

**Aus der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Prof. Dr. med. G. Emons)  
im Zentrum Frauenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Expression des Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Rezeptors in  
primären humanen Osteoblasten und Effekte des GnRH-Agonisten  
Triptorelin auf die Expression osteoblastärer Gene**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von  
Julia Klompen  
aus Kamp-Lintfort**

**Göttingen 2010**

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker**

**II. Berichterstatter/in:**

**III. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		III
1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Histologie, Grading und Staging	3
1.1.3	Früherkennung und Diagnostik	5
1.1.4	Therapie	6
1.2	Das Knochengewebe	8
1.2.1	Knochenmetastasierung bei Brustkrebs	9
1.3	Das GnRH-System	11
1.4	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Lösungen und Puffer	16
2.1.5	Nährmedien	16
2.1.6	Kits	16
2.1.7	Antikörper	17
2.1.8	Enzyme	17
2.1.9	GnRH-Analoga	17
2.1.10	Oligonukleotide	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Anlegen einer Primärkultur aus humanem Knochenmaterial	19
2.2.2	Immunfärbung der primären humanen Osteoblasten	19
2.2.3	Versuche mit Osteoblasten	20
2.2.4	Isolierung der mRNA	21
2.2.5	Quantifizierung der gewonnenen RNA	22
2.2.6	Reverse Transkription	22
2.2.7	PCR-Amplifikation	23
2.2.8	Statistische Auswertung	30

---

3	Ergebnisse	31
3.1	Expression von GnRH-I- und -II-Rezeptoren in primären humanen Osteoblasten	31
3.2	Effekte des GnRH-I-Agonisten Triptorelin	32
3.2.1	GnRH-I- und -II-Rezeptor	32
3.2.2	SDF-1	34
3.2.3	EGF	35
3.2.4	IGF I und IGF II	36
3.2.5	OPG und RANKL	38
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung und Ausblick	47
6	Literaturverzeichnis	48
Danksagung	58	
Lebenslauf	59	

# Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
BET	brusterhaltende Therapie
Bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer genes</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	copy Deoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FCS	Foetal Calf Serum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glutaraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
hOB	humane Osteoblasten
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LH	luteinisierendes Hormon
LK	Lymphknoten
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin

---

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pM	Picomolar
P/S	Penicillin-Streptomycin
PTHrP	<i>parathyroid hormone-related protein</i>
RANK	<i>receptor activator of nucleus <math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>receptor activator of nucleus <math>\kappa</math>B-ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
SDF	<i>stromal cell derived factor</i>
sec	Sekunde(n)
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i>
sRNA	small-Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TGF $\beta$	<i>tumor growth factor <math>\beta</math></i>
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit(s)
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Bis heute ist das fernmetastasierte Mammakarzinom nur in Ausnahmefällen heilbar (Kreienberg et al. 2008). Betrachtet man dies im Zusammenhang mit der Tatsache, dass jede zehnte bis elfte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt, wird die Relevanz des Mammakarzinoms als gesundheitliche Bedrohung deutlich. Nach Angaben der IARC (International Agency for Research of Cancer) ist Brustkrebs mit etwa 1,2 Millionen erkrankten Frauen pro Jahr die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit. Etwa 410 000 Frauen sterben jährlich daran (Ferlay et al. 2004). In Deutschland werden derzeit jährlich über 57 000 Neuerkrankungen registriert, was einem Anteil von 27,8% aller Krebserkrankungsfälle bei Frauen entspricht (Batzler et al. 2008). Laut Angaben des Statistischen Bundesamts starben im Jahr 2007 16 780 Frauen an Brustkrebs. Damit liegt das Mammakarzinom bezüglich der Mortalität an Malignomen vor dem Bronchial- und Kolorektalkarzinom an erster Stelle (Kreienberg et al. 2008) und stellt somit auch in Deutschland die häufigste Krebserkrankung und Krebstodesursache der Frau dar. Seit den 80er Jahren steigt die Inzidenz von Brustkrebs stetig, während die Mortalität seit Mitte der 90er Jahren leicht sinkt (Batzler et al. 2008). So betrug die 5-Jahres-Überlebensrate aller Tumorstadien von 1988 bis 1992 72%. Im Zeitraum von 1998 bis 2002 stieg sie auf 79% an (Brenner et al. 2005). Allerdings zeigen Daten des Tumorregisters des Tumorzentrums München, dass in den letzten 20 Jahren nach erfolgter Fernmetastasierung keine Lebensverlängerung erzielt werden konnte (Schlesinger-Raab et al. 2005).

Die genaue Ätiologie des Mammakarzinoms ist noch immer unklar. Aufgrund epidemiologischer Studien wird derzeit ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Als wichtigster allgemeiner Risikofaktor gilt das fortgeschrittene Lebensalter. So treten in Deutschland durchschnittlich 79% der Erkrankungen nach dem 50. Lebensjahr auf (Engel et al. 2001). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren (Batzler et al. 2008). Darüber hinaus führt die langjährige Wirkung von körpereigenem Östrogen zu einer Risikoerhöhung. Dazu kommt es durch eine frühe Menarche (Apter et al. 1989) und eine späte Menopause (Bernstein und Ross 1993). Auch Kinderlosigkeit sowie eine erste Geburt nach dem 30.

Lebensjahr führen zu einer langen ovariellen Aktivität und steigern so das Risiko der Brustkrebsentstehung (White 1987). In der Postmenopause verursacht Adipositas durch eine verstärkte Aromatisierung von androgenen Vorstufen zu Östrogenen eine Erhöhung des Brustkrebsrisikos (Schaffler et al. 2007).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass jede Geburt das Mammakarzinomrisiko um 7% reduziert und durch jedes Jahr, das gestillt wird, eine weitere Reduktion um 4,3% erreicht werden kann (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002).

Ob auch die exogene Östrogenwirkung einer postmenopausalen Hormonersatztherapie das Brustkrebsrisiko erhöht, wurde lange kontrovers diskutiert (Emons 2001; Greiser 2001). Derzeit legen Studien einen Zusammenhang zwischen Hormonersatztherapie und Brustkrebsrisiko nahe, wobei das Risiko bei Einnahme einer kombinierten Östrogen/Progesteron-Therapie gegenüber einer alleinigen Progesterontherapie höher zu sein scheint (Shah und Wong 2006).

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Mastopathie mit atypischer Epitheldysplasie (Mastopathia cystica fibrosa Grad III nach Prechtel) eine Präkanzerose mit deutlich erhöhter Erkrankungswahrscheinlichkeit darstellt. Gutartige Brustdrüsenveränderungen ziehen dagegen kein erhöhtes Mammakarzinomrisiko nach sich (Dupont und Page 1985).

Neben dieser Reihe allgemeiner Einflüsse sind auch genetische Faktoren bekannt. Zwar entsteht nach heutigem Kenntnisstand mit 95% die Mehrzahl aller Mammakarzinome sporadisch, bei ca. 5% liegt jedoch eine genetische Prädisposition vor. Frauen, die von einer Keimbahnmutation der Tumorsuppressorgene BRCA (*breast cancer genes*) 1 und 2 betroffen sind, haben ein lebenslanges Risiko von 50 bis 80% an einem Mammakarzinom, von 60% an einem kontralateralen Mammakarzinom und von 10 bis 40% an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Kreienberg et al. 2008). Familiäre Häufungen von Brustkrebs können zum einen in dieser erblichen Disposition begründet liegen, zum anderen führen ähnliche Lebensstile und eine gemeinsame Umwelt zu einer Erhöhung des Risikos in Familien. So steigt das relative Risiko bei Frauen, bei denen eine Verwandte 1. Grades an Brustkrebs erkrankt ist, um das 2- bis 4-Fache an (Kelsey und Berkowitz 1988).



### 1.1.2 Histologie, Grading und Staging

Die Mehrzahl aller Mammakarzinome entwickelt sich in den Epithelien der terminalen dukto-lobulären Einheit, den Endstrecken des Gangsystems mit den Drüsenläppchen. Bei der weiteren Tumorprogression kommt es zur Ausdehnung auf Milchgänge bzw. Drüsenläppchen (duktale/ lobuläre Kanzerisierung). Wird dabei die Basalmembran nicht durchbrochen, spricht man vom duktalem bzw. lobulären Carcinoma in situ (DCIS und LCIS). Kommt es allerdings zu einer Ausdehnung von Tumorzellen über die Basalmembran hinaus, spricht man vom invasiv duktalem Karzinom, welches mit 80% den häufigsten Typ darstellt, sowie vom invasiv lobulären Karzinom, das etwa 10% der invasiven Mammakarzinome ausmacht. Bei den restlichen 10% handelt es sich um besondere Differenzierungsformen invasiv duktalem Karzinome und Mischformen (Wittekind und Riede 2003).

Brustkrebs metastasiert bereits frühzeitig lymphogen und hämatogen. Durch hämatogene Tumoraussaat entstehen sowohl ossäre als auch viszerale Filiae. Knochenmetastasen stellen die häufigsten Fernmetastasen dar und finden sich meist in Wirbelsäule und Becken. Weichteilmetastasen entstehen am häufigsten in Lunge, Leber und Gehirn.

Das Mammakarzinom wird gemäß TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) eingeteilt. Mit ihr wird die Größe des Tumors (T), der Lymphknotenbefall (N) und die Fernmetastasierung (M) beschrieben. Die Stadieneinteilung dient als Basis der Therapieplanung und lässt prognostische Aussagen zu; sie ist in Tabelle 1.1 dargestellt. Darüber hinaus wird für das invasiv duktalem Karzinom ein Grading angegeben, durch das anhand der Kriterien Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate eine Einteilung in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3) differenzierte Karzinome vorgenommen wird. So sind Rückschlüsse auf den Malignitätsgrad des Karzinoms möglich.

**Tab. 1.1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (Sobin und Wittekind 2002)**

<b>Tis</b>	Carcinoma in situ nicht infiltrierendes intraduktales Karzinom oder lobuläres Carcinoma in situ oder Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
<b>T1</b>	Tumor $\leq$ 2 cm <b>mic</b> $\leq$ 0,1 cm Mikroinvasion <b>a</b> $>$ 0,1 bis 0,5 cm <b>b</b> $>$ 0,5 bis 1 cm <b>c</b> $>$ 1 bis 2 cm
<b>T2</b>	Tumor $>$ 2 bis 5cm
<b>T3</b>	Tumor $>$ 5 cm
<b>T4</b>	Tumor jeder Größe mit Infiltration in die Brustwand oder in die Haut <b>a</b> Ausdehnung auf die Brustwand <b>b</b> Ödem (inkl. Apfelsinenhaut), Ulzeration oder ipsilaterale Satelliten-Hautmetastase <b>c</b> T4a und T4b <b>d</b> inflammatorisches Karzinom
<b>N0</b>	keine befallenen Lymphknoten (LK), isolierte Tumorzellen $\leq$ 0,2 mm
<b>N1</b>	<b>mi</b> Mikrometastasen $>$ 0,2 bis 2 mm <b>a</b> Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten <b>b</b> ipsilaterale Mikrometastase(n) in LK entlang der Arteria (A.) mammaria interna <b>c</b> N1a und N1b
<b>N2</b>	<b>a</b> Metastase(n) in 4-9 axillären LK <b>b</b> ipsilaterale klinisch erkennbare Metastase(n) in LK entlang der A. mammaria interna ohne gleichzeitige axilläre LK-Metastasen
<b>N3</b>	<b>a</b> Metastase(n) in $\geq$ 10 ipsilateralen axillären LK <i>oder</i> in ipsilateralen infraklavikulären LK <b>b</b> Metastase(n) in LK entlang der A. mammaria interna mit $\geq$ 1 axillären LK-Metastase <b>c</b> Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären LK
<b>M1</b>	Nachgewiesene Fernmetastasen (auch kontralaterale Mamma, LK ab zervikaler Lokalisation, LK entlang der kontralateralen A. mammaria interna)

### 1.1.3 Früherkennung und Diagnostik

Je früher Brustkrebs diagnostiziert wird, desto besser sind die Behandlungsmöglichkeiten und die Prognose. Werden präinvasive und frühe invasive Stadien erkannt, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei optimaler Therapie bei über 90% (Joensuu et al. 1999; Michaelson et al. 2002). Als Goldstandard der Diagnostik von Neoplasien und deren Vorstufen gilt nach wie vor die Mammographie. In der Bundesrepublik Deutschland ist das Mammographie-Screening seit 2004 für Frauen zwischen 50 bis 69 Jahren Teil der Richtlinien des Bundesausschusses für Früherkennung von Krebserkrankungen und wird flächendeckend angeboten.

Liegt eine verdächtige Läsion vor, muss diese zum Ausschluss eines malignen Geschehens abgeklärt werden. Dazu sollte die Trias aus klinischer Untersuchung, Bildgebung und Histologie immer vollständig durchgeführt werden (Donegan 1992). Die klinische Untersuchung umfasst die genaue Inspektion und Palpation beider Mammæ, wobei auch nach auffälligen Lymphknoten im Bereich der Axillæ sowie der Infra- und Supraklavikulargruben getastet werden muss. Zur Bildgebung gehört die Mammographie in zwei Ebenen. Zusätzlich gilt die Mammasonographie als wichtiges Untersuchungsverfahren und sollte bei Frauen unter 40 Jahren sowie bei Gravidität/Laktation vor der Mammographie eingesetzt werden (Nothacker et al. 2007). Die Magnetresonanztomographie der Mamma wird derzeit vor allem zum präoperativen lokalen Staging beim lobulären Mammakarzinom empfohlen (Kreienberg et al. 2008). Zur histologischen Sicherung wird meist die sonographisch gesteuerte Hochgeschwindigkeitsstanzbiopsie durchgeführt. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität (92-98%) und Spezifität (bis 100%) (Perlet et al. 2007) gilt sie momentan als Methode der Wahl zur minimal-invasiven Abklärung verdächtiger Befunde.

Ist ein Karzinom der Mamma gesichert, erfolgt vor Therapiestart ein Staging nach TNM-Klassifikation. Dazu sollten eine Röntgen-Thorax-Untersuchung, eine Sonographie der Leber sowie eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden. Eine Mammographie der Gegenseite ist obligat (Kreienberg et al. 2008).

### 1.1.4 Therapie

1882 führte der amerikanische Chirurg William Stewart Halsted in New York die Methode der radikalen Mastektomie ein. Aufgrund seiner Erfolge postulierte er 1894 „Heilung ist durch Operation möglich“ (Halsted 1894). Seitdem ist zwar eine unglaubliche Vielzahl neuer Erkenntnisse gewonnen worden, doch die komplette Exstirpation des Tumors mit einem tumorfreien Resektionsrand (so genannte R0-Resektion) gilt auch heute noch als Basis der Therapie für alle nicht fortgeschrittenen Karzinome. Bei invasiven Karzinomen sollte der mikroskopisch gemessene Sicherheitsabstand zwischen Tumor und Resektionsrand mindestens 1 mm betragen, bei intraduktalen Karzinomen 5 mm oder mehr. Randomisierte Studien belegen, dass eine brusterhaltende Operation mit nachfolgender Bestrahlung im Vergleich zur Mastektomie identische Überlebensraten erzielt. Tabelle 1.2 zeigt Indikationen für die brusterhaltende Therapie (BET) und Mastektomie.

**Tab. 1.2: Indikationen für BET und Mastektomie (nach Kreienberg et al. 2008)**

Indikationen für eine BET	Indikationen für eine Mastektomie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• lokal begrenzte nicht-invasive Karzinome (DCIS, LCIS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multizentrität</li> <li>• diffuse ausgedehnte Kalzifikation vom malignen Typ</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• invasive Karzinome mit günstiger Relation von Tumorgröße zu Brustvolumen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ungünstige Relation von Tumorgröße zu Brustvolumen</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• invasive Karzinome mit intraduktaler Begleitkomponente, solange die Resektionsränder im Gesunden verlaufen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ausgedehntes assoziiertes intraduktales Karzinom &gt;4 cm</li> <li>• inkomplette Tumorentfernung auch nach Nachresektion</li> <li>• inflammatorisches Karzinom</li> <li>• Kontraindikation/ Ablehnung der Nachbestrahlung nach BET</li> <li>• Wunsch der aufgeklärten Patientin</li> </ul>

Bei invasiven Karzinomen gehört die Entfernung des Sentinellymphknotens zur operativen Therapie. Bei negativem Befund wird so eine sichere lokale Kontrolle mit einer axillären Rezidivrate von weniger als 1% erreicht (Palesty et al. 2006). Bei Befall des Sentinellymphknotens ist zur Minderung des Lokalrezidivrisikos eine operative Ausräumung der axillären Lymphknoten indiziert. Durch Bestimmung des Nodalstatus können dann weitere Therapieentscheidungen gezielt getroffen werden. Besteht bereits ein klinischer Verdacht auf eine fortgeschrittene Lymphknotenbeteiligung, sollte unmittelbar eine axilläre Dissektion mit Entfernung von mindestens zehn Lymphknoten erfolgen (Kreienberg et al. 2008).

Die operative Therapie nach Halsted wurde seit Ende der 60er Jahre durch Bernard Fisher in Frage gestellt. Es setzte sich mehr und mehr die Erkenntnis durch, dass eine okkulte Metastasierung oft schon zum Zeitpunkt der Erstdiagnose stattgefunden hat (Fisher et al. 1985). Seitdem hat eine Vielzahl von Studien die Erfolge der Radio- und Chemotherapie in der Behandlung des Mammakarzinoms belegt.

Die Strahlentherapie dient insbesondere der lokalen Tumorkontrolle und wird adjuvant nach brusterhaltender Therapie des DCIS und des invasiven Karzinoms eingesetzt. So wird die Lokalrezidivrate gesenkt (Houghton et al. 2003) und die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen erhöht (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005 a). Auch nach Mastektomie erzielt die Radiotherapie eine Reduktion des Lokalrezidivrisikos und ist daher auch bei T3/T4-Tumoren, R1/R2-Resektion oder mehr als drei positiven Lymphknoten indiziert. Neue Studien beschäftigen sich derzeit mit der Teilbrustbestrahlung. Diese wird von der Beobachtung getragen, dass die meisten intramammären Rezidive in direkter Nähe des Primärtumors liegen (Schaffer et al. 2007). So wären Behandlungszeiten zu verkürzen. Langzeitergebnisse bezüglich Effektivität und Komplikationen stehen bisher noch aus.

Die systemische Therapie zur Bekämpfung nicht sichtbarer Tumorzellen ist heute ein obligater Bestandteil in der Therapie des Mammakarzinoms. Derzeit stehen Zytostatika, Hormonpräparate sowie monoklonale Antikörper zur Verfügung. Die Auswahl der Präparate erfolgt individuell nach Kriterien wie Menopausenstatus, Lymphknotenstatus, Rezeptorstatus, Grading und Staging. Prämenopausal ist eine Polychemotherapie besonders effektiv: Bei Frauen unter 50 Jahren wird eine absolute Verringerung der Mortalität um 8% nach zehn Jahren erreicht (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005 b). Heute gehören neben der alten Kombination aus Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil Anthrazykline und Taxane zum neuen Standard (Levine et al. 1998).

Die endokrine Therapie inhibiert durch Hormonantagonisten das hormonabhängige Wachstum von Tumoren, die Rezeptoren für Östrogen und/oder Progesteron exprimieren. Bei prä- und postmenopausalen Patientinnen ist die Gabe von Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptor-Modulator (SERM, *selective estrogen receptor modulator*), indiziert. Dieser wirkt als partieller Antagonist am Östrogenrezeptor der Tumorzellen und unterdrückt so die Stimulation des Zellstoffwechsels. In der Postmenopause steht die Östrogenproduktion im peripheren Fettgewebe im Vordergrund. Hier greifen Aromatasehemmer an, die die

enzymatische Umwandlung von Androstendion und Testosteron in Östron und Östradiol unterbinden (Brueggemeier et al. 2005). Darüber hinaus wird Fulvestrant genutzt. Dies ist ein reiner Östrogenrezeptor-Antagonist ohne östrogene Restwirkung, der für die Behandlung postmenopausaler Patientinnen mit östrogenrezeptorpositivem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom nach Versagen einer vorherigen endokrinen Therapie zugelassen ist (Heinemann et al. 2007). Bei prämenopausalen Frauen kann die Östrogenproduktion durch Ovariectomie oder strahlentherapeutische Ovarablation (Radiomenolyse) inhibiert werden. Zum anderen stehen GnRH-Agonisten zur Verfügung, die zu einer vollständigen Downregulation und Desensitivierung der hypophysären Rezeptoren führen. So entsteht ein hypogonadotroper, hypoöstrogener Zustand, den man auch als reversible chemische Kastration bezeichnen kann (Emons et al. 2003; Klijn und de Jong 1982).

Einen weiteren Angriffspunkt stellt der Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu (*human epidermal growth factor receptor*) dar, der in ca. 25 bis 30% aller Mammakarzinome überexprimiert wird (Slamon et al. 1989). Der monoklonale Antikörper Trastuzumab blockiert spezifisch diesen Rezeptor. Studien konnten zeigen, dass Trastuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie das rezidivfreie Überleben verlängert und die Mortalität um ca. 30% senkt (Joensuu et al. 2006; Romond et al. 2005). Sein Einsatz ist bei Patientinnen mit Her-2-Überexpression und positivem Nodalstatus bzw. Tumorgröße über 1 cm indiziert. Zu beachten ist seine Kardiotoxizität, die ein engmaschiges Monitoring der Herzfunktion mittels Echokardiographie fordert. Obwohl die Therapie sehr effektiv erscheint, treten bei 25 bis 48% der Patientinnen mit metastasiertem Karzinom neue ZNS-Metastasen auf, was mit fehlender Durchgängigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke erklärt wird (Heinemann et al. 2007).

## 1.2 Das Knochengewebe

Knochen ist ein spezialisiertes Bindegewebe und dient als mechanisches Stützgerüst des Körpers. Er ist Speicher für Mineralsalze und Ort der Blutbildung im Knochenmark und besteht aus zellulären Bestandteilen und einer organischen Grundsubstanz, die auch als Osteoid bezeichnet wird. Darin ist eine anorganische Komponente eingelagert, die sich hauptsächlich aus Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat zusammensetzt. Die organische Grundsubstanz enthält vor allem Kollagen I, Proteoglykane und Glykoproteine, die von

Osteoblasten gebildet und sezerniert wird. Diese Zellen entstehen aus mesenchymalen Stammzellen des embryonalen Bindegewebes. Durch Einlagerung der Mineralsalze verkalkt die Grundsubstanz, die Osteoblasten werden darin eingeschlossen und differenzieren zu Osteozyten. Darüber hinaus befinden sich im Knochengewebe Osteoklasten, die in der Lage sind das Osteoid abzubauen. Sie gehören zum mononukleären Phagozytensystem und stammen somit von hämatopoetischen Stammzellen ab (Junqueira et al. 2000).

Durch die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten unterliegt das Knochengewebe einem ständigen Umbau, sodass eine optimale Anpassung an Belastungen erreicht wird. Diese Plastizität wird durch vielfältige Regulationsmechanismen ermöglicht. So sind einige Hormone bekannt, die in den Knochenumbau eingreifen. Parathormon fördert den Knochenabbau durch Osteoklasten, sodass Kalzium frei wird. Dagegen reduzieren Östrogene die Knochenresorption durch ihre osteoklastenhemmende Wirkung sowie durch Inhibition der Freisetzung proresorptiver Faktoren durch Osteoblasten (Compston 2001). Viele dieser Vorgänge sind wesentlich an das OPG/RANKL/RANK-System gekoppelt. Dazu gehört der *receptor activator of nucleus  $\kappa$ B-ligand* (RANKL), ein Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, das unter anderem von Osteoblasten sezerniert wird. Durch Bindung an seinen Rezeptor (RANK), der auf der Oberfläche von Vorläuferzellen der Osteoklasten exprimiert wird, erfolgt die Differenzierung dieser Vorläuferzellen in reife Osteoklasten (Khosla 2001). Osteoprotegerin (OPG) gehört ebenfalls zu den Tumornekrosefaktoren. Es wird als lösliches Protein sezerniert und bindet an RANKL. So wird die Interaktion zwischen RANKL und RANK verhindert und die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten gehemmt (Morony et al. 2001). Im gesunden Knochengewebe ist das Verhältnis zwischen OPG und RANKL ausgeglichen, sodass ein Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und -aufbau herrscht.

### **1.2.1 Knochenmetastasierung bei Brustkrebs**

Bereits 1889 erkannte Paget, dass Knochen für bestimmte Krebszellen einen fruchtbaren Boden darstellt (Paget 1889). Dementsprechend stellt Knochengewebe mit ca. 30% die bevorzugte Erstmanifestation hämatogener Streuung dar. In Autopsiestudien betrug die Inzidenz ossärer Metastasen bei Patientinnen, die an Brustkrebs starben, 52-85% (Solomayer et al. 2000). Der Primärtumor ist meist östrogenrezeptorpositiv und gut bis mäßig differenziert. Brustkrebs ist nach erfolgter Knochenmetastasierung bisher nur in wenigen

Ausnahmefällen heilbar. Darüber hinaus sind ossäre Metastasen Ursache für eine erhöhte Morbidität, die die Lebensqualität der Patientinnen deutlich einschränkt, da sie zu Knochenschmerzen, pathologischen Frakturen und spinalen Kompressionssyndromen führen. Meist entstehen osteolytische Metastasen, bei denen die Patientinnen aufgrund der dadurch bedingten Kalziummobilisation aus dem Knochen oft an den Folgen einer Hyperkalzämie wie Adynamie, Obstipation, Übelkeit, Polydipsie und Polyurie leiden.

Genauere Metastasierungsmechanismen sind bisher nicht bekannt, doch deren Aufklärung steht derzeit im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen. Gesichert ist die Beteiligung des OPG/RANK/RANKL-Systems. Im gesunden Knochengewebe besteht ein Gleichgewicht zwischen OPG und RANKL. Im Rahmen von Metastasierungsmechanismen in den Knochen wird dieses Verhältnis gestört und osteoblastische bzw. osteolytische Metastasen entstehen. So steigern vom Tumor produzierte Faktoren wie das *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) oder die Interleukine 11 und 6 die Knochenresorption durch Stimulation der RANKL-Expression in Osteoklasten (Thomas et al. 1999; Guise 2009). Auf diesem Wege werden Wachstumsfaktoren wie der *tumor growth factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$ ) oder der *insulin-like growth factor* (IGF) aus der mineralisierten Knochenmatrix freigesetzt und stimulieren ihrerseits das Knochengewebe zur Produktion osteolytischer Faktoren (Yin et al. 1999). Neuere Untersuchungen zeigen darüber hinaus auch eine Beteiligung des OPG/RANK/RANKL-Systems bei der Migration und Invasion von Tumorzellen in Knochengewebe. So konnten Jones et al. 2006 eine konzentrationsabhängige Steigerung der Migration von Brustkrebszellen durch Stimulation mit RANKL nachweisen, die durch OPG inhibiert wurde.

Auch die Rolle des *stromal cell derived factor 1* (SDF-1) bei Metastasierungsmechanismen von Brustkrebszellen ist bekannt. Dieser Faktor gehört zur CXC-Untergruppe der Chemokine und ist Ligand des Rezeptors CXCR4. Maximale Konzentrationen des Liganden SDF-1 werden in Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochenmark gemessen, also Organen, in die das Mammakarzinom bevorzugt metastasiert (Shirozu et al. 1995; Müller et al. 2001). CXCR4 wird dagegen in Brustkrebszellen und ihren Metastasen besonders stark exprimiert (Müller et al. 2001), was Zusammenhänge zwischen CXCR4 und Tumormetastasierung nahe legt. Darüber hinaus werden Metastasierungsvorgänge mit EGF und seinem Rezeptor in Verbindung gebracht. So zeigte sich eine Beteiligung ihrer Signaltransduktion bei der Migration und Invasion von Brustkrebszellen (Spencer et al. 2000; Hynes 2000). Price et al.

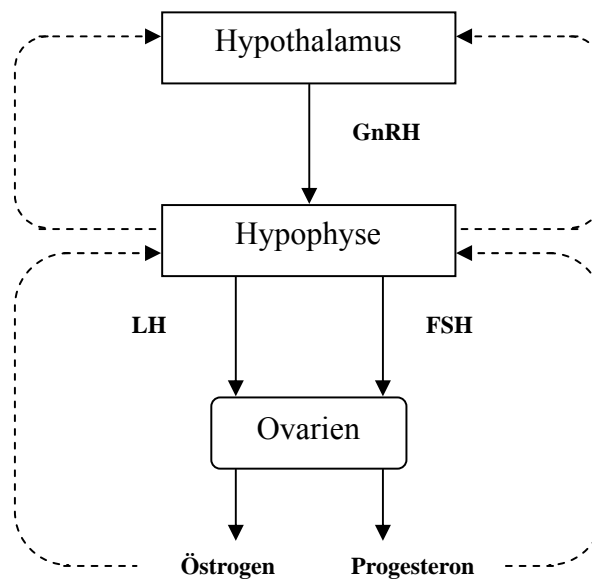


konnten eine gerichtete Migration von MDA-MB-231-Brustkrebszellen auf EGF nachweisen (Price et al. 1999). Ähnliche Mechanismen scheinen durch IGF I vermittelt zu werden. Untersuchungen konnten zeigen, dass IGF I die Migration von Brustkrebszellen (Doerr und Jones 1996; Dunn et al. 1998) induziert. 1996 wiesen Doerr und Jones eine spezifische Migration von MCF-7-Zellen in Richtung IGF I nach, die durch IGF-I-Rezeptor-Antikörper gehemmt werden konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der IGF-I-Rezeptor-Expression Metastasierungsschritte verhindert werden können (Long et al. 1995; Dunn et al. 1998).

Bei Patientinnen mit Knochenmetastasen werden zurzeit palliativ Bisphosphonate eingesetzt. Diese induzieren die Apoptose von Osteoklasten und verringern somit die Morbidität, erreichen allerdings keine Regression. Darüber hinaus laufen derzeit Studien zum adjuvanten Einsatz von Bisphosphonaten zur Prävention der Knochenmetastasierung. Bisher konnte kein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich Effektivität und Einfluss auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Diel et al. 1998; Saarto et al. 2004; Powles et al. 2006). Wünschenswert wären Prophylaktika, die auf molekularer Ebene die Entstehung von Knochenmetastasen effektiv verhindern könnten.

### **1.3 Das GnRH-System**

Das Dekapeptid Gonadotropin-Releasing-Hormon Typ I (GnRH-I) ist als Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse essentiell für die ovarielle Regulation. Es wird alle 30 bis 120 Minuten pulsatil aus dem Hypothalamus abgegeben und erreicht über das Portalvenensystem den Hypophysenvorderlappen (Knobil 1990). Dort bindet GnRH an den GnRH-Rezeptor, einen membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Die Pulsfrequenz entscheidet über die Sezernierung und Synthese der Gonadotropine LH (Luteinisierendes Hormon) und/oder FSH (Follikelstimulierendes Hormon). LH und FSH stimulieren in den Ovarien sowohl die Follikelreifung als auch die Östrogen- und Progesteronsynthese (Stojilkovic et al. 1994). Für die Regulation der Gonadotropinfreisetzung sind Regelkreise bekannt, die Abb. 1.1 zeigt.



**Abb 1.1: Schematische Darstellung der Rückkopplungsmechanismen der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse.**

1998 wurde neben GnRH-I erstmals eine weitere Form, das GnRH-II, im Menschen beschrieben (White et al. 1998). Seine Aminosäuresequenz ist zu 70% homolog zu GnRH-I, von dem es sich durch drei Aminosäuren in Position fünf, sieben und acht unterscheidet (Tab. 1.3). Die genaue physiologische Funktion konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. Die Wirkungen von GnRH und seinen Analoga werden in vielfältiger Weise therapeutisch genutzt. Durch Imitation der Pulsatilität der endogenen GnRH-Sekretion werden Erkrankungen wie die hypothalmische Amenorrhoe oder das Polyzystische Ovarialsyndrom behandelt. GnRH-Antagonisten wirken als kompetitive Inhibitoren. Nach Bindung an den Rezeptor unterbleibt die Induktion der Signaltransduktion. Agonisten, die kontinuierlich verabreicht werden, bewirken eine Downregulation und Desensitivierung der GnRH-Rezeptoren, sodass ein hypogonadotroper, hypoöstrogener Zustand erreicht wird, der vergleichbar mit der postmenopausalen Situation ist. Sie werden beispielsweise bei Endometriose und Hormonrezeptor-positiven Tumoren der Mamma und Prostata eingesetzt (Cuzick et al. 2007; Labrie et al. 2005). Prämenopausale Frauen, die eine Chemotherapie erhalten, können mit GnRH-Analoga zur Ovarprotektion behandelt werden. Die Ovarien werden so in einen Ruhezustand versetzt, bei dem eine Schädigung schnell teilender Primordialfollikel verhindert wird (Potolog-Nahari et al. 2007).

**Tab. 1.3: Sekundärstrukturen der Dekapeptide GnRH-I, GnRH-II und Triptorelin**

	Aminosäuresequenzen										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GnRH-I	pGlu-	His-	Trp-	Ser-	Tyr-	Gly-	Leu-	Arg-	Pro-	Gly-	NH <sub>2</sub>
GnRH-II	pGlu-	His-	Trp-	Ser-	<b>His-</b>	Gly-	<b>Trp-</b>	<b>Tyr-</b>	Pro-	Gly-	NH <sub>2</sub>
Triptorelin	pGlu-	His-	Trp-	Ser-	<b>D-Trp-</b>	Gly-	Leu-	Arg-	Pro-	Gly-	NH <sub>2</sub>

Neben ihrem Vorkommen in Hypothalamus und Hypophyse wurden GnRH-I und sein Rezeptor auch in anderen Organen wie Ovarien (Minaretzis et al. 1995), Uterus (Chegini et al. 1996) und Plazenta (Bramley et al. 1992) nachgewiesen. Auch in 80% der untersuchten Endometrium- und Ovarialkarzinome (Irmer et al. 1994; Völker et al. 2002) sowie in ca. 50 bis 64% der Mammakarzinome (Mangia et al. 2002; Moriya et al. 2001) zeigte sich eine Expression von GnRH-Rezeptoren. Obwohl die DNA-Sequenz dieses Rezeptors identisch zu seinem hypophysären Pendant ist (Kakar et al. 1994), weist die Signaltransduktion signifikante Unterschiede auf. In der Hypophyse kommt es zur Interaktion mit dem G-Protein  $\alpha_{q/11}$ , das kalziumabhängig eine Signaltransduktion einleitet, an dessen Ende die Regulation und Synthese der Gonadotropine LH und FSH steht. Im Gegensatz dazu interagiert der GnRH-I-Rezeptor gynäkologischer Tumore mit dem G-Protein  $\alpha_i$ , wodurch über die Aktivierung einer Phosphotyrosinphosphatase (PTP) die Tyrosin-Autophosphorylierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehemmt wird. Hier liegt also eine Inhibition mitogener Wachstumsfaktor-Signaltransduktion vor (Emons et al. 1997; Gründker et al. 2001). In GnRH-Rezeptor-positiven Brustkrebszelllinien konnten direkte antiproliferative Effekte von GnRH-Agonisten in vitro beschrieben werden (Miller et al. 1985; Blankenstein et al. 1985; Foekens et al. 1986; Eidne et al. 1987). Diese Effekte scheinen zumindest teilweise durch die Inhibition mitogener Wachstumsfaktor-Signaltransduktion vermittelt zu werden.

Die Entstehung von Knochenmetastasen ist eine häufige Komplikation des Mammakarzinoms, die mit einer deutlichen Morbidität der Patientinnen einhergeht. Daher stellte sich aufgrund der antiproliferativen Wirkung des GnRH in GnRH-Rezeptor-positiven Brustkrebszelllinien in vitro die Frage nach Wirkungen von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf das Invasions- und Migrationsverhalten und somit das Metastasierungspotential von Brustkrebszellen in den Knochen. Dazu entwickelten von Alten et al. ein Kokultursystem, um die Interaktionen von verschiedenen Brustkrebszelllinien und primären humanen Osteoblasten bzw. der osteoblastenähnlichen Zelllinie MG63 zu analysieren. Es wurde nachgewiesen, dass

die Invasion von MCF-7-Brustkrebszellen durch Kokultivierung mit Knochenzellen erhöht wird. Diese gerichtete Invasion konnte durch die Behandlung mit GnRH-I- sowie GnRH-II-Agonisten reduziert werden. Darüber hinaus führte die Stimulation mit GnRH während der Kokultivierung zur Reduktion der Expression des osteoblastären Chemokines *stromal cell derived factor 1* (Von Alten et al. 2006).

## 1.4 Fragestellung

Aufgrund der antiproliferativen Wirkung des GnRH in GnRH-Rezeptor positiven Brustkrebszelllinien in vitro stellte sich die Frage nach Wirkungen von GnRH-Analoga auf das Invasions- sowie Migrationsverhalten und somit das Metastasierungspotential von Brustkrebszellen in den Knochen. Von Alten et al. entwickelten ein Verfahren zur Kokultivierung von Brustkrebszellen und Knochenzellen in einer modifizierten Boyden-Kammer, in dem die Zellen ohne direkten Zellkontakt wachsen konnten. Die Membran des oberen Wells bestand aus Polycarbonat und war mit Matrigel beschichtet. In dieses Well wurden Brustkrebszellen eingesetzt, in das untere Well primäre humane Osteoblasten (hOB) oder die osteoblastenähnliche Zelllinie MG63. Die Brustkrebszellen in den oberen Wells wurden mit GnRH-I-Agonist Triptorelin, GnRH-I-Antagonist Cetrorelix, GnRH-II-Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II und 17 $\beta$ -Estradiol stimuliert. Die hOB bzw. MG63-Zellen wurden nicht stimuliert. Es zeigte sich eine gerichtete Invasion der Brustkrebszellen in Richtung Knochen, die durch GnRH-Analoga reduziert werden konnte. Der Effekt war für den GnRH-I-Agonisten Triptorelin am größten. Genaue Mechanismen dieser Vorgänge sind nicht bekannt.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Wirkungen der GnRH-Analoga über die Interaktion mit den Brustkrebszellen vermittelt werden oder möglicherweise direkte Einflüsse der GnRH-Analoga auf Knochenzellen vorliegen, da eine direkte Wirkung der GnRH-Analoga auf die Knochenzellen in den unteren Wells durch von Alten et al. nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit Primärkulturen aus humanem Knochenmaterial angelegt und zunächst untersucht, ob eine Expression von GnRH-Rezeptoren vorliegt. Darüber hinaus sollte die Expression verschiedener Gene, die in ossäre Metastasierungsvorgänge involviert sind, nach Stimulation der primären humanen Osteoblasten mit dem GnRH-I-Agonisten Triptorelin analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer
Analysenwaage	Sartorius
Biofuge pico, Labofuge 400R	Heraeus Holding
Brutschrank, Modell 3121 S/N 28439531	Forma Scientific
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems
Gene Amp PCR-System 2400 und 9700	Amersham Bioscience
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht
Phasenkontrastmikroskop, axiovertiert 25	Zeiss
Polaroid Land-Kamera, MP 4	Polaroid
Polaroid-Film Typ 665 (50 ASA)	Polaroid
Power Supply, EC 250-90, EC Apparatus Corporation Standard Power Pack p25	Biometra
Quarzglasküvette 10 mM	Hellma
Spektralphotometer (Biophotometer)	Eppendorf
Sterilwerkbank, LaminAir® LFH 2472	Heraeus Holding
Thermocycler T <sub>1</sub>	Biometra
Thermocycler T <sub>3000</sub>	Biometra
Ultrazentrifuge (UZ <sup>6</sup> )	Sorvall
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat
Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>	Bender & Hobein
Waage, Kern 440-47	Kern
Wasserbad	GFL

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Biozym, Brand, Eppendorf, Greiner bio-one, Merck, Nunc, Sarstedt und Zymed bezogen, sofern es in dieser Arbeit nicht anders angegeben wird.

### 2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen, sofern es nicht anders angegeben wird. Alle Chemikalien entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad.

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit autoklaviertem Aqua bidest. hergestellt und der pH-Wert, falls nötig, eingestellt.

1,5 % Agarosegel	1,5% Agarose, 98,5% TBE
Ethidiumbromidbad	0.007% Ethidiumbromid, 100% Aqua bidest.
TBE (10x)	0.1M Tris/HCl, 5.5% Borsäure, 0.5M EDTA, pH 8.0
Trypsin/EDTA	0.05% Trypsin, 5mM EDTA, 100% PBS/BSA
PBS	137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.0mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4

### 2.1.5 Nährmedien

Kulturmedium:

500 ml DMEM	(DMEM Low Glucose (1g/l) without L-Glutamine, PAA)
50 ml FCS	(Foetal Calf Serum, PAA)
5ml P/S	(Penicillin-Streptomycin, 10.000 Units, Invitrogen Corporation)
5ml Glutamin	(L-Glutamin, 200mM, Biochrom AG)

Hungermedium:

DMEM	(Dulbecco's Medium without Phenol Red, Gibco)
------	---

### 2.1.6 Kits

Histostain® Bulk Kit	Zymed
RNAeasy® Mini Kit	QIAGEN

### 2.1.7 Antikörper

GnRH-I-Rezeptor Antiserum Kaninchen, polyklonal, 1:10000

### 2.1.8 Enzyme

DNase I, RNase-free (10 U/μl, Roche)  
Recombinant RNasin (40 U/μl, Ribonuklease Inhibitor, Promega)  
SuperScript™ (200 U/μl, RNase H Reverse Transkriptase, Invitrogen)  
Taq DNA-Polymerase (5 U/μl, Roche)

### 2.1.9 GnRH-Analoga

Triptorelin ([D-Trp6]GnRH-I, GnRH-I Agonist, Ferring Pharmaceutics)  
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

## 2.1.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

**Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide**

Primer	Laufriichtung	Sequenz	Annealig	Produkt
<b>GAPDH</b>	sense	5'-ATT CCA ATG GCAAAT TC-3'	64°C	392 Bp
	antisense	5'-AGT GAT GGC ATG GAC TGT GG-3'		
<b>GnRH-I-Rezeptor</b>	sense	5'-GAC CTT GTC TGG AAA GAT CC-3'	61°C	319 Bp
	antisense	5'-CAG GCT GAT CAC CAC CAT CA-3'		
<b>GnRH-II-Rezeptor</b>	sense	5'-GCC CTG CTT ATC TTG CTG AC-3'	60°C	313 Bp
	antisense	5'-CTC CTG CCC TTC TTG ATG TC-3'		
<b>SDF-1</b>	sense	5'-CCG CGC TCT GCC TCA GCG ACG GGA AG-3'	64°C	227 Bp
	antisense	5'-CTT GTT TAA AGC TTT CTC CAG GTA CT-3'		
<b>EGF</b>	sense	5'-ACA TCA AAT ATC CTC AAT GG-3'	55°C	330 Bp
	antisense	5'-GTG GCA TCA AGA CCG GGC TGC-3'		
<b>IGF I</b>	sense	5'-GGA CCG GAG ACG CTC TGC GG-3'	50° C	284/ 431 Bp
	antisense	5'-TTT GCC TCT GCA TTC AGC AT-3'		
<b>IGF II</b>	sense	5'-AGT CGA TGG TGC TTC TCA-3'	60° C	486 Bp
	antisense	5'-GTG GGC GGG GTC TTG GGT GGG TAG-3'		
<b>OPG</b>	sense	5'-GAA CCC CAG AGC GAA ATA CA-3'	54° C	441 Bp
	antisense	5'-CGC TGT TTT CAC AGA GGT CA-3'		
<b>RANKL</b>	sense	5'-AGC TCA GCC TTT TGC TCA TC -3'	62° C	567 Bp
	antisense	5'-TGG TGC TTC CTC CTT TCA TC -3'		



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Anlegen einer Primärkultur aus humanem Knochenmaterial**

Aus dem erhaltenen Knochenmaterial, das in steriler physiologischer Kochsalzlösung zur Verfügung gestellt wurde, wurde unter sterilen Bedingungen unter der Impfbank eine Primärkultur angelegt. Dazu wurde das Material in eine Petrischale gegeben und dort von evtl. vorhandenen Bindegewebsrückständen befreit und anschließend mit einem Skalpell so zerkleinert, dass es mittels einer 25 ml Pipette in ein 50 ml Tube überführt werden konnte. In dieses wurden zusätzlich 10 ml PBS-Puffer gegeben. Daraufhin wurde das Tube kräftig geschüttelt, um Blut, welches sich noch in den Knochenfragmenten befand, auszuwaschen. Falls nötig, wurde der PBS-Puffer ausgetauscht und dieser Vorgang solange wiederholt, bis die Fragmente von Blut befreit waren. Im Anschluss wurden diese mit DMEM-Nährmedium (ohne Zusätze) gespült, welches dann vorsichtig abgesaugt wurde. Es wurde DMEM-Nährmedium mit Zusätzen hinzugefügt und alles in eine Petrischale überführt. Die Knochenfragmente wurden dann mit einem Skalpell weiter zerkleinert und je nach Menge auf weitere Petrischalen verteilt, welche bereits mit je 4 ml DMEM-Nährmedium mit Zusätzen versehen waren. Die Petrischalen mit den Primärkulturen wurden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für eine Woche inkubiert. Nach einer Woche wurde das Wachstum in den Petrischalen unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht und anschließend ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Nährmedium vorsichtig abgesaugt und durch 5 ml neues Medium ersetzt. Dann wurde zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt, bis die Petrischalen dicht von Zellen bewachsen waren. Dann konnten die Zellen durch Trypsinierung vom Boden der Schale gelöst werden, um sie dann in 6-Well-Platten auszusähen.

### **2.2.2 Immunfärbung der primären humanen Osteoblasten**

Für die immunzytologischen Färbungen wurden die in Petrischalen gewachsenen Osteoblasten mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und in Lab-Tek Chamber Slides Systemen (Nunc) ausgesät. Dies sind sterile Glasobjektträger, auf die eine Plastikumrandung aufgebracht ist, in der die Zellen kultiviert werden können. Die Zellen hatten 24 bis 48 Stunden Zeit anzuwachsen. Dann erfolgte das dreimalige Waschen für jeweils 10 Minuten (min) mit PBS-Puffer und die Fixierung mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung in PBS-Puffer für 24 Stunden. Um die endogene Peroxidase zu

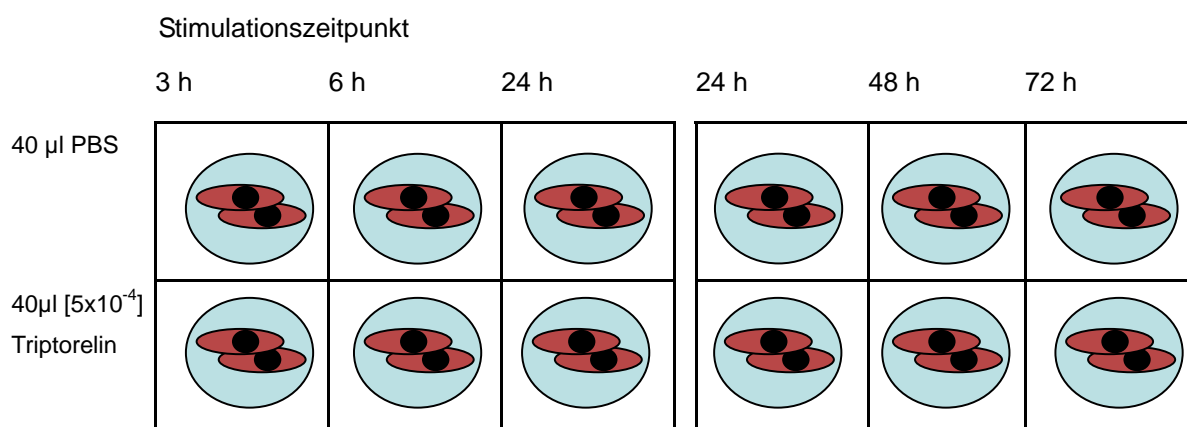
blocken wurden die Objektträger dann mit einer 3%igen  $H_2O_2$ -Lösung in Methanol für 20 min inkubiert. Für die Immunfärbung wurde das Histostain® Bulk Kit der Firma Zymed verwendet. Zuerst erfolgte das Beschichten der Objektträger mit der im Kit enthaltenen Serum Blocking Solution für 15 min. Anschließend wurde die Blocking Solution vorsichtig abpipettiert, aber nicht abgewaschen. Der Objektträger wurde gedanklich zweigeteilt. Die eine Hälfte diente als Negativkontrolle, auf die das Nicht-Immunsereum, die andere Hälfte als Probe, auf die das rabbit-anti-human-GnRH-I-Rezeptor-Serum (1. Antikörper) hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Danach erfolgte das dreimalige Waschen für jeweils 10 min mit PBS-Puffer, bevor der biotinylierte zweite Antikörper für 15 bis 20 min aufgegeben wurde. Wiederum wurden die Objektträger dreimal für jeweils 10 min mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde Streptavidin-Peroxidase für 10 min hinzugefügt, um das Signal der Farbreaktion zu verstärken. Wieder erfolgte ein Waschschriff wie zuvor. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB, DakoCytomation) für 2-30 min. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion als Braunfärbung sichtbar. Um die Kerne der einzelnen Zellen anzufärben, wurde Mayer's Hämalaun (Merck) verwendet. In diese Lösung wurde der Objektträger für 10 bis 20 Sekunden (sec) eingetaucht. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 min mit Leitungswasser. Durch die pH-Wert Änderung von 6,8 auf 7,4 kommt es zur Blaufärbung der Kerne ("Bläuen"). Zur Konservierung wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90% und Alkohol absolut) und Xylol für jeweils zweimal 10 min dehydriert. Danach wurden sie mit DePex Mounting Medium (Gurr) blasenfrei mit Deckgläschen eingedeckt und archiviert.

### **2.2.3 Versuche mit Osteoblasten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden primäre humane Osteoblasten kultiviert, um das Vorhandensein von GnRH-Rezeptoren zu überprüfen und die Wirkung des GnRH-Analogons Triptorelin auf die Osteoblasten zu beobachten.

Die in Petrischalen gewachsenen Osteoblasten wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Beim Versuch 2/06 wurden je 110 000 Zellen in 2 ml Kulturmedium in die Wells zweier 6-Well-Platten überführt, bei Versuch 4/06 startete man mit 180 000 Zellen pro Well, bei Versuch 6/06 mit 120 000 Zellen. Die Zellen bekamen dann fünf Tage Zeit um anzuwachsen und zu proliferieren. Dann wurde

das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch 2 ml Hungermedium ersetzt. Nach 24 Stunden begann die Stimulation mit 40  $\mu\text{l}$  [ $5 \times 10^{-4}$ ] Triptorelin bzw. 40  $\mu\text{l}$  PBS für die Kontrolle. Nach drei Stunden wurde der Versuch bei den ersten zwei Wells (je ein mit Triptorelin stimuliertes Well und eine Kontrolle) gestoppt und die Isolierung der mRNA begonnen. Die folgenden Wells wurden 6, 24, 48 und 72 Stunden stimuliert. Nach 24 Stunden wurde auf die Wells, die für 48 bzw. 72 Stunden Stimulation vorgesehen waren, ein zweites Mal 40  $\mu\text{l}$  [ $5 \times 10^{-4}$ ] Triptorelin bzw. 40  $\mu\text{l}$  PBS gegeben. Abbildung 2.1 zeigt den Versuchsaufbau schematisch.



**Abb. 2.1: Versuchsaufbau mit 6-Well-Platten.**

## 2.2.4 Isolierung der mRNA

Um die Triptorelin-induzierte Wirkung auf die mRNA-Expression untersuchen zu können, wurde die mRNA der humanen Osteoblasten mit Hilfe des RNeasy Mini Kit 250 isoliert. Das Prinzip der Isolation beruht auf selektiven Bindungsmöglichkeiten einer Silica-Gel-Membran für RNA. RNA-Moleküle, die länger als 200 Basenpaare sind, binden in Anwesenheit eines hochkonzentrierten Salzpuffers an die Membran. So wird eine Anreicherung von mRNA erzielt, da rRNA, sRNA und tRNA-Moleküle weniger als 200 Basenpaare besitzen.

Nach der Stimulation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Überschüssiges Medium wurde mit 5 ml PBS entfernt. Anschließend wurden je 600  $\mu\text{l}$  des RLT-Puffers, dem 6  $\mu\text{l}$  Mercaptoethanol zugesetzt worden waren, auf die Wells gegeben. Dem so entstandenen Lysat wurden dann 600  $\mu\text{l}$  Ethanol zugeben, um optimale Bindungsbedingungen zu schaffen. Während des Waschvorgangs, der gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt wurde, wurden Verunreinigungen entfernt. Im Anschluss wurde die gebundene RNA mit 25  $\mu\text{l}$

RNase-freiem Wasser aus dem Kit eluiert. Danach wurde die Menge der mRNA im Eluat photometrisch bestimmt. Die Proben wurden anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.5 Quantifizierung der gewonnenen RNA

Die Menge der Gesamt-RNA im Eluat wurde photometrisch bestimmt. Da RNA ein charakteristisches Absorptionsmaximum von 260 nm besitzt, konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Konzentration der RNA berechnet werden. Der Quotient aus A260:A280 diente zur Beurteilung möglicher Proteinkontaminationen. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Absorption der Proben wurde in 1 cm Quarzglasküvetten bestimmt, in die 70  $\mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung aus Eluat und Ampuwa pipettiert wurden. Der Abgleich erfolgte mit 70  $\mu\text{l}$  Ampuwa.

### 2.2.6 Reverse Transkription

Nach der Isolierung der mRNA war diese zur weiteren Analyse in copy DNA (cDNA) umzuschreiben. Dazu wurde die Reverse Transkriptase genutzt, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die aus einem Retrovirus isoliert wurde. Zunächst fand eine Inkubation mit den Enzymen RNasin und DNase I statt, um eine Kontamination der Gesamt-RNA auszuschließen. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

RNA	1 $\mu\text{g}$
DNase I	1 $\mu\text{l}$
RNasin	1 $\mu\text{l}$ .

Dieser Ansatz wurde mit Ampuwa auf ein Gesamtvolumen von 14  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  30 min mit einer anschließenden Denaturierung bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 min im Thermocycler inkubiert. Danach erfolgte eine Kühlung der Proben bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Zum Synthesestart der cDNA dienten Thymin-Oligonukleotide (Oligo-(dT)<sub>15</sub>Primer), indem sie an die Poly-A-Sequenz der mRNA hybridisieren. Die weitere Kettenverlängerung erfolgte durch komplementäre Anlagerung von Oligonukleotiden an den mRNA-Strang. Durch die Ribonuklease-Aktivität der Reversen Transkriptase wird der RNA-Teil des entstandenen RNA/DNA-Hybrids hydrolysiert. Der verbliebene DNA-Strang wird dann durch die Reverse Transkriptase zu einem DNA-Doppelstrang ergänzt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus

folgenden Reagenzien zusammen:

Oligo-(dT) <sub>15</sub> Primer	8,0 µl
dNTPs (10 mM)	4,0 µl
15xRT-Puffer	8,0 µl
0,1 M DTT	4,0 µl
SuperScript (200 U/µl)	2,0 µl.

Die einzelnen Reagenzien wurden als Master-Mix angesetzt und je 26 µl auf die Probe gegeben. Im Thermocycler erfolgte dann die Inkubation bei 37°C für 60 min mit einer anschließenden Denaturierung bei 95°C für 10 min. Die Proben wurden auf 4°C heruntergekühlt und in Tubes überführt. Zusätzlich wurde in Tubes eine 1:4-Verdünnung aus 10 µl cDNA und 30 µl Ampuwa angesetzt. Im Folgenden wurden die cDNA-Proben bei -30°C gelagert.

### 2.2.7 PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der in-vitro-Amplifikation einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstranges. Dieser wird zunächst bei 90°C denaturiert. Nach Abkühlung auf die entsprechende Annealing-Temperatur binden Sense- und Antisense-Oligonucleotid-Primer an das jeweils entsprechende 5'-Ende der beiden Einzelstränge und rahmen so einen definierten Abschnitt der DNA ein. Die thermostabile Taq-DNA-Polymerase ergänzt die beiden Einzelstränge zum Doppelstrang. Dieser Reaktionszyklus, der also aus Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation des DNA-Stranges besteht, kann im Thermocycler bis zu 35-fach wiederholt werden. Somit wird eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht.

#### GAPDH

Glutaraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wird in allen Geweben exprimiert. Somit dient die PCR für dieses housekeeping-Gen zum Nachweis der Unversehrtheit der gewonnenen cDNA. Darüber hinaus wird es im Gewebe immer mit gleicher Intensität exprimiert und wird deswegen als Vergleichsparameter der Expressionsstärke der zu analysierenden Gene verwendet. Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 392 bp lange DNA-Sequenz des GAPDH-Gens flankiert. Die für die PCR

benötigten Salze waren im 10xPCR-Puffer enthalten. Die Taq-Polymerase wurde aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit erst zum Schluss dem Mix zugefügt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	11,1 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 0,6 µl der 1:4 verdünnten Proben in einem Ansatz von 14,4 µl eingesetzt. Für GAPDH wurden die in Tab. 2.2 aufgeführten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.2: Reaktionsbedingungen für GAPDH.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	64°C	72°C
Dauer	3 min	1 min	1 min

Für die Proben des Versuches 2/06 wurden 21 Zyklen durchgeführt. Beim Versuch 4/06 wurden 22 Zyklen gewählt; bei Versuch 6/06 erzielte man mit 23 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

#### GnRH-I-Rezeptor

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 319 bp lange DNA-Sequenz des GnRH-I-Rezeptor-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	10,5 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl

dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 1,2 µl der unverdünnten Proben in einem Ansatz von 13,8 µl eingesetzt. Für den GnRH-I-Rezeptor wurden die in Tab. 2.3 genannten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.3: Reaktionsbedingungen für GnRH-I.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	61°C	72°C
Dauer	60 sec	60 sec	45 sec

Für alle Proben erzielte man mit 35 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

#### GnRH-II-Rezeptor

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 313 bp lange DNA-Sequenz des GnRH-II-Rezeptor-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	10,5 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 1,2 µl der unverdünnten Proben in einem Ansatz von 13,8 µl eingesetzt. Für den GnRH-II-Rezeptor wurden die in Tab. 2.4 genannten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.4: Reaktionsbedingungen für GnRH-II.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	60°C	72°C
Dauer	30 sec	30 sec	60 sec

Für die Proben des Versuches 2/06 und 4/06 wurden 28 Zyklen durchgeführt. Bei Versuch 6/06 erzielte man mit 29 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

#### SDF-1

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 227 bp lange DNA-Sequenz des SDF-1-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	11,1 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 0,6 µl der 1:4 verdünnten Proben in einem Ansatz von 14,4 µl eingesetzt. Für SDF-1 wurden die in Tab. 2.5 genannten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.5: Reaktionsbedingungen für SDF-1.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	64°C	72°C
Dauer	30 sec	60 sec	60 sec

Für die Proben des Versuches 2/06 wurden 31 Zyklen durchgeführt. Beim Versuch 4/06 wurden 34 Zyklen gewählt; bei Versuch 6/06 erzielte man ebenfalls mit 34 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.



## EGF

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 330 bp lange DNA-Sequenz des EGF-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	11,1 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 0,6 µl der 1:4 verdünnten Proben in einem Ansatz von 14,4 µl eingesetzt. Für EGF wurden die in Tab. 2.6 genannten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.6: Reaktionsbedingungen für EGF.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	55°C	72°C
Dauer	30 sec	60 sec	60 sec

Für die Proben des Versuches 2/06 wurden 23 Zyklen durchgeführt. Beim Versuch 4/06 wurden 24 Zyklen gewählt; bei Versuch 6/06 erzielte man ebenfalls mit 24 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

## IGF I

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 284/ 431 bp lange DNA-Sequenz des IGF-I-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	11,1 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl

10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 0,6 µl der unverdünnten Proben in einem Ansatz von 14,4 µl eingesetzt. Für IGF I wurden die in Tab. 2.7 genannten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.7: Reaktionsbedingungen für IGF I.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	50°C	72°C
Dauer	60 sec	60 sec	60 sec

Für die Proben des Versuches 2/06 wurden 32 Zyklen durchgeführt. Beim Versuch 4/06 wurden 30 Zyklen gewählt; bei Versuch 6/06 erzielte man ebenfalls mit 30 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

#### IGF II

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 486 bp lange DNA-Sequenz des IGF-II-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	11,1 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 0,6 µl der 1:4 verdünnten Proben in einem Ansatz von 14,4 µl eingesetzt. Für IGF II wurden die in Tab. 2.8 aufgeführten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.8: Reaktionsbedingungen für IGF II.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	60°C	72°C
Dauer	60 sec	60 sec	60 sec

Für die Proben des Versuches 2/06 wurden 30 Zyklen durchgeführt. Beim Versuch 4/06 wurden 26 Zyklen gewählt; bei Versuch 6/06 erzielte man ebenfalls mit 26 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

### OPG

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 441 bp lange DNA-Sequenz des OPG-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	11,1 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 0,6 µl der 1:4 verdünnten Proben in einem Ansatz von 14,4 µl eingesetzt. Für OPG wurden die in Tab. 2.9 genannten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.9: Reaktionsbedingungen für OPG.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	54°C	72°C
Dauer	30 sec	60 sec	90 sec

Für die Proben des Versuches 2/06 wurden 28 Zyklen durchgeführt. Beim Versuch 4/06 wurden 27 Zyklen gewählt; bei Versuch 6/06 erzielte man ebenfalls mit 27 Zyklen das beste Ergebnis. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

## RANKL

Es wurde ein Primerpaar (MWG Biotech) verwendet, welches eine 567 bp lange DNA-Sequenz des RANKL-Gens flankiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles H <sub>2</sub> O	11,1 µl
GAPDH sense (20 pM)	0,3 µl
GAPDH antisense (20 pM)	0,3 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl.

Für die PCR wurden je 0,6 µl der 1:4 verdünnten Proben in einem Ansatz von 14,4 µl eingesetzt. Für RANKL wurden die in Tab. 2.10 genannten Reaktionsbedingungen gewählt.

**Tab. 2.10: Reaktionsbedingungen für RANKL.**

	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	94°C	62°C	72°C
Dauer	30 sec	60 sec	45 sec

Für alle Proben wurden 35 Zyklen durchgeführt. Abschließend wurde die Taq-Polymerase bei 72°C in 10 min inaktiviert und auf 4°C heruntergekühlt.

### 2.2.8 Statistische Auswertung

Es wurden drei Primärkulturen aus humanem Knochenmaterial angelegt. Mit jeder dieser Primärkulturen wurde der Versuch einmal und unabhängig voneinander durchgeführt. Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde bei jedem zu untersuchenden Gen dreimal pro Versuch wiederholt. Die Daten wurden auf signifikante Differenzen mittels t-Test untersucht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression von GnRH-I- und -II-Rezeptoren in primären humanen Osteoblasten

Die Ergebnisse von von Alten et al. zeigten eine Zunahme der gerichteten Invasion von Mammakarzinomzellen in Richtung Knochen bei Kokultivierung mit humanen Osteoblasten (Von Alten et al. 2006). Diese Zunahme konnte durch die Behandlung mit GnRH-I und -II-Agonisten reduziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob direkte Einflüsse von GnRH auf Knochenzellen existieren. Dazu wurden Primärkulturen aus humanem Knochenmaterial angelegt. Zunächst wurde eine GnRH-I- und GnRH-II-Rezeptor Expression überprüft. Mittels Immunzytologie sowie RT-PCR konnte bei allen untersuchten Primärkulturen humaner Osteoblasten eine Expression des GnRH-I-Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. 3.1).

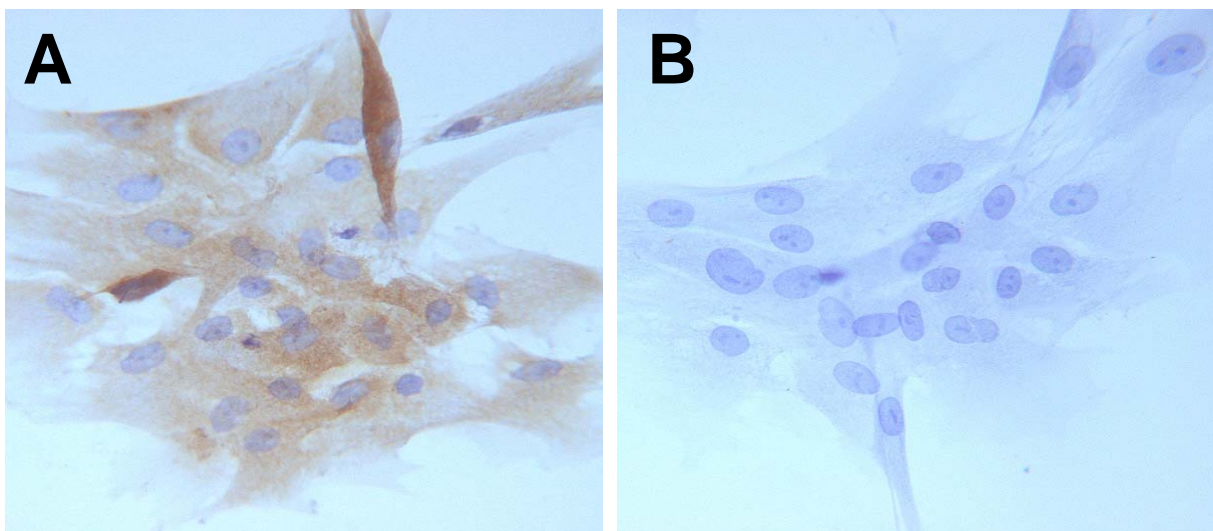


Abb. 3.1: A) Immunzytologischer Nachweis von GnRH-I-Rezeptor-Expression in hOB; B) Negativkontrolle.

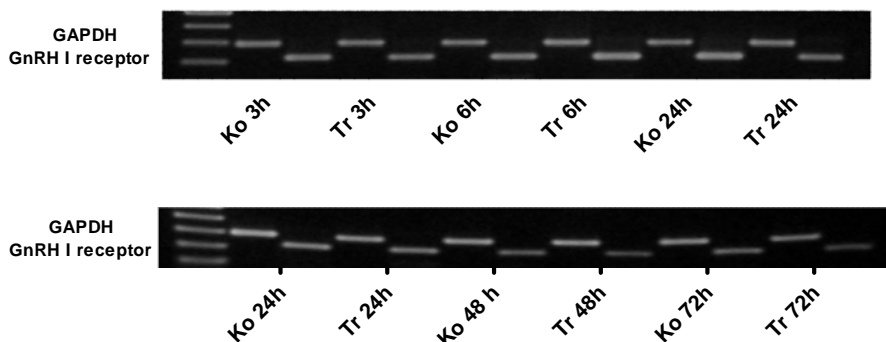


Abb. 3.2: GnRH-I-Rezeptor-mRNA-Expression in humanen Osteoblasten.

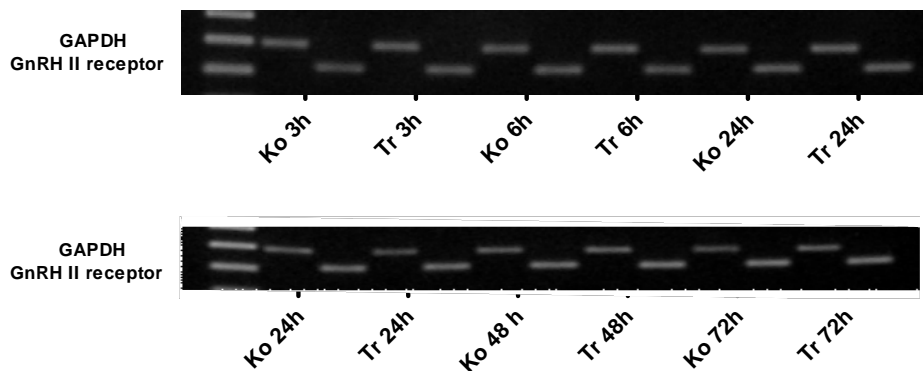


Abb. 3.3: GnRH-II-Rezeptor-mRNA-Expression in humanen Osteoblasten.

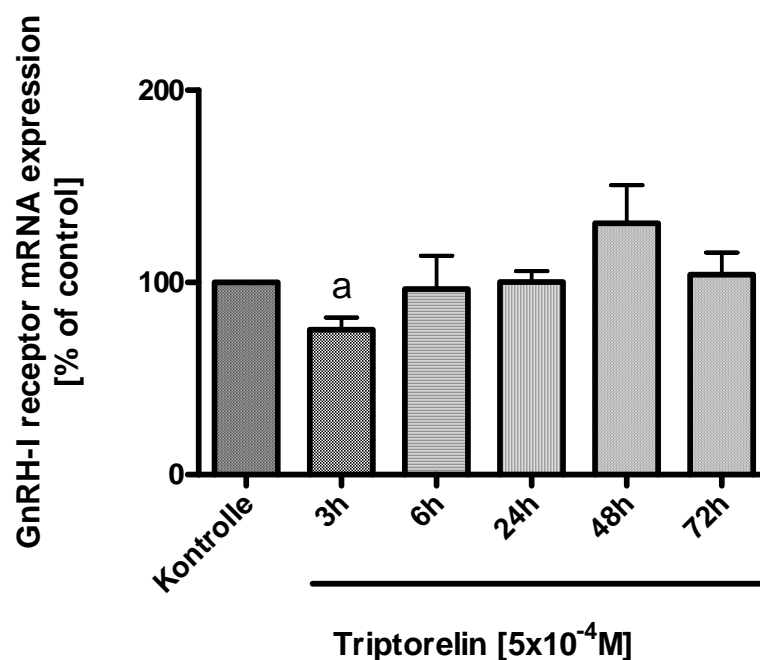
## 3.2 Effekte des GnRH-I-Agonisten Triptorelin

Zur Überprüfung möglicher Regulationsmechanismen folgten Untersuchungen zu Effekten des GnRH-I-Agonisten Triptorelin auf die mRNA-Expression der osteoblastären GnRH-Rezeptoren. Darüber hinaus wurden Auswirkungen auf die Expression verschiedener Gene, die in Metastasierungsmechanismen von Brustkrebszellen in den Knochen involviert sind, analysiert.

### 3.2.1 GnRH-I- und -II-Rezeptor

Die Summe der PCR-Produkte des GnRH-I-Rezeptors stieg in bis zu 35 Zyklen exponentiell und als lineare Funktion der Summe der eingesetzten totalen RNA an. In der Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) war kein Signal detektierbar. GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.

Die Expression der GnRH-I-Rezeptor-mRNA sank nach 3 Stunden Stimulation mit Triptorelin auf  $75,47\% \pm 6,22\%$  im Vergleich zur Kontrolle (100%) (Abb.3.4). Bei einer Stimulationsdauer von 6 sowie 24 Stunden zeigte sich eine mRNA-Expression entsprechend dem Kontrollniveau ( $96,53\% \pm 17,36\%$  und  $100,3\% \pm 5,61\%$ ). Nach 48 Stunden zeigte sich ein Anstieg der GnRH-I-Rezeptor-mRNA auf  $130,7\% \pm 19,96\%$ . Bei 72 Stunden Stimulation konnte man wieder einen Rückgang der Expression auf  $104,1\% \pm 11,44\%$  beobachten. Die statistische Auswertung ergab, dass die Veränderung nach drei Stunden Stimulation im Vergleich zur Kontrolle signifikant ist ( $p < 0,05$ ). Alle anderen Veränderungen sind nicht signifikant.



**Abb. 3.4: GnRH-I-Rezeptor-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten. Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreimal wiederholter Polymerase-Ketten-Reaktion. a,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.**

Die Summe der PCR-Produkte des GnRH-II-Rezeptors stieg in bis zu 29 Zyklen exponentiell und als lineare Funktion der Summe der eingesetzten totalen RNA an. In der Negativkontrolle ( $H_2O$ ) war kein Signal detektierbar. GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.

Die mRNA-Expression des GnRH-II-Rezeptors zeigte nach 3 Stunden Stimulation mit Triptorelin eine maximale Steigerung auf  $138,8\% \pm 18,63\%$  im Vergleich zur Kontrolle (100%) (Abb. 3.5). Bei 6 Stunden Stimulationsdauer konnte noch eine Steigerung der mRNA-Expression auf  $121,0\% \pm 12,52\%$  beobachtet werden. Nach 24 und 48 Stunden sank die Menge der mRNA weiter auf  $107,9\% \pm 5,82\%$  und  $96,77\% \pm 6,12\%$ . Bei 72 Stunden Stimulationsdauer konnte wieder ein leichter Anstieg der mRNA-Expression auf  $111,8\% \pm 10,18\%$  bemerkt werden. Die statistische Auswertung zeigte, dass die Veränderungen nicht signifikant sind ( $p > 0,05$ ).

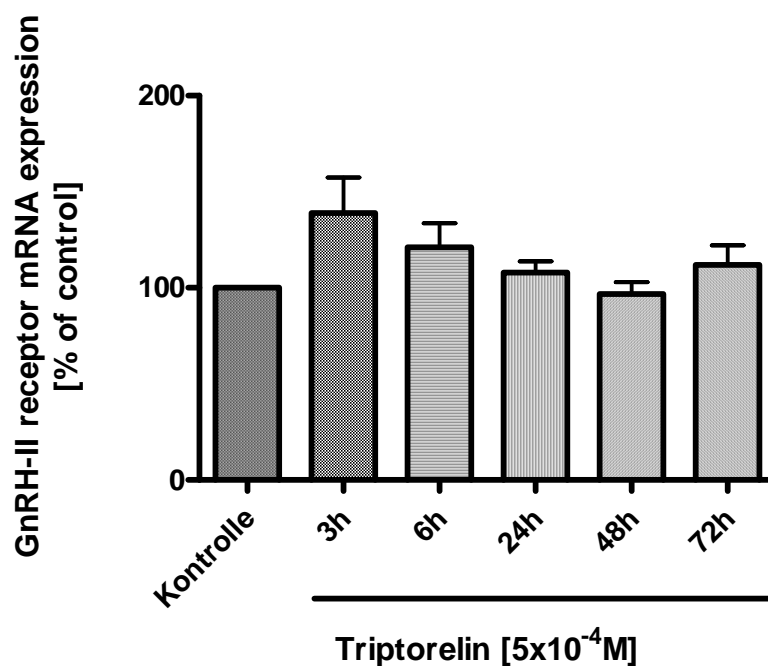
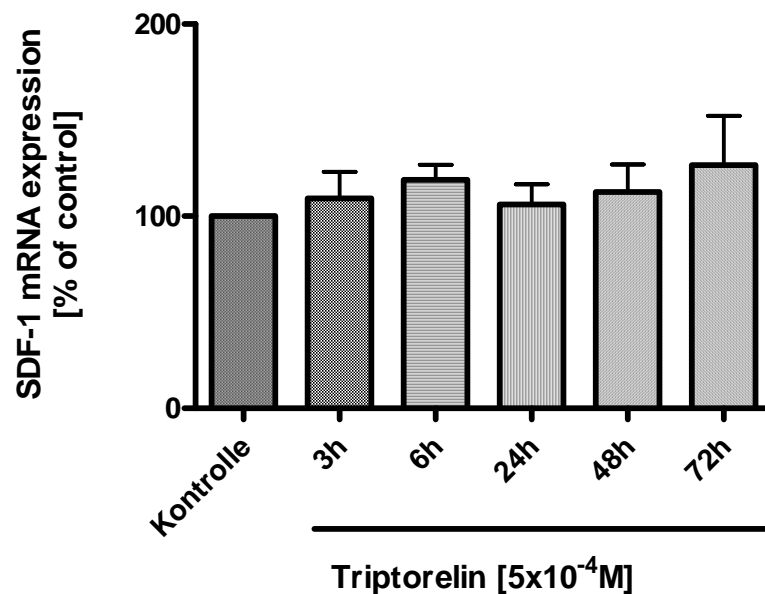


Abb. 3.5: GnRH-II-Rezeptor-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten. Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreimal wiederholter Polymerase-Ketten-Reaktion.

### 3.2.2 SDF-1

Der *stromal cell derived factor 1* gehört zu der CXC-Untergruppe der Chemokine und CXCR4 ist sein Rezeptor. Bekannt ist die Beteiligung dieses Systems in Metastasierungsvorgänge von Brustkrebszellen in den Knochen (Müller et al. 2001). Es wurde untersucht, ob Effekte des GnRH-I-Agonisten Triptorelin auf die SDF-1-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten vorliegen. Die Summe der PCR-Produkte des SDF-1 stieg in bis zu 34 Zyklen exponentiell und als lineare Funktion der Summe der eingesetzten totalen RNA an. In der Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) war kein Signal detektierbar. GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.



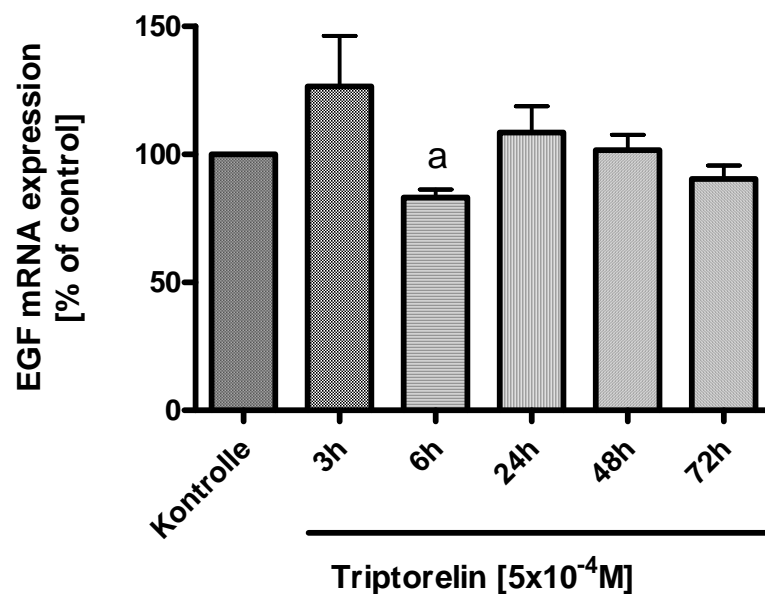


**Abb. 3.6: SDF-1-Rezeptor-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten. Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreimal wiederholter Polymerase-Ketten-Reaktion.**

Die Expression der SDF-1-mRNA zeigte im Vergleich zur Kontrolle (100%) einen leichten Anstieg, der bis zu 48 Stunden Stimulation ein gleich bleibendes Niveau aufwies (Abb. 3.6). So konnten nach 3 Stunden Werte von  $109,2\% \pm 13,94\%$  beobachtet werden, nach 6 Stunden  $118,9\% \pm 7,82\%$ , nach 24 Stunden  $106,1\% \pm 10,52\%$  sowie nach 48 Stunden Stimulation  $112,6\% \pm 14,24\%$ . Nach 72 Stunden zeigte sich ein weiterer Anstieg der Expression auf  $126,7\% \pm 25,54\%$ . Die statistische Auswertung zeigte, dass die Veränderungen nicht signifikant sind ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3 EGF

Vom *epidermal growth factor* ist neben seiner Rolle als Wachstumsfaktor auch eine Beteiligung bei der Migration und Invasion von Brustkrebszellen bekannt (Spencer et al. 2000; Hynes et al. 2000). Um zu überprüfen, ob GnRH-Agonisten über den osteoblastären GnRH-Rezeptor direkte Einflüsse auf die Expression des *epidermal growth factors* ausüben, wurden die Primärkulturen auf ihre EGF-mRNA-Expression hin untersucht. Die Summe der PCR-Produkte des EGF stieg in bis zu 24 Zyklen exponentiell und als lineare Funktion der Summe der eingesetzten totalen RNA an. In der Negativkontrolle ( $H_2O$ ) war kein Signal detektierbar. GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.



**Abb. 3.7: EGF-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten. Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreimal wiederholter Polymerase-Ketten-Reaktion. a,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.**

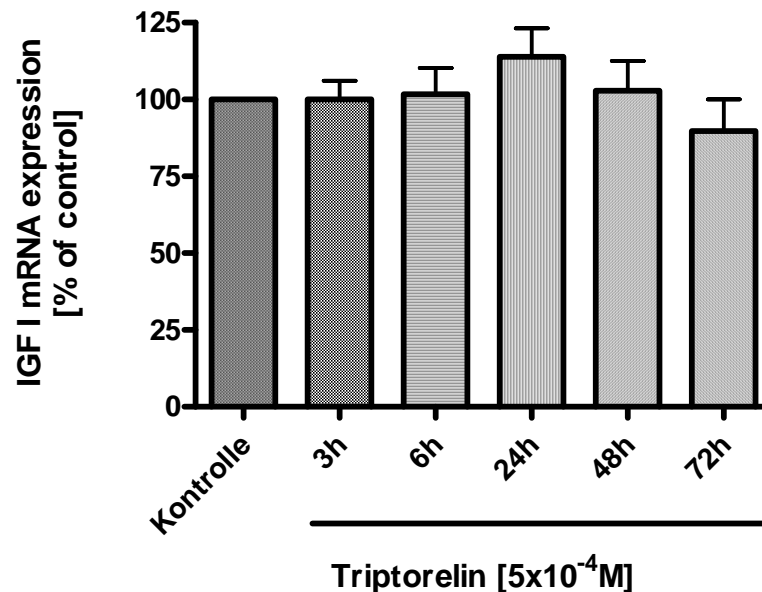
Die Expression der EGF-mRNA stieg nach 3 Stunden Stimulation mit Triptorelin auf  $126,61\% \pm 19,71\%$  im Vergleich zur Kontrolle (100%) (Abb. 3.7). Bei einer Stimulationsdauer von 6 Stunden zeigte sich ein Abfall der mRNA-Expression auf  $83,14\% \pm 3,19\%$ . Nach 24 Stunden Stimulation zeigte sich ein Wiederanstieg auf  $108,61\% \pm 10,27\%$ . Bei Stimulationszeiten von 48 bzw. 72 Stunden sank die EGF-mRNA wieder auf  $101,74\% \pm 5,96\%$  und  $90,47\% \pm 5,15\%$  ab. Die statistische Auswertung ergab, dass die Veränderungen nach 6 Stunden signifikant sind ( $p > 0,05$ ). Alle anderen Veränderungen sind nicht signifikant.

### 3.2.4 IGF I und IGF II

IGF I und II sind Polypeptidhormone mit einer ähnlichen molekularen Struktur wie Insulin. Neben proliferativen und antiapoptotischen Effekten zeigte sich auch eine Beteiligung von IGF bei der Migration und Invasion von Brustkrebszellen (Dunn et al. 1998). Um zu überprüfen, ob GnRH-Agonisten über den osteoblastären GnRH-Rezeptor direkte Einflüsse auf die Expression von IGF I und II ausüben, wurden die Primärkulturen auf ihre IGF-I- und -II-mRNA-Expression hin untersucht.

Die Summe der PCR-Produkte des IGF I stieg in bis zu 32 Zyklen exponentiell und als lineare Funktion der Summe der eingesetzten totalen RNA an. In der Negativkontrolle ( $H_2O$ ) war

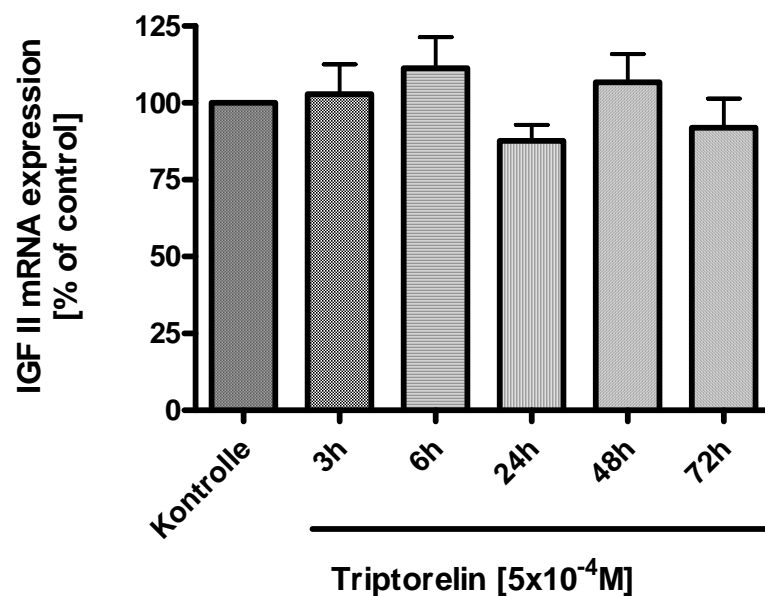
kein Signal detektierbar. GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.



**Abb. 3.8: IGF-I-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten. Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreimal wiederholter Polymerase-Ketten-Reaktion.**

Die IGF-I-mRNA-Expression wies nach 3 und 6 Stunden Stimulation mit  $100,1\% \pm 5,99\%$  sowie  $101,7\% \pm 8,56\%$  Werte entsprechend dem Kontrollniveau (Kontrolle= 100%) auf (Abb. 3.8). Nach 24 Stunden Stimulationsdauer zeigte sich ein diskreter Anstieg der Expression auf  $113,9\% \pm 9,3\%$ . Bei 48 Stunden dauernder Stimulation sank die Expression mit  $102,9\% \pm 9,69\%$  wieder auf Kontrollniveau, welches bei 72 Stunden mit  $89,78\% \pm 10,31\%$  leicht unterschritten wurde. Die statistische Auswertung ergab, dass die Veränderungen nicht signifikant sind ( $p > 0,05$ ).

Die Summe der PCR-Produkte des IGF II stieg in bis zu 30 Zyklen exponentiell und als lineare Funktion der Summe der eingesetzten totalen RNA an. In der Negativkontrolle ( $H_2O$ ) war kein Signal detektierbar. GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.



**Abb. 3.9: Abb.4: IGF-II-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten. Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreimal wiederholter Polymerase-Ketten-Reaktion.**

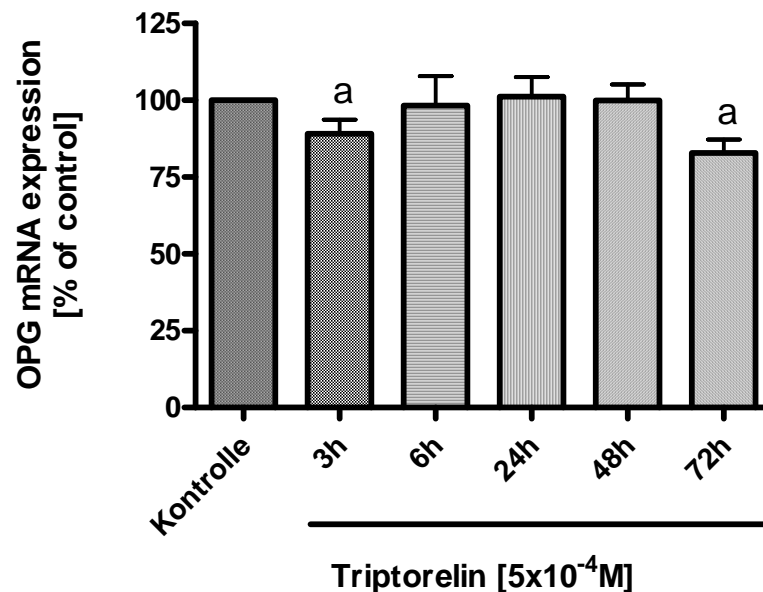
Die Expression der IGF-II-mRNA stieg nach 3 und 6 Stunden Stimulation mit Triptorelin auf  $102,9\% \pm 9,72\%$  und  $111,4\% \pm 10,08\%$  im Vergleich zum Kontrollniveau (Kontrolle= 100%) leicht an (Abb. 3.9). Nach 24 Stunden zeigte sich ein maximaler Abfall auf  $87,64\% \pm 5,27\%$ . Bei einer Stimulationsdauer von 48 Stunden stieg die mRNA-Expression leicht auf  $106,7\% \pm 9,23\%$ . Nach 72 Stunden konnte mit  $91,97\% \pm 9,41\%$  erneut ein leichter Abfall der IGF-II-mRNA beobachtet werden. Die statistische Auswertung ergab, dass die Veränderungen nicht signifikant sind ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.5 OPG und RANKL

OPG und RANKL gehören zur Familie der Tumornekrosefaktoren und spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation von Knochenaufbau und -abbau. Darüber hinaus konnte ihre Beteiligung bei der Migration und Invasion von Tumorzellen in Knochengewebe gezeigt werden (Jones et al. 2006). Es stellte sich die Frage, ob Triptorelin dieses System moduliert. Dazu wurden die Primärkulturen auf ihre OPG- und RANKL-mRNA-Expression hin untersucht.

Die Summe der PCR-Produkte des OPG stieg in bis zu 28 Zyklen exponentiell und als lineare Funktion der Summe der eingesetzten totalen RNA an. In der Negativkontrolle ( $H_2O$ ) war

kein Signal detektierbar. GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.



**Abb. 3.10: OPG-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten. Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreimal wiederholter Polymerase-Ketten-Reaktion. a,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.**

Die Expression der OPG-mRNA sank nach 3 Stunden Stimulation auf  $89,09\% \pm 4,62\%$  im Vergleich zum Kontrollniveau (Kontrolle = 100%) (Abb. 3.10). Bei Stimulationszeiten von 6, 24 und 48 Stunden konnte kein Einfluss des Triptorelins auf die OPG-mRNA-Expression beobachtet werden ( $98,24 \pm 9,66\%$ ;  $101,1\% \pm 6,39\%$ ;  $99,98\% \pm 5,189$ ). Nach 72 Stunden Stimulation zeigte sich ein Abfall der mRNA-Expression auf  $82,86\% \pm 4,36\%$ . Die statistische Auswertung ergab, dass die Veränderungen nach 3 und 72 Stunden Stimulation signifikant sind. Alle anderen Veränderungen sind nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Die RT-PCR der RANKL-mRNA erwies sich als nur schwer verwertbar. In einer Primärkultur konnte keine Expression nachgewiesen werden; in den beiden anderen Versuchen zeigten sich in der semiquantitativen Auswertung widersprüchliche Ergebnisse.

## 4 Diskussion

Von Alten et al. zeigten 2006 mittels Kokultivierung eine gerichtete Invasion von Brustkrebszellen in Richtung Knochen, die durch GnRH-Analoga reduziert werden konnte. Genaue Mechanismen dieser Vorgänge sind nicht bekannt. Unklar blieb auch, ob die Wirkungen der GnRH-Analoga über eine Interaktion mit Brustkrebszellen vermittelt werden oder direkte Einflüsse der GnRH-Analoga auf Knochenzellen vorliegen. In dieser Arbeit wurden Primärkulturen aus humanem Knochenmaterial hinsichtlich einer Expression von GnRH-Rezeptoren untersucht. Darüber hinaus wurden direkte Einflüsse des GnRH-I-Agonisten Triptorelin auf die Expression verschiedener Gene, die in Metastasierungsmechanismen involviert sind, analysiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass humane Osteoblasten GnRH-Rezeptoren exprimieren. Bisher war für den GnRH-I-Rezeptor nur das Vorkommen in der Adenohypophyse und darüber hinaus in Organen des Reproduktionstraktes sowie deren Tumoren bekannt. So finden sich GnRH-I-Rezeptoren in der Plazenta (Lin et al. 1995) in Granulosazellen (Minaretzis et al. 1995), im Myometrium (Chegini et al. 1996) sowie in lymphatischen Zellen (Chen et al. 1999). Auch 80% der humanen Ovarial- und Endometriumkarzinome sowie 50 bis 64% der Mammakarzinome zeigen eine Expression des GnRH-I-Rezeptors (Irmer et al. 1994; Mangia et al. 2002; Völker et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals mittels Immunzytologie sowie RT-PCR eine Expression des GnRH-I-Rezeptors in primären humanen Osteoblasten nachgewiesen werden.

Der GnRH-II-Rezeptor zeigt eine ubiquitäre Expression. Fister et al. fanden auf Proteinebene eine schwache Expression in nicht-reproduktiven Organen. In reproduktiven Organen und Tumoren dieser Gewebe konnte hingegen eine starke Expression nachgewiesen werden (Fister et al. 2007). Eine Analyse auf RNA-Ebene wurde von Neill durchgeführt und zeigte ähnliche Ergebnisse (Neill 2002). Mittels RT-PCR erfolgte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Nachweis der GnRH-II-Rezeptor-mRNA-Expression in humanen Knochenzellen.

In der Hypophyse führt eine kontinuierliche Exposition mit GnRH und seinen Agonisten zu einer Downregulation der GnRH-Rezeptorexpression. Kovacs et al. konnten diesen Effekt auch für GnRH-Antagonisten nachweisen (Kovacs et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigte sich

nach Behandlung von Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien mit dem GnRH-I-Agonisten Triptorelin sowie dem GnRH-II-Antagonisten Cetrorelix nur eine geringe Verminderung der Rezeptorexpression (Völker et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse erhielten Fister et al. durch Untersuchung der GnRH-I und -II-Rezeptorexpression in Mäusen, die mit verschiedenen gynäkologischen Tumorzelllinien xenotransplantiert und mit GnRH-II-Antagonisten behandelt wurden. Hier konnte ebenfalls keine Downregulation der Rezeptordichte beobachtet werden (Fister et al. 2007). Auch in Prostatakarzinomzelllinien erfolgte nach Behandlung mit GnRH-Analoga keine Downregulation der GnRH-Rezeptorexpression (Castellón et al. 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Regulation der GnRH-Rezeptor-mRNA-Expression durch Triptorelin in Osteoblasten analysiert. Die Osteoblasten wurden dazu bis zu 72 Stunden mit dem GnRH-Agonisten stimuliert. Nach drei Stunden kam es zu einer signifikanten Abnahme der GnRH-I-Rezeptor-mRNA-Expression auf  $75,47\% \pm 6,22\%$ . Die GnRH-II-Rezeptor-mRNA-Expression stieg im gleichen Zeitraum auf  $138,8\% \pm 18,63\%$  an, wobei die Veränderungen nicht signifikant waren. Nach 72 Stunden erreichten sowohl GnRH-I- als auch GnRH-II-Rezeptor-mRNA-Expression das Kontrollniveau. Daraus kann geschlossen werden, dass der Rezeptor wahrscheinlich nicht in seiner Dichte reguliert wird, sodass die Ergebnisse in die Reihe der Beobachtungen Fisters, Völkers und Castellóns einzuordnen sind.

Der *stromal cell derived factor 1* gehört zur CXC-Untergruppe der Chemokine und ist Ligand des Rezeptors CXCR4. Maximale Konzentrationen des Liganden SDF-1 wurden in Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochenmark gemessen, also Organen, in die das Mammakarzinom bevorzugt metastasiert (Shirozu et al. 1995; Müller et al. 2001). Der Rezeptor wird hauptsächlich von Stromazellen wie Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen des Knochenmarks gebildet (Yun und Jo 2003; Aust et al. 2001). Die Beobachtung, dass CXCR4 darüber hinaus in Brustkrebszellen und ihren Metastasen besonders stark exprimiert wird (Müller et al. 2001), unterstreicht mögliche Zusammenhänge zwischen CXCR4 und Tumormetastasierung, insbesondere bei Brustkrebs. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung einer signifikanten Steigerung der Invasivität und Migrationsgeschwindigkeit der CXCR4-positiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 durch Transfektion mit SDF-1 bestätigt (Kang et al. 2005). Für die Kokultivierung primärer humaner Osteoblasten mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 konnten von Alten et al. eine Steigerung der Invasion von Brustkrebszellen in Richtung Osteoblasten durch eine artifizielle Basalmembran nachweisen. Dieser Effekt wurde von einer Steigerung der osteoblastären

SDF-1-Sekretion begleitet. Durch die Behandlung der Brustkrebszellen mit dem GnRH-I-Agonisten Triptorelin wurde die Invasion signifikant reduziert. Auch die osteoblastäre SDF-1-Expression nahm ab (Von Alten et al. 2006). Eine direkte Wirkung des GnRH-Agonisten auf die Knochenzellen konnte durch von Alten et al. nicht sicher ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Effekte essentiell an die Kokultivierung gebunden sind oder über die GnRH-Rezeptoren der Osteoblasten vermittelt werden. Dazu wurde die SDF-1-mRNA-Expression der mit dem GnRH-I-Agonisten Triptorelin stimulierten Osteoblasten untersucht. Es zeigte sich, dass eine direkte Stimulation humaner Osteoblasten mit Triptorelin keine Effekte auf die osteoblastäre Expression des *stromal cell derived factors* ausübt. Die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse zeigen somit, dass die Reduktion der osteoblastären SDF-1-Expression essentiell an die Interaktion zwischen Brustkrebszellen und humanen Osteoblasten gebunden ist und durch die Wirkung von GnRH-Analoga am GnRH-Rezeptor der Brustkrebszellen ausgelöst wird. Eine Vermittlung dieser Effekte über den osteoblastären GnRH-Rezeptor kann nun ausgeschlossen werden. Durch Wirkung des Liganden am CXCR4-Rezeptor der Brustkrebszellen scheint letztlich die Steigerung der gerichteten Invasion vermittelt zu werden. Offenbar moduliert GnRH diese Mechanismen über den GnRH-Rezeptor der Brustkrebszellen, sodass es zu einer Reduktion der SDF-1-Expression in Osteoblasten und Reduktion der gerichteten Invasion kommt. Neuere Untersuchungen zeigten eine Reduktion der Brustkrebsmetastasierung in Lunge und regionale Lymphknoten von Mäusen durch Neutralisierung der Interaktionen von CXCR4 und SDF-1 durch CXCR4-Antikörper oder CXCR4-Antagonisten (Müller et al. 2001; Liang et al. 2004). Die Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeit von von Alten et al. (2006) deckt nun Zusammenhänge zwischen dem CXCR4-System und GnRH-Rezeptoren der Brustkrebszellen auf. Auch die Wirkung von GnRH-Agonisten in der Therapie prämenopausaler Frauen mit Brustkrebs ist daher neu zu überdenken. Sie werden derzeit zur chemischen Kastration durch Downregulation der GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse eingesetzt. Denkbar wären auch spezifisch wirkende GnRH-Agonisten zur Prophylaxe der Ausbildung von Knochenmetastasen. Nachfolgende Untersuchungen sollten die Wirkungen der GnRH-Analoga am GnRH-Rezeptor der Brustkrebszellen weiter analysieren, um vorliegende Signaltransduktionsmechanismen zu identifizieren. Je genauer diese Mechanismen bekannt sind, desto gezielter kann zukünftig die Entstehung von Brustkrebsmetastasen in den Knochen verhindert werden.

Der *epidermal growth factor* gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Er ist Ligand des



EGF-Rezeptors, einem Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Durch Bindung von EGF an den natürlichen Rezeptor wird das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose gehemmt. In malignen Neoplasien wurden Veränderungen der Expression und Aktivität des EGF-Rezeptors nachgewiesen, die vermehrtes Zellwachstum und Reduktion des natürlichen Zelltods nach sich ziehen. In Ovarial-, Endometrium- und Brustkrebszellen wirken GnRH-I-Analoga antiproliferativ. Diese Effekte können zumindest teilweise mit ihrer Wirkung auf EGF und seinen Rezeptor erklärt werden: GnRH-I-Analoga aktivieren durch Bindung an den G $\alpha$ i-gekoppelten GnRH-I-Rezeptor in Tumorzellen eine Phosphotyrosinkinase, die den EGF-Rezeptor dephosphoryliert (Gründker et al. 2001). So werden wachstumsfördernde Signale unterbunden (Günthert et al. 2005). Darüber hinaus werden auch Metastasierungsvorgänge mit EGF und seinem Rezeptor in Verbindung gebracht. So zeigte sich eine Beteiligung ihrer Signaltransduktion bei der Migration und Invasion von Brustkrebszellen (Spencer et al. 2000; Hynes 2000). Price et al. konnten eine gerichtete Migration von MDA-MB-231-Brustkrebszellen auf EGF nachweisen (Price et al. 1999). Von Alten et al. zeigten eine Hemmung der Migration und Invasion von Brustkrebszellen durch GnRH-Agonisten. Diese antiinvasiv wirkenden Effekte könnten ähnlich der antiproliferative Wirkung von GnRH über eine Interaktion mit EGF und seinem Rezeptor vermittelt werden. Um zu überprüfen, ob diese Effekte über den osteoblastären GnRH-Rezeptor vermittelt werden, wurde in dieser Arbeit die EGF-mRNA-Expression in primären humanen Osteoblasten nach Behandlung mit dem GnRH-Agonisten Triptorelin untersucht. Nach drei Stunden Inkubation kam es zu einem Anstieg der Expression auf  $126,61\% \pm 19,71\%$ , der mit einer kurzfristigen Stimulation der Osteoblasten durch GnRH erklärt werden kann. Nach sechs Stunden zeigte sich eine signifikante Abnahme auf  $83,14\% \pm 3,19\%$ . Im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden kam es zu einem Ausgleich der Schwankungen bis auf  $90,47\% \pm 5,15\%$ , wobei die Veränderungen nicht signifikant waren. Dies kann in verschiedener Hinsicht diskutiert werden. Zum einen könnte eine mögliche Hemmung der EGF-Expression an die Kokultivierung von humanen Osteoblasten mit Brustkrebszellen gebunden sein und würde somit über den GnRH-Rezeptor der Krebszellen vermittelt werden. Zum anderen ist es möglich, dass die antiinvasiven Effekte im Gegensatz zur antiproliferativen Wirkung von GnRH-Analoga nicht mit der Signaltransduktion von EGF und seinem Rezeptor in Zusammenhang stehen.

IGF I und II sind Polypeptidhormone mit einer ähnlichen molekularen Struktur wie Insulin. Die Wirkungen von IGF I werden durch dessen Bindung an den IGF-I-Rezeptor vermittelt.

Dadurch werden Zellwachstum und Zellteilung stimuliert und der apoptotische Zelltod gehemmt. IGF II bindet ebenfalls an den IGF-I-Rezeptor und spielt eine Schlüsselrolle in der Fetalzeit, während der er Zellteilung und -differenzierung beeinflusst. Neben der bekannten Wachstumsstimulation von IGF I wird dessen Rolle bei Metastasierungsvorgängen immer deutlicher. Untersuchungen konnten zeigen, dass IGF I die Migration von Melanomzellen (Stracke et al. 1989), Pankreaskarzinomzellen (Klemke et al. 1994), Bronchialkarzinomzellen (Long et al. 1998) und Brustkrebszellen (Doerr und Jones 1996; Dunn et al. 1998) induziert. 1996 wiesen Doerr und Jones eine spezifische Migration von MCF-7-Zellen in Richtung IGF I nach, die durch IGF-I-Rezeptor-Antikörper gehemmt werden konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der IGF-I-Rezeptor-Expression Metastasierungsschritte verhindert werden können (Long et al. 1995; Dunn et al. 1998). In dieser Arbeit wurden mögliche Effekte des GnRH-I-Agonisten Triptorelin auf die mRNA-Expression von IGF I und II in humanen Osteoblasten untersucht. So sollte überprüft werden, ob Mechanismen des in der Kokultur antiinvasiv wirkenden GnRH mit der Signaltransduktion von IGF und seinem Rezeptor verbunden sind und über den osteoblastären GnRH-Rezeptor vermittelt werden. Insgesamt zeigte sich keine Regulation der IGF-I- und IGF-II-mRNA-Expression durch Triptorelin. Diese Ergebnisse sind konsequenterweise ähnlich der Resultate zu EGF zu diskutieren. Entweder wird eine Hemmung der Produktion und Sekretion der chemotaktischen Faktoren IGF I und II über den GnRH-Rezeptor der Brustkrebszellen induziert oder es besteht kein Zusammenhang zwischen der antiinvasiven Wirkung von GnRH und IGF I und II.

Osteoprotegerin (OPG) gehört zu den Tumornekrosefaktoren und hemmt die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten (Morony et al. 2001). Es wird als lösliches Protein sezerniert und bindet den *receptor activator of nucleus  $\kappa$ B-ligand* (RANKL). RANKL induziert die Differenzierung von Vorläuferzellen in reife Osteoklasten, stimuliert deren Aktivität und hemmt ihre Apoptose durch Bindung an seinen Rezeptor (RANK), der auf der Oberfläche von Vorläuferzellen der Osteoklasten exprimiert wird (Khosla 2001). OPG antagonisiert die proosteoklastische Wirkung von RANKL und RANK, da der gebundene Ligand seinen Rezeptor nicht mehr aktivieren kann.

Die Beteiligung des OPG/RANKL/RANK-Systems in Metastasierungsvorgänge in den Knochen wird derzeit immer deutlicher. Bekannt ist, dass Signale von Krebszellen das Verhältnis von OPG und RANKL im Knochengewebe stören, sodass es zu gesteigerter

Knochenresorption oder Knochenneubildung kommt. So zeigte sich eine Steigerung der RANKL-Expression in Osteoklasten durch von Tumorzellen produzierte Faktoren wie das *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) oder die Interleukine 11 und 6 (Thomas et al. 1999; Guise 2009). Die daraus resultierende Knochenresorption führt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie TGF  $\beta$  oder IGF aus der mineralisierten Knochenmatrix, die ihrerseits das Knochengewebe zur Produktion osteolytischer Faktoren stimulieren (Yin et al. 1999). Neuere Untersuchungen zeigen darüber hinaus auch eine Beteiligung des OPG/RANKL/RANK-Systems bei der Migration und Invasion von Tumorzellen in den Knochen. So wiesen Jones et al. 2006 eine konzentrationsabhängige Steigerung der Migration von Brustkrebszellen durch Stimulation mit RANKL nach, die durch OPG inhibiert werden konnte. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des GnRH-Agonisten Triptorelin auf die osteoblastäre mRNA-Expression von OPG und RANKL untersucht. Nach Langzeitstimulation von 72 Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion der OPG-mRNA auf  $82,86\% \pm 4,36\%$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100%). Dies deutet darauf hin, dass Osteoprotegerin über den GnRH-Rezeptor humaner Osteoblasten reguliert wird. Diskutiert werden muss, ob die antiinvasive Wirkung des GnRH in der Kokultur über den osteoblastären GnRH-Rezeptor ausgelöst wird. Im Kontext der Ergebnisse dieser Arbeit ist dies jedoch nicht anzunehmen. Neben den Ergebnissen zu EGF, IGF I und II legt insbesondere die fehlende Regulation der SDF-1-mRNA-Expression in hOB nach Stimulation mit Triptorelin die Vermittlung der antiinvasiven Wirkung des GnRH über den GnRH-Rezeptor der Brustkrebszellen nahe. Ob ein Zusammenhang zwischen dem OPG/RANKL/RANK-System und der antiinvasiven Wirkung von GnRH in der Kokultur besteht, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Dieser Arbeit lag die Frage nach direkten Effekten des in der Kokultur antiinvasiv wirkenden GnRH auf primäre humane Osteoblasten zugrunde. Doch neben der Rolle des GnRH-Rezeptors in Metastasierungsmechanismen von Brustkrebszellen stellt sich die Frage nach einer physiologischen Funktion. Zum einen könnte es möglich sein, dass der osteoblastäre GnRH-Rezeptor ein Rudiment darstellt und seine Expression keine physiologische Funktion mehr nach sich zieht. Zum anderen sollte eine Bedeutung bei der Regulation des Knochenstoffwechsels nicht außer Acht gelassen werden. So sind die physiologischen Veränderungen der Menopause häufig mit der Entstehung einer Osteoporose assoziiert. Diese werden durch die Ausbildung eines hypoöstrogenen Zustands und der somit fehlenden osteoklastenhemmenden Wirkung der Östrogene erklärt (Compston 2001). Betrachtet man die

physiologischen Veränderungen in der Menopause mit dem Sistieren der ovariellen Funktion, so erkennt man einen Anstieg der Gonadotropine sowie GnRH durch die Rückkopplungsmechanismen der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Darüber hinaus zeigt sich auch durch Gebrauch von GnRH-Analoga in der Therapie hormonabhängiger gynäkologischer Erkrankungen die Ausbildung einer Osteoporose, die mit der Ausbildung eines hypoöstrogenen Zustands in Zusammenhang gebracht werden (Waibel-Treber et al. 1989). In dieser Arbeit wurde die Wirkung des GnRH-Agonisten Triptorelin auf die osteoblastäre mRNA-Expression von OPG untersucht. Nach Langzeitstimulation von 72 Stunden kam es zu einer signifikanten Reduktion der OPG-mRNA auf  $82,86\% \pm 4,36\%$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100%). Dies deutet auf eine Regulation des Osteoprotegerins über den GnRH-Rezeptor humaner Osteoblasten hin. Somit muss eine mögliche direkt vermittelte knochenabbauende Wirkung durch den GnRH-Rezeptor der Osteoblasten zumindest in Betracht gezogen werden. Hier sollten weitere Untersuchungen folgen, um mögliche Interaktionen aufklären zu können, die Grundlage neuer Behandlungsstrategien für Osteoporose und andere Knochenerkrankungen darstellen könnten.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass humane Osteoblasten GnRH-Rezeptoren exprimieren. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass der Rezeptor ähnlich anderer peripherer GnRH-Rezeptoren durch Exposition mit GnRH-Agonisten nicht in seiner Dichte reguliert wird.

Eine Reduktion der Invasion von Brustkrebszellen durch den GnRH-I-Agonisten Triptorelin und ein Zusammenhang mit der Abnahme der osteoblastären SDF-1-Sekretion konnte bereits gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden humane Knochenzellen mit Triptorelin stimuliert, wobei keine Effekte auf die osteoblastäre SDF-1-mRNA-Expression nachgewiesen wurden. Somit zeigt diese Arbeit, dass die Reduktion der osteoblastären SDF-1-Expression essentiell an die Interaktion zwischen Brustkrebszellen und humanen Osteoblasten gebunden ist und durch die Wirkung von GnRH-Analoga am GnRH-Rezeptor der Brustkrebszellen ausgelöst wird. Eine Vermittlung dieser Effekte über den osteoblastären GnRH-Rezeptor kann nun ausgeschlossen werden. Dementsprechend scheint auch die antiinvasive Wirkung des GnRH in der Kokultur über die GnRH-Rezeptoren der Brustkrebszellen vermittelt zu werden. Auch die in dieser Arbeit nachgewiesene fehlende Regulation der in Metastasierungsmechanismen beteiligten Wachstumsfaktoren EGF, IGF I und II unterstreicht dies. Nachfolgende Untersuchungen sollten die Wirkung der GnRH-Analoga am GnRH-Rezeptor der Brustkrebszellen und Effekte auf das Knochengewebe weiter analysieren, um vorliegende Signaltransduktionsmechanismen zu identifizieren. Je genauer diese Mechanismen bekannt sind, desto gezielter kann zukünftig die Entstehung von Brustkrebsmetastasen in den Knochen verhindert werden.

Neben der Rolle des GnRH-Rezeptors bei Metastasierungsmechanismen von Brustkrebszellen stellt sich die Frage nach einer physiologischen Funktion. In dieser Arbeit konnte eine Reduktion der OPG-mRNA nach Stimulation mit Triptorelin nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Regulation des Osteoprotegerins über den GnRH-Rezeptor humaner Osteoblasten hin. Daher muss eine mögliche direkt vermittelte knochenabbauende Wirkung durch den GnRH-Rezeptor humaner Osteoblasten zumindest in Betracht gezogen werden. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob Interaktionen vorliegen, die als Grundlage neuer Behandlungsstrategien für Osteoporose und andere Knochenerkrankungen dienen könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

- (Apter et al. 1989) Apter D, Reinila M, Vihko R (1989): Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. *Int J Cancer* 44, 783-787
- (Aust et al. 2001) Aust G, Steinert M, Kiessling S, Kamprad M, Simchen C (2001): Reduced expression of stromal-derived factor 1 in autonomous thyroid adenomas and its regulation in thyroid-derived cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (7), 3368-3376
- (Batzler et al. 2008) Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R: Krebs in Deutschland 2003 – 2004: Häufigkeiten und Trends. hrsg. vom Robert Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.; 6. überarbeitete Auflage, Berlin 2008, 54-58
- (Bernstein und Ross 1993) Bernstein L, Ross RK (1993): Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15 (1), 48-65
- (Blankenstein et al. 1985) Blankenstein MA, Henkelmann MS, Klijn JG (1985): Direct inhibitory effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist on MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21 (12), 1493-1499
- (Bramley et al. 1992) Bramley TA, McPhie CA, Menzies GS (1992): Human placental gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites: I. Characterization, properties and ligand specificity. *Placenta* 13 (6), 555-581
- (Brenner et al. 2005) Brenner H, Stegmeier C, Ziegler H (2005): Verbesserte Langzeitüberlebensraten von Krebspatienten: Die unterschätzten Fortschritte in der Onkologie. *Dtsch Arztebl*; 102: A 2628–2633 [Heft 39]
- (Brueggemeier et al. 2005) Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES (2005): Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev* 26 (3), 331-345
- (Castellón et al. 2006) Castellón E, Clementi M, Hitschfeld C, Sánchez C, Benítez D, Sáenz L, Contreras H, Huidobro C (2006): Effect of leuprolide and cetrorelix on cell growth, apoptosis, and GnRH receptor expression in primary cell cultures from human prostate carcinoma. *Cancer Invest* 24 (3), 261-268
- (Chegini et al. 1996) Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok C, Williams RS

- (1996): Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (9), 3215-3221
- (Chen et al. 1999) Chen HF, Jeung EB, Stephenson M, Leung PC (1999): Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (2), 743-750
- (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002) Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002): Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *Lancet* 360 (9328), 187-195
- (Compston 2001) Compston JE (2001): Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81 (1), 419-447
- (Cuzick et al. 2007) Cuzick J, Ambroisine L, Davidson N, Jakesz R, Kaufmann M, Regan M, Sainsbury R; LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview group (2007): Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. *Lancet* 369 (9574), 1711– 1723
- (Diel et al. 1998) Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G (1998): Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 339 (6), 357-363
- (Doerr und Jones 1996) Doerr ME and Jones JI (1996): The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 271 (5), 2443-2447
- (Donegan 1992) Donegan WL: Evaluation of palpable breast mass. *N Engl J Med* 327, 937-942
- (Dunn et al. 1998) Dunn SE, Ehrlich M, Sharp NJH, Reiss K, Solomon G, Hawkins R, Baserga R, Barrett JC (1998): A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res* 58 (15), 3353-3361

- (Dupont und Page 1985) Dupont WD, Page DL (1985): Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 312 (3), 146-51
- (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005 a) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005): Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366 (9503), 2087-2106
- (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005 b) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365 (9472), 1687-1717
- (Eidne et al. 1987) Eidne KA, Flanagan CA, Harris NS, Millar RP (1987): Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-binding sites in human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH-antagonists. *J Clin Endocrinol Metab* 64 (3), 425-432
- (Emons 2001) Emons G (2001): Hormonersatztherapie nach der Menopause. *Dtsch Med Wochenschr* 126 (9), 253-254
- (Emons et al. 1997) Emons G, Ortmann O, Schulz KD, Schally AV (1997): Growth- inhibitory actions of analogues of luteinizing hormone-releasing hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab* 8(9), 355-362
- (Emons et al. 2003) Emons G, Grundker C, Gunthert AR, Westphalen S, Kavanagh S, Verschraegen C (2003): GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* 10 (2), 291-299
- (Engel et al. 2001) Engel J, Nagel G, Breuer E, Meisner C, Albert US (2001): Primary breast cancer therapy in six regions of Germany. *Eur J Cancer* 38, 578-585
- (Ferlay et al. 2004) Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, 2. Auflage, IARC Press, Lyon 2004
- (Fisher et al. 1985) Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Bauer M, Wolmark N, Wickerham DL, Deutsch M, Montague E, Margolese R, Foster R (1985): Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med* 312 (11), 674-681



- (Fister et al. 2007) Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007): Gonadotropin-releasing hormone type II antagonists induce apoptotic cell death in human endometrial and ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 67 (4), 1750-1756
- (Foekens et al. 1986) Foekens JA, Henkelmann MS, Fukkink JF, Blankenstein MA, Klijn JG (1986): Combined effects of buserelin, estradiol and tamoxifen on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 140 (2), 550-556
- (Greiser 2001) Greiser E (2001): Hormonersatztherapie - Therapie mit Risiken. *Dtsch Med Wochenschr* 126 (9), 255-256
- (Gründker et al. 2001) Gründker C, Völker P, Emons G (2001): Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 142 (6), 2369-2380
- (Günthert et al. 2005) Günthert AR, Gründker C, Olota A, Läsche J, Eicke N, Emons G (2005): Analogs GnRH-I and GnRH-II inhibit epidermal growth factor-induced signal transduction and resensitize resistant human breast cancer cells to 4OH-tamoxifen. *Eur J Endocrinol* 153 (4), 613-625
- (Guise 2009) Guise TA (2009): Breaking down bone: new insight into site-specific mechanisms of breast cancer osteolysis mediated by metalloproteinases. *Genes Dev* 23, 2117-2123
- (Halsted 1894) Halsted WS (1894): The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January 1894. *Ann Surg* 20 (5), 497-555
- (Heinemann et al. 2007) Heinemann V, Abenhardt W, Bastert G, Beinert T, Dietzfelbinger W, Eiermann N, Harbeck N, Hölzel D, Kahlert T, Lorenz R: Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms; in: *Manual Mammakarzinome*; hrsg. vom Tumorzentrum München. Bd.-Hrsg. Janni W; 11. überarbeitete Auflage; Zuckschwerdt Verlag, München 2007, 251-269
- (Houghton et al. 2003) Houghton J, George WD, Cuzick J, Duggan C, Fentiman IS, Spittle M; UK Coordinating Committee on Cancer Research; Ductal Carcinoma in situ Working Party; DCIS trialists in the UK, Australia, and New Zealand (2003): Radiotherapy and tamoxifen in women with completely excised ductal carcinoma in situ of the breast in the UK, Australia, and New Zealand: randomised controlled trial. *Lancet* 362 (9378), 95-102

- (Hynes 2000) Hynes NE (2000): Tyrosine kinase signalling in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2 (3), 154-157
- (Irmer et al. 1994) Irmer G, Bürger C, Ortmann O, Schulz KD, Emons G (1994): Expression of luteinizing hormone releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 79 (3), 916-919
- (Joensuu et al. 1999) Joensuu H, Pylkkänen L, Toikkanen S (1999): Late mortality from pT1N0M0 Breast Carcinoma. *Cancer* 85, 2183-2189
- (Joensuu et al. 2006) Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bone P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M (2006): Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 354 (8), 809-820
- (Jones et al. 2006) Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV (2006): Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440 (7084), 692-696
- (Junqueira et al. 2000) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Histologie. hrsg. von Gratzel M; 5., neu übersetzte und aktualisierte Auflage; Springer Verlag, Berlin 2002, 65- 106
- (Kakar et al. 1994) Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD (1994): The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 106 (1-2), 145-149
- (Kang et al. 2005) Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7 (4), R402-410
- (Kelsey und Berkowitz 1988) Kelsey JL, Berkowitz GS (1988): Breast cancer epidemiology. *Cancer Res* 48, (20), 5615-5623
- (Khosla 2001) Khosla S (2001): Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142 (12), 5050-5055
- (Klemke et al. 1994) Klemke RL, Yebra M, Bayna EM, Cheresch DA (1994): Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin alpha v beta 5-directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J Cell Biol* 127 (3), 859-866
- (Klijn und de Jong, 1982) Klijn JG, de Jong FH (1982): Treatment with a luteinising-hormone-releasing-hormone analogue (buserelin) in

- premenopausal patients with metastatic breast cancer. *Lancet* 1982,1, 1213-1216
- (Knobil 1990) Knobil E (1990): The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 163 (5 Pt 2), 1721-1727
- (Kovacs et al. 2001) Kovacs M, Schally AV, Csernus B, Rekasi Z (2001): Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist Cetrorelix down-regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LH-RH by counteracting the stimulatory effect of endogenous LH-RH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (4), 1829-1834
- (Kreienberg et al. 2008) Kreienberg R, Kopp I, Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. ISTO-Informationszentrum für Standards in der Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 1. Aktualisierung; Zuckschwerdt Verlag, München 2008, 2-228
- (Labrie et al. 2005) Labrie F, Bélanger A, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez J, Candas B (2005): Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer. *Endocr Rev* 26 (3), 361-379
- (Levine et al. 1998) Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI, Norris BD, Shepherd LE, Abu-Zahra H, Findlay B, Warr D, Bowman D, Myles J (1998): Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 16 (8), 2651-2658
- (Liang et al. 2004) Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, Nie S, Umbreit J, Shim H (2004): Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 64 (12), 4302-4308
- (Lin et al. 1995) Lin LS, Roberts VJ, Yen SS (1995): Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 80 (2), 580-585
- (Long et al. 1995) Long L, Rubin R, Baserga R, Brodt P (1995): Loss of the metastatic phenotype in murine carcinoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 55 (5), 1006-1009

- (Long et al. 1998) Long L, Rubin R, Brodt P (1998): Enhanced invasion and liver colonization by lung carcinoma cells overexpressing the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Exp Cell Res* 238(1), 116-121
- (Mangia et al. 2002) Mangia A, Tommasi S, Reshkin SJ, Simone G, Stea B, Schittulli F, Paradiso A (2002): Gonadotropin releasing hormone receptor expression in primary breast cancer: comparison of immunohistochemical, radioligand and Western blot analyses. *Oncol Rep* 9(5), 1127-1132
- (Michaelson et al. 2002) Michaelson JS, Silverstein M, Wyatt J, Weber G, Moore R, Halpern E, Kopans DB, Hughes K (2002): Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. *Cancer* 95, 713-723
- (Miller et al. 1985) Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM, Sharpe RM (1985): Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* 313(5999), 231-233
- (Minaretzis et al. 1995) Minaretzis D, Jakubowski M, Mortola JF, Pavlou SN (1995): Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab* 80(2), 430-434
- (Moriya et al. 2001) Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H, Sasano H (2001): Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int* 51(5), 333-337
- (Morony et al. 2001) Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, Kostenuik PJ (2001): Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 61(11), 4432-4436
- (Müller et al. 2001) Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824), 50-56
- (Neill 2002) Neill JD (2002): GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* 143(3), 737-743
- (Nothacker et al. 2007) Nothacker M, Lelgemann M, Giersiepen K, Weinbrenner S: Evidenzbericht 2007 zur S3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland. Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (AZQ), Berlin 2007

- (Paget 1889) Paget S (1889): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889,1, 571-573
- (Palesty et al. 2006) Palesty JA, Foster JM, Hurd TC, Watroba N, Rezaishiraz H, Edge SB (2006): Axillary recurrence in women with negative sentinel lymph node and no axillary dissection in breast cancer. *J Surg Oncol* 93 (2), 129-132
- (Perlet et al. 2007) Perlet C, Artmann A, de Waal JC, Hellemann HP, Hölzel D, Imhoff K, Kessler M, Rjosk-Dendorfer D, Sittek H, Strauss A: Mammographie-Screening, bildgebende und minimal-invasive Diagnostik; in: *Manual Mammakarzinome*; hrsg. vom Tumorzentrum München. Bd.-Hrsg. Janni W; 11. überarbeitete Auflage, Zuckschwerdt Verlag, München 2007, 42
- (Potolog-Nahari et al. 2007) Potolog-Nahari C, Fishman A, Cohen I (2007): Protection of ovarian function and fertility using a combination of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist during cancer treatment in young females. *Gynecol Endocrinol* 23 (5), 290-294
- (Powles et al. 2006) Powles T, Paterson A, McCloskey E, Schein P, Scheffler B, Tidy A, Ashley S, Smith I, Ottensand L, Kanis J (2006): Reduction in bone relapse and improved survival with oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer [ISRCTN83688026]. *Breast Cancer Res* 8 (2), R13; Erratum in: *Breast Cancer Res* 8 (3), 406
- (Price et al. 1999) Price JT, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D, Thompson EW (1999): Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res* 59 (21), 5475-5478
- (Romond et al. 2005) Romond EH, Perez AD, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA (2005): Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353 (16), 1673-1684
- (Saarto et al. 2004) Saarto T, Vehmanen L, Virkkunen P, Blomqvist C: Ten-year follow-up of a randomized controlled trial of adjuvant clodronate treatment in node-positive breast cancer patients. *Acta Oncol* 43 (7), 650-656
- (Schaffer et al. 2007) Schaffer P, Ataseven B, Herbst M, Höß C, Lindner H, Nikolajek K, Riepel M, Röper B, Sommer H, Stadler P: Radioonkologische Behandlung; in: *Manual Mammakarzinome*; hrsg. vom Tumorzentrum München. Bd.-

- Hrsg. Janni W; 11., überarbeitete Auflage, Zuckschwerdt Verlag, München 2007, 123
- (Schaffler et al. 2007) Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C (2007): Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer-endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3, 345-354
- (Schlesinger-Raab et al. 2005) Schlesinger-Raab A, Eckel R, Engel J, Sauer H, Löhrs U, Molls M, Hölzel D (2005): Metastasiertes Mammakarzinom: Keine Lebensverlängerung seit 20 Jahren. *Dtsch Arztebl* 2005; 102: A 2706-2714 [Heft 40]
- (Shah und Wong 2006) Shah NR, Wong T (2006): Current breast cancer risks of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Expert Opin Pharmacother* 7: 2455-2463
- (Shirozu et al. 1995) Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T (1995): Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28 (3), 495-500
- (Slamon et al. 1989) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-12
- (Sobin und Wittekind 2002) Sobin LH, Wittekind CH: TNM classification of malignant tumours. 6. Auflage; Wiley-Liss, New York 2002, 141-142
- (Solomayer et al. 2000) Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bastert G: Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 59 (3), 271-278
- (Spencer et al. 2000) Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL (2000): ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 148 (2), 385-397
- (Statistisches Bundesamt) Statistisches Bundesamt. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2005 [online]. <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.htm>
- (Stojilkovic et al. 1994) Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ (1994): Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 15 (4), 462-499
- (Stracke et al. 1989) Stracke ML, Engel JD, Wilson LW, Rechler MM, Liotta LA

- Schiffmann E (1989): The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* 264 (36), 21544-21549
- (Thomas et al. 1999) Thomas RJ, Guise TA, Jin JJ, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, Gillespie MT (1999): Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 140 (10), 4451-4458
- (Völker et al. 2002) Völker P, Gründker C, Schmidt O, Schulz KD, Emons G (2002): Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Am J Obstet Gynecol* 186 (2), 171-179
- (Von Alten et al. 2006) Von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G, Gründker C (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 100 (1), 13-21
- (Waibel-Treber et al. 1989) Waibel-Treber S, Minne HW, Scharla SH, Bremen T, Ziegler R, Leyendecker G (1989): Reversible bone loss in women treated with GnRH-agonists for endometriosis and uterine leiomyoma. *Hum Reprod* 4 (4), 384-388
- (White 1987) White E (1987): Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. *Am J Public Health* 77 (4), 495-497
- (White et al. 1998) White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD (1998): Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95, 305-309
- (Wittekind und Riede 2003) Wittekind CH, Riede UN: Mammakarzinome; in: Allgemeine und spezielle Pathologie, hrsg. v. Riede UN, Schaefer HE, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2003, 973-980
- (Yin et al. 1999) Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR, Guise TA (1999): TGF- $\beta$  signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103, 197-206
- (Yun und Jo 2003) Yun HJ, Jo DY (2003): Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells. *J Korean Med Sci* 18 (5), 679-685

## Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker für die Anregung zu dieser Arbeit, die Offenheit, Geduld und jederzeit engagierte und herzliche Betreuung danken.

Ich danke Prof. Dr. med. Günter Emons dafür, dass ich die vorliegende Arbeit im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker anfertigen konnte.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Hiltrud Schulz für die Einarbeitung in die Laborarbeit und Unterstützung bei meinen Versuchen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Molekularen Gynäkologie in Göttingen für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor mit arbeitsamen, motivierenden und fröhlichen Stunden.



## Lebenslauf

Mein Name ist Julia Klompen und ich wurde am 9. August 1982 in Kamp-Lintfort geboren. Aufgewachsen bin ich in Neukirchen-Vluyn, einer kleinen Stadt am linken Niederrhein. Mein Vater, Gert-Dieter Klompen, ist Meister für Landmaschinenmechanik; meine Mutter, Ellen Klompen, ist Krankenschwester. Meine Geschwister, die Zwillinge Jens und Janna Klompen, kamen am 21.10.1990 auf die Welt.

In Neukirchen-Vluyn besuchte ich von 1993 bis 2002 das Julius-Stursberg-Gymnasium und erlangte die Hochschulreife.

2002 begann ich in Göttingen an der Georg-August-Universität das Studium der Humanmedizin. Nach vier Semestern bestand ich die Ärztliche Vorprüfung.

Im März 2006 begann ich die Dissertation zum Thema „Expression des Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Rezeptors in primären humanen Osteoblasten und Effekte des GnRH-Agonisten Triptorelin auf die Expression osteoblastärer Gene“.

Das Praktische Jahr absolvierte ich von 2007 bis 2008 in der Abteilung für Innere Medizin im Gemeindespital Riehen (Schweiz) sowie in der Gynäkologie und Geburtshilfe des St. Vinzenz-Krankenhauses und der Unfallchirurgie des Bräuderkrankenhauses St. Josef in Paderborn. Am 02.12.2008 bestand ich das 2. Staatsexamen und erhielt die Approbation als Ärztin.

Seit Februar 2009 bin ich als Assistenzärztin der Universitätsklinik Freiburg in der Abteilung für Allgemeine Neurochirurgie tätig.