Eppendorfröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 14.000 RPM bei 4 °C für 5 min wurde der Überstand, der das Lysat enthielt, wiederum in ein neues Gefäß pipettiert und die Proteinkonzentration mithilfe des BCA-Tests bestimmt (s. Kap. 3.2.5).

100 µl der Proben wurden in die Näpfe der mitgelieferten 96-well-Platte aufgetragen. Zur Erhöhung der Validität wurde der Versuch in Doppelbestimmung ausgeführt. Es folgte der erste Inkubationsschritt für 2 h bei 37 °C oder alternativ über Nacht bei 4 °C. In dieser Zeit band die in der Probe enthaltene Caspase an den mit Antikörper beschichteten Boden der Näpfe. Um Reste des Lysats zu entfernen, wurde nach der Inkubationszeit vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und die Rückstände des Puffers durch kräftiges Klopfen der Platte auf einen Stapel Papiertücher entfernt.

In jeden Napf wurden 100 µl des Primärantikörpers pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff und anschließend eine Inkubation mit 100 µl Sekundärantikörper für 30 min bei 37 °C. Um Rückstände des Antikörpers zu entfernen, wurde erneut gewaschen. Die Zugabe von 100 µl TBS Substrat für 10 Minuten bei 37 °C oder für 30 min bei RT sollten einen blauen Farbumschlag bewirken. Durch Zugabe von 100 µl Stop-Lösung wurde ein gelber Farbumschlag sichtbar. Der Farbumschlag diente als erste optische Kontrolle für das Funktionieren des Verfahrens. Innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stop-Lösung erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei 450 nm.

Die Messergebnisse wurden durch Verrechnung mit dem Ergebnis des BCA-Tests korrigiert und konnten ausgewertet werden.

3.2.13 Untersuchung des Mediums auf sRANKL

War eine Zellkulturflasche zu 100 % konfluent, wurde das alte Medium abgesaugt, einmal mit kaltem DPBS gespült und 15 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Nach 24 h, wenn sich das Medium gelb verfärbt hatte, wurde es abpipettiert und für 5 min bei 4.000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Damit aus dem Medium alle restlichen Zellbestandteile entfernt wurden, wurde der Überstand über ein Filtersystem (Steriflip Vacuum-driven Filtration System, Merck Millipore) gefiltert. Mithilfe von speziellen Säulen (Centriprep Centrifugal Filters, Merck Millipore) wurde das Medium in einem mehrstündigen Verfahren in mehreren Schritten auf ein Volumen von 500 µl eingengt, indem durch Zentrifugation über einen Filter das im Medium enthaltene Wasser, sowie Bestandteile bis zu einem Molekulargewicht von 3.000 Da entfernt wurden.

Durch Anwendung des BCA-Tests (s. Kap. 3.2.5) wurde der Proteingehalt im konzentrierten Medium bestimmt.

Zum Nachweis der Sekretion bestimmter Proteine wurde das Medium für einen Western Blot (s. Kap. 3.2.6) verwendet. Da der Anteil an Proteinen, die nicht nachgewiesen werden sollten, durch Verwendung von serumhaltigem Medium sehr hoch ist, wurden mindestens 100 µg Protein aufgetragen.

3.2.14 Immunpräzipitation mit unkonjugiertem primären Antikörper

Die Immunpräzipitation diente dem Selektionieren eines bestimmten Proteins aus einem Proteingemisch durch den Einsatz von Agarose, an die der für das Protein spezifische Antikörper bindet. Auf diese Weise erhielt man eine Probe, die eine sehr hohe Menge des in anderen Verfahren nachzuweisenden Proteins enthielt.

500 µg Gesamtzelllysate wurden mit 500 µl RIPA-Puffer aufgefüllt und mit 4 µg des spezifischen Antikörpers versetzt. Um eine möglichst gute Antikörper-Protein-Bindung zu erzielen wurde das Ganze für einen Zeitraum von einer Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert.

Zu jeder Probe wurden 40 µl Protein A/G-Agarose hinzugegeben, an die das Antikörper-Protein-Konstrukt bindet und über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Reaktionsgefäß bei 1.000 g und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde abpipettiert und das Agarosepellet insgesamt drei Mal mit Hank's Lösung gewaschen und nach jedem Waschschrift bei 1.000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das verbleibende Agarosepellet, welches in der Regel etwa einem Volumen von 40 µl entsprach, wurde mit 30 µl Lämmli-Probenpuffer versetzt und im Heizblock bei 95 °C für 5 min aufgekocht.

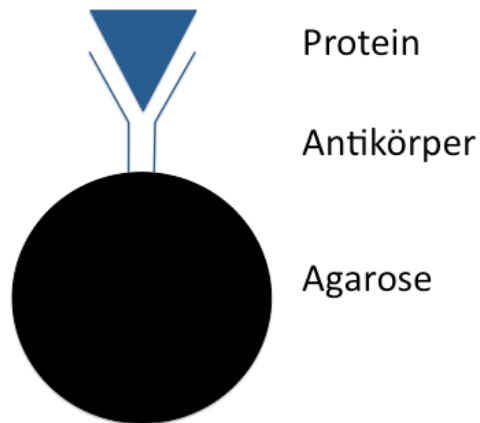


Abb. 7: Schematische Darstellung der Agarose-Antikörper-Protein-Bindung

Nach Zentrifugation für 1 min bei 1.000 g wurde die flüssige Phase auf ein SDS-Gel aufgetragen und ein Western Blot durchgeführt.

3.2.15 Isotypkontrolle und Immunpräzipitation

Eine Isotypkontrolle wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass bei Verwendung eines polyklonalen Antikörpers die im Western Blot (Kap. 3.2.6) sichtbaren Banden lediglich unspezifische Antikörperbindungen darstellen.

Es wurden zwei IP-Ansätze (Immunpräzipitationsansätze) vorbereitet und in einen Ansatz ein Antikörper, der gegen ein beliebiges Protein gerichtet ist, aber aus der gleichen Spezies stammt wie der zu verwendende Antikörper, eingesetzt. Die Immunpräzipitation wurde wie oben beschrieben fortgesetzt. Banden, die im abschließenden Western Blot bei beiden Antikörpern sichtbar wurden, sind als unspezifisch einzustufen.

3.2.16 Sandwich-ELISA

Für den Nachweis von löslichem RANKL im Serum von gesunden Probanden sowie im Serum von Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind, wurde ein Sandwich-ELISA-Test (Total sRANKL (human) ELISA kit, Immundiagnostik) durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Reagenzien stammten aus dem zugehörigen Kit.

Es wurde eine Mikrotiterplatte verwendet, in deren Vertiefungen ein hochspezifischer OPG-Antikörper haftet (Fängerantikörper). Um Pipettier- und Messungenauigkeiten auszugleichen, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zuerst wurde die Mikrotiterplatte fünf Mal mit je 250 µl pro Vertiefung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Reste des Waschpuffers durch sorgfältiges Ausklopfen auf Papier entfernt. Anschließend wurden die Vertiefungen mit je 50 µl der Standardlösungen, der Kontrolllösung und der verdünnten Patientenproben (1:10) befüllt. Zu jeder Probe wurden je 50 µl OPG-Lösung pipettiert. In diesem 24-stündigen Inkubationsschritt bei 4 °C wurde das sRANKL an das OPG gebunden, das wiederum vom Fängerantikörper gebunden wurde. Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Vertiefungen verworfen und jede Vertiefung wie oben beschrieben gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl biotinyliertem Detektionsantikörper mit Inkubation für 2 h bei RT. An der Wand der Mikrotiterplatte bildete sich nun ein Komplex aus Fängerantikörper und humanem OPG-sRANKL-Detektionsantikörper. Nach Verwerfen des Inhaltes der Vertiefungen erfolgte ein weiterer Waschschrift. Mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, von dem je 100 µl zu jedem Ansatz gegeben wurde, erfolgte die Quantifizierung durch die spezifische Bindung an Biotin. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 1 h bei 4 °C. Nach Verwerfen des Inhaltes der Vertiefungen schloss sich ein weiterer Waschschrift an. Als Peroxidasesubstrat wurde Petramethylbenzidin (TMB) eingesetzt, von dem nun je 100 µl in alle Vertiefungen pipettiert wurde. Nach Inkubation für 20 bis 30 min bei RT im Dunkeln wurde je 50 µl der Stopplösung zu den Ansätzen gegeben. Die darin enthaltene Säure stoppte die Enzymreaktion. Dadurch erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion wurde unmittelbar danach am Photometer bei 620 nm und bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe war dabei dem sRANKL-Gehalt in den Proben direkt proportional. Von den gemessenen Differenzen wurde anschließend der Leerwert abgezogen und aus der Standardreihe eine Eichgerade erstellt, sodass die sRANKL-Konzentration in den Patientenproben ermittelt werden konnte.

3.2.17 Plasmid-Präparation für Transfektionen

Die Plasmid-Präparation ist ein Verfahren zur Vermehrung von Plasmiden mithilfe von *E. coli* Bakterien. Alle verwendeten Puffer stammten, soweit nicht anders erwähnt, aus dem zugehörigen Kit (Plasmid Purification Kit, QIAGEN).

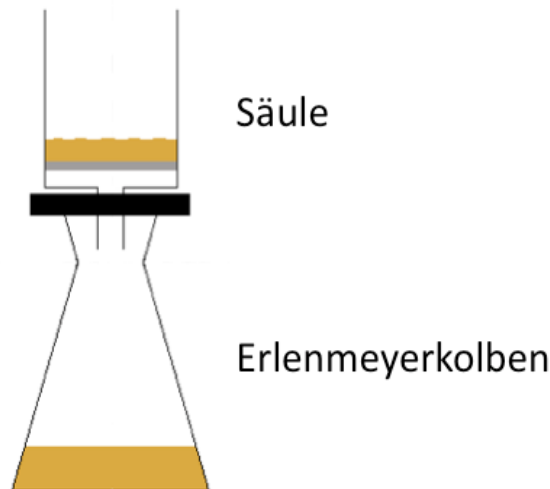


Abb. 8: Schematische Darstellung des Waschprozesses zur Gewinnung der aufgereinigten DNA.

Eine Pipettenspitze voller Bakterien wurde zusammen mit 200 ml speziellem Nährmedium (Luria Broth Medium) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und leicht schüttelnd über Nacht inkubiert. Um die Bakterien zu separieren, erfolgte eine Zentrifugation bei 4.000 g für 10 min. Der Überstand wurde entfernt, das Bakterienpellet in 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml des Lysepuffers wurde das Röhrchen vorsichtig geschwenkt und 3 min bei RT inkubiert.

10 ml Präzipitationspuffer wurden dazugegeben und das Röhrchen erneut geschwenkt, bis sich eine homogene Mischung ergab. Das Röhrchen wurde anschließend für 15 min bei -20 °C gelagert.

Um das Lysat vom restlichen Pellet zu trennen, wurde bei RT mit 12.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 30 ml Equilibrationspuffer equilibrierte Säule gegeben. Durch die Schwerkraft lief der Überstand durch die Säule in den darunter stehenden Erlenmeyerkolben. Die Säulen wurden daraufhin mit 60 ml Waschpuffer gewaschen und der Durchfluss verworfen.

Unter die Säulen wurde ein steriles Zentrifugationsröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 30 ml platziert und zur Elution der DNA 15 ml Elutionspuffer dazugegeben. Das Röhrchen enthielt nun die aufgereinigte DNA. Die Säule wurde verworfen und 10,5 ml Isopropanol der DNA zugefügt. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und entsorgt.

Das DNA-Pellet wurde in 10 ml 70 %igem Ethanol resuspendiert und erneut bei gleichen Einstellungen wie zuvor für 15 min zentrifugiert. Anschließend trocknete das Pellet für 5 min an der Luft. Das Pellet wurde in 500 µl TE Puffer resuspendiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.2.18 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion diente einer Vorauswahl mit optischer Kontrolle des Transfektionserfolges. Als Transportmedium der DNA diente Lipofektamin. Dieses bestand aus lipidhaltigen Bestandteilen, die Liposomen um die Plasmide bildete, was die Aufnahme durch Endosomen in die Zellen ermöglichte. Opti-MEM ist ein spezielles serumreduziertes Medium, das ideale Bedingungen für Transfektionen bildete, während die üblichen Serumzusätze in Nährmedien den Transfektionserfolg vermindern.

Zur Vorbereitung wurden die Zielzellen in 6-Napf-Platten ausgesät und bebrütet, bis diese eine Konfluenz von etwa 80% erreichten. Es erfolgte die Vorbereitung der Transfektionsansätze. Pro Ansatz wurden 400 µl Opti-MEM mit 10 µl Lipofektamin sowie 400 µl Opti-MEM mit 3 µl der aufgereinigten Plasmid-DNA und 1 µl Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und für 15 min bei RT inkubiert. Der Inhalt der beiden Gefäße wurde vermengt und für weitere 15 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium in den Näpfen abgesaugt und Rückstände mit PBS ausgewaschen. 1 ml Opti-MEM wurde in jeden Napf vorgelegt. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurden die gesamten 800 µl des Lipofektamin/DNA/EGFP-Gemisches auf die Zellen getropft. Nach mindestens fünfstündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt, Rückstände mit PBS entfernt und das für die Zellen passende Medium hinzugegeben.

Nach 24 h sollte sich das EGFP im Plasma befinden und die Zellen bei Betrachtung unter dem Mikroskop im Dunkeln grün leuchten. Da es sich um eine transiente Transfektion handelte, war keine Selektion mit Puromycin notwendig. Nach einigen Tagen des Wachstums konnte aus den Näpfen Lysate gewonnen werden, um die Effizienz der Transfektion der einzelnen Plasmide mit einem Western Blot zu beurteilen.

3.2.19 Ermitteln der Puromycin-Konzentration für Transfektionen

Im Rahmen einer Transfektion wurde neben der gewünschten Plasmid-DNA ebenfalls eine Puromycinresistenz auf die Zellen übertragen. Bei Puromycin handelt es sich um ein Nukleosidantibiotikum, das konzentrationsabhängig zu einem Absterben der Zellen führt. Bei Transfektionen führte die Puromycinbehandlung zu einem Selektionsdruck, sodass lediglich Zellen mit erfolgreicher Transfektion, also erfolgreicher Integrierung des Plasmids für die Puromycinresistenz, überlebten und für weitere Versuche verwendet werden konnten.

Die nicht transfizierten Zellen wurden in einer 6-Napf-Platte ausgesät und die einzelnen Näpfe mit aufsteigenden Puromycinkonzentrationen behandelt. Hierdurch wurde die kleinste Konzentration ermittelt, bei der sämtliche Zellen abgestorben waren.

3.2.20 Stabile Transfektion

Prinzipiell war das Vorgehen das gleiche wie bei einer transienten Transfektion (s. Kapitel 3.2.18), lediglich das Verhältnis von eingesetzter DNA zu Lipofektamin unterschied sich.

Es erfolgte zunächst das Aussäen der Zellen in 10 cm Schalen. Für jede Schale wurden je 40 µl Lipofektamin und 24 µg DNA mit jeweils 1,5 ml Opti-MEM vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Gefäßinhalte wurden anschließend gemischt und für weitere 15 min inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium auf den Zellen abgesaugt, mit PBS gespült und 12 ml Opti-MEM vorgelegt. Das Lipofektamin-DNA-Gemisch wurde vorsichtig auf die Zellen getropft.

Nach fünfstündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und nach Spülen mit PBS das für die Zellen zugehörige Medium in die Schalen pipettiert.

Nach einer Erholungsphase über Nacht wurden die Zellen mit der halben finalen Puromycinkonzentration behandelt. Nach weiteren 3 bis 4 Tagen beinhaltete das Medium die finale Puromycinkonzentration. Durch die Antibiotikabehandlung starben alle Zellen ab, bei denen die Transfektion nicht erfolgreich war. In der Regel zeigten sich bei Betrachtung unter dem Mikroskop nur noch wenige Zellen überlebensfähig, sodass sich ein Zellwachstum zögerlich gestaltete. Sobald sich kleine Kolonien bildeten, konnte weiter verfahren werden.

3.2.21 Kolonien picken (Transfektion)

Die Zellen wurden in den 10 cm Schalen so lange bebrütet, bis Kolonien sichtbar wurden, diese aber noch ausreichend Abstand zueinander hatten. Das Medium in den Schalen wurde abgesaugt. Über einzelnen Kolonien, die groß genug waren, um eine ausreichende Zellzahl zu gewinnen, wurde je ein kleiner Kunststoffring angebracht, sodass die Kolonie von dem Ring vollständig umschlossen war. Das Medium wurde abgesaugt, vorsichtig einmal mit PBS gespült und anschließend Trypsin über die Kolonie gegeben, bis diese gerade bedeckt war. Die Schale wurde anschließend für 5 min im Inkubator bebrütet. Währenddessen wurde in kleinen Zellkulturflaschen Medium vorgelegt. Das Trypsin mit den gelösten Zellen wurde mehrere Male auf- und abpipettiert und anschließend eine Kolonie in eine Zellkulturflasche überführt. Am Ende entsprach jede Zellkulturflasche einer Kolonie aus der 10 cm Schale.

3.2.22 Lentivirale Transduktion und Transfektion

Ziel der beschriebenen Methode des viralen Gentransfers war die Etablierung einer Zelllinie mit einem wirkungsvollen dauerhaften Knockdown der RANK-Expression. Als Kontrolle erfolgte die Transfektion eines Ansatzes mit SCR Puro, bei dem die RANK-Expression erhalten blieb und lediglich die Puromycinresistenz auf die Zellen übertragen wurde. Auf diese Weise konnte eine effizientere Transduktion erreicht werden als mit herkömmlichen Methoden (s. Kap. 3.2.20).

Für dieses Verfahren wurden bestimmte Hilfszellen verwendet, die nach Transduktion Lentiviren produziert hatten, die nach Vermehrung auf die Zielzellen gegeben wurden. Bei den Hilfszellen handelte es sich um die Zelllinie HEK293T (Human Embryonic Kidney Cells), die Anfang der Siebzigerjahre an der Universität Leiden etabliert wurde.

Sie bestehen aus transformiertem Nierenzellgewebe. Es handelte sich dabei im Gegensatz zu den HEK293-Zellen um eine Variante, die zusätzlich das T-Antigen des SV40 exprimiert, die eine Vermehrung von Lentiviren in diesen Zellen zulässt. Die Versuche wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

Die Hilfszellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät und im Inkubator bis zu einer Konfluenz von 80 % herangezüchtet. Es folgte die Transfektion in die Zellen mittels Lipofektamin. Hierzu wurden je Ansatz 5 µg der sh-RNA und als Helfervektoren 12 µg lenti gag/pol sowie 2 µg vsv-g mit 750 µl DMEM ohne Zusätze in ein 2 ml Eppendorfröhrchen pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 20 µl Plus Reagenz inkubierten die Ansätze für 15 min bei RT. 30 µl Lipofektamin wurden zu 750 µl DMEM gegeben und von diesem Gemisch 775 µl zu der Plasmid/DMEM Mischung gegeben.

Das Medium der HEK293T Zellen wurde abgesaugt und 5 ml DMEM mit 5 % FCS auf die Zellen gegeben und der Lipofektamin/Plasmidansatz vorsichtig dazupipettiert. Es folgte eine Inkubation für 3 h im Brutschrank. Anschließend wurden die Schale auf 9 ml mit DMEM mit FCS und P/S aufgefüllt und über Nacht im Inkubator bebrütet.

Parallel dazu erfolgte das Aussäen der Zielzellen. Eine zu 80 bis 90 % konfluente Zellkulturflasche wurde trypsiniert und die Zellzahl ermittelt. Das Aussäen wurde in einer 6-Napf-Platte durchgeführt. Nach Vorlegen von je 2,5 ml Medium wurde 5×10^5 Zellen pro Napf hinzugegeben und bebrütet.

Am dritten Tag der Versuchsreihe erfolgte die erste Transduktion des Virusüberstands auf die Zielzellen. Dazu wurde der Virusüberstand von den transfizierten HEK293T-Zellen genommen und filtriert. Auf die Hilfszellen wurde frisches Medium (DMEM mit FCS und P/S) gegeben. Das Medium der Zielzellen wurde abgesaugt und 1 ml frisches Medium vorgelegt. Anschließend wurden 2 ml des Virusüberstands hinzugegeben.

Der restliche Virusüberstand wurde für weitere Versuchsreihen bei -80 °C eingefroren. Das gleiche Vorgehen erfolgte an den zwei darauffolgenden Tagen. Am sechsten Tag des Versuchs wurde puromycinhaltes Medium auf die Zielzellen gegeben. Bei hoher Konfluenz wurden die Zellen in einer kleinen Zellkulturflasche bebrütet, sodass im Verlauf Gesamtzelllysate und RNA hergestellt werden konnten.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von RANK in humanen Pankreaskarzinomzelllinien

4.1.1 Nachweis mittels Western Blot

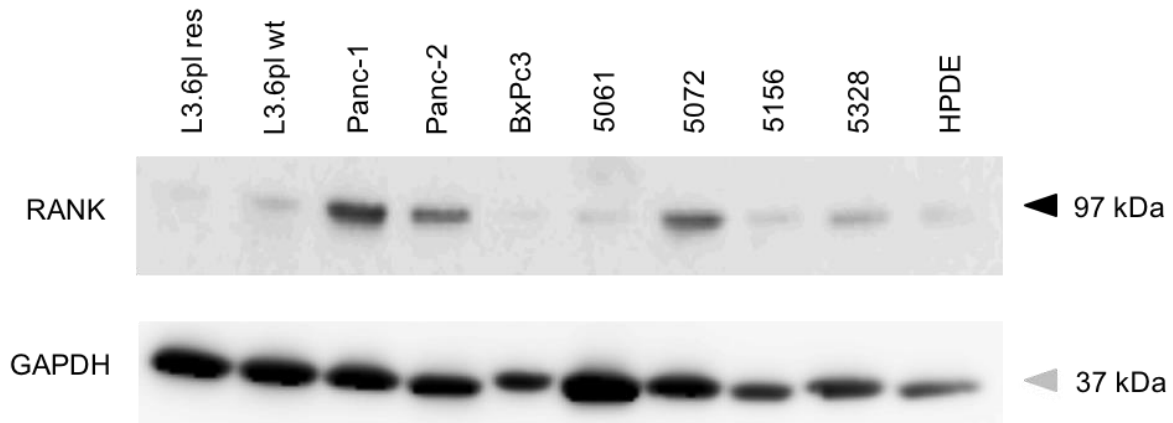


Abb. 9: RANK-Expression (Antikörper: Anti-RANK, ab22106, Abcam, 1:500 verdünnt) mit Gesamtzelllysaten der Zelllinien L3.6pl wt, L3.6pl res, Panc-1, Panc-2, BxPc3, 5061, 5072, 5156, 5328 und HPDE bei 97 kD (schwarzer Pfeil). Eine Ladekontrolle wurde mit GAPDH (Abcam, Ab9485, 1:2500 verdünnt) durchgeführt (grauer Pfeil).

Im Western Blot zeigte sich, dass die RANK-Expression innerhalb der Zelllinien sehr unterschiedlich war. Während Zelllinien wie Panc-1, Panc-2 und 5072 sehr starke Signale zeigten, war die Expression in den restlichen Zelllinien eher gering. Vergleich man die Zelllinien L3.6pl res und L3.6pl wt miteinander, so zeigte sich, dass der Wildtyp eine etwas ausgeprägtere RANK-Expression aufwies als die Gemcitabin resistente Zelllinie. Auch die verwendete Referenzzelllinie HPDE zeigte keine ausgeprägte Expression des membranständigen Proteins.

Die Banden waren wie zu erwarten auf einer Höhe von 97 kDa sichtbar. Es ließ sich zudem beobachten, dass in einigen Versuchsreihen mit Verwendung anderer Lysate Doppelbanden auf einer Höhe von 105 kDa nachzuweisen sind.

4.1.2 Nachweis mittels qRT-PCR

Der Nachweis der RANK-mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. In Abb. 11 sind die errechneten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte mitsamt der Standardabweichung für die neun untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien in Bezug zu HPDE dargestellt.

In allen Zelllinien ließ sich RANK-mRNA nachweisen. Wie im Western Blot zeigte die Zelllinie Panc-1 die höchste Expression von RANK. BxPC3 sowie 5156 wiesen ebenfalls eine erhöhte RANK-Expression im Vergleich zu HPDE auf. Vergleich man die L3.6pl-Zelllinien, zeigte sich beim Wildtyp (L3.6pl wt) eine höhere Expression als bei der Gemcitabin-resistenten Linie (L3.6pl res).

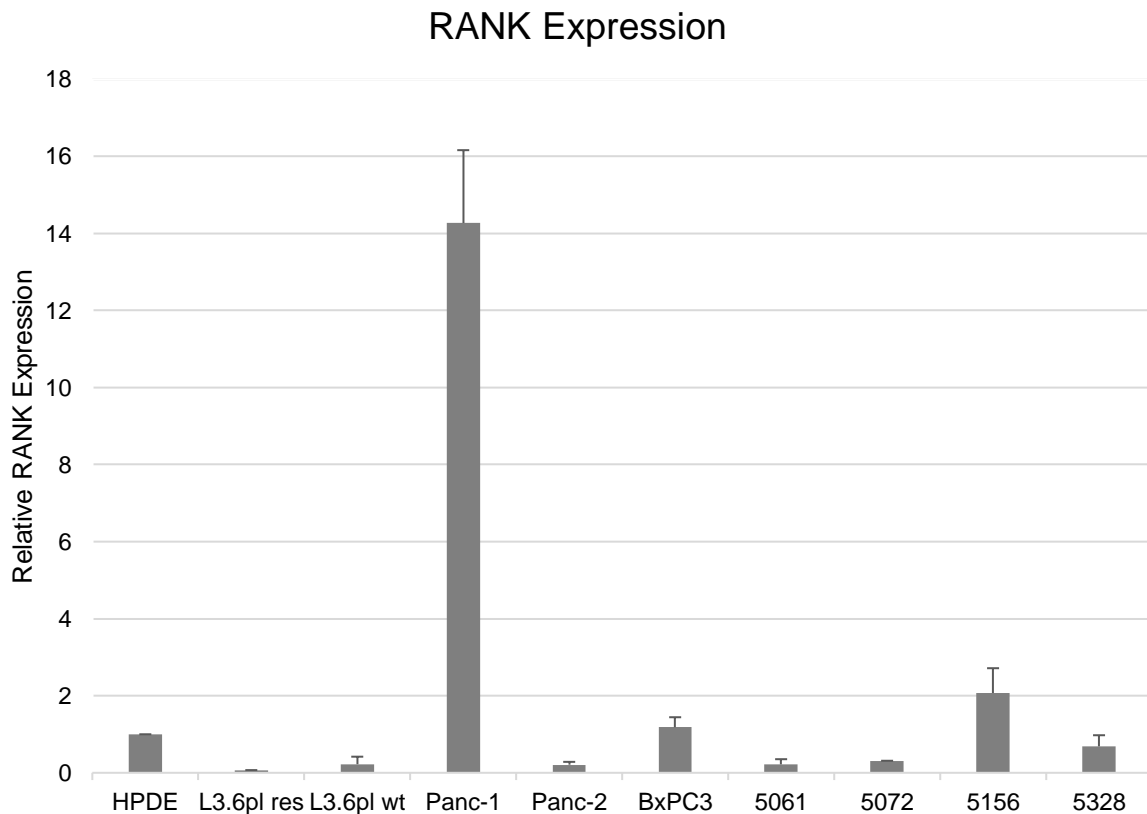


Abb. 10: mRNA-Expression von RANK mittels qRT-PCR. Dargestellt ist die relative Expression der neun untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien mit Standardabweichung. Die relative Expression ist zu HPDE (1) aufgetragen. L3.6pl res (0,05), L3.6pl wt (0,22), Panc-1 (14,27), Panc-2 (0,21), BxPC3 (1,18), 5051 (0,22), 5072 (0,31), 5156 (2,07) und 5328 (0,69).

4.2 Nachweis von RANKL in humanen Pankreaskarzinomzelllinien

4.2.1 Nachweis mittels Western Blot

In jeder untersuchten Karzinomzelllinie konnte RANKL nachgewiesen werden. Wie erwartet erschien eine Bande auf Höhe von 37 kDa. Zusätzlich konnte bei jeder Zelllinie eine Bande bei 35 kDa nachgewiesen werden. Die Ladekontrolle erfolgte mit HSC 70. Zudem konnten teils sehr schwache Banden zwischen 52 und etwa 110 kDa detektiert werden.

Insgesamt war die obere Bande, die bei 37 kDa lag, stärker ausgeprägt als die Bande, die bei 35 kDa nachgewiesen werden konnte. Eine Ausnahme bildete hier die Zelllinie 5072, bei der die 35 kDa-Bande deutlich stärker zu erkennen war als die bei 37 kDa. Ebenso zeigte sich bei L3,6pl wt die untere Bande etwas stärker kontrastiert, als die obere.

Im Vergleich zu HPDE zeigten Panc-1, Panc-2 sowie 5072 eine stärkere RANKL-Expression.

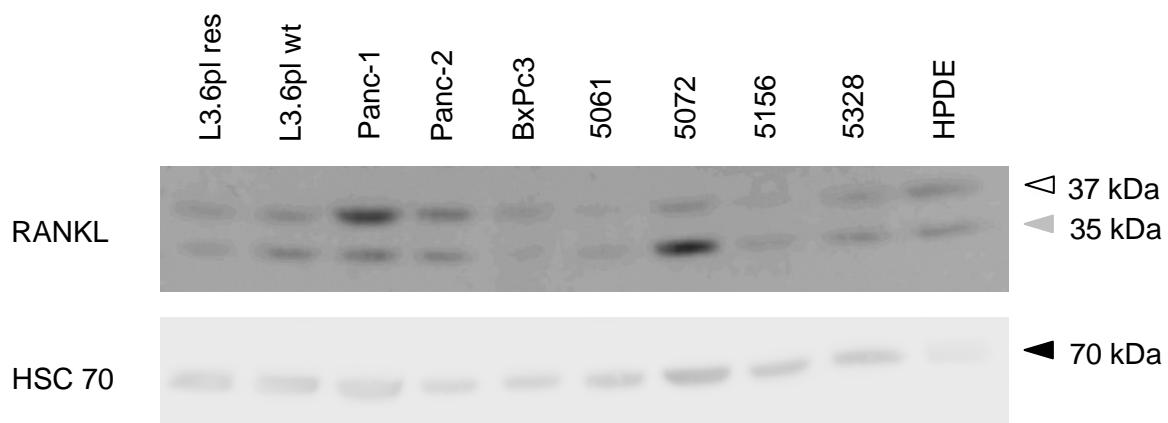


Abb. 11: Darstellung der RANKL-Expression (Antikörper: Anti-RANKL, ab9957, Abcam, 1:500) mit Gesamtzelllysaten von L3.6pl res, L3.6pl wt, Panc-1, Panc-2, BxPC3, 5061, 5072, 5156, 5328 und HPDE. RANKL wurde bei 37 kDa (weißer Pfeil) nachgewiesen. Zusätzlich stellte sich eine Bande bei 35 kDa dar (grauer Pfeil). Als Beladungskontrolle diente HSC 70 (Antikörper: Anti-HSC 70, sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, 1:500, schwarzer Pfeil).

4.3 Nachweis von löslichem RANKL (sRANKL) in humanen Serumproben mittels ELISA

Zum Vergleich der Serumkonzentration von löslichem RANKL bei gesunden Probanden und Patienten mit einem Pankreaskarzinom wurde ein Sandwich-ELISA-Test durchgeführt. Dafür wurden 15 Proben von Probanden und 14 Proben von Patienten mit einem histologisch gesicherten Pankreaskarzinom untersucht. Es zeigte sich, dass es sehr große Spannweiten der Serumkonzentration in beiden Gruppen gab. In der Gruppe der Probanden lag die sRANKL-Konzentration zwischen 32 und 604 pg/ml (Median 283 pg/ml), während die Spannweite bei den Patienten bei 12 bis 604 pg/ml lag (Median 259 pg/ml). Die jeweiligen Mittelwerte sind mit der entsprechenden Standardabweichung in Abb. 13 dargestellt. Insgesamt stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen dar. Zu statistisch

genaueren Aussagen wäre sicherlich eine Untersuchung mit einem größeren Kollektiv notwendig.

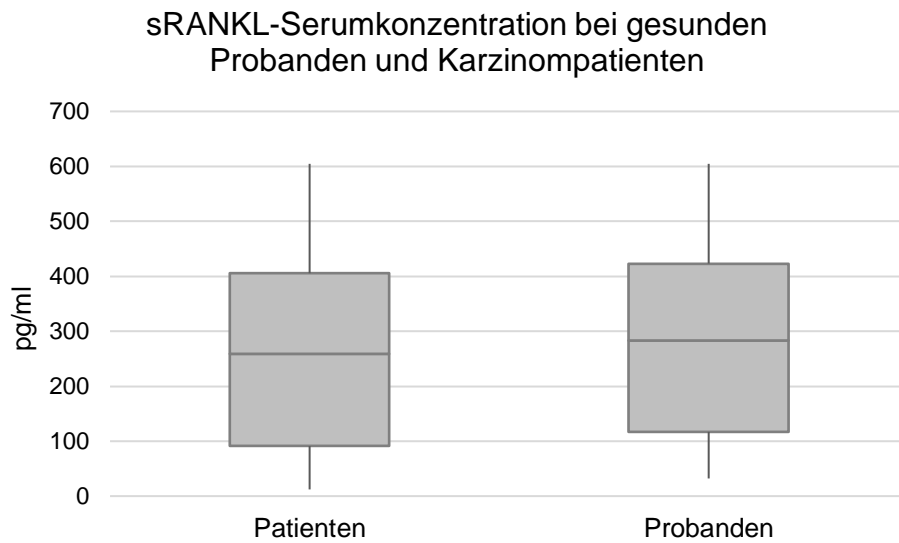


Abb. 12: Bestimmung der sRANKL-Serumkonzentration in pg/ml mittels ELISA bei gesunden Probanden und Pankreaskarzinompatienten (Probanden n = 15, Patienten n =14).

In einer weiterführenden Untersuchung wurde die sRANKL-Konzentration im Serum bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom vor und nach Durchlaufen der Chemotherapie mit Gemcitabine verglichen (Abb. 13).

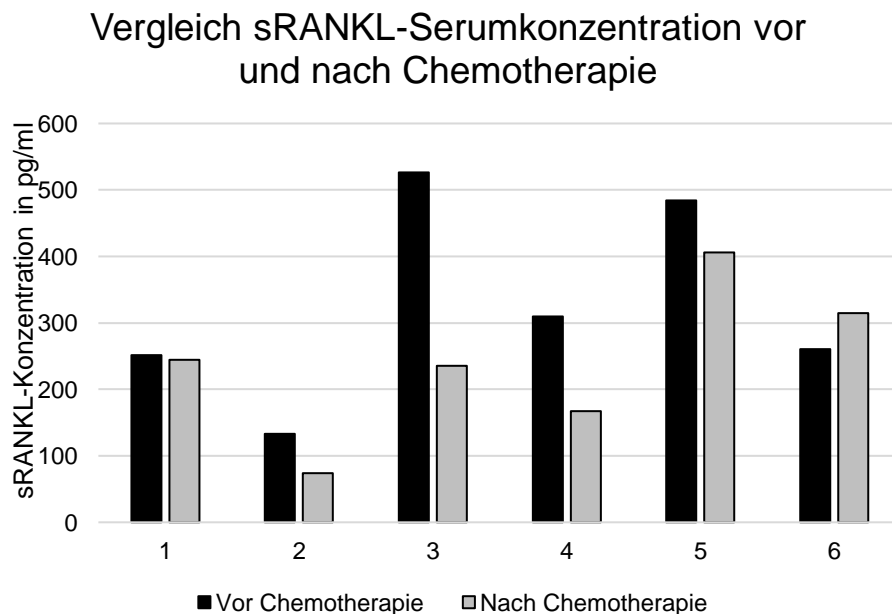


Abb. 13: Vergleich der sRANKL-Serumkonzentration von Pankreaskarzinompatienten (n=6) vor und nach Chemotherapie mit Gemcitabine. Verbleibende relative sRANKL-Konzentration im Serum nach Chemotherapie: 1=97,24%, 2=55,31%, 3=44,79%, 4=54,11%, 5=83,99%, 6=120,72%.

Aufgrund geringer Probenmengen konnte dieser Versuch nur einmal durchgeführt werden, sodass eine endgültige Validität sicherlich nicht gegeben ist und die Untersuchung lediglich orientierende Ergebnisse zeigte. Bei drei der sechs untersuchten Patientenproben kam es nach Beendigung der Chemotherapie zu einem deutlichen Abfall der sRANKL-Konzentration im Serum. Eine Probe zeigte keine Veränderung (Probe 1) und bei einem Patienten konnte nach der Chemotherapie sogar eine höhere Menge an sRANKL im Serum nachgewiesen werden, als vor Beginn der Chemotherapie (Probe 6).

4.4 RANK-Knockdown Versuche

4.4.1 Panc-1

Im Vorfeld wurde zur Testung der Effektivität der einzelnen Plasmide eine transiente Transfektion (s. Kapitel 3.2.18) durchgeführt, bei der zu den Zielplasmiden zusätzlich EGFP hinzugefügt wurde, was eine Fluoreszenz unter der lichtmikroskopischen Betrachtung und somit eine optische Erfolgskontrolle ermöglichte (Abb. 14).

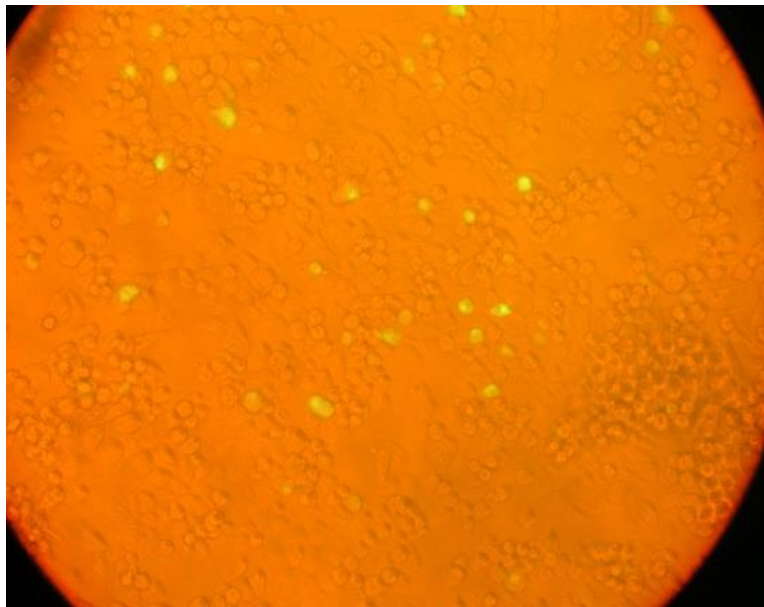


Abb. 14: Lichtmikroskopisches Bild nach transienter Transfektion von Panc-1 mit dem RANK knockout Plasmid 3351 und EGFP. Die leuchtenden Zellen stellen hier die erfolgreich transfizierten Zellen dar.

Für die Zelllinie Panc-1 wurde nach stabiler Transfektion eine Reihe von neuen Knockdown-Zelllinien generiert (s. Kap. 3.2.19 und 3.2.20), die mittels Western Blot

auf die Effektivität des Knockdowns untersucht werden sollten. In allen Zellreihen zeigte sich eine RANK-Expression mit Banden bei 105 und 97 kDa. Die Zelllinie Panc-1 SCR diente als Referenzzelllinie, anhand derer die Restexpression von RANK nach dem Knockdown bestimmt werden sollte.

Die Plasmide 3351 und 3352 wurden im Folgenden nach Erstellung von Subkulturen der Einfachheit halber mit 51 bzw. 52 abgekürzt.

Insbesondere die Linie 52.5 zeigte im Western Blot eine geringere Bandenstärke als SCR, wohingegen sich bei den meisten anderen Reihen die Expression von RANK durch den Knockdown kaum zu verändert haben schien.

Als Beladungskontrolle wurde GAPDH verwendet, das, wie erwartet, eine Bande in Höhe von 37 kDa aufwies.

Zusätzlich zum Western Blot wurde zur Quantifizierung eine qRT-PCR der knockdown Zellreihen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt.

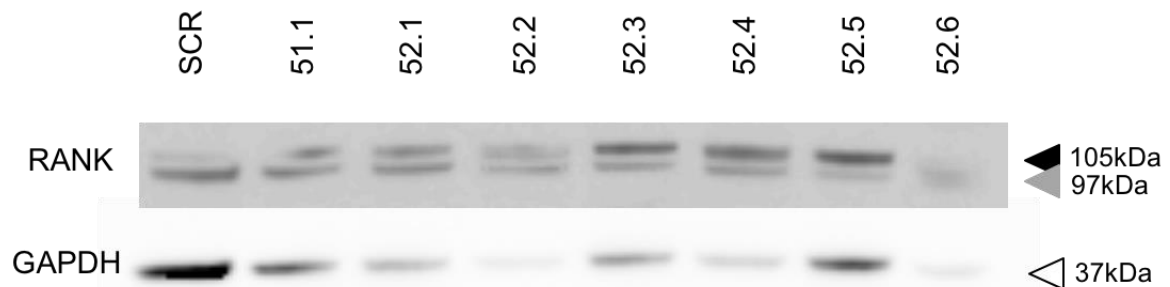


Abb. 15: Screening Panc-1 RANK-Knockdown Zellen (Antikörper: Anti-RANK, ab22106, Abcam, 1:500). Es zeigten sich Doppelbanden auf Höhe von 105 kDa (schwarzer Pfeil) und 97 kDa (grauer Pfeil). Als Beladungskontrolle wurde GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9485, Abcam, 1:500) verwendet. Getestet wurden die Subtypen 51.1 und 52.1-52.6. Als Referenz diente Panc-1 SCR.

Bei allen untersuchten Zellreihen war eine deutliche Verminderung der RANK-Expression zu erkennen. Dabei schwankte die verbliebene Expression des RANK-Proteins zwischen 24 % (52.5) und 5,2 % (52.4).

RANK knockdown Panc-1

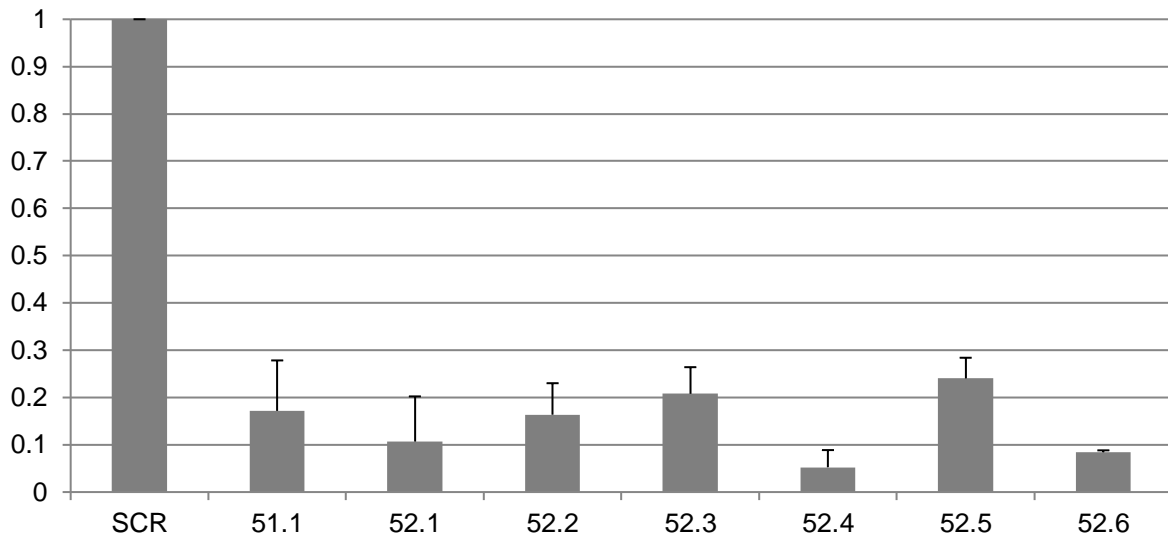


Abb. 16: Darstellung der RANK-Expression in den Knockdown Zelllinien 51.1 und 52.1-52.6 im Vergleich zu Panc-1 SCR. Auf der y-Achse ist die RANK-Expression aufgetragen. Die verbliebenen RANK-Expressionen sind 51.1: 17,2%, 52.1: 10,7%, 52.2: 16,4%, 52.3: 20,8%, 52.4: 5,2%, 52.5: 24% und 52.6: 8,4%.

4.4.2 BxPC3

Bei der Zelllinie BxPC3 wurde das Verfahren der lentiviralen Transfektion und Transduktion angewendet um den gewünschten Knockdown zu erreichen. Abb. 17 zeigt einen Western Blot, bei dem nach erfolgter Transfektion RANK nachgewiesen wurde. Als Referenzzelllinie zur noch verbliebenen RANK-Expression wurde BxPC3 SCR verwendet. Die Beladungskontrolle erfolgte mit GAPDH.

Alle Zelllinien zeigten eine RANK-Expression mit sichtbaren Banden bei 97 kDa. Eine genaue Aussage zur Effektivität des Knockdowns war bei schwacher Bandenstärke nicht sicher zu treffen, sodass, wie bei anderen Versuchen auch, eine Quantifizierung mittels qRT-PCR zur Validierung durchgeführt wurde.

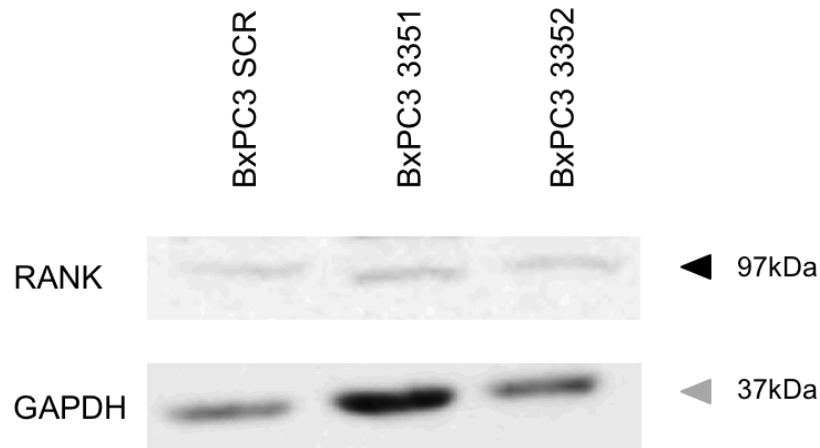


Abb. 17: Vergleich der RANK-Expression (Antikörper: Anti-RANK, ab22106, Abcam 1:500) der Knockdown-Zelllinien BxPC3 3351 und 3352 mit BxPC3 SCR (schwarzer Pfeil) bei einer Höhe von 97 kDa (schwarzer Pfeil). Die Beladungskontrolle wurde mit GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500) durchgeführt (grauer Pfeil).

RANK knockdown BxPc3

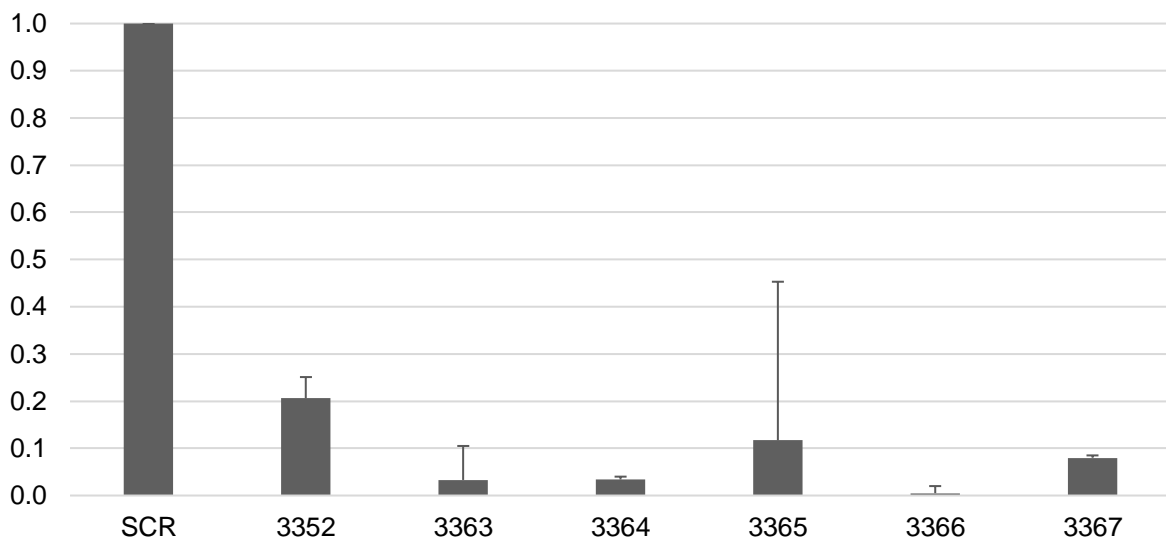


Abb. 18: Darstellung der RANK-Expression der knockdown Zelllinien BxPC3 3352, 3363-3367 im Vergleich zu BxPC3 SCR. Die verbliebenen RANK-Expressionen nach knockdown sind 3352: 20,6 %, 3363: 3,3 %, 3364: 3,4 %, 3365: 11,7 %, 3366: 0,5 %, 3367: 8,0 %.

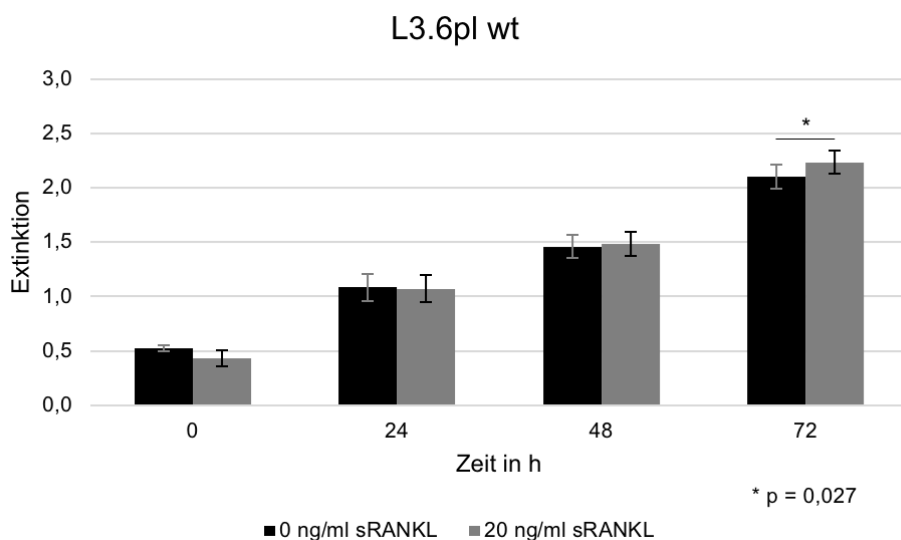
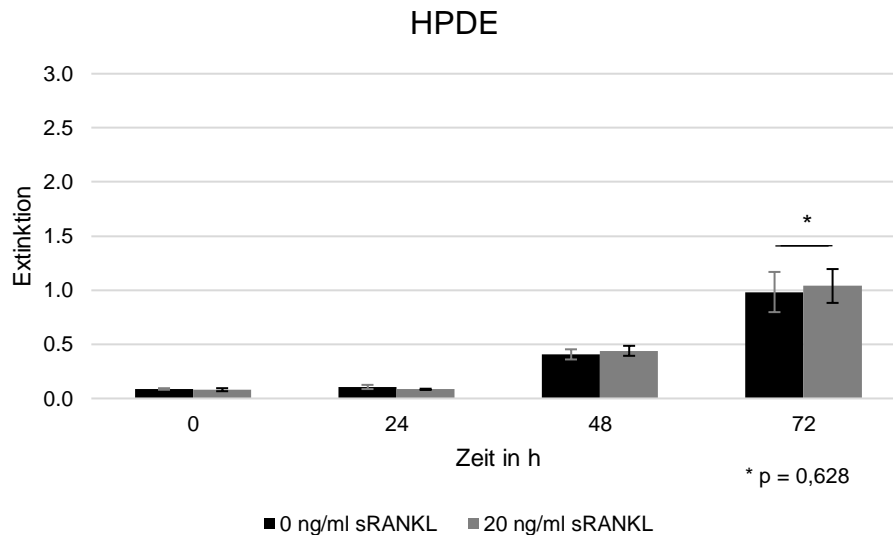
Bei allen untersuchten Zelllinien des RANK-Knockdowns war eine deutlich verminderte Expression des Zielproteins im Vergleich zu BxPC3 SCR zu erkennen (Abb. 18). Die verbliebene RANK-Expression schwankte hierbei zwischen 0,5 % (3366) und 20,6 % (3352), sodass insgesamt von einem erfolgreichen Knockdown ausgegangen werden konnte. Die Messwerte der Zelllinie 3365 zeigten sehr große

Schwankungen auf, sodass eine sichere Aussage hinsichtlich zur vorhandenen Restexpression nicht getroffen werden kann.

4.5 Zellproliferationsversuche mit sRANKL-Stimulation

4.5.1 Native Zelllinien

Die einzelnen Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von löslichem RANKL behandelt, um die Auswirkung auf das Proliferationsverhalten zu untersuchen. Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit den Konzentrationen 20 und 40 ng/ml sRANKL durchgeführt, grafisch dargestellt sind hier die nur die Versuche mit 20 ng/ml.



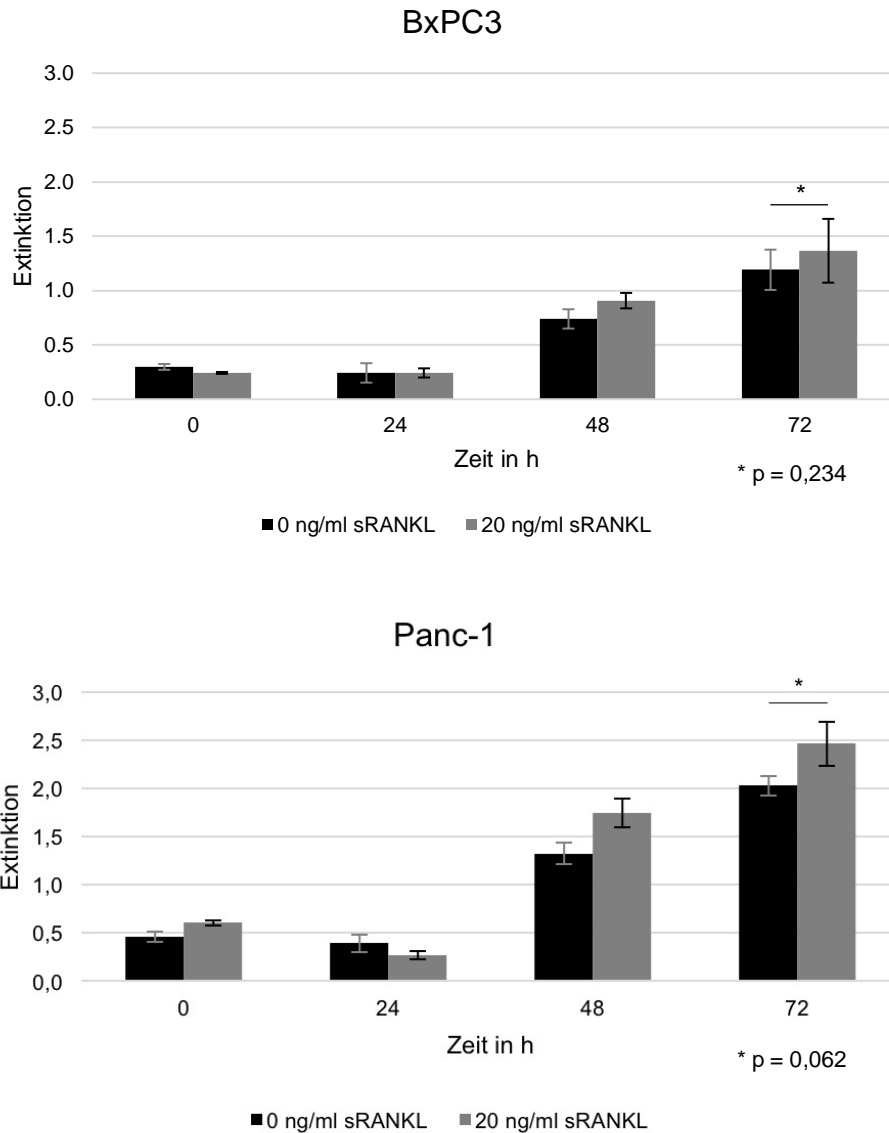


Abb. 19: Darstellung des Zellwachstums im MTT-Test über einen Zeitraum von 72 Stunden. Verglichen wurde die Zellviabilität der Zelllinien HPDE ($p=0,63$), L3.6pl wt ($p=0,03$), Panc-1 ($p=0,06$) und BxPC3 ($p=0,32$) ohne sRANKL-Stimulation und unter Zugabe von 20 ng/ml sRANKL (Recombinant human TRANCE (sRANKL), R&D Systems).

In der Kontrollzelllinie HPDE konnte bei keiner verwendeten sRANKL-Konzentration eine signifikante Auswirkung auf das Proliferationsverhalten nachgewiesen werden. Zwar zeigte sich bei einigen der getesteten Pankreaskarzinomzelllinien sowohl mit 20 als auch mit 40 ng/ml ein vermehrtes Wachstum unter Stimulationsbedingungen; die statistische Auswertung mit dem student's *t-test* zeigt jedoch lediglich bei der Zelllinie L3.6pl wt einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) des Zellwachstums nach 72 h. Interessanterweise konnte dieser Unterschied bei einer Anwendung von 40 ng/ml sRANKL nicht nachgewiesen werden.

Das Wachstumsverhalten zeigte sich von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. Während L3.6pl wt ein relativ konstantes Wachstum aufwies und sich die Zellzahl nach 24 h bereits um das 3,5-Fache vervielfacht hatte, zeigten die anderen Zellreihen ein zu Beginn etwas verzögertes Proliferationsverhalten. Sowohl bei HPDE, Panc-1 als auch bei BxPC3 war erst bei der Messung nach 48 h ein Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen. Auch wenn HPDE in den ersten 24 h keinen nennenswerten Anstieg der Zellviabilität aufwies, so zeigte sich diese Zelllinie doch als jene, die über den Gesamtzeitraum von 72 h das stärkste Wachstum aufwies. Die Zellzahl vermehrte sich hierbei um das 11-Fache.

BxPC3 erwies sich als die Zelllinie, die ohne sRANKL-Stimulation das langsamste Wachstum bot, die Zellviabilität erhöhte sich hier nach 72 h gerade einmal um das 4-Fache.

4.5.2 Knockdown-Zelllinien

Die Knockdown-Zelllinien der BxPC3-Zelllinie wurden, analog zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Versuchen, mit 20 und 40 ng/ml sRANKL behandelt, um das Verhalten auf das Wachstum zu untersuchen.

Weder in der Kontrolllinie BxPC3 SCR noch in den Knockdown-Zelllinien zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten unter sRANKL-Stimulation. Deutlichere Ergebnisse ergab der Vergleich der einzelnen Zelllinien ohne sRANKL-Stimulation. So fiel auf, dass die Knockdown-Zelllinien ein signifikant langsames Wachstum ($p=0,02$ bzw. $p=0,03$) aufwiesen als die SCR-Kontrolle (s. Abb. 21). Die RANK-Expression scheint demzufolge einen gewissen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu haben. Eine Stimulation von RANK durch lösliches RANKL erbrachte keine Änderungen bei der Proliferationsgeschwindigkeit.

Versuche, die mit einer sRANKL-Konzentration von 40 ng/ml durchgeführt werden, zeigten ähnliche Ergebnisse wie in den unten aufgeführten Abbildungen.

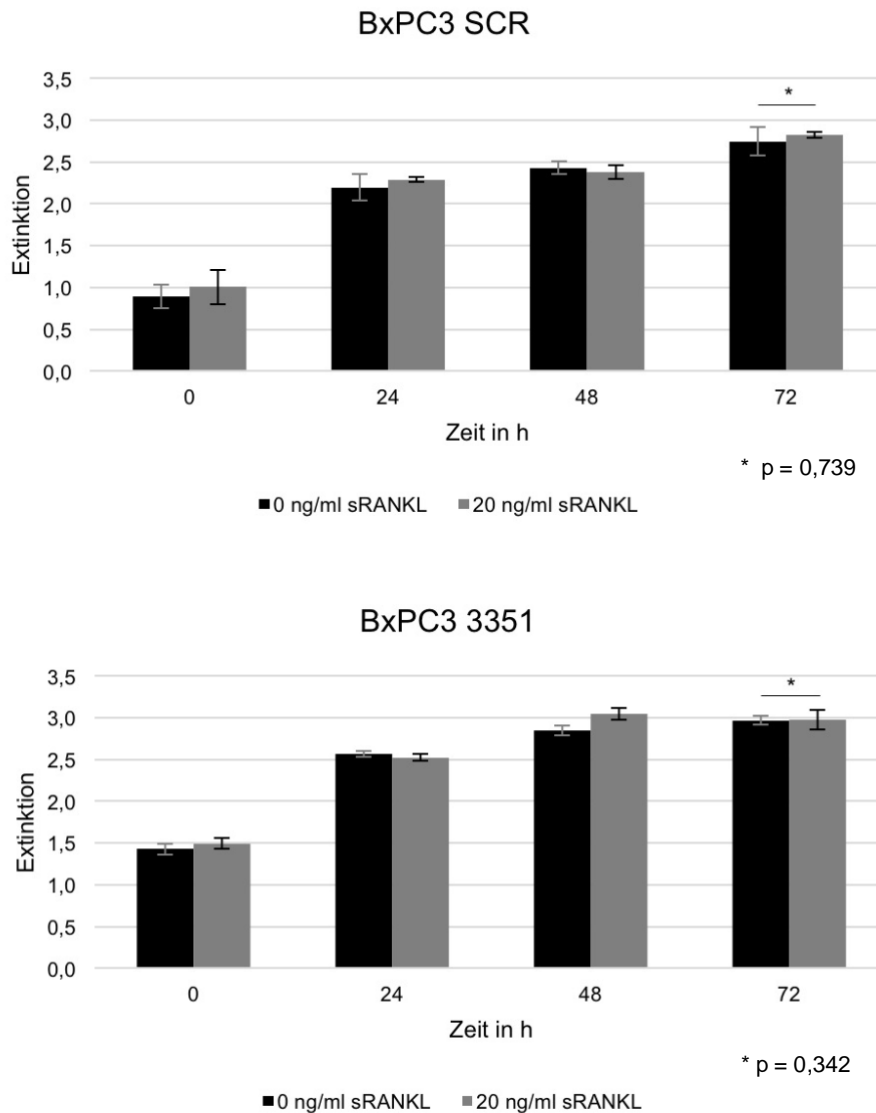


Abb. 20: Vergleich des Wachstumsverhaltens der Knockdown-Zelllinien BxPC3 SCR und 3351. Die Versuche wurden mit einer Konzentration von 20 ng/ml sRANKL (Recombinant human TRANCE (sRANKL), R&D Systems) und über einen Zeitraum von 72 h durchgeführt.

Bei den Knockdown-Zelllinien der Panc-1 Linie zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Sowohl mit als auch ohne sRANKL-Stimulation zeigten die Zelllinien ein annähernd gleiches Wachstumsverhalten, ohne dass einer dieser Unterschiede eine statistische Signifikanz aufwies.

Bei Betrachtung der einzelnen Knockdown-Zelllinien im Vergleich zur Panc-1 SCR stellte sich auch hier kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten dar (siehe Abb. 21).

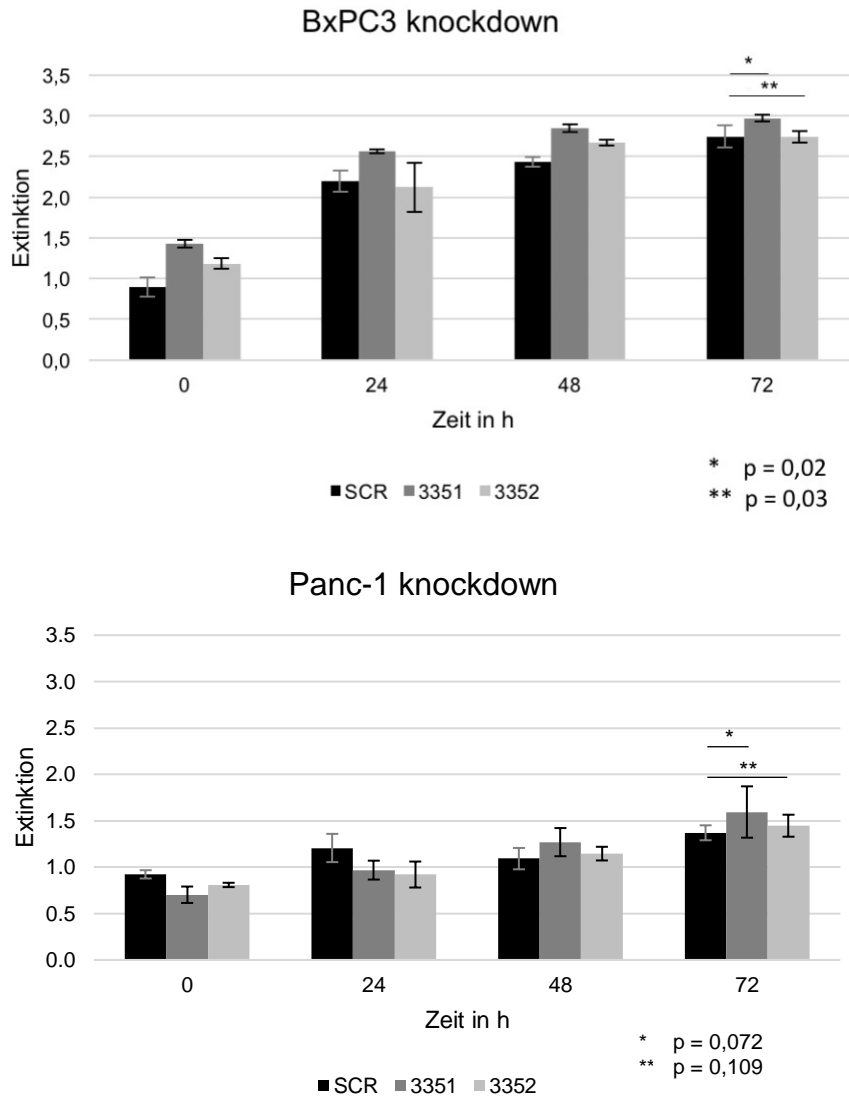


Abb. 21: Vergleich der Proliferation der Zelllinien BxPC3 SCR, 3351 und 3352 sowie Panc-1 SCR, 3351 und 3352 über einen Zeitraum von 72 h.

4.6 Nachweis von COX-2 in humanen Pankreaskarzinomzelllinien

Als Grundlage für weitere Versuche wurde zunächst die Expression von COX-2 in den neun untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HPDE mittels eines Western Blots dargestellt.

Nicht bei allen Zelllinien konnte COX-2 nachgewiesen werden. Während die Expression bei L3.6pl wt und res sowie bei Panc-1 sehr stark war, zeigte sich in den anderen untersuchten Linien eine deutlich geringere bis kaum nachweisbare COX-2 Expression. Dies traf insbesondere für Panc-1, Panc-2 und 5156 zu. In der

Kontrollzelllinie HPDE konnte eine schwache COX-2 Expression nachgewiesen werden.

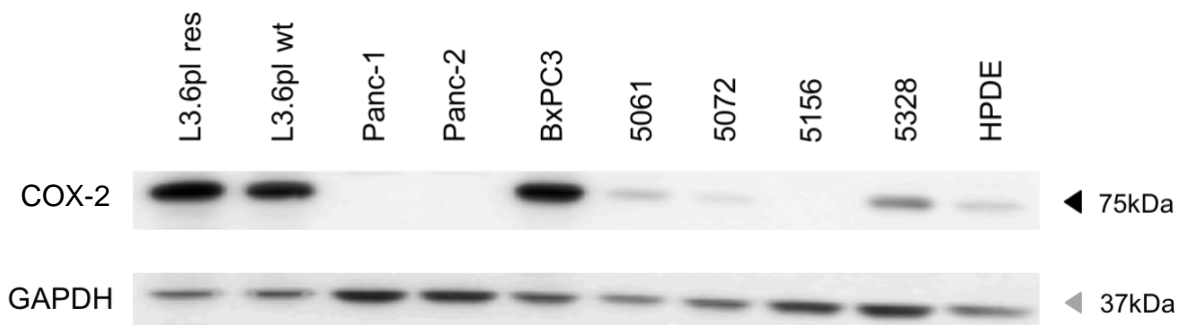


Abb. 22: Vergleich der COX-2-Expression (Antikörper: Anti-COX2, ab15191, Abcam, 1:500) der neun humanen Pankreaskarzinomzelllinien und HPDE. Darstellung einer Bande bei 75 kDa (schwarzer Pfeil). Als Beladungskontrolle diente GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500) mit einer Bande bei 37 kDa (grauer Pfeil).

4.7 COX-2 Nachweis nach sRANKL-Stimulation

Nachdem nachgewiesen wurde, dass einige der Pankreaskarzinomzelllinien COX-2 exprimierten, sollte untersucht werden, ob sich die Expression von COX-2 verändert, wenn die Zellen für definierte Zeiträume in sRANKL-haltigem Medium inkubiert wurden. Hierfür wurde die Referenzzelllinie HPDE verwendet sowie Panc-1 und BxPC3. Auf diese Weise konnte eine Zelllinie mit hoher sowie eine mit sehr geringer COX-2-Expression untersucht werden.

In allen drei Fällen zeigte sich, dass nach Stimulation mit sRANKL eine stärkere COX-2-Bande im Western Blot nachzuweisen war. Dabei unterschieden sich die Zelllinien jedoch im Zeitpunkt der maximalen COX-2-Expression.

HPDE zeigte bereits nach einer Inkubationszeit von nur 5 min eine deutlich stärkere COX-2-Bande. Zu späteren untersuchten Zeitpunkten wurde die Banden bereits wieder schwächer.

Bei Panc-1 wurde weder in der Kontrolle noch zu den ersten zwei Messzeitpunkten eine Bande nachgewiesen. Nach 20 min unter sRANKL-Stimulation war eine schwache Bande zu detektieren, die jedoch nach 30 min Inkubationszeit nicht mehr nachzuweisen war.

BxPC3 zeigte wie in zuvor durchgeführten Versuchen bereits ohne Stimulationsbedingungen eine deutliche Bande, die nach 20 min ihr Maximum

erreichte. Nach 30 min mit sRANKL war bereits ein Rückgang der Bandenstärke zu verzeichnen.

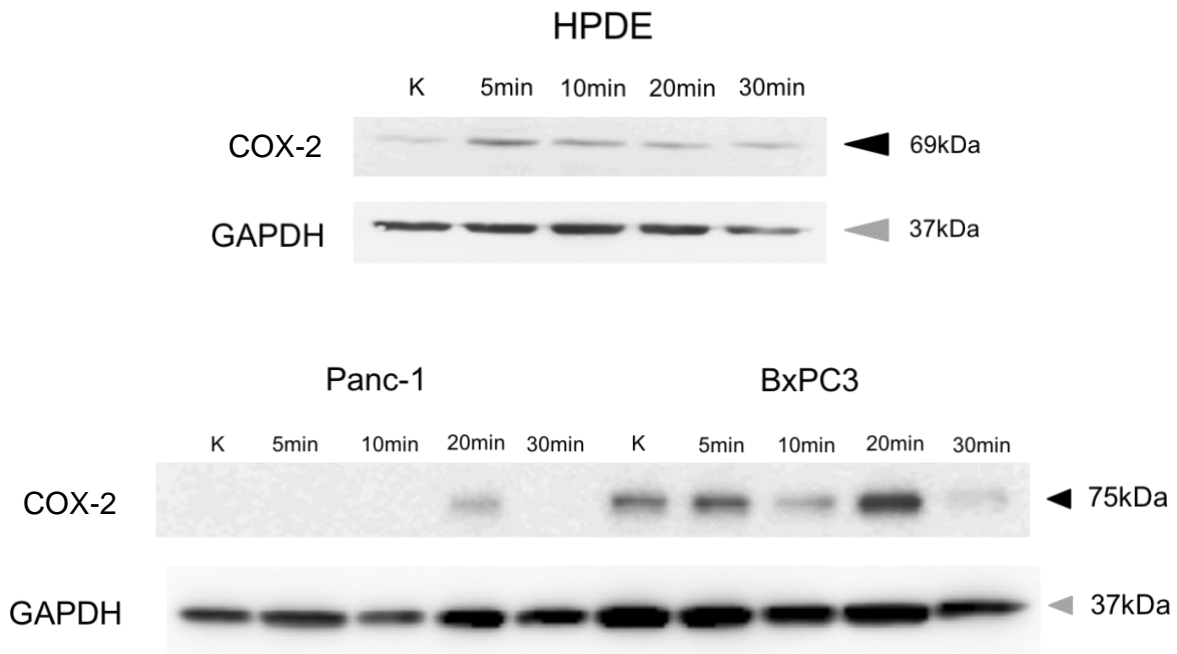


Abb. 23: COX-2-Expression (Antikörper: Anti-COX2, ab15191, Abcam, 1:500; schwarzer Pfeil) nach Stimulation mit sRANKL (Recombinant human TRANCE [sRANKL], R&D Systems). Untersucht wurden die Zelllinien HPDE, Panc-1 und BxPC3. K stellt hierbei die Kontrolle (K) ohne Stimulationsbedingungen dar. Die anderen Proben wurden für je 5, 10, 20 und 30 min der sRANKL-Stimulation ausgesetzt. Als Beladungskontrolle diente GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500), es stellte sich eine Bande bei 37 kDa dar (grauer Pfeil).

4.7.1 COX-2 Nachweis nach sRANKL-Stimulation bei Knockdown-Zellen

Um zu untersuchen, welchen Effekt eine sRANKL-Stimulation auf die hergestellten Knockdown-Zelllinien hat, wurden diese - ebenso wie in den oben beschriebenen Versuchen - je Ansatzreihe für 5, 10, 20 und 30 min mit löslichem RANKL inkubiert, bevor Lysate hergestellt und die COX-2-Expression bestimmt wurde. Zur Kontrolle diente ein sRANKL-freier Ansatz.

Es zeigte sich in jeder Probe eine Bande bei 69 kDa. Bei Panc-1 SCR war ein leichter Anstieg der Bandenintensität zu verzeichnen mit einer maximalen Bandenstärke bei 10 bzw. 20 min. Dahingegen stellten sich sämtliche Banden der Knockdown-Zelllinien Panc-1 52.11 und 52.12 mit einer etwa gleich starken Bandenintensität dar, ein deutlich erkennbarer Anstieg war in keiner der beiden Zelllinien zu verzeichnen (siehe Abb. 24).

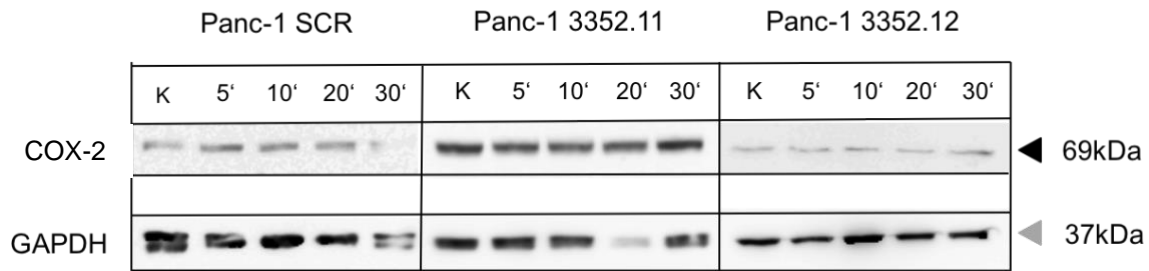


Abb. 24: COX-2-Expression (Antikörper: Anti-COX-2, ab15191, Abcam, 1:500) mit Nachweis einer Bande bei 69 kDa (schwarzer Pfeil). Als Beladungskontrolle wurde GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500) verwendet (grauer Pfeil). Bei den untersuchten Zelllinien handelte es sich um Panc-1 SCR und die Knockdown-Zelllinien Panc-1 3352.11 und Panc-1 3352.12. Je ein Ansatz wurde ohne sRANKL-Stimulation (Recombinant human TRANCE [sRANKL], R&D Systems) angelegt (K), die anderen Proben wurden nach einer Inkubationszeit von 5, 10, 20 und 30 min mit sRANKL untersucht.

4.8 Proliferationsassays mit COX-2-Inhibitor

Untersucht wurden die Zellreihen HPDE, BxPC3, Panc-1 sowie die Knockdown-Zelllinien. Dabei wurde der Fokus insbesondere auf den dosisabhängigen Effekt des COX-2-Inhibitors NS 398 bei den Zelllinien Panc-1 und BxPC3 als Vertreter der Pankreaskarzinomzelllinien mit hoher und kaum nachweisbarer COX-2-Expression gelegt.

HPDE zeigte unter Zusatz von 200 μ M NS 398 eine deutlich verminderte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO ($p < 0,001$). Zudem konnte ein dosisabhängiger Effekt des COX-2-Hemmers nachgewiesen werden (s. Abb. 25). Nach der ersten Messung war zunächst bei allen Ansätzen ein Knick zu sehen, ein systemischer Fehler ist hier nicht auszuschließen. Jedoch könnte ebenso NS 398 einen anfänglich starken Einfluss auf die Zellen haben, der diesen Effekt erklärt. Diese Beobachtung lässt sich bei den anderen untersuchten Zelllinien allerdings nicht bestätigen.

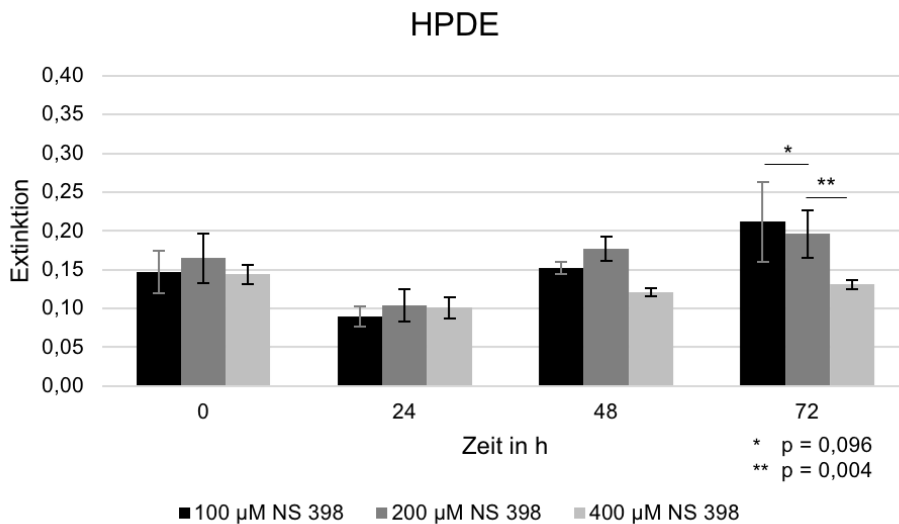
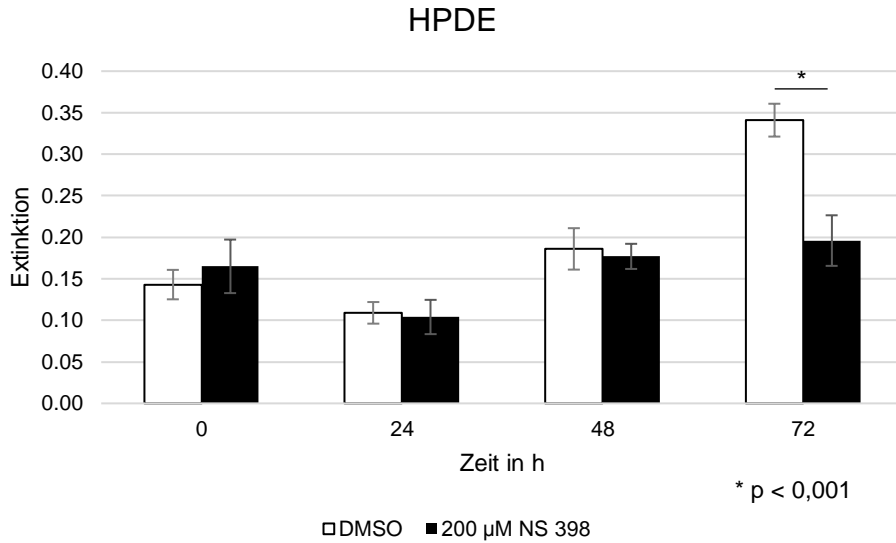


Abb. 25: Wachstumsverhalten der Zelllinie HPDE mit 200 µM NS 398 (ab120295, Abcam) im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO und Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen von NS 398.

Bereits bei Anwendung von 100 µM NS 398 war bei Zellen der Linie BxPc3 eine signifikant eingeschränkte Zellproliferation zu beobachten ($p < 0,001$). Während der Unterschied zwischen den Ansätzen mit 100 und 200 µM keine Signifikanz aufwies, konnte bei Verdopplung von 200 µM auf 400 µM wieder ein relevanter Unterschied aufgezeigt werden ($p = 0,004$), sodass von einem dosisabhängigen Effekt ausgegangen werden kann. Insgesamt wies jede verwendete Konzentration des COX-2-Hemmers eine signifikante Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf.

Mit den gleichen Konzentrationen wurden Ansätze mit Panc-1 Zellen bebrütet. Im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO wies jeder Ansatz einen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten auf. Vergleich man jedoch die unterschiedlichen Konzentrationen untereinander, konnte nirgends ein relevanter Unterschied im Wachstumsverhalten aufgewiesen werden. So ist die Proliferation unter einem COX-2-Hemmer bei Panc-1 nach 48 h eingeschränkt, zeigte jedoch bei den verwendeten Konzentrationen von NS 398 keinen nachweisbaren dosisabhängigen Effekt.

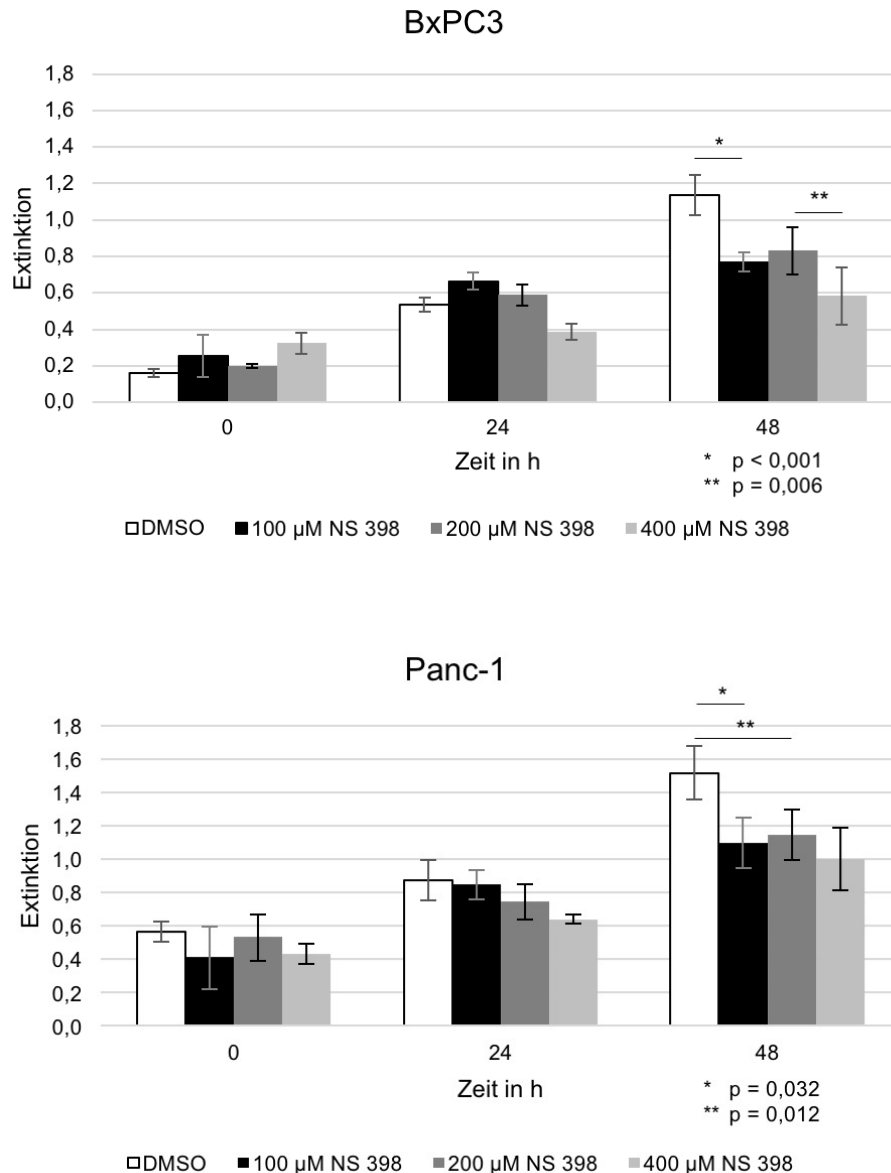


Abb. 26: Wachstumsverhalten der Zelllinien BxPC3 und Panc-1 mit unterschiedlichen Konzentrationen NS 398 (ab120295, Abcam). BxPC3: * p < 0,001, ** p = 0,006. Panc-1: * p = 0,032, ** p = 0,012.

Zur Evaluierung, ob der RANK-Knockdown in der SCR-Linie Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp bewirkte, wurden diese beiden Versuchsansätze miteinander verglichen. Erwartungsgemäß zeigten sich keine relevanten Unterschiede.

Weiterhin wurden RANK-Knockdown-Zellen mit dem NS 398 behandelt, um die Auswirkungen des COX-2-Inhibitors zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, zeigte auch BxPC3 SCR einen signifikanten Rückgang der Zellproliferation unter Anwendung von NS 398. Diese Beobachtung blieb auch bei dem Knockdown-Klon 3351 bestehen. Ähnliche Ergebnisse lagen bei Panc-1 SCR und der Knockdown-Zelllinie Panc-1 52.11 vor. Ein RANK-Knockdown scheint damit auf den ersten Blick keinen basalen Einfluss auf die Wirkungen eines COX-2-Hemmers zu haben.

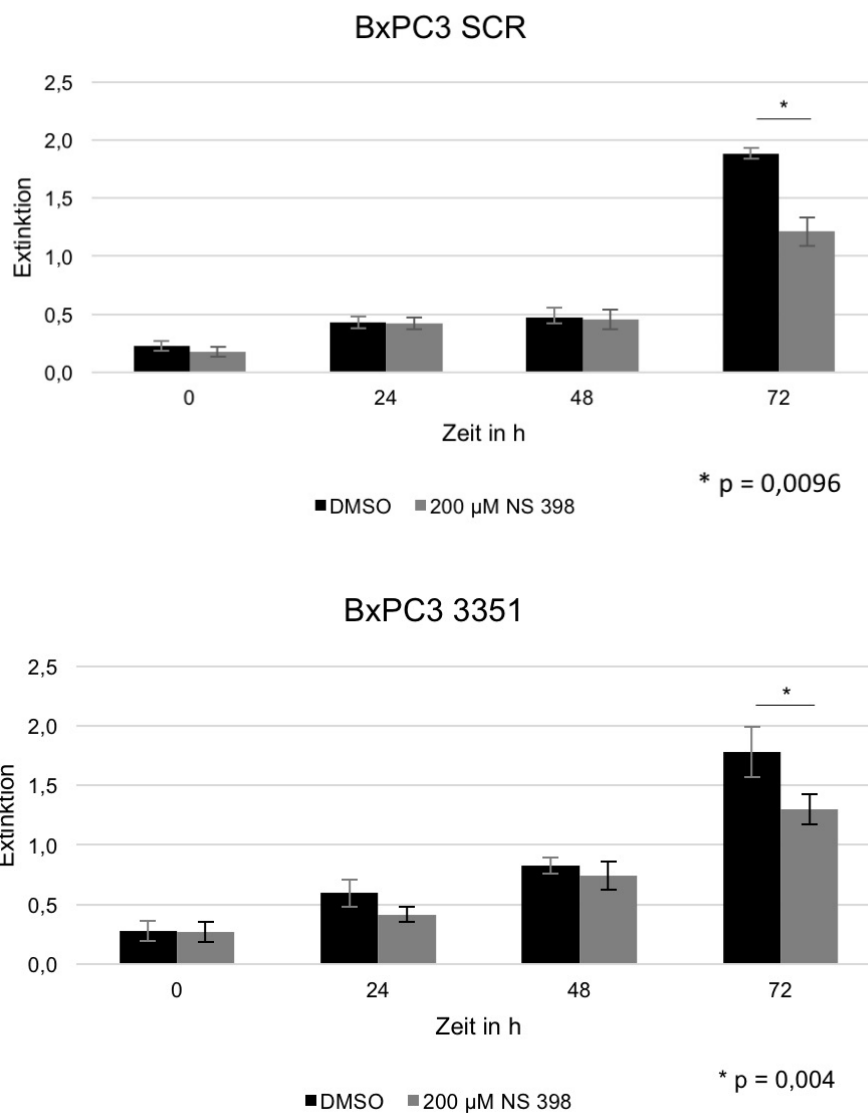


Abb. 27: Proliferation der RANK-Knockdown-Zelllinie BxPC3 3351 im Vergleich zu BxPC3 SCR unter Zugabe des COX-2-Hemmers NS 398 (ab120295, Abcam).

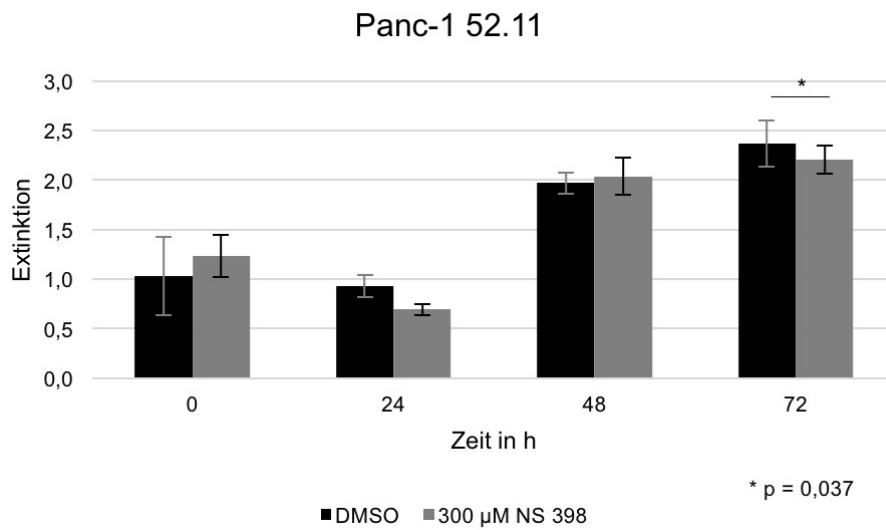
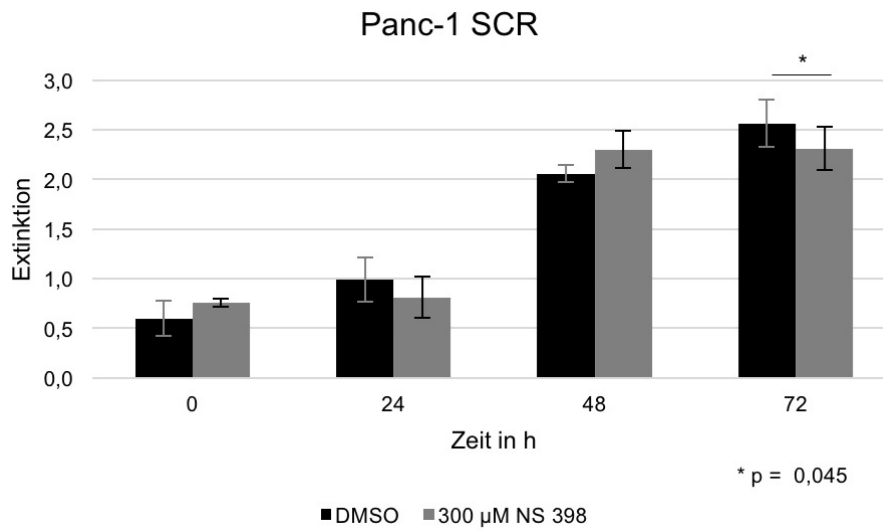


Abb. 28: Darstellung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien Panc-1 SCR und Panc-1 3352.11 mit und ohne Zugabe des COX-2-Inhibitors NS 398 (ab120295, Abcam).

5 Diskussion

Das Pankreaskarzinom gehört zu den tödlichsten Tumorentitäten, was vor allem der späten Diagnose durch einen langen symptomarmen Verlauf geschuldet ist. Trotz verbesserter Diagnostikmöglichkeiten und reger Forschung stellt die chirurgische Resektion die bisher einzige kurative Therapie dar.

Diese ist jedoch aufgrund des fortgeschrittenen Tumorstadiums mit Infiltration in umgebende Strukturen in einem Großteil der Fälle nicht mehr durchführbar. Umso wichtiger erscheint es, intensiv nach anderen Therapieoptionen zu suchen um die hohe Mortalitätsrate zu senken und einen neuen kurativen Heilungsansatz dieser prognostisch schlechten Erkrankung zu erforschen. Die RANK-RANKL-Signalkaskade stellt hierbei einen neuen potentiellen Ansatzpunkt dar.

5.1 RANK

Beim Receptor Activator of NF- κ B (RANK) handelt es sich um ein Transmembranprotein, das an der äußeren Zellmembran von murenen Osteoklasten exprimiert wird (Wright et al., 2009). Bereits für mehrere Tumorentitäten konnte eine RANK-Expression nachgewiesen werden. Dazu gehören das Mammakarzinom, das Prostatakarzinom, das Magenkarzinom, kolorektale Karzinome, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom sowie knocheneigene Tumore wie etwa das Osteosarkom (Bago-Horvath et al., 2014; Branstetter et al., 2015; Ohtaka et al., 2017; Owen et al., 2013; Oyewumi et al., 2014; Peng et al., 2013; Zhang et al., 2017).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression dieses Proteins erstmalig für das humane Pankreaskarzinom sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gezeigt. Die Zelllinie Panc-1 hatte im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zelllinien sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die stärkste RANK-Expression.

Papanastasiou und Sirinian beschrieben 2012 und 2013 fünf Isoformen, wobei vier kleinere Formen als der Wildtyp durch alternatives Spleißen entstehen. Auch stellten sie fest, dass eine RANK-Überexpression ein sehr potenter Induzierer von NF- κ B ist und nicht zwangsläufig einer RANKL-Stimulation bedarf, um die intrazelluläre Kaskade in Gang zu setzen. Das errechnete Molekulargewicht von RANK liegt bei 29-66 kDa, wobei der RANK wt mit einem Gewicht von 66 kDa der größte ist (Crockett et al., 2011).

Die im Western Blot beschriebenen Banden bei 97 kDa entsprechen den Angaben auf dem Datenblatt. Andere Studien zeigen bei der Durchführung von Western Blots mit Zelllysaten anderer Tumorentitäten für RANK ebenfalls Banden bei 97 kDa (Casimiro et al., 2013; Melchiorre et al., 2012). Gründe für das Abweichen des errechneten Molekulargewichts von den nachgewiesenen Banden können posttranslationale Modifizierung, Splicevarianten, Bildung von Multimeren oder die relative Ladung (geladene vs. ungeladene Aminosäuren) sein. Insbesondere die Bildung von Multimeren sollte durch die reduzierenden Bedingungen verhindert werden. Starke Wechselwirkungen können dennoch zu einer Bildung von Quartärstrukturen führen (Datenblatt RANK-Antikörper ab22106, Abcam).

Interessant zu beobachten war die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Western Blots und der qRT-PCR. In beiden Versuchsreihen zeigte die Zelllinie Panc-1 die stärkste RANK-Expression; bei nahezu sämtlichen anderen Zelllinien stimmten die Ergebnisse nicht überein. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass im Western Blot durch die Detektion der 97 kDa Bande ausschließlich der Wildtyp detektiert wurde. Bei den Versuchsansätzen der qRT-PCR kam es möglicherweise zur Vermehrung von RANK- Isoformen, die im Western Blot als unspezifische Banden gewertet wurden. Zudem korrelierte eine erhöhte RANK-Expression mit einem hohen Tumorstadium, schlechterer Differenzierung sowie einem besseren Ansprechen auf eine Chemotherapie (Peng et al., 2013; Pfitzner et al., 2014; Santini et al., 2012). Bei knochen-eigenen Tumoren ist RANK ebenfalls stark exprimiert und korreliert mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben (Bago-Horvath et al., 2014).

Studien konnten zeigen, dass eine starke Expression der Tumorzellen von RANK mit aggressiverem Wachstum und höherem Metastasierungsrisiko assoziiert ist, ebenso dass sich das Migrationsverhalten von Zellen, bei denen ein RANK-Knockout durchgeführt wurde im Vergleich zu den unbehandelten Zelllinien deutlich reduziert ist (Casimiro et al., 2013; Dougall, 2012).

Aufgrund dieser Beobachtung wäre die Annahme gerechtfertigt, dass sich nach dem RANK-Knockdown ein Unterschied im Proliferationsverhalten nachweisen lassen müsste. Insbesondere bei der Panc-1-Zelllinie mit einer hohen RANK-Expression konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den SCR und den

Knockdown-Zellen beobachtet werden. BxPC3 jedoch zeigte nach dem RANK-Knockdown trotz bereits niedriger basaler RANK-Expression einen signifikanten Rückgang des Zellwachstums. Ursachen für den fehlenden Rückgang des Proliferationsverhaltens bei Panc-1 bleiben unklar.

Vergleicht man hingegen die Wachstumsrate der BxPC3-Knockdown-Zellen mit der regulär exprimierenden Zelllinie, lässt sich eine verminderte Wachstumsrate feststellen (s. Abb. 21). Es gilt weiter zu untersuchen weshalb ausgerechnet bei einer Zelllinie, die sowohl im Western Blot als auch in der qRT-PCR eine ähnlich geringe RANK-Expression wie die Referenzzelllinie HPDE aufweist, ein RANK-Knockdown einen Einfluss auf die Proliferationsrate hat. Hier wäre anzunehmen, dass der RANK-Knockdown aufgrund der schon niedrigen Grundexpression keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstumsgeschehen hat. Um adäquate Aussagen bezüglich des RANK-abhängigen Proliferationsverhaltens zu treffen, sind umfangreichere Versuchsreihen notwendig.

Generell stellt sich jedoch die Frage, ob eine allgemeine Aussage zum Wachstumsverhalten anhand der RANK-Expression zu treffen ist oder inwieweit andere Signalkaskaden zur Proliferation der Zellen führen. Vergleicht man die Proliferationsrate von unstimulierten Zellen stellt sich kein Zusammenhang zur RANK-Expression dar, HPDE weist das schnellste Zellwachstum auf, wohingegen Panc-1 trotz hoher RANK-Expression eine deutlich langsamere und mit der Zelllinie BxPC3 vergleichbare Proliferationsrate hat.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse gilt es als wahrscheinlich, dass es keine alleinige Korrelation zwischen der RANK-Expression beim Pankreaskarzinom und der Wachstumsverhalten der Karzinomzellen gibt. Zu bedenken gilt aber, dass im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht geklärt wurde, ob der Knockdown sämtliche Isoformen betrifft oder lediglich die Expression der kanonischen RANK-Form reduziert wurde. Auch welchen Effekt die Aktivierung der einzelnen Isoformen welchen Effekt zeigt, sowie welche Unterschiede in der Anregung der intrazellulären Signalkaskade auftreten, gilt es ebenso weiter zu untersuchen.

Bereits beim Mammakarzinom konnte eine Isoform (RANK-c) nachgewiesen werden, die tumorspezifisch zu sein scheint, da sich diese im gesunden Gewebe nicht

darstellen lässt. RANK-c zeigt sich bei Brustkrebszellen stark hochreguliert im Vergleich zur Wildtyp-Expression und korreliert invers mit der Schwere der Erkrankung. Ebenso scheint RANK-c im Vergleich zum RANK wt die Zellmotilität und Migration von Brustkrebszellen zu inhibieren, indem es den üblichen RANK-Signalweg beeinflusst (Papanastasiou et al., 2012). Ob es ebenso spezifische RANK-Isoformen beim Pankreaskarzinom gibt, oder sich gar auch die Expression von RANK-c nachweisen lässt und welchen Einfluss diese auf das maligne Gewebe haben, gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären.

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass RANK auch beim Pankreaskarzinom eine wesentliche Rolle spielen könnte. Sicherlich sind weitere Studien notwendig um die RANK-Expression in einen klinischen Kontext zu setzen und die Möglichkeit als prognostischen Marker zu evaluieren. Da sich jedoch auch in gesundem Pankreasgewebe eine RANK-Expression nachweisen lässt, ist die Aussagekraft eingeschränkt zu betrachten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich auf den RANK-Wildtyp eingegangen; mögliche Isoformen blieben unberücksichtigt. Umso interessanter gestaltet sich die Frage nach möglicherweise tumorspezifischen Isoformen. Es lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch vermuten, dass der Grad der RANK-Expression keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Karzinomzellen hat.

5.2 RANKL

RANKL konnte bereits bei mehreren Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom, dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Prostatakarzinom, dem Nierenzellkarzinom und dem Endometriumkarzinom nachgewiesen werden (Armstrong et al., 2008; Casimiro et al., 2013; Liu et al., 2016; Mikami et al., 2009; Ohtaka et al., 2017; Papanastasiou et al., 2012; Peng et al., 2013). In dieser Arbeit konnte eine RANKL-Expression nun auch beim Pankreaskarzinom nachgewiesen werden.

Ebenso wie bei RANK wurden bisher mehrere Isoformen detektiert. 2001, wenige Jahre nach der Entdeckung von RANKL, gelang es Ikeda et al. zu der bereits bekannten RANKL-Form zwei weitere Isoformen nachzuweisen (RANKL 1-3), wobei RANKL 3 durch das Fehlen der Transmembrandomäne in löslicher Form vorliegt. Es

wird vermutet, dass die Isoformen durch alternatives Spleißen generiert werden. Die Unterschiede, insbesondere der beiden membrangebundenen Formen, sind bisher unklar.

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne von RANKL und detektiert damit alle drei Isoformen, deren errechnetes Molekulargewicht 28 kDa, 31,5 kDa bzw. 35,5 kDa beträgt (Ikeda et al., 2001). Laut Datenblatt kann RANKL bei 37 kDa nachgewiesen werden. Bei jeder untersuchten Tumorzelllinie sowie bei der Referenzzelllinie HPDE konnten im Western Blot Banden bei 35 und 37 kDa dargestellt werden, was sich mit Beobachtungen anderer Studiengruppen deckt (Baek et al., 2017; Chu et al., 2014; Fan et al., 2017). Zusätzlich wurden für jede Zelllinie Banden bei 72 kDa und 76 kDa beobachtet. Diese werden ebenso im Datenblatt beschrieben. Initial wurden diese Banden als unspezifische Reaktionen betrachtet, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich um Dimere der oben genannten Banden handelt. Reduzierende Bedingungen beim Western Blot sollten die Bildung von Multimeren eigentlich verhindern, möglicherweise reichten diese jedoch nicht aus. Ebenso ist allerdings auch eine Kreuzreaktion mit anderen Antigenen möglich, da es sich bei dem verwendeten Antikörper um einen polyklonalen Antikörper handelt.

Die RANKL-Bande der Zelllinie Panc-1 kontrastierte sich am stärksten bei 37 kDa. Bei dieser Zelllinie konnte ebenso eine starke RANK-Expression nachgewiesen werden. Zellen der Linie 5072 wiesen die stärkste Bande bei 35 kDa auf.

Lum et al. (1999) berichteten, dass nach Deglykolisierung von RANKL nur noch Banden bei einem Molekulargewicht von 35 kDa nachweisbar waren. Auch Lynch et al. interpretierten die von ihnen 2005 detektierte 38 kDa-Bande als unglykosyliertes RANKL. So ist zu vermuten, dass es sich bei den in dieser Arbeit nachgewiesenen Banden bei 35 kDa und 37 kDa um unglykosyliertes RANKL handelt. Jedoch bleibt unklar, ob es sich um Modifizierungen handelt, die den Unterschied im Molekulargewicht verursacht, oder ob zwei unterschiedliche Isoformen dargestellt wurden.

Verlässliche Daten zu Untersuchungen von Serumwerten auf lösliches RANKL liegen bisher nicht vor. Erhobene Daten im Rahmen dieser Arbeit zu Serumkonzentrationen von sRANKL bei Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkrankt waren, und

gesunden Probanden zeigten keine Unterschiede. Dies mag am Überwiegen der membrangebundenen im Vergleich zur sRANKL-Form, bisher fehlenden sensitiven Messmethoden oder an einer unzureichenden Gruppengröße liegen (Bowsher und Sailstad, 2008; Dougall, 2012). Dennoch konnte in einer Studie mit Patienten, die an einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom leiden, signifikant erhöhte sRANKL-Serumwerte nachgewiesen werden (Lu et al., 2016).

Durch Stimulationsversuche mit sRANKL konnte weder bei den meisten pankreatischen Karzinomzelllinien noch bei der Referenzzelllinie (HPDE) ein Einfluss auf das Proliferationsverhalten aufgezeigt werden. Dieses Erkenntnis stimmte mit dem Ergebnis anderer Arbeitsgruppen überein, die das Proliferationsverhalten von unstimulierten und mit sRANKL stimulierten Brustkrebszellen verglich (Casimiro et al., 2013; Papanastasiou et al., 2012). Lediglich die pankreatische Zelllinie L3.6pl wt wies einen signifikanten Anstieg des Proliferationsverhaltens nach sRANKL-Stimulation auf. Der Grund dafür ist bisher ungeklärt. Auch in den RANK-Knockdown-Zellen zeigte sich nach sRANKL Stimulation kein wesentlicher Unterschied zur unbehandelten Gruppe. Bei der BxPC3-Zelllinie scheint dies nicht weiter verwunderlich, da diese ohnehin eine vergleichsweise schwache RANKL-Expression aufweist und damit die Auswirkungen des Knockdowns nicht erheblich sind.

Da jedoch bereits bei mehreren Tumorentitäten eine hohe RANK-Expression mit einem aggressiverem Wachstumsverhalten zu korrelieren scheint, hätte man nach Stimulation des RANK-RANKL-Signalweges Unterschiede in der Wachstumsrate einer Zelllinie mit hoher RANK-Expression nach sRANKL-Stimulation erwartet, wenn man diese mit der zugehörigen Knockdown-Zelllinie vergleicht.

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Aktivierung der RANK-RANKL-Signalkaskade keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten beim Pankreaskarzinom zu haben scheint. Entgegen dieser Beobachtungen wiesen Peng et al. (2013) nach, dass beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom eine herbeigeführte Verstärkung der RANKL-Expression in Versuchen an Mäusen zu einer Zunahme der Migration, einem schnelleren Tumorwachstum sowie einem früheren Auftreten von Knochenmetastasen führt. Ob dies eine entitätsspezifische Beobachtung ist oder es Unterschiede zwischen einer Aktivierung des Signalweges durch verschiedene Isoformen gibt, bleibt offen. Weitere Versuche mit einer induzierten RANKL-Überexpression bei Pankreaskarzinomzellen sind zur Klärung

dieser Frage notwendig. Möglicherweise lässt sich die von Peng et al. beschriebene Korrelation zwischen einer hohen RANKL-Expression und dem Vorhandensein von Metastasen sowie abnehmendem Differenzierungsgrad auf das Pankreaskarzinom übertragen. Weitere Studien, die klinische Daten mit immunhistochemischen Präparate vergleichen, sind vor diesem Hintergrund sinnvoll.

In Microarray-Analysen konnte eine hohe RANKL-Expression mit besserer Differenzierung des Karzinomgewebes sowie einer besseren Prognose in Verbindung gebracht werden. Die Überlebensrate zeigte allerdings keine Korrelation (Santini et al., 2012).

In den meisten bisher untersuchten RANK exprimierenden Tumorentitäten konnte kein Zusammenhang zwischen der RANK-Expression und dem klinischen Verlauf aufgezeigt werden, jedoch konnte Lee et al. 2011 zeigen, dass bei Patienten mit einem Osteosarkom eine hohe RANKL-Expression mit einer geringeren Überlebensrate assoziiert ist (Bago-Horvath et al., 2014; Pfitzner et al., 2014).

Die Inhibition von RANKL wurde ebenfalls bereits in mehreren Tumorentitäten wie dem multiplen Myelom, Brustkrebs, Lungenkrebs und Prostatakrebs getestet. Bei jeder Tumorentität zeigte sich eine effiziente Reduktion tumorbedingter Knochenläsionen (Roodman und Dougall, 2008). Da Knochenmetastasen beim Pankreaskarzinom aufgrund des oft weit fortgeschrittenen Krankheitsstadiums keine wesentliche Rolle spielen, stellt sich die Frage, ob es bei anderen Metastasen durch eine RANKL-Inhibition ebenfalls zu einer Reduktion der Metastasengröße kommt. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig, die die RANK- und RANKL-Expression in Metastasen des Pankreaskarzinoms untersuchen.

Mit Denosumab als spezifischem RANKL-Antikörper steht eine mögliche medikamentöse Therapieoption zur Verfügung, sollte sich in weiteren Untersuchungen eine Auswirkung des RANK-RANKL-Signalweges auf das Karzinomgeschehen bestätigen. Bislang wird Denosumab zur Behandlung und Prävention postmenopausaler Osteoporose und Prävention von Knochenverlust bei hormonell behandeltem Prostata- und Mammakarzinom eingesetzt (Lipton et al., 2007; McClung et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RANKL auch beim Pankreaskarzinom eine Rolle zu spielen scheint. Konträre Ergebnisse zeigen, dass die Auswirkungen einer hohen RANKL-Expression, die in einigen der untersuchten Zelllinien des Pankreaskarzinoms durchaus signifikant ist, bisher nicht ausreichend untersucht wurde. Die bisherigen Studien bestätigen jedoch, dass eine Stimulation mit löslichem RANKL keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Karzinomzellen zu haben scheint. Anders sieht es jedoch bei einer induzierten Überexpression von RANKL auf den Karzinomzellen aus. Dies legt die Vermutung nahe, dass je nach Rezeptoraktivierung durch unterschiedliche Isotypen bzw. autokrin/parakrin unterschiedliche Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die rezeptorbindende Domäne sich zwischen den Isoformen nicht unterscheidet. Dies sollte weiterhin Gegenstand intensiver Untersuchungen bleiben.

5.3 COX-2

Beim Pankreaskarzinom, aber auch bei anderen Tumorentitäten wie kolorektalen Karzinomen, dem Bronchialkarzinom und dem Magenkarzinom konnte eine erhöhte COX-2-Expression bereits nachgewiesen werden. Diese scheint Einfluss auf das Zellwachstum und die -migration zu haben (Eibl et al., 2005; Li et al., 2013; Yip-Schneider et al., 2000).

Nach Herstellerangaben stellt sich die COX-2 Bande bei 69 kDa dar. In den durchgeführten Untersuchungen zeigten sich Banden bei 69 oder 75 kDa, wobei die größere Bande am ehesten auf posttranslationale Modifizierungen zurückzuführen ist. COX-2 konnte in mehreren untersuchten pankreatischen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden. Die Expression schwankte dabei zwischen den unterschiedlichen Zelllinien sehr stark. So zeigte BxPC3 eine vergleichsweise starke COX-2-Expression, während diese bei Panc-1 kaum nachweisbar war. Im gesunden Pankreasgewebe lässt sich COX-2 gar nicht oder nur schwach nachweisen (Li et al., 2014).

Eine hohe COX-2 -Expression ist mit einer erhöhten Resistenz neoplastischer Zellen gegenüber Apoptose und einer erhöhten Zellproliferation assoziiert, was das Wachstumsverhalten des Karzinoms weiter unterhält (Crowell et al., 2006; Li et al., 2014). Die Anwendung eines COX-2-Hemmers in präklinischen Studien konnte die

weitere Proliferation der Karzinomzellen blockieren sowie effektiv eine Apoptose induzieren (Tseng et al., 2002).

Proliferationsassays unter Zugabe des COX-2-Inhibitors NS 398 zeigten bei BxPC3 einen dosisabhängigen Effekt auf die Wachstumsrate der Zellen. Dies bestätigt Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, die diesen Effekt ebenfalls beobachten konnten. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen konnte dieser Effekt durch andere Arbeitsgruppen jedoch sowohl bei Zellen mit nachgewiesener COX-2-Expression als auch bei solchen, bei denen sich kein COX-2 nachweisen ließ, festgestellt werden (Sun et al., 2009; Yip-Schneider et al., 2000). Möglicherweise ließ sich der wachstumsmindernde Effekt bei der Zelllinie Panc-1 aufgrund der relativ großen Streubreite nicht darstellen, sodass weitere Versuche auch mit anderen, nicht COX-2 exprimierenden Zelllinien, notwendig sind um diese Beobachtung zu bestätigen. Bei der Anwendung eines COX-2-Inhibitors in vivo reduzierte sich beim Mammakarzinom das Tumorstadium deutlich und erhöhte so die Überlebenszeit (Tseng et al., 2002).

Die Aktivierung von COX-2 ist Teil der intrazellulären Signalkaskade nach Aktivierung des RANK-RANKL-Signalweges. Um dies zu verifizieren, wurde sRANKL zu den Zellen gegeben und die COX-2 Expression nach unterschiedlichen Zeitintervallen gemessen. In allen untersuchten Zellreihen gab es einen Anstieg der COX-2-Expression, wobei die maximale Bandenstärke zwischen den Zellreihen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftrat. Dies bestätigt eine Induktion der COX-2-Expression durch die Aktivierung von RANK. Woher jedoch die zeitlichen Differenzen in der maximalen Bandenausprägung rühren, ist weitestgehend unbekannt und muss weiteren Untersuchungen unterzogen werden.

Bei Durchführung desselben Versuches mit den Knockdown-Zelllinien konnte in der SCR-Zelllinie ein Anstieg der COX-2-Expression verzeichnet werden. Bei den Knockdown-Zelllinien zeigte sich eine beinahe homogene Bandenstärke zu allen Zeitpunkten. Neben der im Western Blot und der qRT-PCR nachgewiesenen Reduzierung der RANK-Expression sprechen also auch diese Ergebnisse für den Erfolg des Knockdowns, da es offensichtlich zu keinem RANK-abhängigen Anstieg der COX-2-Expression kam.

Studien mit einem COX-2-Knockdown in Karzinomzellen zeigten einen drastischen Rückgang der Zellproliferation sowie der Migrationsfähigkeit. Versuche, in denen Mäuse Pankreaskarzinomzellen nach einem COX-2-Knockdown injiziert wurden, wiesen ein deutlich verzögertes Fortschreiten des Karzinomgeschehens auf (Li et al., 2014). Eine Verringerung der COX-2-Expression beeinträchtigt damit die Malignität der Karzinomzellen durch Hemmung von Proliferation und Migration.

Aspirin und selektive COX-2-Hemmer wie etwa Celecoxib, senken, zum Teil dosisunabhängig, bei regelmäßiger Einnahme das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Veettil et al., 2017). Jedoch sind diese Effekte mit gastrointestinalen und kardiovaskulären Risiken verbunden (Caldwell et al., 2006; Cooper et al., 2010; Ofman et al., 2003; Rostom et al., 2007). Angesichts des Nebenwirkungsprofils wird daher eine Einnahme von COX-2-Hemmern als Primärprävention nicht empfohlen.

Aufgrund der teils hohen COX-2-Expression in den untersuchten Zelllinien wäre die Annahme gerechtfertigt, dass sich auch beim Pankreaskarzinom ein positiver Effekt bei Einnahme von COX-2-Hemmern aufzeigen ließe. So ergänzten Lipton et al. (2010) bei Patienten mit einem inoperablen Pankreaskarzinom die Chemotherapie mit Gemcitabine mit einer regelmäßigen Einnahme des COX-2-Inhibitors Celecoxib und konnten im Folgenden eine Verlängerung der Überlebenszeit berichten. In anderen Tumorentitäten wie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte hingegen kein Vorteil bei der zusätzlichen Einnahme eines COX-2-Hemmers zur Standardchemotherapie festgestellt werden (Gulyas et al., 2018).

Nach Beschreibung der Rolle von RANK und RANKL beim humanen Pankreaskarzinom hat auch COX-2 als aktiviertes Enzym in der Signalkaskade einen Einfluss auf die Karzinomzellen. Durch Inhibierung der Apoptose und Induktion zahlreicher Regulatoren, die das Zellwachstum und die –migration beeinflussen, nimmt COX-2 einen negativen Einfluss auf das Karzinomgeschehen. Erste Untersuchungen zur klinischen Anwendung im Sinne einer Kombination mit einer Chemotherapie wurden bereits beschrieben (Lipton et al., 2010). Um Aussagen über die genaue Funktion von COX-2 beim Pankreaskarzinom treffen zu können und

weitere Therapieansätze mit COX-2-Hemmern zu evaluieren, muss der Zusammenhang Gegenstand weiterer Forschung bleiben.

6 Zusammenfassung

Die Expression von RANK und RANKL konnte erstmalig beim humanen Pankreaskarzinom nachgewiesen und die Expression von COX-2 bestätigt werden.

Der Nachweis sowohl von RANK als auch RANKL gelang in allen neun untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien. Serumwerte der löslichen RANKL-Isoform lagen bei Patienten mit einem nachgewiesenen Pankreaskarzinom nicht höher als bei den gesunden Probanden, sodass hier nicht von der Möglichkeit eines diagnostischen Parameters auszugehen ist.

Proliferationsassays zeigten, dass die grundlegende Wachstumsrate der Zellen nicht abhängig von der RANK-Expression zu sein scheint. Ebenso konnte durch Stimulierung des Rezeptors mit löslichem RANKL kein Anstieg der Proliferation verzeichnet werden. RANK-Knockdown-Zellen wurden erfolgreich durch lentivirale Transfektion etabliert. Die Knockdown-Klone der Zelllinie BxPC3 wiesen daraufhin eine signifikant verringerte Proliferationsrate auf; Knockdown-Zellen der Zelllinie Panc-1 zeigten kein verändertes Proliferationsverhalten. Dies lässt auf einen gewissen Einfluss der RANK-Expression auf das Wachstumsverhalten schließen; eine Stimulierung des Rezeptors durch die lösliche Isoform scheint jedoch keine Rolle zu spielen. Die Identifizierung möglicherweise spezifischer Isoformen und deren genauen Einfluss auf die intrazelluläre Signalkaskade gilt es weiter zu untersuchen.

Die COX-2-Expression konnten in Pankreaskarzinomzelllinien bestätigt werden; der Grad der Expressionsstärke schwankte dabei stark. Nach Stimulation der Zellen mit löslichem RANKL konnte in allen getesteten Zellreihen ein Anstieg der COX-2-Expression dargestellt werden. Somit bestätigt sich, dass die Aktivierung von COX-2 ein Teil des RANK-RANKL-Signalweges ist. Unter Anwendung des COX-2-Hemmers NS 398 konnte ein signifikanter Rückgang der Proliferation beobachtet werden. Bei einigen Zelllinien ist dieser Effekt dosisabhängig, bei andere konnte mit Steigerung des NS 398 kein stärkerer Rückgang der Proliferation nachgewiesen werden. Über Möglichkeiten einer klinischen Anwendung von COX-2-Hemmern beim Pankreaskarzinom ist in Anbetracht der Nebenwirkungen weiter zu diskutieren.

6.1 Summary

The expression of RANK and RANKL was first proven in human pancreatic cancer at which time the expression of COX-2 was able to be confirmed as well.

Both RANK and RANKL expression has been demonstrated in nine different pancreatic cancer cell lines. Serum levels of the soluble RANKL isoform in patients with proven pancreatic cancer are not significantly higher than in cases of healthy persons, showing conclusively that RANKL serum level cannot be used as a diagnostic marker.

Proliferation assays show that there seems to be no connection between the basic proliferation rate and the level of RANK expression. Similarly, no increase in cell proliferation could be demonstrated by stimulation of the receptor with soluble RANKL. By further experiment, RANK knockdown cells have been established via lentiviral transfection. Panc-1 cells did not show any alteration in growth behavior after downregulation of RANK, whereas BxPC3 showed significant lower cell proliferation. Hence the interaction between soluble RANKL and RANK has no direct influence on proliferation behavior; but, given the results, indicate a certain influence of RANK on proliferation behavior. Identification of further isoforms, which are possibly specific to pancreatic cancer, and the exact influence on the intracellular signaling cascade, needs to be further explored.

COX-2 expression was confirmed, whereupon the expression rate between the different pancreatic cancer cell lines varied strongly. After stimulation with soluble RANKL, an increase of COX-2 expression in every tested cell line could be detected. This proves that the activation of COX-2 is part of the intracellular signaling cascade of the RANK/RANKL pathway. Using the COX-2 inhibitor NS 398, a significant reduction of proliferative behavior was observed. In some cell lines this effect is dose-dependent, in others no further slowing down of cell growth is shown after an increased concentration of NS 398. Clinical application of COX-2 inhibitors to patients with pancreatic carcinomas has to be carefully discussed considering the side effects.

7 Abkürzungsverzeichnis

®	Registrierte Warenmarke
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninic Acid
BRCA	Breast Cancer Gene
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA 19-9	Carbohydrate Antigen
CD	Cluster of differentiation
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CEA	Carcinoembryonales Antigen
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct	Cycle of threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer-4
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG-Nummer	EINECS-Nummer (Registriernummer der „European Inventory Existing Chemical Commercial Substances“) bzw. ELINCSnummer (Registriernummer der „European List of New Chemical Substances“)
eGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et aliae (und andere)
EtOH	Ethanol
FAMM	Familial atypical multiple mole melanoma
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Basic Fibroblast Growth Factor (human)
FW	Forward
g	Erdbeschleunigung (gravity; 9,81 m/s)
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff
HPDE	Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells
HRP	horseradishperoxidase
Il	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Kum.	Kumulativ
LGR4	Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled Receptor 4

L3.6pl	L3.6 pancreas-liver
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of acticated B-cells
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Tris-Buffered Saline
PBS-T	Tris-Buffered Saline mit Triton X-100
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
pH	-log (H ⁺)
pmol	Picomol
qRT-PCR	quantitative real-time PCR (quantitative polymerase chain reaction)
R0	Resektion des Tumors, so dass histopathologisch kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar ist
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand
Rel.	Relativ(e)
res	resistent
REV	Reverse
rh TRANCE	Human recombinant TNF-related activation-induced cytokine (Synonym für RANKL)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPE	Keine Angaben zur Abkürzung im Kit enthalten
rpm	Revolutions Per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RW1	Keine Angaben zur Abkürzung im Kit enthalten
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFM	Serum Free Media
sek	Sekunden
sog.	sogenannte
sRANKL	soluble RANKL
Tab.	Tabelle
TACE	TNF α konvertierendes Enzym
TBS	Tris-Buffered Saline

TBS-T	Tris-Buffered Saline mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TGF- β -R	TGF- β -Rezeptor
TM	unregistrierte Warenmarke
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNFSF11	Tumor Nekrose Faktor superfamily member 11
TNM	Primary Tumor, Regional Lymph Nodes, Distant Metastases
TP53	Tumor Protein p53
TRAF	TNF Rezeptor assoziierten Faktoren
TRANCE	TNF-Related Activation-Induced Cytokine
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan
U	Einheit(en) (unit(s))
UICC	Union International contre le Cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wt	Wildtyp
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

8 Abbildungsverzeichnis

Tabellen:

Tab. 1: Krebsneuerkrankungen und -sterbefälle in Deutschland sowie altersstandardisierte Raten, 2013. Quellen: Zentrum für Krebsregisterdaten, Statistisches Bundesamt.....	4
Tab. 2: TNM-Klassifikation für Pankreaskarzinome; Quelle: Frei übersetzt nach Seufferlein et al., 2012, Vincent et al., 2011.....	8
Tab. 3: UICC-Klassifikation für Pankreaskarzinome; Quelle: Frei übersetzt nach Seufferlein <i>et al.</i> , 2012.....	9
Tab. 4: Verwendete Chemikalien.....	16
Tab. 5: Verwendete Gebrauchsmaterialien	18
Tab. 6: Verwendete Kits.....	19
Tab. 7: Eingesetzte Geräte	20
Tab. 8: Verwendete Software.....	21
Tab. 9: Nährmedien mit entsprechenden Zusätzen für die jeweiligen Zelllinien.....	23
Tab. 10: Reaktionsschritte der rtPCR.....	33

Abbildungen:

Abb. 1: Pancreas in situ. Quelle: Netter 2015.....	2
Abb. 2: Links: Langerhans-Inseln. Rechts: Übersicht Pankreas 1 Drüsenläppchen ▶ Langerhans-Insel, interlobulärer Ausführungsgang. Quelle: Welsch 2014.....	3
Abb. 3: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs). Quelle: Kaatsch et al., 2015.	5
Abb. 4: Entstehungsmodell des Pankreaskarzinoms (Hruban et al., 2000).	7
Abb. 5: Möglichkeit der Resektabilität in Abhängigkeit von der Infiltration benachbarter Organe und Strukturen (Ryan et al., 2014).....	10
Abb. 6: Aufbau mit einzelnen Schichten der Transferkassette bei Durchführung eines Western Blots.....	29
Abb. 7: Schematische Darstellung der Agarose-Antikörper-Protein-Bindung	38
Abb. 8: Schematische Darstellung des Waschprozesses zur Gewinnung der aufgereinigten DNA.....	40

Abb. 9: RANK-Expression (Antikörper: Anti-RANK, ab22106, Abcam, 1:500 verdünnt) mit Gesamtzelllysaten der Zelllinien L3.6pl wt, L3.6pl res, Panc-1, Panc-2, BxPc3, 5061, 5072, 5156, 5328 und HPDE bei 97 kD (schwarzer Pfeil). Eine Ladekontrolle wurde mit GAPDH (Abcam, Ab9485, 1:2500 verdünnt) durchgeführt (grauer Pfeil). .45

Abb. 10: mRNA-Expression von RANK mittels qPCR. Dargestellt ist die relative Expression der neun untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien mit Standardabweichung. Die relative Expression ist zu HPDE (1) aufgetragen. L3.6pl res (0,05), L3.6pl wt (0,22), Panc-1 (14,27), Panc-2 (0,21), BxPC3 (1,18), 5051 (0,22), 5072 (0,31), 5156 (2,07) und 5328 (0,69).46

Abb. 11: Darstellung der RANKL-Expression (Antikörper: Anti-RANKL, ab9957, Abcam, 1:500) mit Gesamtzelllysaten von L3.6pl res, L3.6pl wt, Panc-1, Panc-2, BxPC3, 5061, 5072, 5156, 5328 und HPDE. RANKL wurde bei 37 kDa (weißer Pfeil) nachgewiesen. Zusätzlich stellte sich eine Bande bei 35 kDa dar (grauer Pfeil). Als Beladungskontrolle diente HSC 70 (Antikörper: Anti-HSC 70, sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, 1:500, schwarzer Pfeil).47

Abb. 12: Bestimmung der sRANKL-Serumkonzentration in pg/ml mittels ELISA bei gesunden Probanden und Pankreaskarzinompatienten (Probanden n = 15, Patienten n =14).48

Abb. 13: Vergleich der sRANKL-Serumkonzentration von Pankreaskarzinompatienten (n=6) vor und nach Chemotherapie mit Gemcitabine. Verbleibende relative sRANKL-Konzentration im Serum nach Chemotherapie: 1=97,24%, 2=55,31%, 3=44,79%, 4=54,11%, 5=83,99%, 6=120,72%.48

Abb. 14: Lichtmikroskopisches Bild nach transienter Transfektion von Panc-1 mit dem RANK knockout Plasmid 3351 und EGFP. Die leuchtenden Zellen stellen hier die erfolgreich transfizierten Zellen dar.49

Abb. 15: Screening Panc-1 RANK-Knockdown Zellen (Antikörper: Anti-RANK, ab22106, Abcam, 1:500). Es zeigten sich Doppelbanden auf Höhe von 105 kDa (schwarzer Pfeil) und 97 kDa (grauer Pfeil). Als Beladungskontrolle wurde GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9485, Abcam, 1:500) verwendet. Getestet wurden die Subtypen 51.1 und 52.1-52.6. Als Referenz diente Panc-1 SCR.50

Abb. 16: Darstellung der RANK-Expression in den Knockdown Zelllinien 51.1 und 52.1-52.6 im Vergleich zu Panc-1 SCR. Auf der y-Achse ist die RANK-Expression aufgetragen. Die verbliebenen RANK-Expressionen sind 51.1: 17,2%, 52.1: 10,7%, 52.2: 16,4%, 52.3: 20,8%, 52.4: 5,2%, 52.5: 24% und 52.6: 8,4%.51

Abb. 17: Vergleich der RANK-Expression (Antikörper: Anti-RANK, ab22106, Abcam 1:500) der Knockdown-Zelllinien BxPC3 3351 und 3352 mit BxPC3 SCR (schwarzer Pfeil) bei einer Höhe von 97 kDa (schwarzer Pfeil). Die Beladungskontrolle wurde mit GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500) durchgeführt (grauer Pfeil).	52
Abb. 18: Darstellung der RANK-Expression der knockdown Zelllinien BxPC3 3352, 3363-3367 im Vergleich zu BxPC3 SCR. Die verbliebenen RANK-Expressionen nach knockdown sind 3352: 20,6 %, 3363: 3,3 %, 3364: 3,4 %, 3365: 11,7 %, 3366: 0,5 %, 3367: 8,0 %.	52
Abb. 19: Darstellung des Zellwachstums im MTT-Test über einen Zeitraum von 72 Stunden. Verglichen wurde die Zellviabilität der Zelllinien HPDE ($p=0,63$), L3.6pl wt ($p=0,03$), Panc-1 ($p=0,06$) und BxPC3 ($p=0,32$) ohne sRANKL-Stimulation und unter Zugabe von 20 ng/ml sRANKL (Recombinant human TRANCE (sRANKL), R&D Systems).	54
Abb. 20: Vergleich des Wachstumsverhaltens der Knockdown-Zelllinien BxPC3 SCR und 3351. Die Versuche wurden mit einer Konzentration von 20 ng/ml sRANKL (Recombinant human TRANCE (sRANKL), R&D Systems) und über einen Zeitraum von 72 h durchgeführt.	56
Abb. 21: Vergleich der Proliferation der Zelllinien BxPC3 SCR, 3351 und 3352 sowie Panc-1 SCR, 3351 und 3352 über einen Zeitraum von 72 h.	57
Abb. 22: Vergleich der COX-2-Expression (Antikörper: Anti-COX2, ab15191, Abcam, 1:500) der neun humanen Pankreaskarzinomzelllinien und HPDE. Darstellung einer Bande bei 75 kDa (schwarzer Pfeil). Als Beladungskontrolle diente GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500) mit einer Bande bei 37 kDa (grauer Pfeil).	58
Abb. 23: COX-2-Expression (Antikörper: Anti-COX2, ab15191, Abcam, 1:500; schwarzer Pfeil) nach Stimulation mit sRANKL (Recombinant human TRANCE [sRANKL], R&D Systems). Untersucht wurden die Zelllinien HPDE, Panc-1 und BxPC3. K stellt hierbei die Kontrolle (K) ohne Stimulationsbedingungen dar. Die anderen Proben wurden für je 5, 10, 20 und 30 min der sRANKL-Stimulation ausgesetzt. Als Beladungskontrolle diente GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500), es stellte sich eine Bande bei 37 kDa dar (grauer Pfeil).	59
Abb. 24: COX-2-Expression (Antikörper: Anti-COX2, ab15191, Abcam, 1:500) mit Nachweis einer Bande bei 69 kDa (schwarzer Pfeil). Als Beladungskontrolle wurde	

GAPDH (Antikörper: Anti-GAPDH, ab9458, Abcam, 1:500) verwendet (grauer Pfeil). Bei den untersuchten Zelllinien handelte es sich um Panc-1 SCR und die Knockdown-Zelllinien Panc-1 3352.11 und Panc-1 3352.12. Je ein Ansatz wurde ohne sRANKL-Stimulation (Recombinant human TRANCE [sRANKL], R&D Systems) angelegt (K), die anderen Proben wurden nach einer Inkubationszeit von 5, 10, 20 und 30 min mit sRANKL untersucht.60

Abb. 25: Wachstumsverhalten der Zelllinie HPDE mit 200 μ M NS 398 (ab120295, Abcam) im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO und Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen von NS 398.....61

Abb. 26: Wachstumsverhalten der Zelllinien BxPC3 und Panc-1 mit unterschiedlichen Konzentrationen NS 398 (ab120295, Abcam). BxPC3: * $p < 0,001$, ** $p = 0,006$. Panc-1: * $p = 0,032$, ** $p = 0,012$62

Abb. 27: Proliferation der RANK-Knockdown-Zelllinie BxPC3 3351 im Vergleich zu BxPC3 SCR unter Zugabe des COX-2-Hemmers NS 398 (ab120295, Abcam).63

Abb. 28: Darstellung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien Panc-1 SCR und Panc-1 3352.11 mit und ohne Zugabe des COX-2-Inhibitors NS 398 (ab120295, Abcam).64

9 Literaturverzeichnis

- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M., 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53, 549–554.
- Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., Galibert, L., 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175–179.
- Armstrong, A.P., Miller, R.E., Jones, J.C., Zhang, J., Keller, E.T., Dougall, W.C., 2008. RANKL Acts Directly on RANK-Expressing Prostate Tumor Cells and Mediates Migration and Expression of Tumor Metastasis Genes. *The Prostate* 68.
- Baek, K., Park, H.-J., Baek, J.-H., Kim, H.-R., 2017. Isoproterenol Increases RANKL Expression in a ATF4/NFATc1-Dependent Manner in Mouse Osteoblastic Cells. *International journal of molecular sciences* 18.
- Bago-Horvath, Z., Schmid, K., Ssler, F.R., Nagy-Bojarszky, K., Funovics, P., Sulzbacher, I., 2014. Impact of RANK signalling on survival and chemotherapy response in osteosarcoma. *Pathology* 46, 411–415.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*.
- Bausch, D., Keck, T., 2017. Laparoskopische Pankreasresektion. *Der Chirurg* 88, 484–489.
- Blair, J.M., Zheng, Y., Dunstan, C.R., 2007. RANK ligand. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39, 1077–1081.
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D.T., Petersen, G., Bracci, P.M., Ji, B.T., Negri, E., Li, D., Risch, H.A., Olson, S.H., Gallinger, S., Miller, A.B., Bueno-de-Mesquita, H.B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P.A., Zatonski, W., Fontham, E., Bamlet, W.R., Holly, E.A., Bertuccio, P., Gao, Y.T., Hassan, M., Yu, H., Kurtz, R.C., Cotterchio, M., Su, J., Maisonneuve, P., Duell, E.J., Boffetta, P., La Vecchia, C., 2012. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23, 1880–8.
- Bowsher, R.R., Sailstad, J.M., 2008. Insights in the application of research-grade diagnostic kits for biomarker assessments in support of clinical drug development: bioanalysis of circulating concentrations of soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 48, 1282–9.
- Branstetter, D., Rohrbach, K., Huang, L.-Y., Soriano, R., Tometsko, M., Blake, M., Jacob, A.P., Dougall, W.C., 2015. RANK and RANK ligand expression in primary human osteosarcoma. *Journal of Bone Oncology* 4, 59–68.

- Bruns, C.J., Harbison, M.T., Kuniyasu, H., Eue, U., Fidler, I.J., 1999. In Vivo Selection and Characterization of Metastatic Variants from Human Pancreatic Adenocarcinoma by Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. *Neoplasia* 1, 50–62.
- Caldwell, B., Aldington, S., Weatherall, M., Shirtcliffe, P., Beasley, R., 2006. Risk of cardiovascular events and celecoxib: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Royal Society of Medicine* 99, 132–140.
- Casimiro, S., Mohammad, K.S., Pires, R., Tato-Costa, J., Alho, I., Teixeira, R., Carvalho, A., Ribeiro, S., Lipton, A., Guise, T.A., Costa, L., 2013. RANKL/RANK/MMP-1 Molecular Triad Contributes to the Metastatic Phenotype of Breast and Prostate Cancer Cells In Vitro. *PLoS ONE* 8.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156–159.
- Chu, G.C.Y., Zhau, H.E., Wang, R., Rogatko, A., Feng, X., Zayzafoon, M., Liu, Y., Farach-Carson, M.C., You, S., Kim, J., Freeman, M.R., Chung, L.W.K., 2014. RANK-and c-Met-mediated signal network promotes prostate cancer metastatic colonization. *Endocrine-Related Cancer*.
- Cooper, K., Squires, H., Carroll, C., Papaioannou, D., Booth, A., Logan, R., Maguire, C., Hind, D., Tappenden, P., 2010. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment* 14, 1–206.
- Crockett, J.C., Mellis, D.J., Shennan, K.I., Duthie, A., Greenhorn, J., Wilkinson, D.I., Ralston, S.H., Helfrich, M.H., Rogers, M.J., 2011. Signal peptide mutations in RANK prevent downstream activation of NF- κ B. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26, 1926–38.
- Crowell, P.L., Schmidt, C.M., Yip-Schneider, M.T., Savage, J.J., Hertzler, D.A., Cummings, W.O., 2006. Cyclooxygenase-2 Expression in Hamster and Human Pancreatic Neoplasia. *Neoplasia* 8, 437–445.
- Crusz, S.M., Balkwill, F.R., 2015. Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Dintzis, S.M., Liggitt, D., 2012. Pancreas. In: *Comparative Anatomy and Histology*. pp. 203–209.
- Dougall, W.C., 2012. Molecular Pathways: Osteoclast-Dependent and Osteoclast-Independent Roles of the RANKL/RANK/OPG Pathway in Tumorigenesis and Metastasis. *Clin Cancer Res* 18, 326–35.

- Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J., Schuh, J., 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes and Development* 13, 2412–2424.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E., 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal* 12, 1063–1073.
- Duheron, V., Hess, E., Duval, M., Decossas, M., Castaneda, B., Klöpffer, J.E., Amoasii, L., Barbaroux, J.-B., Williams, I.R., Yagita, H., Penninger, J., Choi, Y., Lézot, F., Groves, R., Paus, R., Mueller, C.G., 2011. Receptor activator of NF- κ B (RANK) stimulates the proliferation of epithelial cells of the epidermo-pilosebaceous unit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5342–5347.
- Eibl, G., Takata, Y., Boros, L.G., Liu, J., Okada, Y., Reber, H.A., Hines, O.J., 2005. Growth Stimulation of COX-2-Negative Pancreatic Cancer by a Selective COX-2 Inhibitor. *Cancer Research* 65, 982–990.
- Ellis, H., 2013. Anatomy of the pancreas and the spleen. *Surgery (United Kingdom)* 31, 263–266.
- Fan, J., Zhao, J., Shao, J., Wei, X., Zhu, X., Li, M., 2017. I-BET151 inhibits expression of RANKL, OPG, MMP3 and MMP9 in ankylosing spondylitis in vivo and in vitro. *Experimental and therapeutic medicine* 14, 4602–4606.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136, E359–E386.
- Ferrandina, G., Lauriola, L., Zannoni, G.F., Distefano, M.G., Legge, F., Salutari, V., Gessi, M., Maggiano, N., Scambia, G., Ranelletti, F.O., 2002. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in tumour and stroma compartments in cervical cancer: clinical implications. *British Journal of Cancer* 87, 1145–1152.
- Fried, M., Manns, M.P., Rogler, G., 2013. Magen-Darm-Trakt. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Gagner, M., Pomp, A., 1994. Laparoscopic pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *Surgical Endoscopy* 8, 408–410.
- Garavito, R.M., Dewitt, D.L., 1999. The cyclooxygenase isoforms: Structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Giovannucci, E., Egan, K.M., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Speizer, F.E., 1995. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *The New England journal of medicine* 333, 609–14.

- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A., Willett, W.C., 1994. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Annals of Internal Medicine* 121, 241–246.
- Gonzalez-Suarez, E., Jacob, A.P., Jones, J., Miller, R., Roudier-Meyer, M.P., Erwert, R., Pinkas, J., Branstetter, D., Dougall, W.C., 2010. RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 468, 103–107.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Gulyas, M., Mattsson, J.S.M., Lindgren, A., Ek, L., Lamberg Lundström, K., Behndig, A., Holmberg, E., Micke, P., Bergman, B., 2018. COX-2 expression and effects of celecoxib in addition to standard chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Acta Oncologica* 57, 244–250.
- Hanada, R., Hanada, T., Sigl, V., Schramek, D., Penninger, J.M., 2011. RANKL/RANK-beyond bones. *Journal of Molecular Medicine* 89, 647–656.
- Hofbauer, L.C., 2010. Bedeutung des RANK / RANKL / OPG- Signalwegs für den Knochen- stoffwechsel. *Osteologie* 19, 354–357.
- Hofbauer, L.C., Schoppet, M., 2004. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 292, 490–495.
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S.E., 2000. Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 2969–72.
- Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K., 2001. Determination of Three Isoforms of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and Their Differential Expression in Bone and Thymus*. *Endocrinology* 142, 1419–26.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Auflag. ed. Berlin.
- Kartsogiannis, V., Zhou, H., Horwood, N.J., Thomas, R.J., Hards, D.K., Quinn, J.M., Niforas, P., Ng, K.W., Martin, T.J., Gillespie, M.T., 1999. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 25, 525–34.
- Kawamori, T., Rao, C. V., Seibert, K., Reddy, B.S., 1998. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Research* 58, 409–412.
- Kazem, A., Sayed, K. El, Kerm, Y. El, 2014. Prognostic significance of COX-2 and β -catenin in colorectal carcinoma. *Alexandria Journal of Medicine* 50, 211–220.

- Kim, N.S., Kim, H.J., Koo, B.K., Kwon, M.C., Kim, Y.W., Cho, Y., Yokota, Y., Penninger, J.M., Kong, Y.Y., 2006. Receptor activator of NF-kappa B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Molecular and cellular biology* 26, 1002.
- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., 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, W.J., 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165–176.
- Li, D., Morris, J.S., Liu, J., Hassan, M.M., Day, R.S., Bondy, M.L., Abbruzzese, J.L., 2009. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 301, 2553–2562.
- Li, W., Mao, Z., Fan, X., Cui, L., Wang, X., 2014. Cyclooxygenase 2 promoted the tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Tumor Biology* 35, 2271–2278.
- Lipton, A., Campbell-Baird, C., Witters, L., Harvey, H., Ali, S., 2010. Phase II Trial of Gemcitabine, Irinotecan, and Celecoxib in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology* 44, 286–288.
- Lipton, A., Steger, G.G., Figueroa, J., Alvarado, C., Solal-Celigny, P., Body, J.-J.J.-J., de Boer, R., Berardi, R., Gascon, P., Tonkin, K.S., Coleman, R., Paterson, A.H.G.G., Peterson, M.C., Fan, M., Kinsey, A., Jun, S., 2007. Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 4431–7.
- Liu, Y., Wang, J., Ni, T., Wang, L., Wang, Y., Sun, X., 2016. CCL20 mediates RANK/RANKL-induced epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer cells. *Oncotarget* 7, 25328–39.
- Lu, C., Sun, C., Jin, H., 2016. Serum sRANKL and sRANKL/OPG ratio: Novel biomarkers in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters* 11, 2261–2265.
- Lucenteforte, E., La Vecchia, C., Silverman, D., Petersen, G.M., Bracci, P.M., Ji, B.T., Bosetti, C., Li, D., Gallinger, S., Miller, A.B., Bueno-de-Mesquita, H.B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P.A., Zatonski, W., Fontham, E., Bamlet, W.R., Holly, E.A., Gao, Y.T., Negri, E., Hassan, M., Cotterchio, M., Su, J., Maisonneuve, P., Boffetta, P., Duell, E.J., 2012. Alcohol consumption and pancreatic cancer: A pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology* 23, 374–382.
- Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Becherer, J.D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., Tempst, P., Choi, Y., Blobel, C.P., 1999. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *The Journal of biological chemistry* 274, 13613–8.

- Luo, J., Yang, Z., Ma, Y., Yue, Z., Lin, H., Qu, G., Huang, J., Dai, W., Li, C., Zheng, C., Xu, L., Chen, H., Wang, J., Li, D., Siwko, S., Penninger, J.M., Ning, G., Xiao, J., Liu, M., 2016. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nature Medicine* 22, 539–546.
- McClung, M.R., Lewiecki, E.M., Cohen, S.B., Bolognese, M.A., Woodson, G.C., Moffett, A.H., Peacock, M., Miller, P.D., Lederman, S.N., Chesnut, C.H., Lain, D., Kivitz, A.J., Holloway, D.L., Zhang, C., Peterson, M.C., Bekker, P.J., AMG 162 Bone Loss Study Group, 2006. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England journal of medicine* 354, 821–31.
- Melchiorre, D., Milia, A.F., Linari, S., Romano, E., Benelli, G., Manetti, M., Guiducci, S., Ceccarelli, C., Innocenti, M., Carulli, C., Civinini, R., Morfini, M., Matucci-Cerinic, M., Ibbá-Manneschi, L., 2012. RANK-RANKL-OPG in Hemophilic Arthropathy: From Clinical and Imaging Diagnosis to Histopathology. *The Journal of Rheumatology* 39.
- Mikami, S., Katsube, K.I., Oya, M., Ishida, M., Kosaka, T., Mizuno, R., Mochizuki, S., Ikeda, T., Mukai, M., Okada, Y., 2009. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *Journal of Pathology* 218, 530–539.
- Netter, F. H., 2015, Atlas der Anatomie, 6. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München
- Ofman, J.J., Maclean, C.H., Straus, W.L., Morton, S.C., Berger, M.L., Roth, E.A., Shekelle, P.G., 2003. Meta-analysis of dyspepsia and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis & Rheumatism* 49, 508–518.
- Ohtaka, M., Kawahara, T., Mochizuki, T., Takamoto, D., Hattori, Y., Teranishi, J., Miyoshi, Y., Yumura, Y., Hasumi, H., Yokomizo, Y., Hayashi, N., Kondo, K., Yao, M., Miyamoto, H., Uemura, H., 2017. RANK/RANKL expression in prostate cancer. *International Journal of Surgery Case Reports* 30, 106–107.
- Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., Taketo, M.M., 1996. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87, 803–9.
- Owen, S., Ye, L., Sanders, A.J., Mason, M.D., Jiang, W.G., 2013. Expression profile of receptor activator of nuclear-kb (rank), rank ligand (rankl) and osteoprotegerin (OPG) in breast cancer. *Anticancer Research* 33, 199–206.
- Oyewumi, M.O., Alazizi, A., Wehrung, D., Manochakian, R., Safadi, F.F., 2014. Emerging Lung Cancer Therapeutic Targets Based on the Pathogenesis of Bone Metastases.
- Papanastasiou, A.D., Sirinian, C., Kalofonos, H.P., 2012. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-kB isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Research* 14, R112.

- Peng, X., Guo, W., Ren, T., Lou, Z., Lu, X., Zhang, S., Lu, Q., Sun, Y., 2013. Differential Expression of the RANKL/RANK/OPG System Is Associated with Bone Metastasis in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 8.
- Pfitzner, B.M., Branstetter, D., Loibl, S., Denkert, C., Lederer, B., Schmitt, W.D., Dombrowski, F., Werner, M., Rüdiger, T., Dougall, W.C., Von Minckwitz, G., Pfitzner, B.M., Denkert, Á.C., Schmitt, Á.W.D., Branstetter, D., Loibl, S., Lederer, Á.B., Von Minckwitz, Á.G., Dombrowski, F., Werner, M., Rüdiger, T., Dougall, W.C., Von Minckwitz, G., 2014. RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 145, 307–315.
- Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M., 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Research*.
- Renema, N., Navet, B., Heymann, M.-F., Lezot, F., Heymann, D., 2016. RANK–RANKL signalling in cancer. *Biosci. Rep.*
- Riede, U.-N., Blum, H.E., 2009. Pankreas. In: Riede, U.-N., Werner, M., Freudenberg, N. (Eds.), *Basiswissen Allgemeine Und Spezielle Pathologie*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Riede, U.N., Brand-Saberi, B., 2009. Fehlbildungen. In: Riede, U.-N., Werner, M., Freudenberg, N. (Eds.), *Basiswissen Allgemeine Und Spezielle Pathologie*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Roodman, G.D., Dougall, W.C., 2008. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews* 34, 92–101.
- Rostom, A., Dubé, C., Lewin, G., Tsertsvadze, A., Barrowman, N., Code, C., Sampson, M., Moher, D., U.S. Preventive Services Task Force, 2007. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine* 146, 376–89.
- Ryan, D.P., Hong, T.S., Bardeesy, N., 2014. Pancreatic Adenocarcinoma. *The New England journal of medicine* 371, 1039–1049.
- Santini, D., Schiavon, G., Vincenzi, B., Gaeta, L., Pantano, F., Russo, A., Ortega, C., Porta, C., Galluzzo, S., Armento, G., Verde, N. La, Caroti, C., Treilleux, I., Ruggiero, A., Perrone, G., Addeo, R., Clezardin, P., Muda, A.O., Tonini, G., 2012. Receptor Activator of NF-κB (RANK) Expression in Primary Tumors Associates with Bone Metastasis Occurrence in Breast Cancer Patients. *PLoS ONE* 6.
- Seufferlein, T., Bachet, J.B., Van Cutsem, E., Rougier, P., 2012. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23 Suppl 7, vii33-40.

- Shein, H.M., Enders, J.F., 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1164–1172.
- Siech, M., Strauss, P., Huschitt, S., Bartsch, D.K., Wittel, U., Keck, T., Study Grp Laparoscopic Pancreas, S., 2017. The Indications for Laparoscopic Pancreatectomy Results on 550 Patients in the German Laparoscopic Pancreas Registry in Comparison to Other Registries. *Deutsches Arzteblatt International* 114, 263–268.
- Simonet, W., Lacey, D., Dunstan, C., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H., 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, T., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Boyle, W., 1997. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89, 309–319.
- Spanknebel, K., Conlon, K.C., 2001. Advances in the surgical management of pancreatic cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 7, 312–323.
- Stathis, A., Moore, M.J., 2010. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 163–172.
- Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K.S., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L.-K., Levin, B., Godio, L., Patterson, S., Rodriguez-Bigas, M.A., Jester, S.L., King, K.L., Schumacher, M., Abbruzzese, J., DuBois, R.N., Hittelman, W.N., Zimmerman, S., Sherman, J.W., Kelloff, G., 2000. The Effect of Celecoxib, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor, in Familial Adenomatous Polyposis. *New England Journal of Medicine* 342, 1946–1952.
- Sun, W.-H., Chen, G.-S., Ou, X.-L., Yang, Y., Luo, C., Zhang, Y., Shao, Y., Xu, H.-C., Xiao, B., Xue, Y.-P., Zhou, S.-M., Zhao, Q.-S., Ding, G.-X., 2009. Inhibition of COX-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma synergistically inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Letters* 275, 247–255.
- Tan, W., Zhang, W., Strasner, A., Grivennikov, S., Cheng, J.Q., Hoffman, R.M., Karin, M., 2011. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL–RANK signalling. *Nature* 470, 548–553.
- Teitelbaum, S.L., 2006. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis research & therapy* 8, 201.
- Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S.K., Fortun, Y., Redini, F., Heymann, D., 2004. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*.

- Tseng, W.W., Deganutti, A., Chen, M.N., Saxton, R.E., Liu, C.D., 2002. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 6, 838–43; discussion 844.
- Veetil, S.K., Lim, K.G., Ching, S.M., Saokaew, S., Phisalprapa, P., Chaiyakunapruk, N., 2017. Effects of aspirin and non-aspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the incidence of recurrent colorectal adenomas: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of randomized clinical trials. *BMC Cancer* 17.
- Vega, D., Maalouf, N.M., Sakhaee, K., 2007. CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 4514–21.
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H., Goggins, M., 2011. Pancreatic cancer. *The Lancet* 378, 607–620.
- Welsch U., 2014. Lehrbuch Histologie, 4. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, 407-408.
- William F. Young Jr. 2012. Netter Collection Medizinischer Atlas – Endokrines System, 1. Auflage, Urban & Fischer, München, pp. 126-128.
- Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Sauter, B., Li, H.-L., Steinman, R.M., Choi, Y., 1997. TRANCE (Tumor Necrosis Factor [TNF]-related Activation-induced Cytokine), a New TNF Family Member Predominantly Expressed in T cells, Is a Dendritic Cell-specific Survival Factor. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 2075–2080.
- Wright, H.L., McCarthy, H.S., Middleton, J., Marshall, M.J., 2009. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*.
- 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., 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 3597–3602.
- Yip-Schneider, M.T., Barnard, D.S., Billings, S.D., Cheng, L., Heilman, D.K., Lin, a, Marshall, S.J., Crowell, P.L., Marshall, M.S., Sweeney, C.J., 2000. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 21, 139–146.
- Young, William F., J., 2012. Netter Collection Medizinischer Atlas - Endokrines System, 1. Auflage. ed. Urban & Fischer, München.

Zhang, X., Song, Y., Song, N., Zhang, Y., Zhang, L., Wang, Y., Wang, Z., Qu, X., Liu, Y., 2017. RANKL/RANK pathway abrogates cetuximab sensitivity in gastric cancer cells via activation of EGFR and c-Src. *OncoTargets and Therapy* 10, 73–83.

10 Danksagung

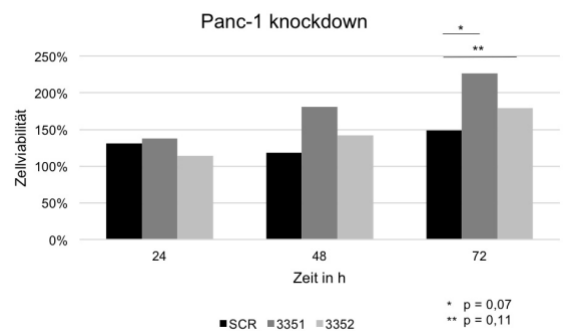
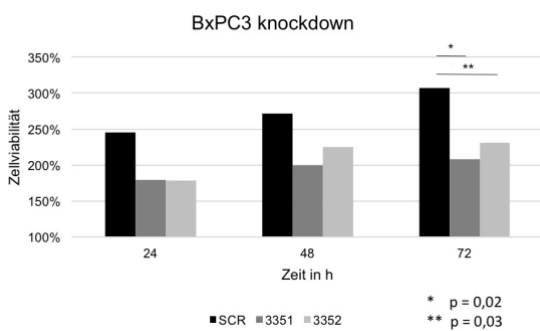
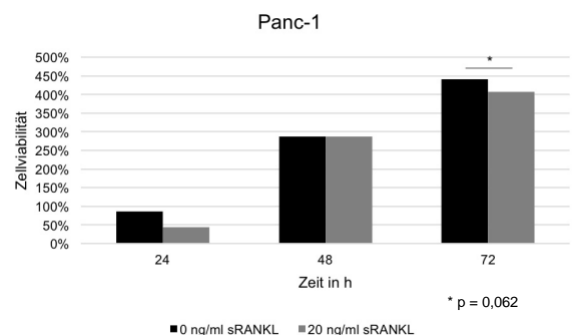
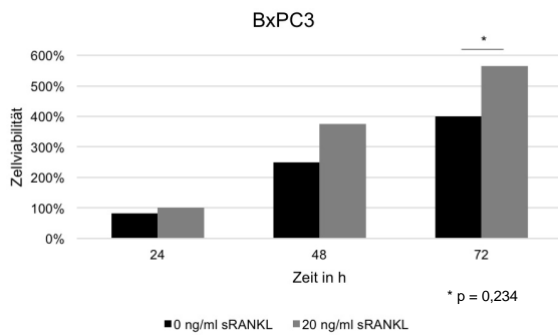
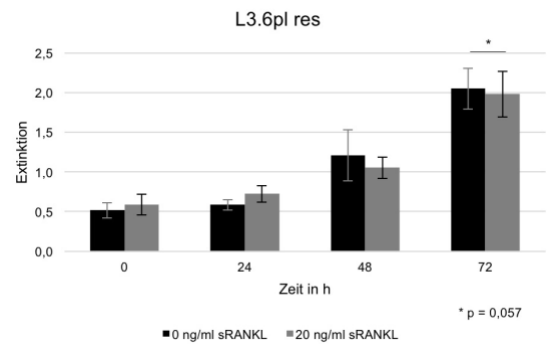
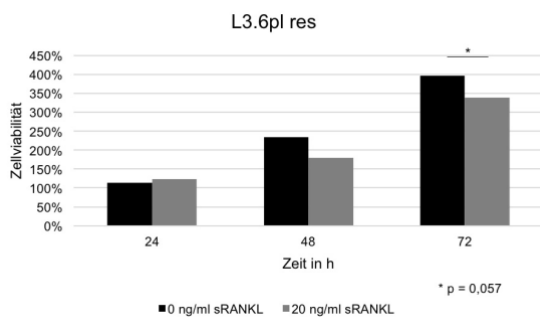
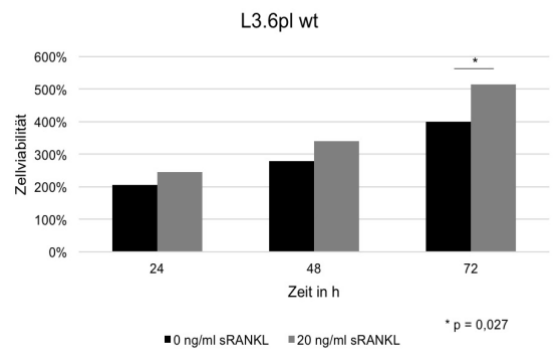
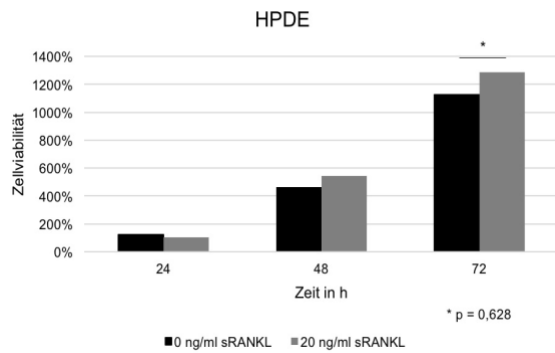
Mein Dank gilt allen, die an der Durchführung dieser Arbeit beteiligt waren.

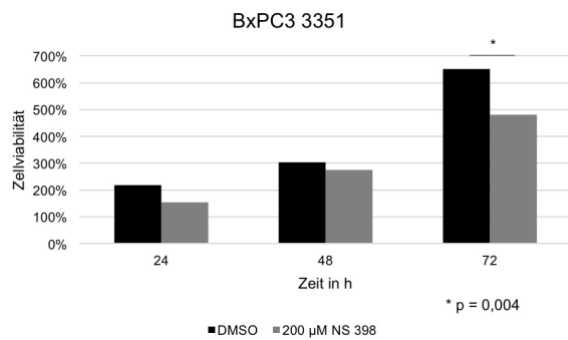
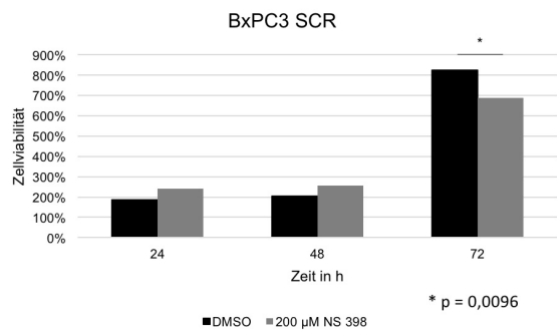
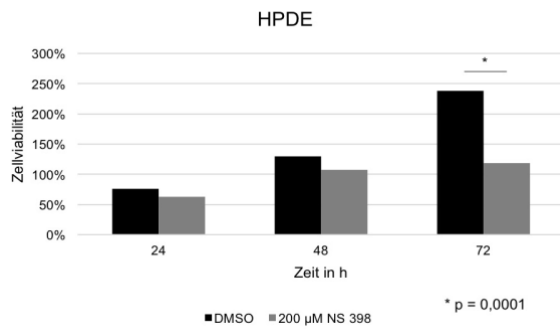
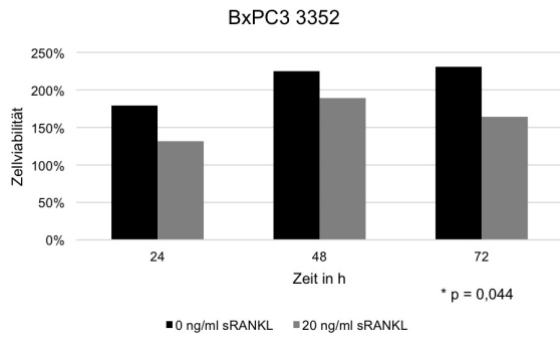
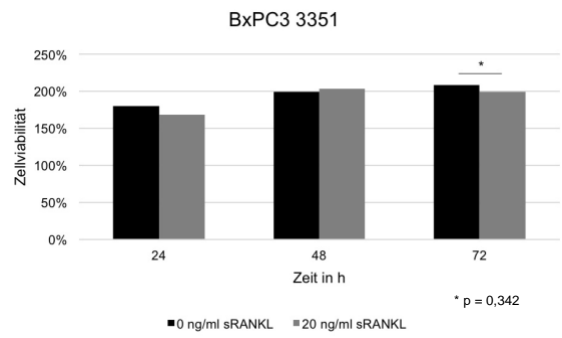
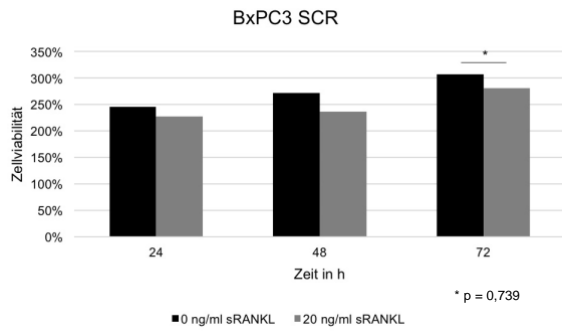
Ich danke Prof. Dr. Jakob R. Izbicki für die Bereitstellung des Themas sowie PD Dr. Daniel Perez und Dr. Alexander El Gammal für die Betreuung und der Hilfe bei der Planung und Durchführung der Versuche. Für die kompetente Unterstützung im Labor danke ich Dr. Cenap Güngör, Dr. Gerrit Wolters-Eisfeld und den chemisch-technisch-Assistentinnen Petra Merkert und Petra Schroeder ganz herzlich, durch die diese Arbeit erst ermöglicht wurde.

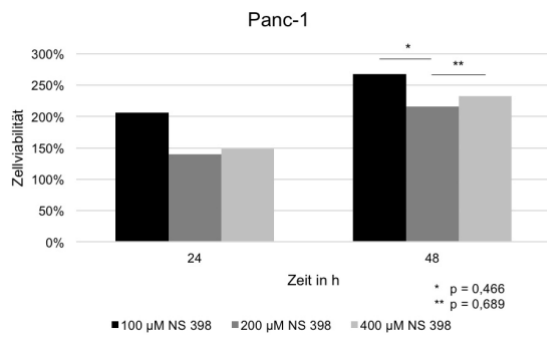
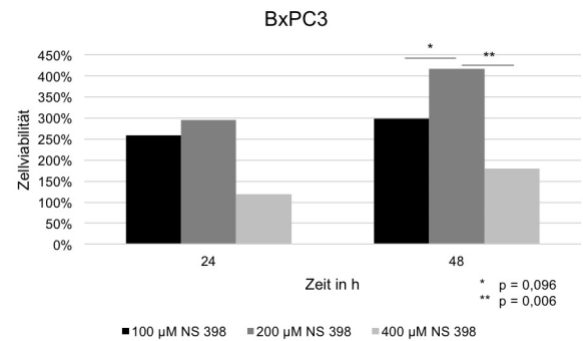
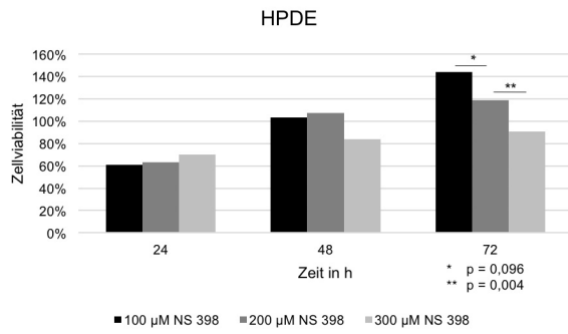
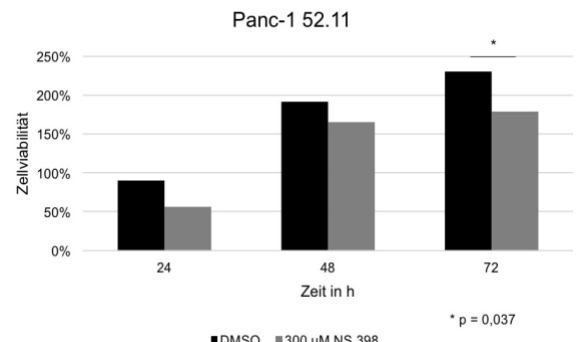
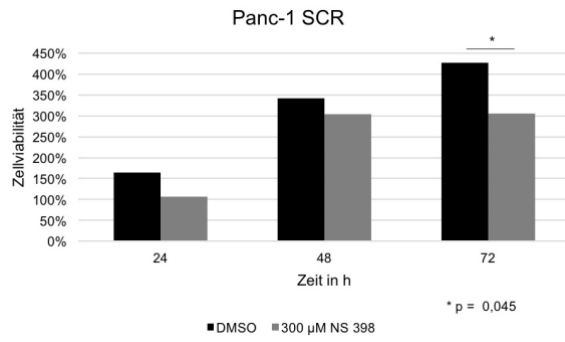
Ein herzlicher Dank gilt auch Anja, Nina und Ruth für die gegenseitige Motivation, stets an dieser Arbeit dranzubleiben.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie für die ständige und geduldige Unterstützung während des Studiums und der Verfassung dieser Promotionsschrift ganz besonders danken.

11 Anhang







12 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: