

**Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert**

**Charakterisierung der Regulation des kontaktinduzierten Targets ANGPTL-4
zur Steigerung der Sensitivität von Bildgebung und Therapie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Gerhard Andreas Biedermann

aus Oy-Mittelberg

Würzburg, Februar 2022

Referentin: Prof. Dr. Regina Ebert

Koreferent: Prof. Dr. Torsten Blunk

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2022

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Tumorwachstum in Knochen.....	1
1.2.	Therapie von Knochentumoren	5
1.3.	Angiopoetin-like 4.....	6
1.4.	Ziel der Arbeit	10
2.	Methoden und Material	11
2.1.	Ethikvotum	11
2.2.	Material.....	11
2.2.1.	Reagenzien.....	11
2.2.2.	Zellen.....	14
2.2.3.	Kulturmedien.....	14
2.2.4.	Enzyme	15
2.2.5.	Kits	15
2.2.6.	Relevante Laborgeräte.....	16
2.2.7.	Software.....	16
2.2.8.	Primer	17
2.2.9.	Antikörper.....	17
2.2.10.	Vektoren	18
2.3.	Methoden.....	19
2.3.1.	Apoptose-Viabilität-Messung.....	19
2.3.2.	Luciferase-Reporter-Assay	20
2.3.3.	mRNA Isolation.....	21
2.3.4.	Reverse Transkription zu cDNA	22
2.3.5.	Polymerasekettenreaktion.....	23
2.3.6.	Gelelektrophorese.....	24

2.3.7.	Densitometrie	24
2.3.8.	Quantitative Polymerasekettenreaktion	25
2.3.9.	Immunfluoreszenzzytologie	26
3.	Ergebnisse.....	28
3.1.	<i>In silico</i> -Analyse des Angiopoetin-like 4 Promotors	28
3.2.	Konzentrationsfindung für Lipopolysaccharide und Testosteron mittels Apoptose-Viabilität-Assay an hMSC-TERT-Zellkulturen	30
3.3.	Stimulation von mit pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen und Luciferase- Reporter-Assay	32
3.4.	Bestimmung der basalen Angiopoetin-like 4 Expression in Myelom- und Mammakarzinomzelllinien sowie in primären mesenchymalen Stromazellen	34
3.5.	Stimulation von primären MSC-Zellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression.....	35
3.6.	Stimulation von hMSC-TERT-Zellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression.....	37
3.7.	Stimulation von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression	38
3.8.	Stimulation von MCF-7-Mammakarzinomzellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression	40
3.9.	Charakterisierung der ANGPTL-4 Expression in MDA-MB-231 - Mammakarzinomzellen mittels qPCR	41
3.10.	Charakterisierung der ANGPTL-4 Expression in MCF-7 - Mammakarzinomzellen mittels qPCR	42
3.11.	Charakterisierung der ANGPTL-4 Expression in hMSC-TERT-Zellen mittels qPCR	43
3.12.	Charakterisierung der ANGPTL-4 Proteinexpression mittels Immunzytologie .44	
3.13.	Immunzytologie nach Stimulation von MDA-MB-231-Zellkulturen	45

3.14.	Immunzytologie nach Stimulation von MSC-Zellkulturen	47
3.15.	Immunzytologie nach Stimulation von MSC/MDA-MB-231-Co-Kulturen	48
4.	Diskussion	51
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
4.2.	Methodische Limitationen	52
4.2.1.	Luciferase-Assay	52
4.2.2.	Polymerasekettenreaktion.....	52
4.2.3.	Quantitative Polymerasekettenreaktion	53
4.2.4.	Immunfluoreszenzzytologie	54
4.3.	Diskussion der Ergebnisse.....	54
4.3.1.	Luciferase-Assay mit MM.1S-Zellen	54
4.3.2.	Basale Expression von ANGPTL-4 in verschiedenen Zelltypen	55
4.3.3.	ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in verschiedenen Zelllinien.....	56
4.3.3.1.	ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in MDA-MB-231-Zellen	57
4.3.3.2.	ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in MCF-7-Zellen.....	59
4.3.3.3.	ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in primären MSCs und hMSC-TERT.....	61
4.4.	Ausblick.....	62
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	65

Appendix

I Abbildungen

II Abkürzungsverzeichnis

III Abbildungsverzeichnis

IV Tabellenverzeichnis

V Danksagung

1. Einleitung

1.1. Tumorwachstum in Knochen

Tumorwachstum in Knochen tritt entweder im Rahmen benigner oder maligner primärer Knochentumore oder wesentlich häufiger im Rahmen von Fernmetastasierung solider Karzinome bzw. Lymphome auf. Auch nicht solide maligne Erkrankungen wie beispielsweise Leukämien können Knochengewebe infiltrieren. Das Mammakarzinom, das Prostatakarzinom, das Multiple Myelom und die Akute Lymphatische Leukämie sind nur einige Beispiele maligner Erkrankungen, die häufig eine Filialisierung in Knochen aufweisen. Diese erfolgt hauptsächlich hämatogen, wofür das Knochenmark besonders anfällig ist, aufgrund mehrerer für seine Funktion als wichtigstes hämatopoetisches Organ des Erwachsenen zwingend erforderlicher Eigenschaften.¹

So ist das Knochenmark besonders gut vaskularisiert.² Dies ist einerseits notwendig, um die für die Blutbildung erforderlichen Nährstoffe in adäquater Menge bereitzustellen, andererseits um einen größtmöglichen Austausch an Blutzellen zu gewährleisten. So können neu gebildete Blutzellen effektiv ausgeschwemmt und im Körper verteilt werden und verschiedene Zelltypen ins Knochenmark einwandern, um dort beispielsweise immunologische Funktionen wahrzunehmen. Diese gute Durchblutungssituation im Knochenmark erhöht die statistische Auftretenswahrscheinlichkeit von hämatogenen Metastasen. Die am häufigsten betroffenen Regionen des Skeletts sind die Wirbelsäule, die Rippen, das Becken, das proximale Femur und der Schädel, also jene Regionen, die das besonders gut durchblutete rote Knochenmark enthalten.³

Der Blutfluss im Knochenmark ist extrem verlangsamt, da der Gesamtquerschnitt des dortigen Gefäßsystems durch sinusoidal erweiterte Kapillaren stark vergrößert ist.⁴ Dies begünstigt sowohl einen guten Nährstoffaustausch durch lange Diffusionszeiten als auch die Adhäsion und Extravasation von Zellen. Beides wird weiterhin durch eine große Permeabilität des Kapillarendothels gefördert. Diese Mechanismen ermöglichen es hämatogen verschleppten Tumorzellen, in den Extravasalraum zu gelangen, und soliden Metastasen, sich ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen.⁵

Das Mikromilieu des Knochenmarks ist besonders vorteilhaft für Stammzellen. So bilden mesenchymale Stromazellen hämatopoetische Nischen und unterstützen hämatopoetische Stammzellen in ihren Funktionen. Maligne Zellen, die durch die fenestrierten Sinusoide in den Extravasalraum gelangt sind, können durch Manipulation der Zell-Zell- sowie der Zell-Matrix-Kontakte diese hämatopoetischen Nischen in metastatische Nischen umwandeln. Wie hämatopoetische Stammzellen können in diesen Nischen Krebsstammzellen jahrelang überdauern, bis sie erneut zu proliferieren beginnen. Des Weiteren werden die Tumorzellen von den nischenbildenden Zellen bei Proliferation und Immunescape unterstützt, unter anderem durch Angiogenese.⁶

Tumorwachstum in Knochen führt zu diversen medizinischen Komplikationen, welche die Lebensqualität und die Lebenserwartung betroffener Patienten massiv einschränken.

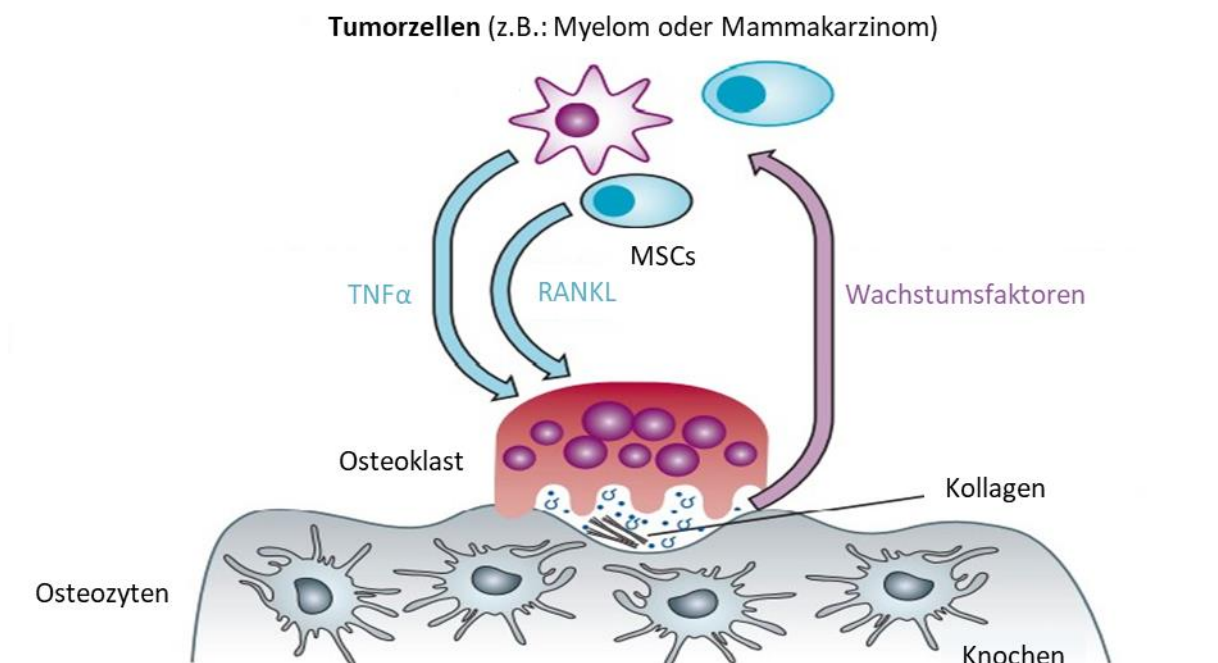


Abb. 1: Regulation des Knochenstoffwechsels durch Tumorzellen: Knochenmetastasen fördern häufig den Knochenabbau, indem sie Osteoklasten parakrin stimulieren. Dies geschieht sowohl direkt beispielsweise durch von Tumorzellen gebildetem TNF α als auch indirekt durch Anregen von MSCs zur RANKL Produktion. Von Osteoklasten beim Knochenabbau freigesetzte Wachstumsfaktoren, die zuvor im Knochengewebe eingelagert waren, unterstützen wiederum das Wachstum der Tumorzellen. So entsteht ein sich selbst verstärkender circulus vitiosus aus Tumorwachstum und Knochendestruktion. Modifiziert nach Hofbauer et al. ⁷ Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Knochenmetastasen beeinträchtigen die Mikroarchitektur des Knochens, indem sie das Gleichgewicht von knochenaufbauenden Osteoblasten zu knochenresorbierenden

Osteoklasten stören. Osteoblasten regulieren durch Sezernieren von zwei Faktoren, RANKL und Osteoprotegerin (OPG), die Osteoklastogenese und somit den Knochenabbau. Durch die Bindung von RANKL (Rezeptor Aktivator von NF- κ B Ligand) an Osteoklastenvorläuferzellen werden diese in Osteoklasten differenziert und aktiviert. OPG, ein löslicher RANKL-Decoy-Rezeptor, verhindert die Bildung von Osteoklasten und damit die Knochenresorption durch Hemmung der RANKL-RANK-Rezeptor Interaktion.^{8,9} Im Knochen befindliche Osteozyten hemmen wiederum die Produktion neuen Knochengewebes, indem sie beispielsweise durch Sekretion von Sclerostin die WNT-abhängige Osteoblastogenese aus MSCs inhibieren.⁷ Darüber hinaus kommunizieren MSCs und hämatopoetische Stammzellen, also die Vorläuferzellen der Osteoklasten, über parakrin sezernierte BMPs (bone morphogenetic proteins). Die meisten Knochenmetastasen führen zu einer Osteolyse, indem sie Substanzen produzieren, die das Überleben und die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen begünstigen (Abb. 1).¹⁰ Eine Ausnahme bilden Metastasen des Prostatakarzinoms, da sie osteoblastisch wirken und Osteoblasten zur übermäßigen Bildung von Osteoid anregen.¹¹ Beide Mechanismen führen über eine Zerstörung der an die Belastung angepassten Trabekelstruktur zu einer Destabilisierung des Knochens, woraus häufig pathologische Frakturen resultieren. Neben den assoziierten Schmerzen leiden Patienten häufig an dauerhafter Bewegungseinschränkung und dem damit verbundenen Mobilitätsverlust, da diese Frakturen nur schwer therapeutisch zu versorgen sind.

Auch ohne Frakturen verursachen Knochenmetastasen starke Schmerzen. Die genauen Mechanismen der Schmerzentstehung sind noch nicht exakt geklärt. Osteoklasteninduzierte Acidose und direkte Stimulation sensorischer Neuronen durch vom Tumor gebildete Substanzen werden als mögliche Ursachen diskutiert.¹²

Aufgrund der Tatsache, dass die Wirbelkörper überproportional häufig von Knochenmetastasen betroffen sind, ist eine Komprimierung des Myelons eine bekannte und besonders schwerwiegende Komplikation.¹ Nicht rechtzeitig erkannt und nicht rechtzeitig adäquat therapiert, kann hieraus ein die Lebensqualität massiv einschränkendes, irreversibles Querschnittssyndrom resultieren. Je nach Lokalisation können zervikale Metastasen bei Myelonschäden oberhalb von C3 durch Atemlähmung schnell lebensbedrohlich werden.

Aufgrund des infiltrativen Wachstums von Knochenmetastasen kann es auch zu direkter Schädigung peripherer Nerven kommen, wenn diese in unmittelbarer Nachbarschaft des Knochens verlaufen. Neben motorischen und sensorischen Ausfällen kommt es hierbei häufig zu neuropathischen Schmerzen. Diese können auch durch Schädigung im Knochen befindlicher Nervenenden entstehen und sind eine typische Komponente von Knochenschmerzen durch Tumorwachstum. Sie sind analgetisch besonders schwierig zu therapieren, da sie, plötzlich einschließend, ohne definierten Auslöser und in hoher Intensität auftreten und so das analgetische Therapieregime durchbrechen können.¹²

Durch Tumorosteolyse können innerhalb kurzer Zeit so viele gelöste Kalziumionen anfallen, dass diese nicht mehr durch Bindung an Serumproteine abgepuffert werden können, wodurch die Konzentration an freien und damit physiologisch aktiven Kalziumionen stark ansteigt.¹ Durch Erhöhung des Ruhemembranpotenzials zieht diese Hyperkalzämie diverse neuronale und kardiale Komplikationen nach sich. Die Erregbarkeit neuronaler Zellen wird reduziert, was zu muskulärer Schwäche, Verwirrtheit und Bewusstseinsstörungen führt. Des Weiteren können bradykarde Herzrhythmusstörungen auftreten. Die erhöhte renale Kalziumausscheidung führt zu Urolithiasis, Nephrokalzinose und Polyurie. Auch gastrointestinale Nebenwirkungen, wie gastroduodenale Ulzera oder Pankreatitiden, sind möglich.

Gerade bei fortgeschrittener Tumordinfiltration des roten Knochenmarks kann es durch Verdrängung und zunehmender Ressourcenausschöpfung des Tumorgewebes zu einer Myelosuppression mit inadäquater Hämatopoese aller drei Blutzelllinien kommen. Diese Trizytopenie ist ein Mischbild aus Anämie, Leukopenie und Thrombopenie. Letztere führt zu einer Störung der primären Blutgerinnung mit verstärkter Blutungsneigung. Die mannigfaltigen Folgen einer Anämie resultieren aus der verminderten Sauerstofftransportkapazität des Blutes. Zu nennen sind beispielsweise Tachykardie und Dyspnoe als Versuch der Kompensation sowie allgemeine Leistungsminderung, bis hin zu gravierenden ZNS-Störungen als Ausdruck der Sauerstoffmangelversorgung des peripheren Gewebes. Aus einem Mangel an Leukozyten resultiert eine unter Umständen lebensbedrohliche Insuffizienz des Immunsystems. Diese reicht von leichter Infektanfälligkeit bis zu systemischen Infekten, die nicht selten die finale Todesursache bei Tumorpatienten darstellen.

1.2. Therapie von Knochentumoren

Tumorwachstum im Knochen ist häufig die Folge einer disseminierten malignen Erkrankung, weshalb in den meisten Fällen eine systemische Therapie je nach Primärtumor notwendig ist. In den seltensten Fällen ist diese beim Erwachsenen als kurativ anzusehen. Die zahlreichen Komplikationen, die durch Knochenmetastasen ausgelöst werden können, machen neben der systemischen Therapie zusätzliche lokale Therapieverfahren notwendig.

Die gängigste Therapie zur lokalen Kontrolle von Knochenmetastasen ist die Strahlentherapie.¹ Hierbei wird der Tumor von einer rotierenden Strahlenquelle mit ionisierender Strahlung im Röntgenbereich bestrahlt. Nebenwirkungen werden durch Fraktionierung der Gesamtdosis auf tägliche Einzeldosen reduziert. Da maligne Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe eingeschränkte Reparaturmechanismen aufweisen, wird die Wirkung auf den Tumor dabei kaum beeinflusst. Durch Rotation der Strahlenquelle wird erreicht, dass das umliegende Gewebe einer deutlich geringeren Strahlendosis ausgesetzt wird als das Tumorbett. Die Bestrahlung führt durch Hemmung der Zellteilung zu einer Reduktion des Tumorwachstums und zu einer Remineralisierung des Knochens. Dadurch erhöht sich die Stabilität, wodurch Frakturen vorgebeugt und Schmerzen sowie Komplikationen durch Kompression gelindert werden. Allerdings ist auch mit teils schweren Nebenwirkungen im Rahmen einer akuten Strahlenreaktion zu rechnen. Hierbei können Schleimhautschäden, gastrointestinale Nebenwirkungen und eine Insuffizienz der Hämatopoese auftreten. Bei Knochenmetastasierung wird die Strahlentherapie meist in palliativer Intention angewandt.

In einigen Situationen, wie beispielsweise bei stattgefundener oder drohender pathologischer Fraktur, ist es erforderlich, den betroffenen Knochen operativ zu stabilisieren.¹ Dies ist aufgrund der Gefahr von Impfmastasen und der eingeschränkten Knochenstabilität besonders herausfordernd. Ein häufig angewandtes Verfahren ist der Fixateur interne an der Wirbelsäule, um durch Metastasen destabilisierte Wirbelkörper zu überbrücken.

Eine systemische Therapie, die aber lokal an Knochenmetastasen wirkt, ist die Gabe von Bisphosphonaten.¹ Diese werden in den mineralisierten Knochen eingelagert und bei Resorption freigesetzt. Sie hemmen die Osteoklasten, also den Zelltyp, der für viele

Komplikationen von Knochenmetastasen verantwortlich ist. Knochenstabilität, Schmerzen und die Hyperkalzämie werden positiv beeinflusst. Zusätzlich ist mittlerweile bekannt, dass Bisphosphonate auch direkt das Tumorwachstum im Knochen hemmen können, indem sie in Tumorzellen Apoptose auslösen und das Mikromilieu des Knochenmarks zu Ungunsten des Tumors verändern.¹³ Letzteres wird unter anderem durch Hemmung der Angiogenese und Hemmung der Makrophagenrekrutierung bewerkstelligt.¹⁴ Klinische Studien konnten zeigen, dass eine hoch dosierte Bisphosphonat-Therapie in frühen Stadien eines Mammakarzinoms die Wahrscheinlichkeit einer Knochenmetastasierung senkt und das Überleben verlängert.^{15,16} Zu erwähnen sind allerdings auch die Nebenwirkungen, wie Nephrotoxizität sowie das Auslösen aseptischer Kiefernekrosen und Ösophagiden.

Essenziell bei der Behandlung von Patienten mit Knochenmetastasen ist weiterhin eine suffiziente Schmerztherapie, da die gerade beschriebenen Therapieoptionen auch in Kombination häufig nicht zu einer adäquaten Symptomkontrolle führen. Diese sollte nach WHO-Schema je nach Bedarf mit NSARs und retardierten Opioiden, gegebenenfalls in Kombination, erfolgen. Zur Behandlung sogenannter Durchbruchschmerzen stehen nicht-retardierte, schnell wirksame Opioide zur Verfügung.¹⁷

1.3. Angiopoetin-like 4

Das Protein Angiopoetin-like 4 (ANGPTL-4) ist ein Adipokin, das vorwiegend im Fettgewebe gebildet wird und im Allgemeinen für seine regulatorische Funktion im Lipidhaushalt bekannt ist.¹⁸ Beispielsweise inhibiert es die Lipoproteinlipase. Dieses Enzym befindet sich auf der lumenseitigen Membran von Endothelzellen und spaltet Fettsäuren von in zirkulierenden Lipoproteinen befindlichen Triglyceriden ab, welche anschließend von den Endothelzellen aufgenommen werden können.¹⁹ Darüber hinaus verstärkt es die Wirkung von Katecholaminen auf die adipozytäre Lipolyse in Fastensituationen. Katecholamine, die an den β -Adrenozeptor von weißen Adipozyten binden, führen über die Aktivierung der Adenylatcyclase zu einer Produktion von cAMP. Dieses wiederum aktiviert die Proteinkinase A, welche durch Phosphorylierung Schlüsselenzyme der intrazellulären Lipolyse aktiviert. ANGPTL-4 verstärkt diesen Signalweg, indem es die Konzentration an intrazellulärem cAMP erhöht.²⁰ Beide Mechanismen führen bei dauerhafter Aktivierung zu einem chronisch erhöhten

Serumspiegel an Triglyceriden. Deshalb wird ANGPTL-4 in Verbindung mit Arteriosklerose, Diabetes Mellitus und anderen Folgeerkrankungen des Metabolischen Syndroms gebracht.²¹ Es existiert in drei verschiedenen Isoformen, eine in voller Länge und zwei kleinere Formen, die durch proteolytische Spaltung entstehen. Das N-terminale Spaltprodukt weist eine Coiled-coil-Domäne als Hauptstrukturmotiv auf und übernimmt die Regulation im Lipidstoffwechsel. Das C-terminale Spaltprodukt hat eine fibrinogenähnliche Domäne.²² Die Produktion der Isoformen ist gewebeabhängig; so produziert die Leber hauptsächlich die gespaltenen Isoformen, wohingegen Adipozyten das Protein ungespalten sezernieren.

Nach heutigem Kenntnisstand wird ANGPTL-4 vorwiegend von Kernrezeptoren der PPAR Familie reguliert.²³ Neben ihrer Funktion als Lipid-Sensoren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der PPA-Rezeptoren an der Karzinogenese.²⁴ Hypoxie, ein in Tumorgewebe häufig auftretendes Phänomen, ist ein weiterer bekannter Stimulus, der über HIF-1 α und HIF-2 α zu einer gesteigerten Expression von ANGPTL-4 führt.²⁵

Für ANGPTL-4 selbst sind, wie bei allen Mitgliedern der ANGPTL-Familie, keine Rezeptoren bekannt.²⁴ Allerdings moduliert es den intrazellulären cAMP Signalweg in positivem Sinne und führt zu einer erhöhten intrazellulären cAMP Konzentration.²⁰

Angiopoetin-like 4 ist in der extrazellulären Matrix lokalisiert und reguliert über seine Funktion im Lipidmetabolismus hinaus die Migration und die Mobilität von Zellen in positivem Sinne. Des Weiteren wird die Invasion sowie die Extravasation von Zellen in bzw. aus Blutgefäßen begünstigt. Auch die Angiogeneese wird von ANGPTL-4 induziert.²⁶ All diese Mechanismen sind essenzielle Bestandteile der Wundheilung und des Wiederaufbaus von gesundem Gewebe.

Allerdings sind eben diese Mechanismen auch die Grundlage für infiltratives Wachstum und Metastasierung von malignen Tumoren. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass viele Karzinome eine erhöhte Expression von ANGPTL-4 aufweisen, beispielsweise das Nierenzellkarzinom, verschiedene maligne gastrointestinale Tumore, das Mammakarzinom und das Osteosarkom.^{25,27} Zudem wird in mesenchymalen Stromazellen ANGPTL-4 durch direkten Zellkontakt mit malignen Myelomzellen induziert und die Adhäsion dieser gesteigert.²⁸ Die angiogeneetische Wirkung von hypoxieinduziertem ANGPTL-4 fördert durch eine konsekutiv verbesserte

Versorgungslage mit Sauerstoff und Nährstoffen das Tumorwachstum im Allgemeinen.²⁹ Über diese Mechanismen ist ANGPTL-4 direkt an der Bildung metastatischer Nischen im Knochenmark beteiligt und begünstigt das Überleben maligner Zellen in fremden Gewebetypen. Ein erhöhtes Expressionsniveau ist mit einer gesteigerten Invasivität und einer erhöhten Rate an Fernmetastasierung verbunden, was sich negativ auf die Prognose und die Lebensqualität auswirkt.^{27,30}

Dies wird von den physiologischen Funktionen von ANGPTL-4 in der extrazellulären Matrix verursacht. Die gesteigerte endotheliale Permeabilität ermöglicht es Tumorzellen in den Blutkreislauf einzutreten. Des Weiteren ermöglicht ANGPTL-4 Tumorzellen in fremden Gewebetypen zu proliferieren, indem es Anoikis durch eine Verschiebung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes verhindert. Dies ist eine spezielle Form des programmierten Zelltodes, der auftritt, wenn Zellen ihre Verankerung in der gewohnten extrazellulären Matrix verlieren.³¹ Beide Mechanismen sind essenziell für die Entstehung von Fernmetastasen (Abb.2).

Eine spezielle Rolle kommt ANGPTL-4 in Knochenmetastasen sowie in primären Knochentumoren zu. So unterstützt es die Knochendestruktion durch Tumorgewebe, indem es Monozyten zur Proliferation und deren Differenzierung zu Osteoklasten anregt. Zusätzlich hemmt es die Mineralisierung von Knochen.²⁵ Speziell beim Mammakarzinom ist bekannt, dass die Rekrutierung von Makrophagen, einer Tochterzellart der Monozyten, zu Tumormakrophagen das Tumorwachstum unterstützt.³² In Knochenmetastasen geschieht dies durch Freisetzung von im Knochengewebe abgelagerten Wachstumsfaktoren bei der osteoklastozytären Knochenresorption (Abb. 1).⁷ Eine hohe Anzahl an Makrophagen im Tumor ist deshalb mit einer schlechteren Prognose assoziiert.³³ Auch bei nicht malignen Erkrankungen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von ANGPTL-4 am Knochenabbau. Bei Patienten, die an rheumatoider Arthritis leiden, zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem ANGPTL-4 Serumspiegel und dem Serumspiegel an RANKL, einem Blutparameter für Knochenabbau. Zusätzlich ist bei diesen Patienten die Expression von ANGPTL-4 in vielen Zelltypen der Synovia erhöht.³⁴

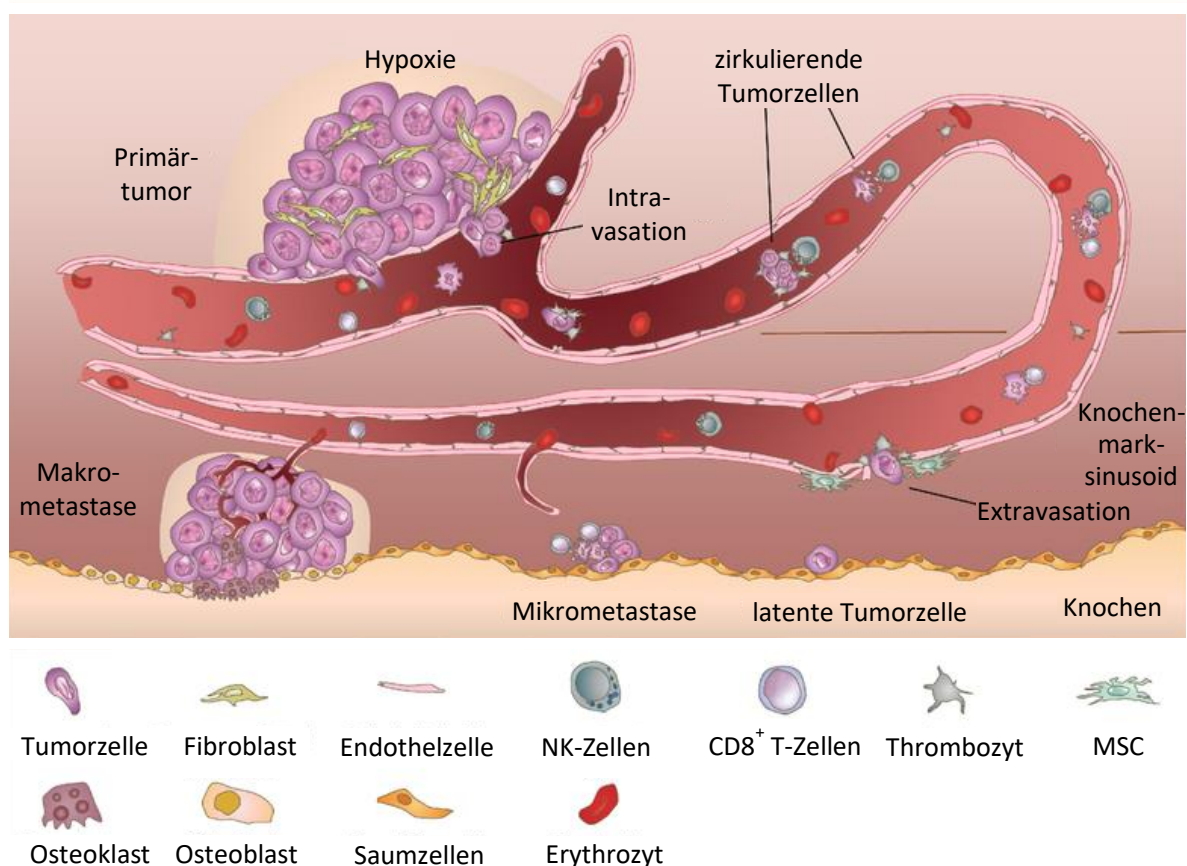


Abb. 2: Schlüsselstellen bei der Entstehung von Knochenmetastasen: ANGPTL-4 wird unter anderem durch Hypoxie im Primärtumor induziert und unterstützt sowohl die Intra- und Extravasation in den Blutkreislauf als auch die Extravasation aus den Knochenmarksinusoiden. Im Knochenmark begünstigt es durch seine Funktion als Matrixprotein das Überleben von latenten Tumorzellen und deren Entwicklung zu Mikrometastasen. Indem es an der Angiogenese beteiligt ist, fördert ANGPTL-4 die Versorgung von Makrometastasen. Modifiziert nach Zhang et al. ³⁵ Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Die stimulierende Wirkung auf die Invasivität und die Metastasierung von Karzinomen im Allgemeinen machen Angiopoetin-like 4 zu einem potenziellen Ziel für Therapeutika gegen maligne Erkrankungen. Aufgrund seiner speziellen Effekte im Knochen gilt dies insbesondere für die Therapie primärer Knochentumore und Knochenmetastasen. Zum einen ist ANGPTL-4 durch seine Funktion als Matrixprotein und der Stimulation der Angiogenese an der Bildung metastatischer Nischen beteiligt und verbessert die Adhäsion von Myelomzellen an mesenchymale Stromazellen. Zum anderen stimuliert es die Osteoklasten und deren Vorläufer, also einen Schlüsselzelltyp in Knochenmetastasen, der maßgeblich die Entstehung vieler Komplikationen wie beispielsweise destabilisierende Osteolysen, azidotischer Knochenschmerz und Hyperkalzämie verursacht.

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Regulation des Proteins Angiopoetin-like 4 in Tumorzelllinien, die eine Neigung zu Knochenmetastasierung haben, und in mesenchymalen Stromazellen zu untersuchen. Zunächst soll mittels Luciferase-Reporter-Assay eine große Anzahl an Substanzen auf ihren Einfluss auf den ANGPTL-4 Promotor gescreent werden. Mit den sich dabei als aussichtsreich zeigenden Substanzen werden dann Expressionsanalysen mit PCR- und qPCR- Experimenten auf mRNA-Ebene und mit Immunfluoreszenzzytologie auf Protein-Ebene durchgeführt.

Hierdurch sollen einzelne Botenstoffe, Rezeptoren und intrazelluläre Signalkaskaden gefunden werden, die die Expression von ANGPTL-4 *in vitro* steuern. Daraus könnten sich potenziell Möglichkeiten zur Beeinflussung der ANGPTL-4 Expression *in vivo* ergeben. Dies könnte wiederum aufgrund der vielfältigen Funktionen von ANGPTL-4 als Tumorpromotor bzw. als Regulator des Knochenstoffwechsels von therapeutischem Nutzen sein. Letzteres gilt besonders für die Behandlung von Knochentumoren und kann sowohl der Symptom- als auch der Progresskontrolle dienen. Des Weiteren könnte ANGPTL-4 aufgrund seiner verstärkten Expression in Tumorgewebe ein Ziel für molekulare Bildgebung wie PET- bzw. SPECT-CT sein. Durch Erhöhung der Trennschärfe bildgebender Verfahren zwischen Tumor- und Normalgewebe könnten beispielsweise Bestrahlungsfelder besser auf den Tumor abgestimmt und damit enger gewählt werden. Dies würde vor allem lokale Nebenwirkungen reduzieren und höhere Strahlendosen im Tumorgewebe erlauben, um die Effektivität der Strahlentherapie zu verbessern.

2. Methoden und Material

2.1. Ethikvotum

Für diese Arbeit liegt das notwendige positive Ethikvotum der Ethik-Kommission der Universität Würzburg zur Verwendung von Rest-Biomaterial für Forschungszwecke vor. Die Nummer des Ethikvotums lautet: Az 186/18

2.2. Material

2.2.1. Reagenzien

Tabelle 1: Reagenzien

Substanz	Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Art.-Nr. 840001)
Bradford-Lösungen	5X Roti-Nanoquant	Carl Roth GmbH (Art.-Nr. K880.1)
BSA	Albumin (BSA) Fraction V (pH 7.0)	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. A1391,0100)
dATP (100 mM)	dATP, 100 mM	Promega GmbH (Art.-Nr. U120A)
dGTP (100 mM)	dGTP, 100 mM	Promega GmbH (Art.-Nr. U121A)
dCTP (100 mM)	dCTP, 100 mM	Promega GmbH (Art.-Nr. U122A)
dTTP (100 mM)	dTTP, 100 mM	Promega GmbH (Art.-Nr. U123A)
Gel-Red		VWR (Art.-Nr. 41003)
Hygromycin	Invitrogen Hygromycin B	Thermo Fisher Scientific (Art.-Nr. 10687010)
Ladepuffer Agarose Gel/PCR-Reaktions-Puffer	5X Green GoTaq Flexi Buffer	Promega GmbH (Art.-Nr. M891A)

Luciferase -Substrat	Luciferase Assay Substrate	Promega GmbH (Art.-Nr. E151A)
Luciferase-Puffer	Luciferase Assay Buffer	Promega GmbH (Art.-Nr. E152A)
Medium RPMI	gibco RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific (Art.-Nr. 72400-021)
Medium MEM	gibco MEM (1X)	Thermo Fisher Scientific (Art.-Nr. 01095-029)
Medium DMEM/F-12	gibco DMEM/F-12 /1X) + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific (Art.-Nr. 31331-028)
Medium DMEM/HG	gibco DMEM, hoher Glukosegehalt	Thermo Fisher Scientific (Art.-Nr. 41965-039)
Methanol	Methanol >99,9%, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH (Art.-Nr. 0082.1)
Ethanol	Ethanol absolute p.A.	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. A1613,2500PE)
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. A3672,0250)
MgCl ₂ (25 mM)	MgCl ₂ , 25 mM	Promega GmbH (Art.-Nr. A351H)
nukleasefreies Wasser	Nuclease-Free Water	Promega GmbH (Art.-Nr. P119E)
Oligo-dT Nukleotide	Oligo-dT	Promega GmbH (Art.-Nr. C1101)
PBS	PBS buffer (1X, Dulbecco's) - Powder	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. A0964,9100)
Pierce-Puffer	Pierce Luciferase Cell Lysis Buffer (2X)	Thermo Fisher Scientific (Art.-Nr. 1689)
RT-Reaktions-Buffer	M-MLV RT 5X Buffer	Promega GmbH (Art.-Nr. M531A)

EDTA (für TBE-Puffer)	EDTA Disodium Salt 2-hydrate	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. 131669.1211)
Borsäure (für TBE-Puffer)	Borsäure für die Molekularbiologie	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. A2940,5000)
Tris (für TBE-Puffer)	Tris Hydrochloride	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. A3452,1000)
10X TBE-Puffer	108g Tris 55g Borsäure 40 mg EDTA 1000ml ddH ₂ O	
Tween-20	Tween 20	A. Hartenstein GmbH (Art.-Nr. A1389,0500)
Vectashield+DAPI	Vectashield with DAPI	Vector Laboratories (Art.-Nr. H- 1200)
FCS	B&S Fötale Kälber- Serum	Bio&SELL GmbH (Art.-Nr. BS.FCS 0.500 EUA)
qPCR-Puffer	GoTaq qPCR Master Mix, 2X	Promega GmbH (Art.-Nr. A600A)
L-Glutamin	gibco L-Glutamine 200mM (100X)	Thermo Fisher Scientific (Art.- Nr. 25030-024)
Penicillin/Streptomycin	gibco Pen Strep	Thermo Fisher Scientific (Art.- Nr. 15140-122)
Insulin	Insulin solution human	Sigma-Aldrich (Art.-Nr. 19278)
Gentamicin	Genatamicin-Sulfat	Sigma-Aldrich (Art.-Nr. G1264)
Pyruvat	Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich (Art.-Nr. P5280)

2.2.2. Zellen

Tabelle 2: Zellen

MDA-MB-231	ATCC (Art.-Nr. HTB-26)
MCF-7	ATCC (Art.-Nr. HTB-22)
hMSC	Isolation aus Patientengewebe, Ethikvotum Az 186/18
hMSC-TERT	Moustapha Kassem, Odense, Dänemark
MM.1S	ATCC (Art.-Nr. CRL-2974)
AMO-1	DSMZ (Art.-Nr. ACC 538)
OPM-2	DSMZ (Art.-Nr. ACC 50)
INA-6	DSMZ (Art.-Nr. ACC 862)

2.2.3. Kulturmedien

Tabelle 3: Medien zur Zellkultur

MDA-MB-231	DMEM/F-12 500ml FCS 10%(v/v) Pen/Strep 5ml (10.000 U/ml / 10.000µg/ml)
MCF-7	DMEM/HG 500ml FCS 10%(v/v) Pyruvat 500µl (1M) Insulin 1/1000
hMSC	DMEM/F-12 500ml FCS 10%(v/v) Pen/Strep 5ml (10.000 U/ml / 10.000µg/ml) Ascorbat 1ml (50µg/ml)
hMSC-TERT	MEM 500ml FCS 10%(v/v) Gentamicin 1ml (50mg/ml)

MM.1S	RPMI	500ml
	FCS	10%(v/v)
	Glutamin	5µl
	Pyruvat	500µl (1M)
	Pen/Strep	5ml (10.000 U/ml / 10.000µg/ml)

2.2.4. Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Reverse Transkriptase	M-MLV Reverse Transcriptase	Promega GmbH (Art.-Nr. M170A)
Taq-Polymerase	GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH (Art.-Nr. M829B)

2.2.5. Kits

Tabelle 5: Kits

Viabilität-Assay	CellTiter-Glo	Promega GmbH (Art.-Nr. G7571)
Apoptose-Assay	Capase-Glo 3/7	Promega GmbH (Art.-Nr. G8091)
Luciferase-Assay	Luciferase Assay System	AG Ebert
Bradford-Assay	5X Roti-Nanoquant	Carl Roth GmbH (Art.-Nr. K880.1)
RNA Isolation	NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel GmbH (Art.-Nr. 740955.50)
Reverse Transkription	M-MLV Reverse Transcriptase	Promega GmbH (Art.-Nr. M1701)
PCR	GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH (Art.-Nr. M8295)

qPCR	GoTaq qPCR System	Promega GmbH (Art.-Nr. A6001)
------	-------------------	-------------------------------

2.2.6. Relevante Laborgeräte

Tabelle 6: Geräte

Luminometer	Orion II Microplate Luminometer	Berthold Technologies GmbH
Photometer	Glomax Multi+	Promega GmbH
BioPhotometer	Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf AG
Küvette für BioPhotometer	Eppendorf μ Cuvette G1.0	Eppendorf AG
Thermocycler (für RT)	PTC-200	MJ Research Inc
Thermocycler (für PCR)	PEQSTAR	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Geldokumentationssystem	FusionSL	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Real-Time Thermocycler	qTower ³ G	Analytik Jena
Mikroskop	Axio Observer	Carl Zeiss AG
Beleuchtung Mikroskop	Colibri 7	Carl Zeiss AG
Kamera	ZEISS Axiocam 506 mono	Carl Zeiss AG

2.2.7. Software

Tabelle 7: Software

Bildanalyse	Photoshop CC2020	Adobe Inc.
Mikroskopie	Zen 2.6	Carl Zeiss AG

2.2.8. Primer

Tabelle 8: Primer

ANGPTL-4 for	5´-GCCTATAGCCGCTCAC- 3´	Biomers GmbH (Art.-Nr. 00299389-1)
ANGPTL-4 rev	5´-GGATGGAGCGTACTGG- 3´	Biomers GmbH (Art.-Nr. 00299389-2)
EEF1 α for	5´-CTGTATTGGACACACG- 3´	Biomers GmbH (Art.- Nr.00195604-15)
EEF1 α rev	5´-AGACCGTTCTCCACTG- 3´	Biomers GmbH (Art.- Nr.00195604-16)
EEF1 α for/rev (qPCR)	QuantiTec Primer Assay Hs_EEF1A1_2_SG	Qiagen (Art.-Nr. QT01669934)

2.2.9. Antikörper

Tabelle 9: Antikörper

anti-ANGPTL-4 Antikörper	Angptl-4 (H-200) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology (Art.-Nr. sc-66806)
Fluoreszenz-markierter anti-rabbit Antikörper	Alexa Fluor 488 goat anti- rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific (Art.-Nr. A11008)

2.2.10. Vektoren

Tabelle 10: Vektoren

pGL4.14[luc2/Hygro] Vector	Promega GmbH (Art.-Nr. E669A)
----------------------------	-------------------------------

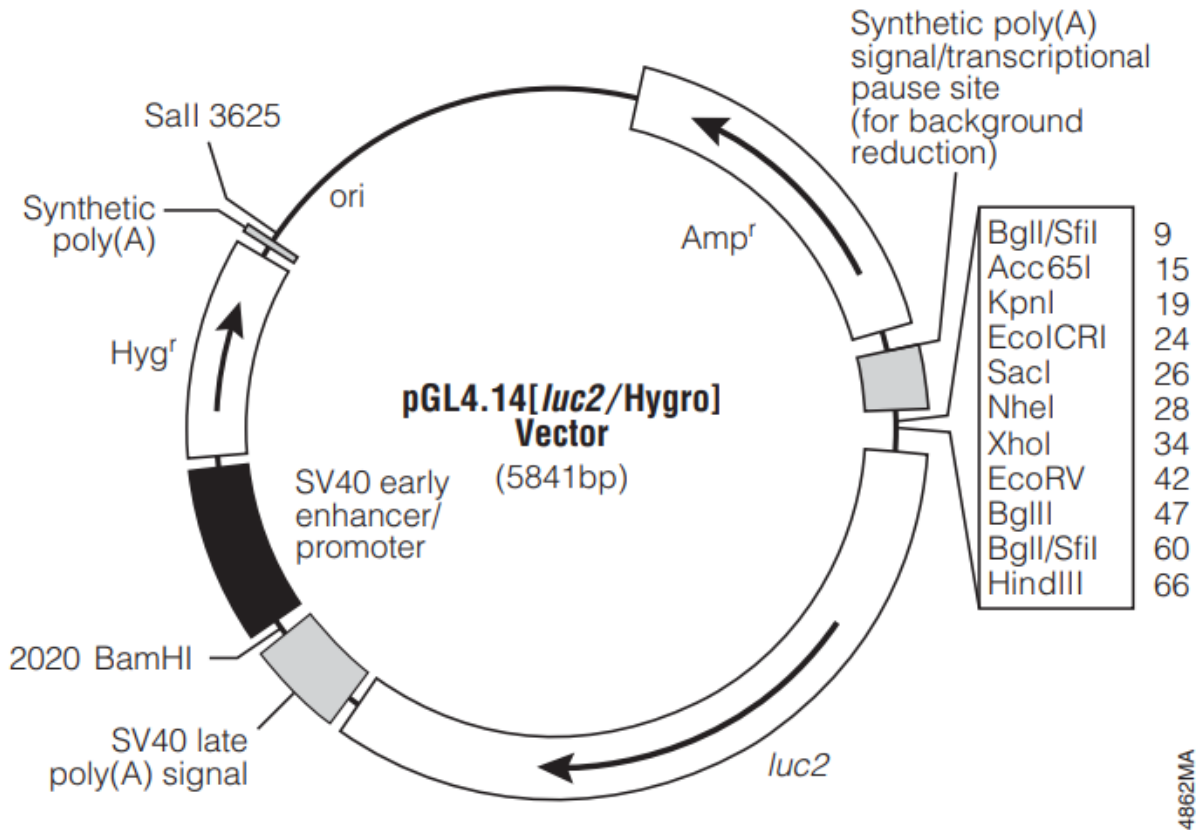


Abb. 3: Vektor pGL4.14 von Promega. Der Vektor enthält einen Polylinker mit mehreren verschiedenen Restriktionsschnittstellen als Klonierungsregion und ein Gen für Hygromycin zur eukaryotischen Selektion. Des Weiteren ist auf dem Plasmid ein *luc2* Gen für die Reporterfunktion vorhanden.³⁶

2.3. Methoden

2.3.1. Apoptose-Viabilität-Messung

Um eine adäquate Konzentration zur Stimulation von Zellen mit Testosteron bzw. Lipopolysacchariden (LPS) zu finden, ohne die Ergebnisse durch Anregung der Zellen zu starker Proliferation oder durch den Tod vieler Zellen zu verfälschen, wurde für verschiedene Konzentrationen sowohl die Viabilität als auch die Apoptose bestimmt. Hierfür wurden in einer für Luminometrie geeigneten 96-Well-Platte 1000 hMSC-TERT-Zellen pro Well ausgesät und über Nacht in 100 µl Medium im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach Absaugen des alten Mediums 100 µl neues Medium hinzugegeben, welches die gewünschte Konzentration der entsprechenden Substanz enthielt. Pro zu untersuchender Konzentration wurden jeweils 6 Wells für 24h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert sowie 6 Wells pro Platte mit Medium als Kontrolle.

Um die Zellviabilität zu bestimmen, wurde der „CellTiter-Glo“ Assay von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieser nutzt das Enzym Luciferase, welches mit Hilfe des zellulären ATPs die Reaktion von Luciferin zu Oxyluziferin katalysiert. Das dabei entstehende Lumineszenzsignal ist proportional zur Menge an zur Verfügung stehendem ATP und damit proportional zur Anzahl der Zellen. Es wurden jeweils 3 Wells pro zu testender Konzentration sowie 3 Wells pro Platte mit Medium als Kontrolle mit 100 µl CellTiter-Glo-Mix versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, davon 2 Minuten unter Agitation. Anschließend wurde in einem Luminometer 1 Sekunde pro Well die Lumineszenz gemessen.³⁷

Die Apoptose wurde mittels des „Capase-Glo3/7“ Assays von Promega nach Angaben des Herstellers quantifiziert. Hierbei wird Luziferin, das an das Oligopeptid DEVD gebunden ist, von zellulären Caspasen-3 und -7 von DEVD abgespalten und kann anschließend durch die Luciferase in Oxyluziferin umgewandelt werden. Das resultierende Lumineszenzsignal ist proportional zur Aktivität der zellulären Caspase-3 und -7 und somit zur Anzahl an apoptotischen Zellen. Pro zu testender Konzentration wurden 3 Wells sowie 3 Wells pro Platte mit Medium als Kontrolle mit 100 µl Caspase-Glo-3/7-Mix 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, darunter 2 Minuten unter

Agitation. Anschließend wurde in einem Luminometer 1 Sekunde pro Well die Lumineszenz gemessen.³⁸

2.3.2. Luciferase-Reporter-Assay

Da der Einfluss vieler Substanzen auf die Expression von ANGPTL-4 untersucht werden sollte, kam als Screening ein Luciferase-Reporter-Assay zum Einsatz. Dieser wurde mit transfizierten MM.1S-Zellen durchgeführt, welche den Vektor pGL4.14 der Firma Promega enthielten (Abb. 3). Die Zellen wurden zur Verfügung gestellt. Neben dem klonierten ANGPTL-4 Promotor, der die Expression des Luciferasereportergens steuert, trägt der Vektor ein Resistenzgen für Hygromycin, um vektortragende Zellen selektieren zu können. Das Antibiotikum wurde deshalb dem Medium zugesetzt. Mit diesen Zellen kann der Einfluss vieler Substanzen auf den ANGPTL-4 Promotor zeit- und kostensparend untersucht werden, da die Produktion an Luciferase einfach luminometrisch zu quantifizieren ist.

Auf einer 24-Well Platte wurden 30.000 Zellen pro Well ausgesät und direkt nach dem Aussäen mit den entsprechenden Substanzen stimuliert. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 4 Minuten bei 4500 rpm abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert und erneut 4 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde wieder der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 150 µl Pierce-Puffer 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert und danach für mindestens 24 Stunden bei -20°C eingefroren.

Jedes Experiment wurde sowohl mit Zellen durchgeführt, welche den Vektor mit ANGPTL-4 Promotor trugen als auch mit Zellen, welche den Vektor ohne Promotor enthielten.

In jeder Probe wurde die Aktivität der Luciferase mittels Luminometrie und der Gesamtproteingehalt photometrisch mittels Bradford-Assay ermittelt.

Zur Aktivitätsmessung der Luciferase wurden je 20 µl des aufgetauten und zuvor homogenisierten Lysats pro Well auf eine weiße 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurde die Injektionsvorrichtung des Luminometers 4 Mal mit 100 µl Luciferase-Substrat

gespült. Pro Well wurde 100 µl Luciferase-Substrat injiziert, 10 Sekunden die Stabilisierung des Signals abgewartet und dann 2 Sekunden die Lumineszenz gemessen. Abschließend wurde die Injektionsvorrichtung 6 Mal mit 500 µl ddH₂O gespült.

Um den Gesamtproteingehalt zu bestimmen, wurde ein Bradford-Assay verwendet. Hierbei bildet der Farbstoff Coomassie-Blau einen Komplex mit Proteinen, was zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums führt. Diese Verschiebung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert werden und über eine Kalibrierungsgerade mit BSA zur Errechnung des Gesamtproteingehalts der Probe genutzt werden.³⁹ Hierfür wurde auf einer transparenten 96-Well-Platte 12 µl Lysat pro Well aufgetragen und mit 200 µl Bradford-Substrat gemischt. Mit BSA wurde eine Verdünnungsreihe von 0,4 µg/ml bis 40 µg/ml erstellt und ebenfalls mit 200 µl Bradford-Substrat gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen.

Das Lumineszenzsignal jeder Probe wurde auf deren Gesamtproteingehalt bezogen.

2.3.3. mRNA Isolation

Die Substanzen, die sich im Luciferase-Reporter-Assay als aussichtsreiche Modulatoren des ANGPTL-4 Promotors erwiesen, wurden weiter auf ihren Einfluss auf die ANGPTL-4 Transkription untersucht. Dazu wurden verschiedene Zellen mit den entsprechenden Substanzen stimuliert und anschließend RNA isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben, diese mit einer ANGPTL-4 selektiven PCR vermehrt und nach gelelektrophoretischer Auftrennung densitometrisch quantifiziert.

Zur Stimulation wurden in 6-Well Platten 400.000 Zellen pro Well ausgesät und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank stimuliert. Nach nochmaliger 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ erfolgte das Ernten der Zellen und die RNA Isolation.

Hierfür wurde das festphasenextraktionsbasierte NucleoSpin RNA Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit RNasen inaktivierendem 350 µl RA1(+β-ME 100:1) Puffer lysiert, mit einem sterilen Spatel homogenisiert und auf einen

NucleoSpin Filter aufgetragen. Jede Zentrifugation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, 1 Minute lang bei 11.000 rpm. Zur Reinigung der Probe wurde diese nun durch den NucleoSpin Filter zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat mit 350 µl 70%-igem Ethanol gemischt und auf eine NucleoSpin RNA Säule aufgetragen. Bei Zentrifugation des Lysats bindet die enthaltene RNA an die Membran der Säule. Der Durchfluss wurde verworfen. Um die Effektivität der anschließenden DNA-Verdauung zu steigern, wurde die Membran mit 350 µl Membrane-Desalting-Buffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Mischen von 10 µl in ddH₂O gelöster rDNase mit 90 µl rDNase-Reaktion-Buffer wurden jeweils 95 µl dieser Mischung auf die Membran aufgetragen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zur Inaktivierung der rDNase mit 200 µl RAW2 Puffer gewaschen und zentrifugiert. Um noch vorhandene Verunreinigungen zu entfernen, wurde nach Verwerfen des Durchflusses 2 Mal mit RA3 Puffer gewaschen, erst mit 600 µl und dann nach Zentrifugation mit 250 µl. Zur Trocknung der Membran erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation bei 11.000 rpm. Abschließend wurde die RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser 1 Minute lang bei 11.000 rpm eluiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis gekühlt.⁴⁰

Direkt im Anschluss wurde die Menge an enthaltener RNA sowie deren Reinheit photometrisch ermittelt. Dazu wurden je 1,5 µl pro Probe auf eine Eppendorf µCuvette G1.0 aufgetragen und im Eppendorf BioPhotometer die Extinktion bei 260 nm bestimmt, welche proportional zur Konzentration der RNA in der Probe ist. Um Verunreinigungen mit Proteinen zu detektieren, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm gemessen. Der Quotient E_{260}/E_{280} soll für reine RNA 2,0 betragen. Verunreinigungen mit organischen Substanzen wurden bei 230 nm gemessen. Auch der Quotient E_{260}/E_{230} soll 2,0 betragen.⁴¹

Abschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.3.4. Reverse Transkription zu cDNA

Um die isolierte RNA mit einer PCR amplifizieren zu können, ist es erforderlich, diese zuvor mit einer reversen Transkriptase in cDNA umzuschreiben.

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wurde das für eine Menge von 1 µg RNA nötige Probenvolumen in einem PCR-Reaktionsgefäß mit nukleasefreiem Wasser

auf 16 μl aufgefüllt. Als Primer wurden je 2 μl an 1:1 mit ddH_2O verdünnten oligo-dT Nukleotiden (50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$) zugesetzt, welche aus 15-20 Desoxythymidin-Wiederholungen bestehen und komplementär den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Das Annealing erfolgte in einer PCR-Maschine 5 Minuten lang bei 70°C .

Im Anschluss wurden je Probe 5 μl 5x Reaktion-Buffer mit 0,125 μl dNTP-Mix (20 mM), 1 μl reverse Transkriptase und 0,875 μl ddH_2O gemischt. Jeder Probe wurden 7 μl dieses Gemisches zugefügt. Die reverse Transkription erfolgte in einer PCR Maschine bei 42°C über 1 Stunde, gefolgt von einer 10-minütigen Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95°C .

Die Proben wurden danach 1:1 mit ddH_2O verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.3.5. Polymerasekettenreaktion

Zur Quantifizierung der in den Proben vorhandenen Menge an ANGPTL-4 mRNA wurde mit jeder Probe sowohl eine ANGPTL-4 als auch eine *EEF1 α* spezifische PCR durchgeführt.

Hierfür wurde zuerst ein Master-Mix aus 10 μl 5x Reaktion-Buffer, 0,5 μl dNTP-Mix (20 mM), je 0,5 μl der Primer (10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$), 0,2 μl Taq-Polymerase (5U/ μl), 4 μl MgCl_2 (25mM) und 32,3 μl ddH_2O pro zu analysierender Probe hergestellt. Es wurden jeweils 2 μl der Probe mit 48 μl des Master-Mix gemischt und in einer PCR-Maschine inkubiert.

Nach einer initialen Denaturierung für 2 Minuten bei 95°C wurden für das Housekeeping-Gen *EEF1 α* 25 Zyklen aus je einminütiger Denaturierung bei 95°C , Primerhybridisierung bei 55°C und Elongation bei 72°C durchgeführt. Für ANGPTL-4 wurden nach initialer Denaturierung 40 Zyklen nach gleicher Weise durchgeführt, bis auf eine veränderte Hybridisierungstemperatur von 56°C . Abschließend wurde bei beiden Reaktionen 5 Minuten bei 72°C elongiert und dann auf 4°C gekühlt.⁴²

Dabei entstehen für *EEF1 α* ein 350 Basenpaare langes und für ANGPTL-4 ein 207 Basenpaare langes Produkt. Die Proben wurden optional bei -20°C gelagert.

2.3.6. Gelelektrophorese

Um die Produkte der PCR aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Zur Herstellung der Gele wurden 100 ml TBE-Puffer mit 1 g Agarose gemischt und kurz bis zum Kochen erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit 8 µl Gel-Red, einem interkalierenden Farbstoff zur Sichtbarmachung von Nukleinsäuren, versetzt und in einen Gelschlitten mit zwei 1 mm Kämmen gegossen.

Nach dem Aushärten wurden die Gele in mit TBE gefüllte Gel-Kammern gegeben. Die Taschen kamen dabei auf der Seite der Kathode zu liegen. Pro Taschenreihe wurde je eine Tasche mit 10 µl DNA-Größenmarker (100 bp Intervall) zur späteren Größenbestimmung der Produkte beladen. Da der PCR-Reaktion-Buffer schon einen Ladepuffer und zwei Farbstoffe enthält, konnten direkt jeweils 15 µl pro Tasche der PCR Produkte der *EEF1α* und der *ANGPTL-4* Reaktion der Proben auf ein Gel aufgetragen werden. Der blaue Farbstoff läuft mit der gleichen Geschwindigkeit wie 3-5 Kilobasenpaare lange Nukleinsäuren, und der gelbe Farbstoff läuft so schnell wie Nukleinsäuren kleiner als 50 Basenpaare.⁴²

Es wurde so lange eine Spannung von 100 V angelegt, bis der gelbe Farbstoff das Ende des Gels erreicht hat. Anschließend wurden die Gele in einer Geldokumentationskammer mit UV-Licht angeregt und Graustufenphotographien angefertigt.

2.3.7. Densitometrie

Zur semiquantitativen Analyse der Menge an *ANGPTL-4* mRNA wurden die Banden auf den Gelen densitometrisch ausgemessen. Hierfür wurde in Photoshop in einem Messareal mit definierter Größe die integrierte Dichte der *ANGPTL-4* und der *EEF1α* Bande sowie die des Hintergrundes bestimmt. Nach Abzug des Hintergrundwertes wurde die integrierte Dichte der *ANGPTL-4* Bande auf die des Housekeeping-Gens *EEF1α* normiert. Die so erhaltenen Quotienten der einzelnen Proben wurden wiederum auf den Quotienten der Kontrolle normiert, sodass die Menge an *ANGPTL-4* mRNA in den Proben in Relation zu der in der Kontrolle angegeben werden kann.

2.3.8. Quantitative Polymerasekettenreaktion

Um die Menge an ANGPTL-4 mRNA quantitativ zu bestimmen, wurde mit den Proben, in denen sich mittels PCR ANGPTL-4 mRNA nachweisen ließ, qPCRs für ANGPTL-4 und das Housekeeping-Gen *EEF1 α* durchgeführt.

Hierfür wurde der Promega GoTaq® qPCR-Master-Mix verwendet, der neben der Taq-Polymerase und dem Reaktionspuffer auch den Fluoreszenzfarbstoff *BTRY-Green* zum Nachweis doppelsträngiger Nukleinsäuren enthält.⁴³

Für die ANGPTL-4 qPCR wurden je Probe 10 μ l Promega Master-Mix, je 0,5 μ l der Primer und 5 μ l ddH₂O gemischt. Anschließend wurden 16 μ l dieses Gemisches mit 4 μ l der Probe versetzt und in einer qPCR Maschine inkubiert. Nach einem initialen Schmelzschrift bei 95°C für 3 Minuten wurden 40 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C, Primerhybridisierung bei 58°C, Elongation bei 72°C und Schmelzen bei 86°C für je 10 Sekunden durchgeführt. Nach jedem Zyklus wurde die Menge an Nukleinsäuren durch Fluoreszenzmessung bestimmt. Der Schmelzschrift bei 86°C war notwendig, um durch Aufschmelzen kleinerer Nebenprodukte die Spezifität zu erhöhen. Nach Abschluss der 40 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Länge des Produkts betrug 207 bp, die Effizienz 1,99.

Für die qPCR des Housekeeping-Gens *EEF1 α* wurden je Probe 10 μ l GoTaq® Promega Master-Mix, 1,5 μ l Primer und 6,5 μ l ddH₂O gemischt. Anschließend wurden 18 μ l dieses Gemisches mit 2 μ l der Probe versetzt und in einer qPCR Maschine inkubiert. Nach einem initialen Schmelzschrift bei 95°C für 3 Minuten wurden 40 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C, Primerhybridisierung bei 60°C und Elongation bei 72°C für je 10 Sekunden durchgeführt. Nach jedem Zyklus wurde die Menge an Nukleinsäuren durch Fluoreszenzmessung bestimmt. Nach Abschluss der 40 Zyklen wurde ebenfalls eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Länge des Produkts betrug 350 bp, die Effizienz lag bei 2,01.

Pro Probe wurden jeweils 3 qPCRs durchgeführt und die Ct-Werte gemittelt.

Zur Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit folgender Formel verwendet:⁴⁴

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CtZielgen}(\text{Kontrolle-Probe})}}{(E_{\text{Houskeepinggen}})^{\Delta\text{CtHouskeepinggen}(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

E_{target} ist die Effizienz der ANGPTL-4 qPCR, E_{ref} die Effizienz der EEF1 α qPCR. R gibt die relative Menge an ANGPTL-4 mRNA der Probe im Vergleich zur Kontrolle an.

2.3.9. Immunfluoreszenzzytologie

Um die Ergebnisse aus den PCR-basierten Experimenten auf Proteinebene zu überprüfen, wurden die Zelllinien, die sich in der PCR als tauglich erwiesen haben, mit den laut PCR aussichtsreichsten Substanzen stimuliert und immunhistochemisch mit einem anti-ANGPTL-4 Antikörper angefärbt.

Zuerst wurde eine Co-Kultur aus MSC- und MDA-MB-231-Zellen angelegt, indem auf mit Deckgläschen bestückten 12-Well-Platten 2×10^4 MSC-Zellen pro Well ausgesät wurden und nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ bei der Hälfte der Wells 5×10^4 MDA-MB-231-Zellen pro Well zugegeben wurden. Zusätzlich wurde auch eine reine MDA-MB-231-Kultur mit 5×10^4 Zellen pro Well angelegt. Nach nochmaliger 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ mit 1:1 gemischtem MDA-MB-231- und MSC-Medium wurde mit Dexamethason, Forskolin und 9-cis-Retinsäure stimuliert und weitere 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Zum Fixieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml -20°C kaltem Methanol für 5 Minuten inkubiert. Nach Abnehmen des Methanols wurden die Zellen 10 Minuten luftgetrocknet und dann bei -20°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Zellen auf den Deckgläschen in einer 12-Well-Platte drei Mal mit je 1 ml PBS für je 5 Minuten gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,05%igem Tween-20 in PBS, ein membranlösendes Tensid, für 15 Minuten permeabilisiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS für je 5 Minuten

wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1 ml 3%igem BSA in PBS für 30 Minuten blockiert. Daraufhin wurde wieder drei Mal mit 1 ml PBS für je 5 Minuten gewaschen.

Zur immunologischen Markierung wurde ein polyklonaler Rabbit anti-ANGPTL-4 Antikörper verwendet. Die Stammlösung in der Konzentration 200 µg/ml wurde 1:200 mit 1%igem BSA in PBS verdünnt. Jedes Well wurde mit 0,5 ml dieser Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Als Zweitantikörper zur Fluoreszenzmarkierung wurde ein an *Alexa Fluor 488* gekoppelter Goat anti-Rabbit Antikörper in der Verdünnung 1:800 verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml PBS für je 5 Minuten wurde jedes Well mit 0,5 ml dieser Verdünnung bei Raumtemperatur für 2 Stunden abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde unter Abdunkelung drei Mal mit 1 ml PBS für je 5 Minuten gewaschen.

Zum Eindecken wurde Vectashield+*DAPI* zur gleichzeitigen Kernfärbung verwendet. Dazu wurde ein Tropfen der Eindecklösung auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit der mit Zellen bewachsenen Seite hineingelegt. Die Objektträger wurden bei 4°C gelagert.

Zur Dokumentation wurden alle Objektträger eines Experimentes mit der gleichen Belichtungszeit für *Alexa Fluor 488* und *DAPI* bei 40facher Vergrößerung in Vierfachkacheln fotografiert.

Zur semiquantitativen Auswertung wurde die gewichtete Intensitätssumme des *Alexa Fluor 488*-Kanals jedes Präparates mit der Anzahl an abgelichteten Zellen dividiert und dieser Quotient auf die Kontrolle normiert, sodass die Menge an markierten ANGPTL-4 in Vielfachen der Kontrolle angegeben werden kann.

3. Ergebnisse

3.1. *In silico*-Analyse des Angiopoetin-like 4 Promotors

Zur Identifizierung geeigneter Substanzen, die die Expression von ANGPTL-4 induzieren oder inhibieren, wurde als erster Schritt eine *in silico*-Analyse des ANGPTL-4 Promotors auf putative responsive Elemente durchgeführt.

Tabelle 11: Auswahl an responsiven Elementen, nach einer *in silico*-Analyse des ANGPTL-4 Promotors. Gezeigt werden Position, Orientierung und Homologie der responsiven Elemente. Relevante, hochkonservierte Positionen sind rot markiert, Großbuchstaben repräsentieren die Core-Sequenz. Zudem werden die Substanzen angegeben, die zur Stimulation der jeweiligen responsiven Elemente ausgewählt wurden.

Motiv	Element	Position bp		Strang	Homo- -logie	Stimulanz	Se- quenz
RXR	Retinoic acid receptor / retinoic X receptor heterodimer, DR5 site	983	1007	(+)	0.791	all-trans- Retinsäure, 9-cis-Retinsäure	tcttgg gatggA GGTcac acgaag c
CREB	cAMP-responsive element binding protein	921	941	(+)	0.934	Forskolin	cagctg cgaTGA Cgaacc ctt
GR	Glucocorticoid responsive element	792	810	(-)	0.881	Dexamethason	agggtc tttaat GTCctg a
ARE	Androgen receptor binding site	746	764	(+)	0.942	Testosteron	tctcct ctttct GTTCtc t
EGR1	EGR induced protein and related factors	1519	1537	(+)	0.977	Epidermaler Wachstumsfaktor	taaggc gGGGGc ggaata g

AP1	Activator Protein 1	1580	1592	(+)	0.871	PMA	aga aGA GT ca cg t
VDR	Vitamin D receptor binding site, DR3 site	158	182	(+)	0.863	Vitamin D	gggctg gg ct ta GAG G gc agcagc a
ERR	Estrogen-related rezeptor α	1482	1504	(-)	0.900	Östrogen	gggcgc acgatt ga GGTC aagac
ER4	Thyroid hormone receptor α	646	670	(-)	0.820	Triiodthyronin	cacttgag cccaggA GG T aga ggcf
SMAD 4	Smad4 transcription factor involved in TGF- β signaling	1479	1489	(+)	0.941	TGF β	gaa GTC T tg ac
STATs	Signal transducer and activator of transcription 3	1922	1940	(-)	0.946	TNF α / Interleukin-6	gggg TT CC agg tg cgagga
LEF1/TCF	TCF/LEF-1, involved in Wnt signal transduction pathway	896	912	(+)	0.951	Wnt-3a	tggaagt C AA A gaa tct
IFR	Interferon regulatory factor related protein	1248	1272	(-)	0.941	Lipopolysaccharide	aaaatgaa aga agaG AAA aga aaag
DR1	RXR/Retinoid acid receptor heterodimer binding site	983	1007	(+)	0.791	ATRA/9CRA	tcttggat gg AGG T ca cac

Nachdem Substanzen ausgewählt wurden, die diese Elemente adressieren können, wurden im nächsten Schritt die Substanzen auf Proliferation bzw. Apoptose getestet.

3.2. Konzentrationsfindung für Lipopolysaccharide und Testosteron mittels Apoptose-Viabilität-Assay an hMSC-TERT-Zellkulturen

Um eine Konzentration ohne Einfluss auf Proliferation bzw. Apoptose zu identifizieren, wurde mit Lipopolysacchariden und Testosteron in unterschiedlichen Konzentrationen Apoptose- und Viabilität-Assays an hMSC-TERT-Zellkulturen durchgeführt.

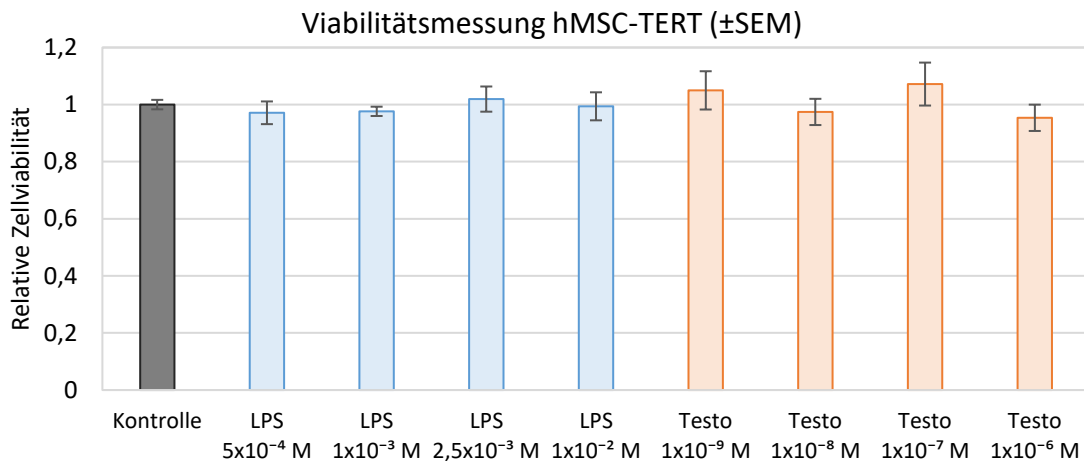


Abb. 4: Viabilitätsmessung an hMSC-TERT nach 24 h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lipopolysacchariden (LPS) und Testosteron (Testo). Die Mittelwerte aus drei Experimenten mit Triplikaten wurden auf die unstimulierte Kontrolle bezogen und werden mit SEM dargestellt.

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die Mittelwerte der im Luminometer gemessenen RLUs (relative light units) pro Sekunde normiert auf die Kontrolle mit SEM (standard error of mean). Das Experiment wurde drei Mal wiederholt.

In der Viabilitätsmessung bei hMSC-TERT-Zellen zeigte sich für Lipopolysaccharide bei keiner der gemessenen Konzentrationen eine relevante Veränderung der ATP-Menge. Bei Testosteron konnte bei der höchsten gemessenen Konzentration von 1×10^{-6} mol/l ein dezenter Abfall der ATP-Menge beobachtet werden (Abb. 4).

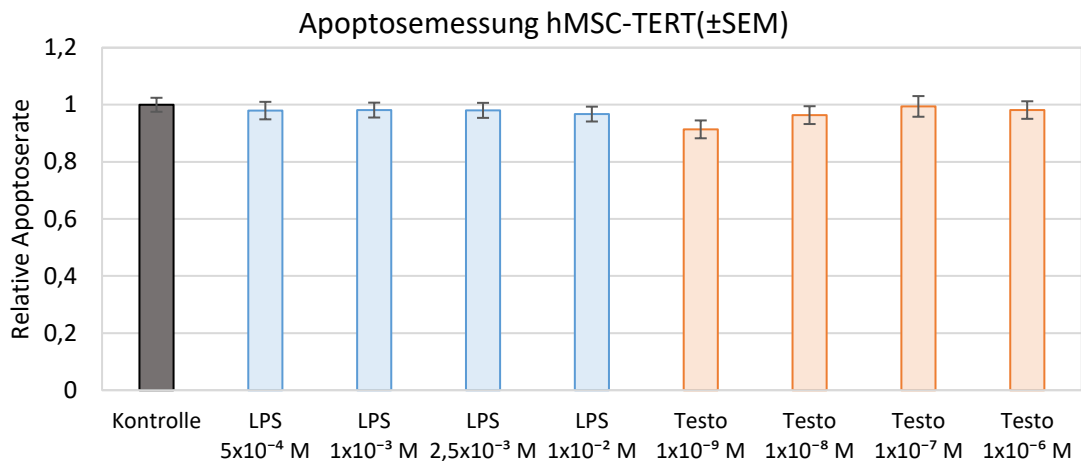


Abb. 5: Apoptosemessung an hMSC-TERT nach 24 h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lipopolysacchariden (LPS) und Testosteron (Testo). Die Mittelwerte aus drei Experimenten mit Triplikaten wurden auf die unstimulierte Kontrolle bezogen und werden mit SEM dargestellt.

Keine der gemessenen Konzentrationen sowohl bei den Lipopolysacchariden als auch bei Testosteron hatte einen Einfluss auf die Apoptose von hMSC-TERT-Zellen, wie aus Abbildung 5 ersichtlich. Die Apoptosemessung wurde drei Mal wiederholt.

Für die weiteren Experimente wurden zur Stimulation mit Lipopolysacchariden eine Konzentration von 1×10^{-2} mol/l und für Testosteron eine Konzentration von 1×10^{-7} mol/l gewählt. Für die restlichen Substanzen waren aus einer vorherigen Arbeit mit analogen Experimenten schon adäquate Konzentrationen bekannt, weshalb auf ein erneutes Screening verzichtet wurde. Die Konzentrationen werden im Folgenden aufgelistet: 9-cis-Retinsäure 2×10^{-6} mol/l, all-trans-Retinsäure 2×10^{-6} mol/l, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ 10^{-7} mol/l, Dexamethason 10^{-6} mol/l und 5×10^{-6} mol/l, Östrogen 10^{-7} mol/l, Forskolin 10^{-5} mol/l, Phorbol-12-myristat-13-acetat 5×10^{-5} g/l, Epidermaler Wachstumsfaktor 10^{-5} g/l, Interleukin-6 2×10^{-4} g/l, Triiodthyronin 10^{-8} mol/l, Tumornekrosefaktor α 10^{-4} mol/l, Wnt-3a 5×10^{-5} g/l.

3.3. Stimulation von mit pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen und Luciferase-Reporter-Assay

Die mit der *in silico*-Analyse des ANGPTL-4 Promotors ermittelten Substanzen (Tabelle 11) wurden mit einem Luciferase-Reporter-Assay auf ihren Einfluss auf den ANGPTL-4 Promotor untersucht. Hierfür wurden MM.1S-Zellen verwendet, die mit dem Luciferase-Reporter-Plasmid pGL4.14, das ein 2000 bp Fragment des ANGPTL-4 Promotors beinhaltet, stabil transfiziert wurden.

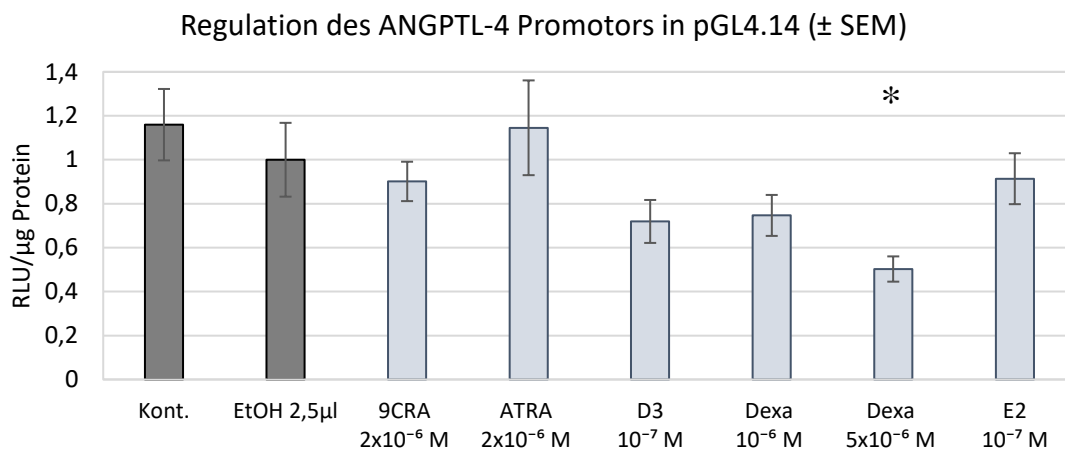


Abb. 6: Luciferaseaktivität, bezogen auf den Gesamtproteingehalt nach Stimulation von mit ANGPTL-4 Promotor in pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sieben Experimenten mit Quadruplikaten, bezogen auf die Ethanolkontrolle mit SEM. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Ethanol (EtOH), 9-cis-Retinsäure (9CRA), all-trans-Retinsäure (ATRA), 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), Östrogen (E2) und Kontrolle aus unstimulierten Zellen.

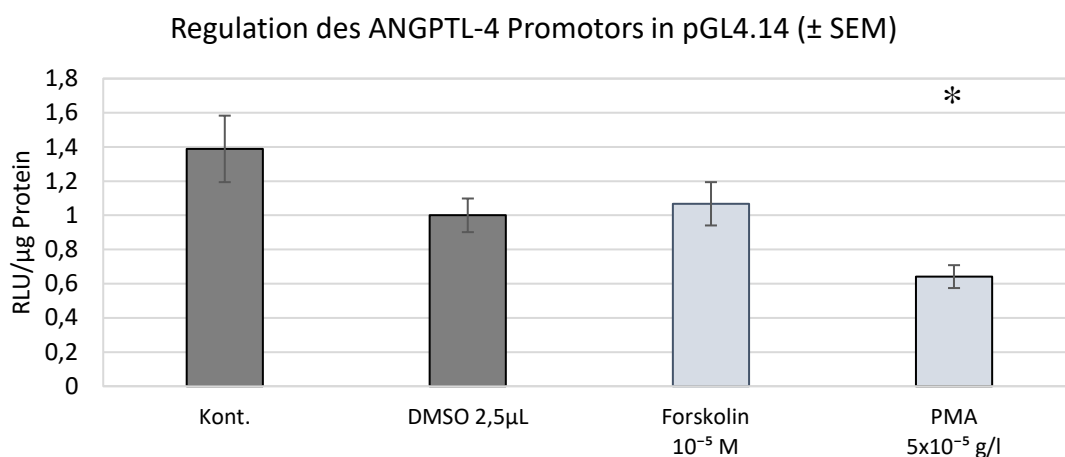


Abb. 7: Luciferaseaktivität, bezogen auf den Gesamtproteingehalt nach Stimulation von mit ANGPTL-4 Promotor in pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sieben Experimenten mit Quadruplikaten, bezogen auf die DMSO-Kontrolle mit SEM. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: DMSO, Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Kontrolle aus unstimulierten Zellen.

Alle getesteten Substanzen führten zu einer mehr oder minder starken Suppression der Luciferaseaktivität (Abb. 6, 7, 8). Für Dexamethason, PMA, EGF und Testosteron war der t-Test auf einem Niveau von 0,05 signifikant. Bei den weiteren Experimenten wurde diese Auswahl an Substanzen sowie die 9-cis-Retinsäure, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und Forskolin verwendet.

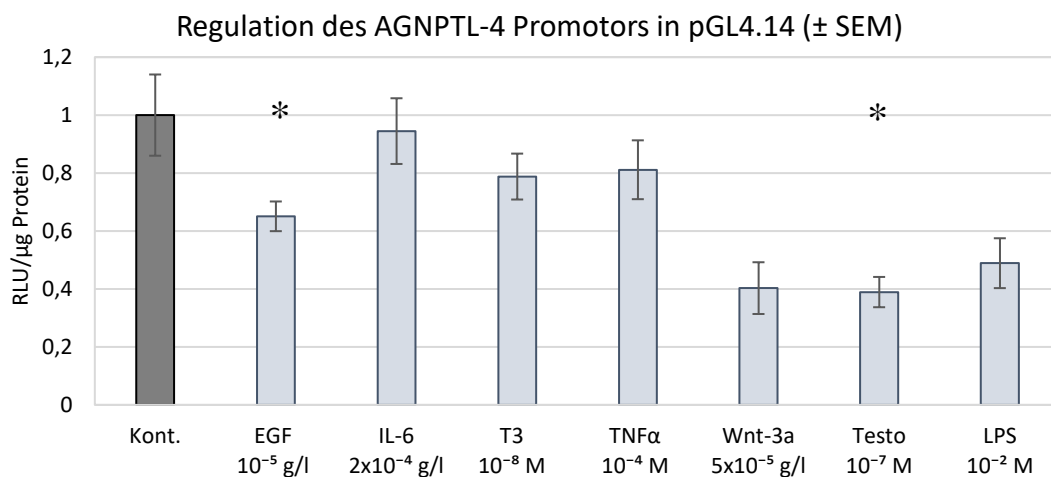


Abb. 8: Luciferaseaktivität, bezogen auf den Gesamtproteingehalt nach Stimulation von mit ANGPTL-4 Promotor in pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sieben Experimenten mit Quadruplikaten, bezogen auf die Kontrolle aus unstimulierten Zellen mit SEM. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Interleukin 6 (IL-6), Triiodthyronin (T3), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Wnt-3a, Testosteron (Testo) und Lipopolysaccharid (LPS), Kontrolle aus unstimulierten Zellen.

3.4. Bestimmung der basalen Angiopoetin-like 4 Expression in Myelom- und Mammakarzinomzelllinien sowie in primären mesenchymalen Stromazellen

Um geeignete Zelltypen für die nachfolgenden Expressionsanalysen zu finden, wurde mittels PCR die basale Expression von ANGPTL-4 in verschiedenen Myelom- und Mammakarzinomzelllinien sowie in primären MSCs untersucht.

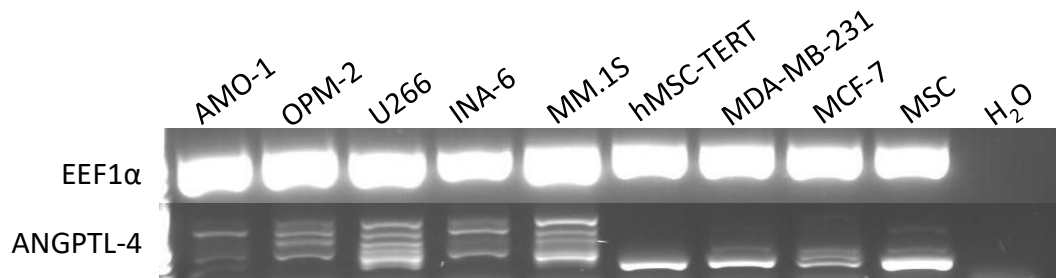


Abb. 9: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus unstimulierten Zellen zum Vergleich der basalen ANGPTL-4 Expression in verschiedenen Myelom- und Mammakarzinom-Zelllinien sowie in Telomerase-immortalisierten bzw. primären mesenchymalen Stromazellen. Die Produktlänge bei ANGPTL-4 lag bei 205 bp, bei EEF1 α bei 350 bp.

Die Abbildung 9 zeigt die Gelelektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 mRNA PCR verschiedener Zelllinien. Im Agarose-Gel ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Telomerase-immortalisierte MSCs (hMSC-TERT) als auch primäre MSCs die stärkste ANGPTL-4 Expression zeigen (Abb. 9). Ebenso eine deutliche Bande konnte bei MDA-MB-231-Zellen, eine tripel-negative Mammakarzinom-Zelllinie, beobachtet werden (Abb. 9). Die Zellen aus der Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zeigten eine schwache Bande für ANGPTL-4 (Abb. 9). Alle getesteten Myelomzelllinien (AMO-1, OPM-2, U266, INA-6, MM.1S) hingegen liefern lediglich unspezifische Produkte, die sich als Leitern nach elektrophoretischer Auftrennung darstellen (Abb. 9).

3.5. Stimulation von primären MSC-Zellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression

Die Substanzen, die im Luciferase-Reporter-Assay signifikante Ergebnisse lieferten, wurden zur Stimulation von primären MSCs, Telomerase-immortalisierten MSCs, MDA-MB-231-Zellen und MCF-7-Zellen verwendet. Anschließend wurde die ANGPTL-4 Expression mit PCRs quantifiziert.

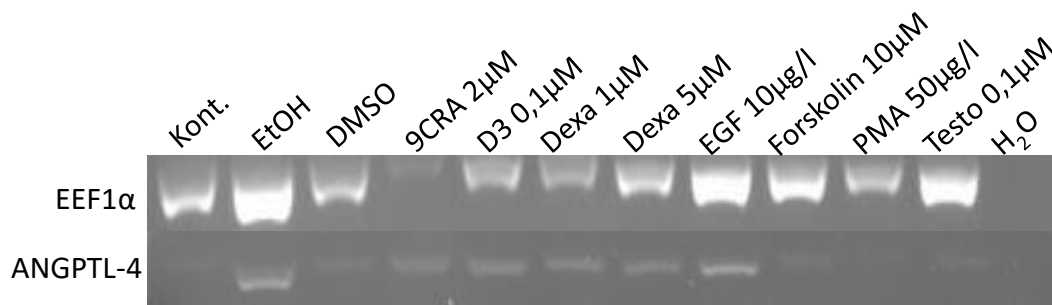


Abb. 10: Repräsentative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten primären MSCs. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O). Die Produktlänge bei ANGPTL-4 lag bei 205 bp, bei EEF1 α bei 350 bp.

Die Abbildung 10 zeigt eine repräsentative Gelelektrophorese einer ANGPTL-4 mRNA PCR aus stimulierten primären MSCs (Weitere Gele im Anhang, Abb. 27, 28). Im Agarosegel ist zu sehen, dass die sehr geringe basale Expression durch 9-cis-Retinsäure, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, Dexamethason und dem epidermalen Wachstumsfaktor erhöht wird (Abb. 10).

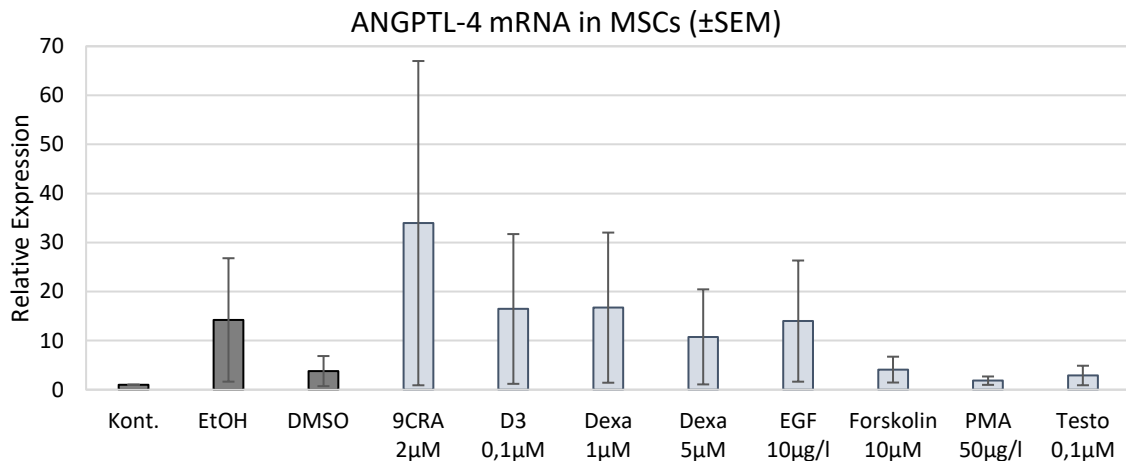


Abb. 11: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten primären MSCs. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM der integrierten Dichte der ANGPTL-4 Bande aus drei Experimenten, bezogen auf die Dichte der *EEF1 α* Bande und normiert auf die Kontrolle. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo).

Allerdings war die Variabilität zwischen den Zellen verschiedener Spender sehr hoch (Abb. 10, 11, 27, 28). Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse aus den biologischen Replikaten, wobei die Mittelwerte der integrierten Dichte der einzelnen Banden zur Kontrolle normiert wurden. Die stärkste Regulierung war bei Dexamethason, 9-cis-Retinsäure, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und EGF zu sehen. Jedoch war keines der Ergebnisse signifikant.

3.6. Stimulation von hMSC-TERT-Zellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression

Wie aus dem repräsentativen Gel (weitere Gele im Anhang, Abb. 29, 30) in Abbildung 12 ersichtlich, steigern 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, niedrig dosiertes Dexamethason und Forskolin die ANGPTL-4 Expression in Telomerase-immortalisierten MSCs.

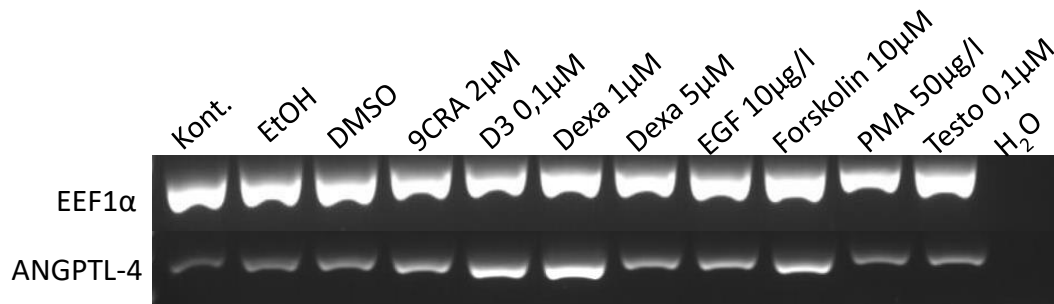


Abb. 12: Repräsentative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEf1α PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O). Die Produktlänge bei ANGPTL-4 lag bei 205 bp, bei EEf1α bei 350 bp.

Auch hier war die Variabilität zwischen den Ergebnissen der drei Mal wiederholten Experimente sehr hoch (Abb.13). Die Expression im Allgemeinen war sehr gering, wobei die größte Stimulation durch Dexamethason erreicht wurde. Es zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz der Ergebnisse.

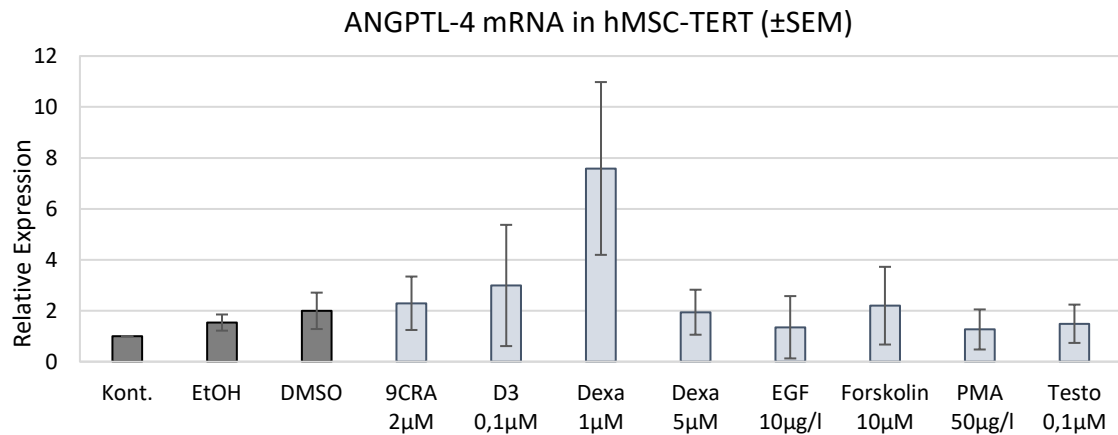


Abb. 13: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM der integrierten Dichte der ANGPTL-4 Bande aus drei Experimenten, bezogen auf die Dichte der EEF1 α Bande und normiert auf die Kontrolle. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ (D $_3$), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo).

3.7. Stimulation von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression

Deutlichere Ergebnisse lieferte die Stimulation von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen, welche drei Mal wiederholt wurde (Abb. 14, 15, 31, 32). Wie Abbildung 14 zeigt, führt vor allem Dexamethason zu einer ausgeprägten Steigerung der Expression von ANGPTL-4.

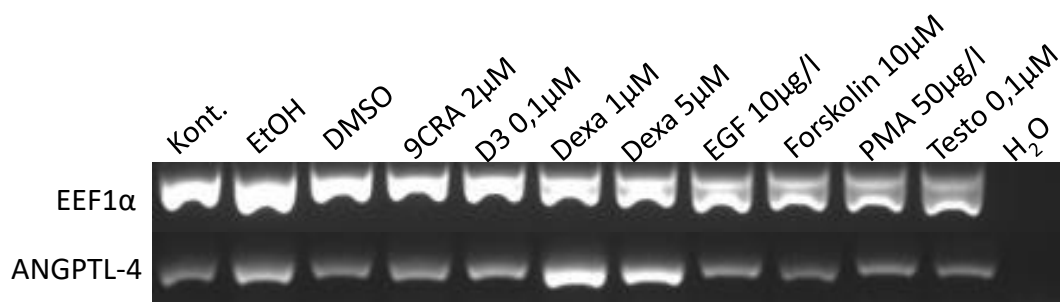


Abb. 14: Repräsentative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ (D $_3$), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H $_2$ O). Die Produktlänge bei ANGPTL-4 lag bei 205 bp, bei EEF1 α bei 350 bp.

Ein geringerer Effekt tritt bei Stimulation mit Forskolin und PMA auf (Abb. 14, Abb. 15). Die Varianz zwischen den einzelnen Experimenten (Abb. 15) war deutlich kleiner als die bei der Stimulation von MSCs (Abb. 13).

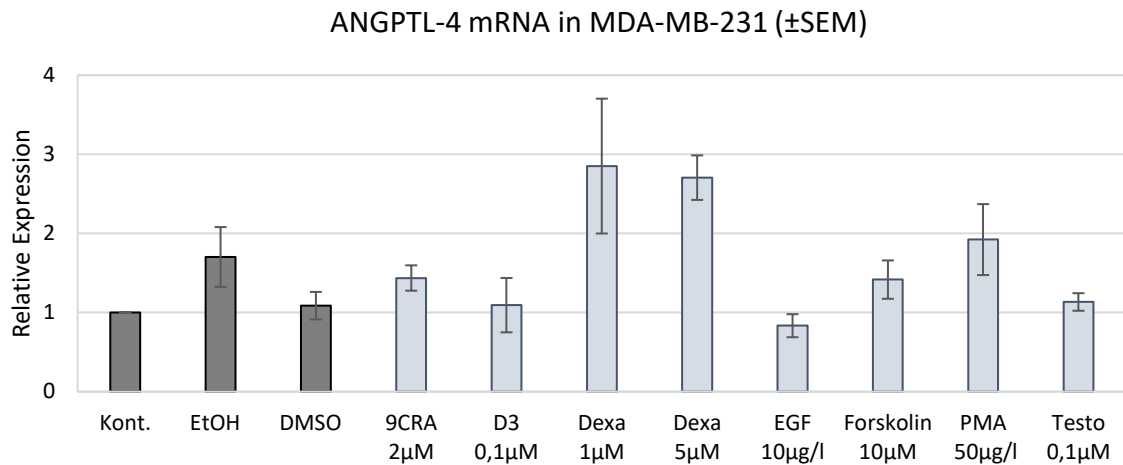


Abb. 15: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten MDA-MB-231. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM der integrierten Dichte der ANGPTL-4 Bande aus drei Experimenten, bezogen auf die Dichte der EEF1 α Bande und normiert auf die Kontrolle. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo).

3.8. Stimulation von MCF-7-Mammakarzinomzellen und Bestimmung der Angiopoetin-like 4 Expression

Die allgemeine Expression an ANGPTL-4 in MCF-7-Zellen war sehr niedrig. Wie aus dem repräsentativen Agarose-Gel (weitere Gele im Anhang, Abb. 33, 34) in Abbildung 16 ersichtlich, ließ sie sich durch Stimulation mit 9-cis-Retinsäure und Dexamethason geringfügig steigern.

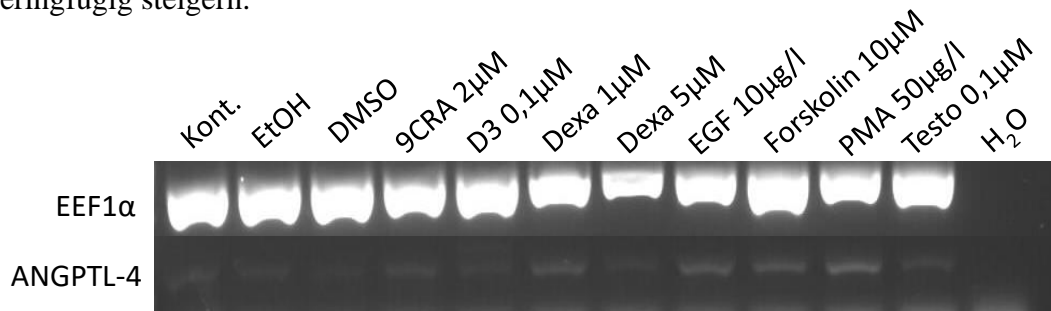


Abb. 16: Repräsentative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H $_2$ O). Die Produktlänge bei ANGPTL-4 lag bei 205 bp, bei EEF1 α bei 350 bp.

Eine ausgeprägtere Verstärkung der Expression zeigte sich bei Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor, Forskolin und PMA (Abb. 16, Abb. 17). Keines der Ergebnisse war signifikant. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt.

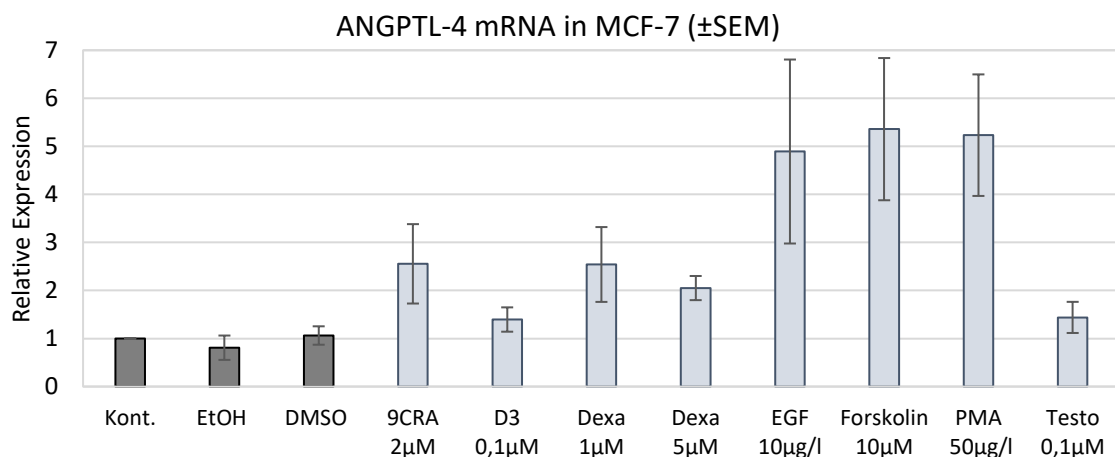


Abb. 17: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM der integrierten Dichte der ANGPTL-4 Bande aus drei Experimenten, bezogen auf die Dichte der EEF1 α Bande und normiert auf die Kontrolle. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo).

3.9. Charakterisierung der ANGPTL-4 Expression in MDA-MB-231 - Mammakarzinomzellen mittels qPCR

Um die Ergebnisse aus der PCR zu überprüfen, wurde mit den Proben aus den stimulierten MDA-MB-231, MCF-7 und den Telomerase-immortalisierten mesenchymalen Stromazellen quantitative PCRs durchgeführt. Die Proben aus den primären MSCs wurden nicht weiter untersucht, da die Menge an ANGPTL-4 mRNA sehr gering und die Ergebnisse zu variabel waren.

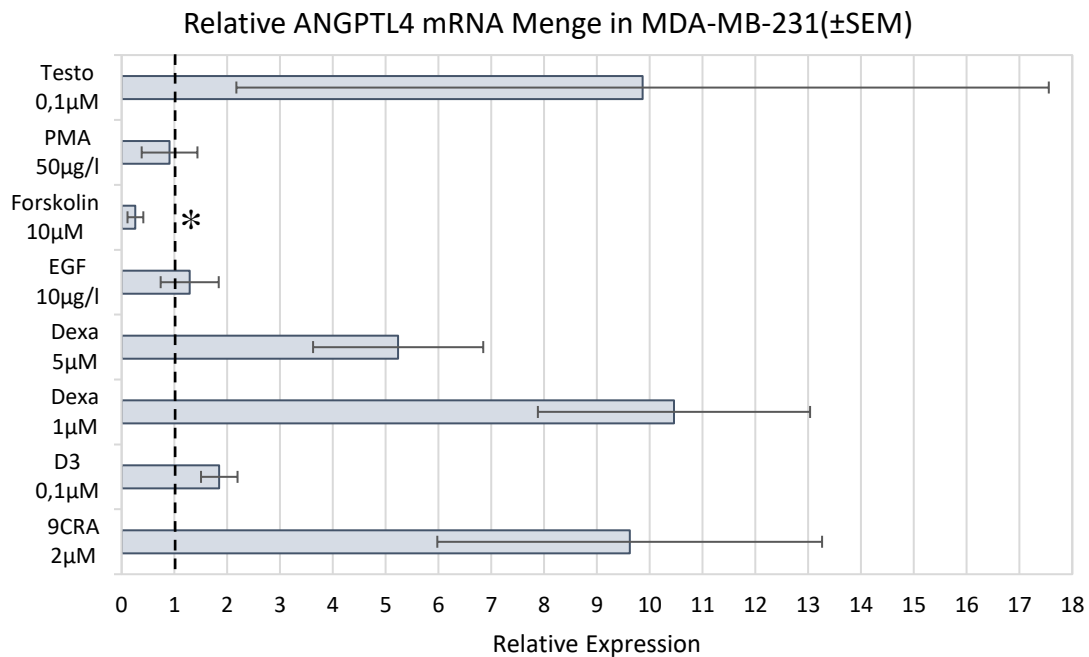


Abb. 18: Auswertung der ANGPTL-4 qPCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM der relativen ANGPTL-4 Expression, bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle aus drei Experimenten mit jeweils drei Einzelwerten. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo).

Die Abbildung 18 zeigt die Auswertung der qPCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dabei wird die Menge an ANGPTL-4 mRNA in Vielfachen der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle angegeben. Beide getesteten Konzentrationen von Dexamethason führen zu einem deutlichen Anstieg der ANGPTL-4 mRNA Menge, wobei der Effekt bei der höheren Konzentration (5 µM vs. 1 µM) geringer ausgeprägt ist. Die 9-cis-Retinsäure führt zu einer deutlicheren Steigerung der Expression von ANGPTL-4 als die konventionelle PCR impliziert. Ebenso zeigte sich dies bei einer Stimulation mit Testosteron, jedoch ist hier zu beachten, dass die einzelnen Ct-Werte sehr

stark voneinander abwichen. Kaum ein Effekt zeigte sich bei 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, bei dem epidermalen Wachstumsfaktor und bei Phorbol-12-myristat-13-acetat. Im Gegensatz zur PCR (Abb. 14, 15) führte Forskolin in der quantitativen PCR zu einer signifikanten Suppression der ANGPTL-4 Expression. Alle qPCRs wurden drei Mal wiederholt mit jeweils drei Einzelwerten.

3.10. Charakterisierung der ANGPTL-4 Expression in MCF-7 - Mammakarzinomzellen mittels qPCR

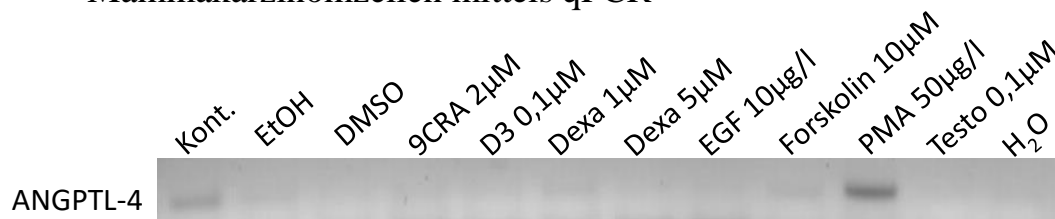


Abb. 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der 207 bp langen Produkte einer ANGPTL-4 qPCR aus stimulierten MCF-7-Zellen. Das Houskeeping Gen *EEF1α* wurde nicht aufgetragen, da die qPCR bei allen Substanzen stabile Ct-Werte lieferte. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

Die qPCRs aus MCF-7-Zellen lieferten nur bei einem Bruchteil der Experimente einen messbaren Ct-Wert für ANGPTL-4, sodass eine sinnvolle Auswertung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode nicht möglich war. Deshalb wurden die Produkte aus der qPCR gelelektrophoretisch aufgetrennt und in Abbildung 19 dargestellt.

Einzig bei der Kontrolle und bei PMA zeigte sich eine Bande, sonst konnte keine ANGPTL-4 mRNA nachgewiesen werden (Abb. 19).

3.11. Charakterisierung der ANGPTL-4 Expression in hMSC-TERT-Zellen mittels qPCR

Wie auch in der PCR hatten die Ergebnisse der qPCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen eine große Streuung (Abb. 20). 9-cis-Retinsäure, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, der epidermale Wachstumsfaktor und Dexamethason steigern die Expression von ANGPTL-4, wobei der Effekt von hochdosiertem (5 µM) Dexamethason kleiner ist als der von niedrig dosiertem (1 µM). Für Testosteron lieferte die qPCR sehr variable und weit auseinander liegende Ct-Werte. Forskolin führt auch bei den Stromazellen zu einer Suppression von ANGPTL-4. Signifikant war keines der Ergebnisse.

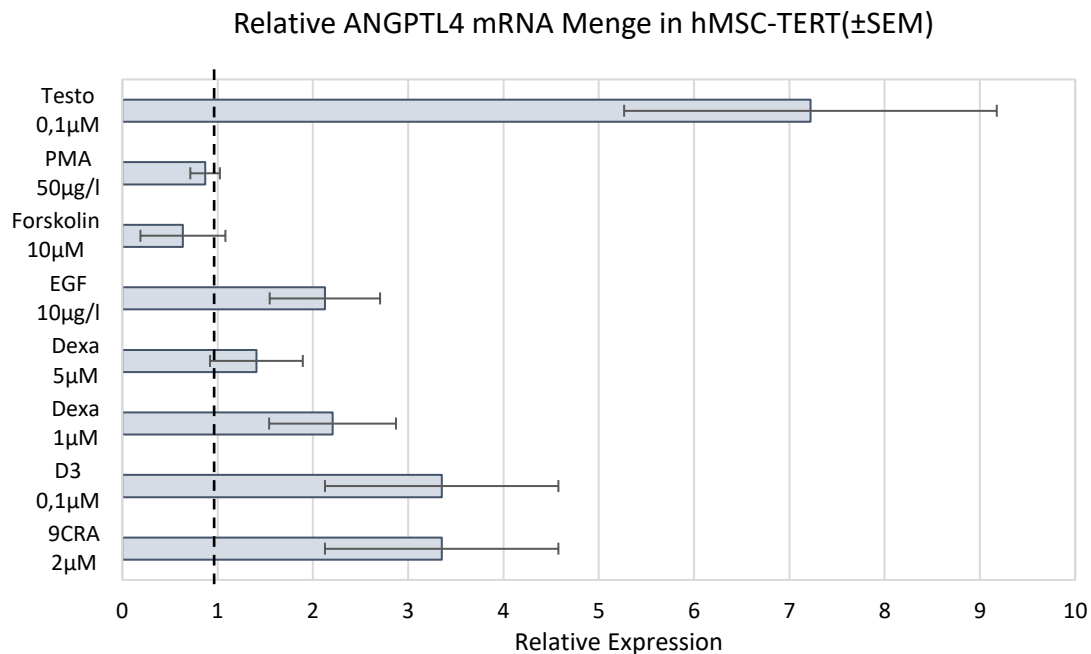


Abb. 20: Auswertung der ANGPTL-4 qPCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM der relativen ANGPTL-4 Expression, bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle aus drei Experimenten mit jeweils drei Einzelwerten. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo).

3.12. Charakterisierung der ANGPTL-4 Proteinexpression mittels Immunzytologie

Zusätzlich zu den PCR- bzw. qPCR-Experimenten wurde die ANGPTL-4 Proteinexpression mittels Immunzytologie gemessen, um die Ergebnisse aus den vorherigen Experimenten auf Proteinebene zu untermauern. Um ein möglichst natürliches Modell zu verwenden, wurde die Immunzytologie neben MDA-MB-231-Zellkulturen auch mit MDA-MB-231/MSC-Co-Kulturen sowie mit MSC-Kulturen durchgeführt, da MDA-MB-231-Zellkulturen in den qPCRs die stabilsten Ergebnisse lieferten. Hierbei wurde ANGPTL-4 mittels eines grünfluoreszierenden Antikörpers detektiert und der Kern mittels *DAPI* blau gefärbt.

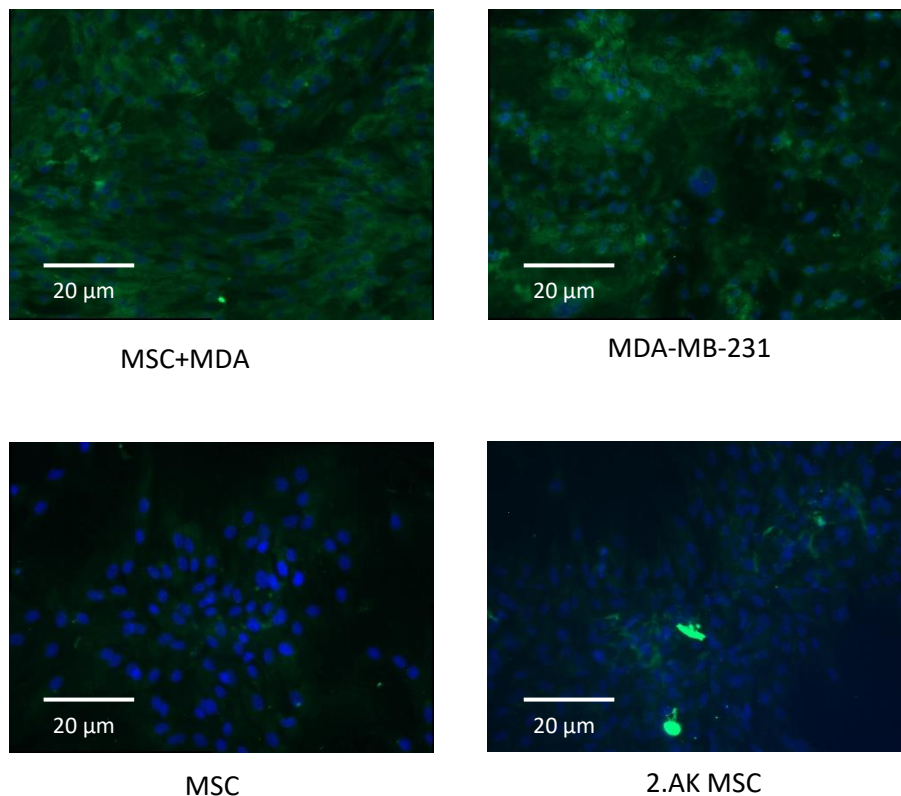


Abb. 21: Fluoreszenzimmunzytologie mit unstimulierten Zellkulturen zum Vergleich der basalen ANGPTL-4 Expression zwischen MDA-MB-231-Zellen, primären MSCs und der Co-Kultur. ANGPTL-4 ist mit *Alexa Fluor 488* grün gefärbt, die Kerne mit *DAPI* blau. Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung und 35 ms Belichtungszeit für den *Alexa Fluor 488*-Kanal. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, das Experiment wurde zwei Mal wiederholt.

Wie aus den Abbildungen 21 und 22 ersichtlich, produziert die Co-Kultur aus MDA-MB-231 und MSCs die größte Menge an ANGPTL-4. Nur geringfügig weniger produziert die MDA-MB-231-Zellkultur. Die primären MSCs zeigen nur ein sehr geringes Signal.

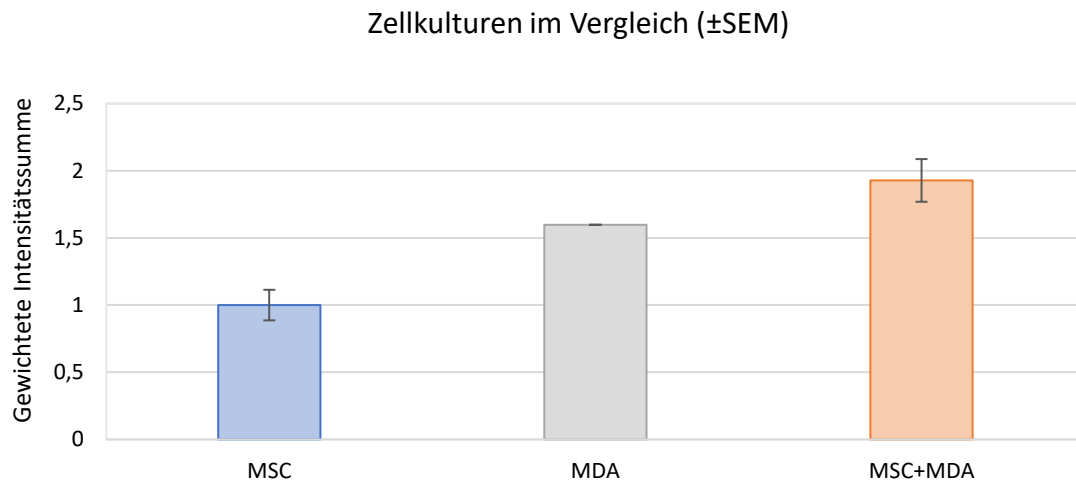


Abb. 22: Densitometrische Auswertung des *Alexa Fluor 488*-Kanals der Immunzytologie aus unstimulierten Zellen. Das Experiment wurde mit MSCs und der Co-Kultur zwei Mal wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, bezogen auf die Co-Kultur. In die Auswertung flossen jeweils vier Aufnahmen ein. Die Intensitäten der Kontrollen mit alleiniger Zweitantikörper-Färbung waren jeweils deutlich geringer (nicht dargestellt).

Im Folgenden wurden zur Stimulation die Substanzen mit dem größten Effekt aus den bisherigen Ergebnissen verwendet: 2 μ M 9-cis-Retinsäure, 1 μ M Dexamethason und 10 μ M Forskolin. Das Experiment wurde mit der Co-Kultur und der MSC-Kultur zwei Mal wiederholt.

3.13. Immunzytologie nach Stimulation von MDA-MB-231-Zellkulturen

Die Stimulation von MDA-MB-231-Zellkulturen mit Dexamethason und 9-cis-Retinsäure führte zu einer deutlichen Steigerung der ANGPTL-4 Produktion im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle, wobei der Effekt bei Dexamethason stärker ausgeprägt war (Abb. 23). Forskolin supprimiert die Produktion von ANGPTL-4 geringfügig (Abb. 23). Die semiquantitative Auswertung ist in Abbildung 26 dargestellt.

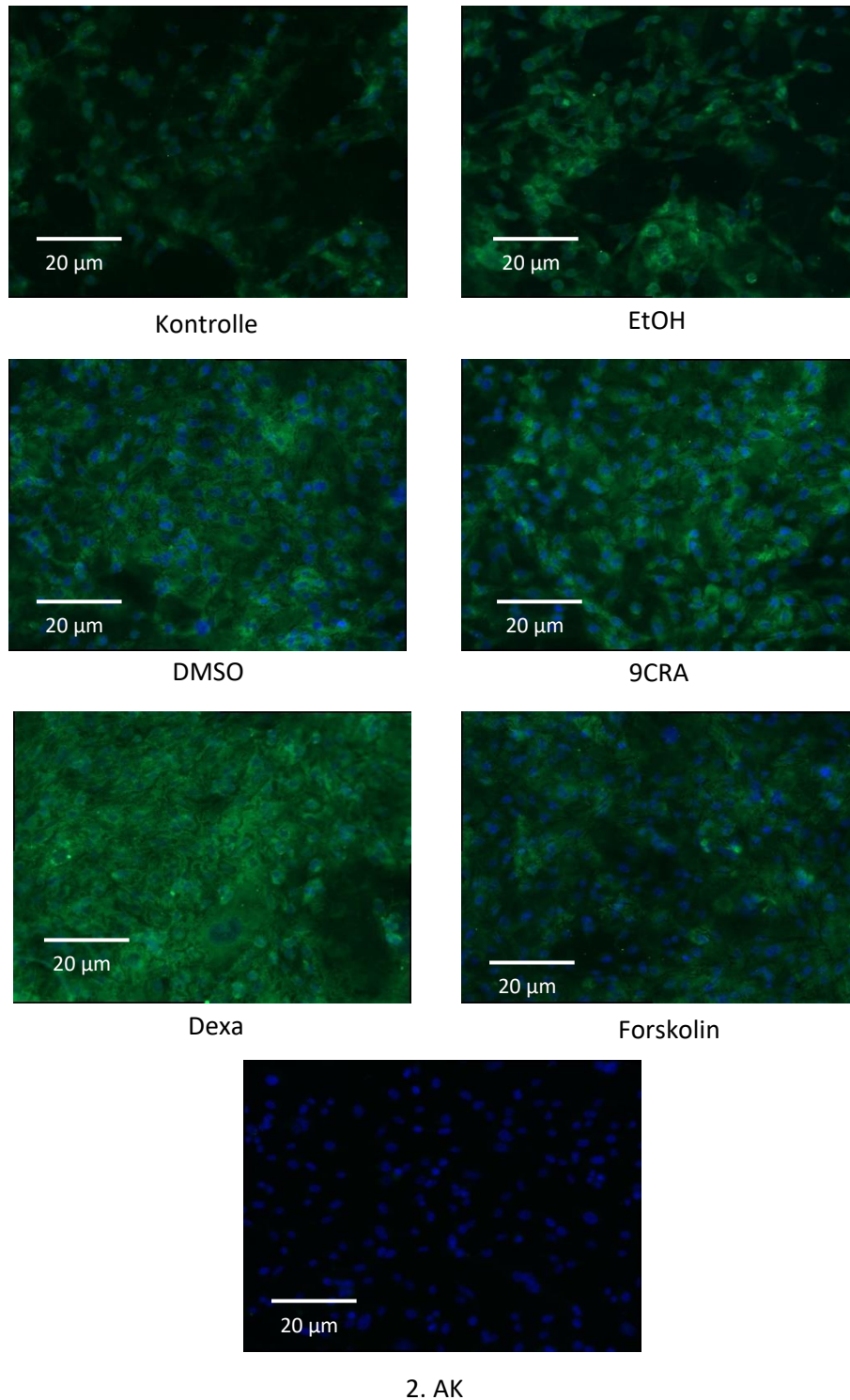


Abb. 23: Fluoreszenzimmunzytologie mit stimulierten MDA-MB-231-Zellen. ANGPTL-4 ist mit *Alexa Fluor 488* grün gefärbt, die Kerne mit *DAPI* blau. Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung und 35 ms Belichtungszeit für den *Alexa Fluor 488*-Kanal. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Unstimulierte Kontrolle, Ethanol 3 µl (EtOH), DMSO 3 µl, 2 µM 9-cis-Retinsäure (9CRA), 1 µM Dexamethason (Dexa), 10 µM Forskolin, Negativkontrolle durch alleinige Färbung mit dem Zweitantikörper (2.AK). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen.

3.14. Immunzytologie nach Stimulation von MSC-Zellkulturen

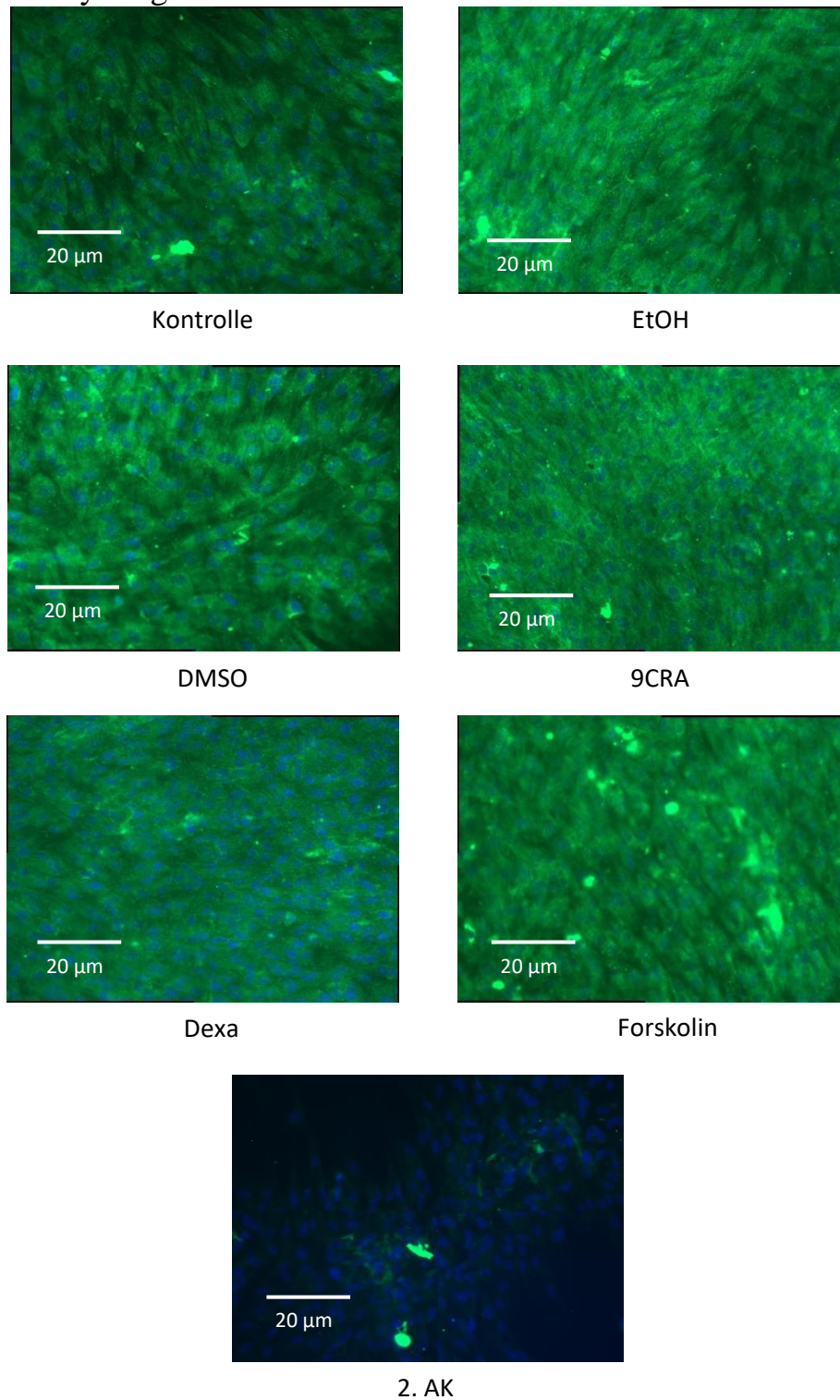


Abb. 24: Fluoreszenzimmunzytologie mit stimulierten primären MSCs. ANGPTL-4 ist mit *Alexa Fluor 488* grün gefärbt, die Kerne mit *DAPI* blau; Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung und 126 ms Belichtungszeit für den *Alexa Fluor 488*-Kanal. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Unstimulierte Kontrolle, Ethanol 3 μl (EtOH), DMSO 3 μl, 2 μM 9-cis-Retinsäure (9CRA), 1 μM Dexamethason (Dexa), 10 μM Forskolin, Negativkontrolle durch alleinige Färbung mit dem Zweitantikörper (2.AK). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, das Experiment wurde zwei Mal wiederholt.

Nach Stimulation konnte bei primären MSC-Kulturen keine relevanten Signalunterschiede zwischen der 9-cis-Retinsäure, Dexamethason und deren Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden (Abb. 24). Forskolin führte zu einer Reduktion der Signalintensität (Abb. 26). Der Versuch wurde zwei Mal wiederholt.

3.15. Immunzytologie nach Stimulation von MSC/MDA-MB-231-Co-Kulturen

Die Co-Kultur aus MDA-MB-231 und MSC lieferte die deutlichsten Ergebnisse (Abb. 25).

Wie nach den qPCRs zu erwarten war, führt Dexamethason zu einer verstärkten ANGPTL-4 Produktion. Die 9-cis-Retinsäure intensiviert ebenfalls die Produktion an Angiopoetin-like 4, allerdings schwächer als Dexamethason. Forskolin unterdrückt die ANGPTL-4 Produktion, allerdings deutlich geringer, als die qPCR dies erwarten ließ. Das Experiment wurde zwei Mal wiederholt.

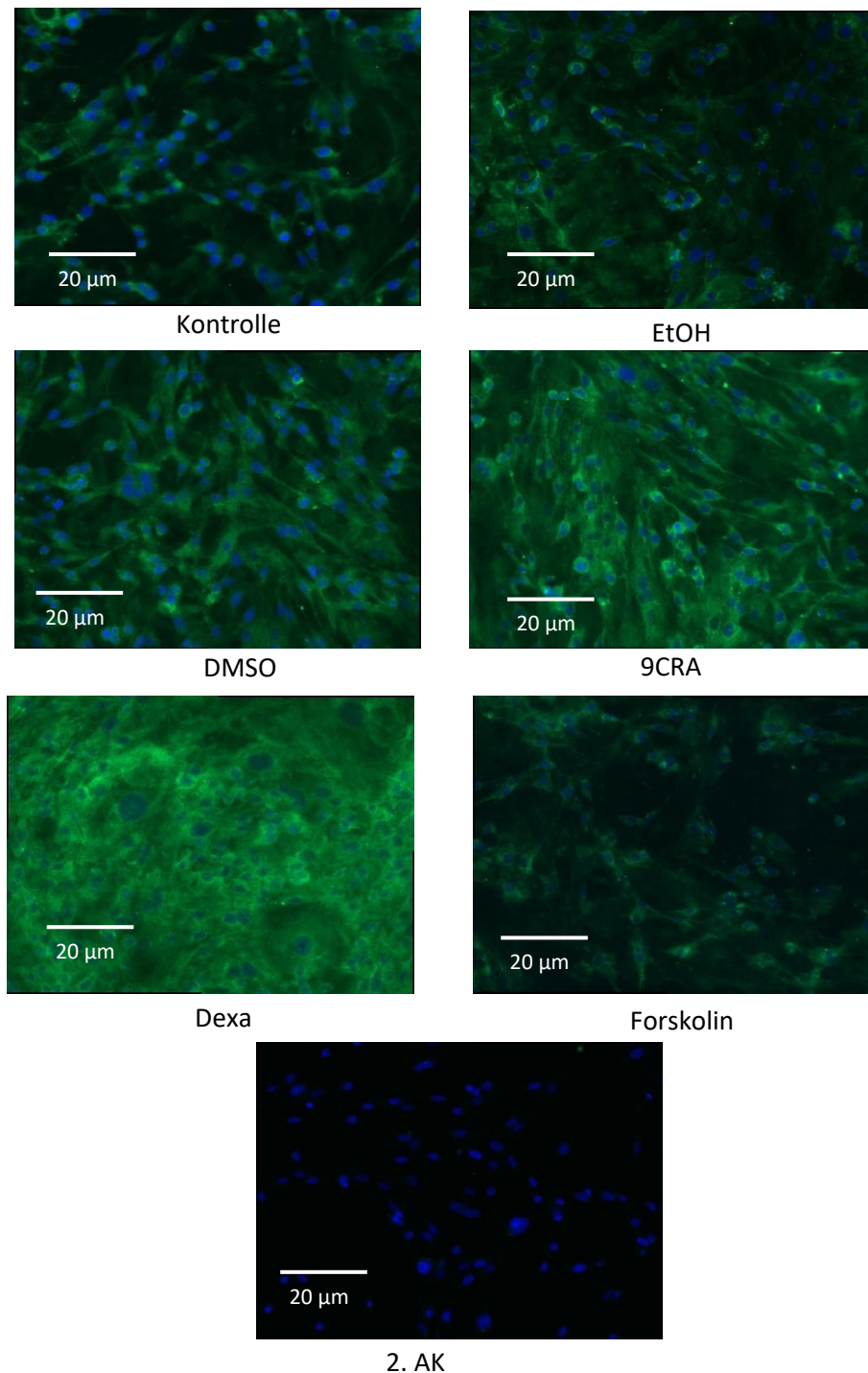


Abb. 25: Fluoreszenzimmunzytologie mit stimulierter Co-Kultur aus MDA-MB-231-Zellen und primären MSCs. ANGPTL-4 ist mit *Alexa Fluor 488* grün gefärbt, die Kerne mit *DAPI* blau. Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung und 40 ms Belichtungszeit für den *Alexa Fluor 488*-Kanal. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Unstimulierte Kontrolle, Ethanol 3 µl (EtOH), DMSO 3 µl, 2 µM 9-cis-Retinsäure (9CRA), 1 µM Dexamethason (Dexa), 10 µM Forskolin, Negativkontrolle durch alleinige Färbung mit dem Zweitantikörper (2.AK). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, das Experiment wurde zwei Mal wiederholt.

Abbildung 26 zeigt die semiquantitative Auswertung.

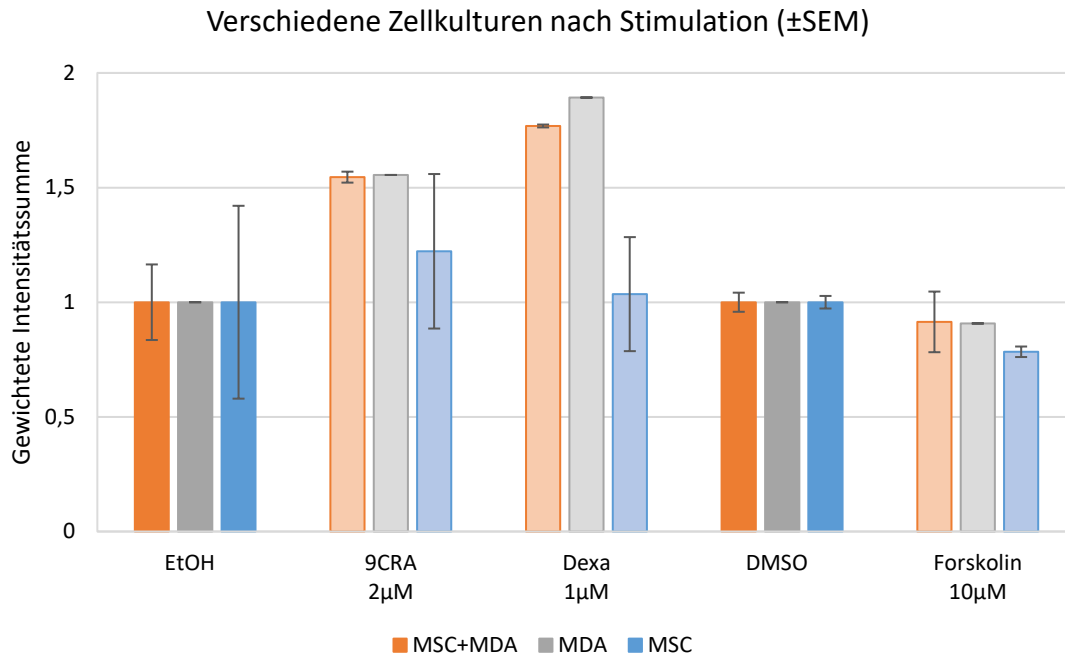


Abb. 26: Densitometrische Auswertung des *Alexa Fluor 488*-Kanals der Immunzytologie aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen, primären MSCs und der Co-Kultur. Das Experiment wurde mit MSCs und der Co-Kultur zwei Mal wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. In die Auswertung flossen jeweils vier Aufnahmen ein. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Ethanol 3 µl (EtOH), DMSO 3 µl, 2 µM 9-cis-Retinsäure (9CRA), 1 µM Dexamethason (Dexa), 10 µM Forskolin.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Dotterweich et al konnten zeigen, dass ein direkter Zellkontakt zwischen primären humanen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) und Zellen der Myelomzelllinie INA-6 zu einer Dysregulation verschiedener Gene in MSCs führt. Unter anderem resultiert hieraus eine verstärkte Expression von Genen, die an Mechanismen wie der Bildung metastatischer Nischen, Osteoklastogenese und der Angiogenese beteiligt sind. Da Angiopoetin-like 4 (ANGPTL-4) einer der aussichtsreichsten Kandidaten in den Transkriptomanalysen war, bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der Expression und Funktion von ANGPTL-4.²⁸

Um den Einfluss verschiedener Substanzen, die sich in einer *in silico*-Analyse des ANGPTL-4 Promotors als mögliche Regulatoren erwiesen haben, auf die ANGPTL-4 Expression zu untersuchen, wurde zuerst ein Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. Anschließend wurden MSCs, hMSC-TERT und die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 mit den aussichtsreichsten Substanzen stimuliert und die ANGPTL-4 mRNA-Expression mittels PCR und qPCR bestimmt. Zusätzlich wurde die ANGPTL-4 Proteinexpression durch Immunzytologie an unstimulierten und stimulierten MSC-Kulturen, MDA-MB-231-Kulturen und Co-Kulturen aus MSCs und MDA-MB-231-Zellen bestimmt.

Alle getesteten Substanzen führten im Luciferase-Assay zu einer Reduktion der Lumineszenz. Fast alle Substanzen, die im Luciferase-Assay einen signifikant-inhibitorischen Effekt aufwiesen, zeigten in den PCR-Experimenten mit MDA-MB-231-Zellen entweder einen stimulatorischen oder gar keinen Effekt auf die ANGPTL-4 Expression. Einzig Forskolin reduzierte die Expression signifikant. Nach Stimulation mit dem Kortikosteroid Dexamethason und der 9-cis-Retinsäure konnte sowohl mit den PCR- als auch mit den qPCR-Experimenten ein deutlicher Anstieg der ANGPTL-4 mRNA registriert werden. Die Ergebnisse für Dexamethason, 9-cis-Retinsäure und Forskolin konnten mittels Immunzytologie an MDA-MB-231-Zellen und MDA-MB-231/MSC-Co-Kulturen auf Proteinebene bestätigt werden. Die PCR- und qPCR-Experimente mit MSC und hMSC-TERT lieferten sehr variable Ergebnisse, allerdings gab es auch hier

Anhaltspunkte für eine erhöhte ANGPTL-4 Expression bei Stimulation mit Dexamethason und 9-cis-Retinsäure. Die MCF-7-Zellen wiesen nur eine geringe basale Expression auf, die sich in den PCR-Experimenten durch Stimulation mit 9-cis-Retinsäure, EGF, Forskolin und PMA steigern ließ. Allerdings gestaltete sich die Auswertung der qPCR schwierig, da sie nur in Einzelfällen Ct-Werte lieferte. Gelelektrophoretisch aufgetrennt zeigte sich ausschließlich bei PMA eine Bande.

4.2. Methodische Limitationen

4.2.1. Luciferase-Assay

Um eine große Anzahl an Substanzen auf ihren Einfluss auf die ANGPTL-4 Expression zu untersuchen, wurde ein Teilabschnitt der Promotorregion des ANGPTL-4 Gens in ein Luciferase-Reporter-Plasmid kloniert. In mit diesem Plasmid transfizierten Zellen steuert der ANGPTL-4 Promotor nun die Luciferaseexpression. Diese lässt sich kosten- und zeiteffizient mittels Luminometrie quantifizieren und kann auf den mittels Bradford-Assay gemessenen Gesamtproteingehalt normiert werden. Da die gemessene Luciferaseaktivität nicht nur von der Menge an vorhandenem Enzym, sondern auch von den Substraten abhängt, sind variierende Konzentrationen derer eine potenzielle Fehlerquelle. Um solche Fehler zu minimieren, wurde für ein Experiment immer ein einzelner Substratansatz verwendet, aus dem, automatisiert vom Luminometer, immer das gleiche Volumen in die Wells eingespritzt wurde. Zudem wurden pro Experiment vier Einzelwerte gemessen. Da der Bradford-Assay sehr empfindlich auf Kontaminationen reagiert, wurde pro Einzelwert der Proteingehalt zwei Mal gemessen und gemittelt. Weitere potenzielle Fehlerquellen sind Hintergrund- und anomale Expression des Plasmids. Beide Effekte sollen von Seiten des Herstellers durch einen speziellen Aufbau des Reporter-Plasmids, der eine reduzierte Anzahl an Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen enthält, abgeschwächt werden.

4.2.2. Polymerasekettenreaktion

Um die Ergebnisse aus dem Luciferase-Assay in einem *in vitro* Modell zu überprüfen, wurden Tumor- und Stromazellen mit den Substanzen, die im Luciferase-Assay signifikante Ergebnisse lieferten, stimuliert und mit PCRs die ANGPTL-4 mRNA-

Expression bestimmt. Dazu wurde aus den stimulierten Zellen RNA isoliert und mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend konnten mit diesen Proben spezifische PCRs durchgeführt werden. Da sich die Konzentrationen der isolierten RNA zwischen den Proben stark unterscheiden können, wurden jene photometrisch gemessen und immer die gleiche Menge an RNA für die reverse Transkription zu cDNA eingesetzt. Zusätzlich wurde neben der ANGPTL-4-spezifischen PCR eine *EEF1 α* -spezifische PCR durchgeführt. *EEF1 α* ist ein sogenanntes Housekeeping-Gen, das in allen Zellen unabhängig von der Stimulation gleich exprimiert wird. Die densitometrisch gemessenen Werte für ANGPTL-4 wurden auf die von *EEF1 α* bezogen, um mögliche Fehler bei der photometrischen RNA-Messung und der reversen Transkription auszugleichen. Dabei ist zu beachten, dass die Sensitivität der bei der densitometrischen Auswertung verwendeten Kamera eine weitere potenzielle Fehlerquelle darstellt, was besonders bei kräftigen Banden ins Gewicht fällt.

4.2.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion

Da die basale Expression von ANGPTL-4 in den verwendeten Zelltypen sehr niedrig ist, waren in den PCR-Experimenten 40 Zyklen notwendig, um eine Bande darstellen zu können. Bei einer so hohen Anzahl an Zyklen können aufgrund von Substratverbrauch Sättigungseffekte in einzelnen Ansätzen auftreten, welche die Ergebnisse verfälschen. Aus diesem Grund wurden mit allen cDNA-Proben zusätzlich qPCRs durchgeführt, bei denen die Produktmenge nach jedem Zyklus gemessen werden kann. Die Anzahl der Zyklen, die benötigt wird, um einen definierten Schwellenwert zu überschreiten, ist der Ct-Wert. Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, welche die Effizienzen der PCRs für ANGPTL-4 und *EEF1 α* berücksichtigt. Zudem wurden pro Experiment Triplikate gemittelt. Lag die Standardabweichung dieser über 10% des Mittelwertes, wurde das gesamte Experiment wiederholt. Die Ergebnisse der qPCR-Experimente sind also als valider anzusehen als jene aus den PCR-Experimenten. Allerdings war es bei einigen Zelltypen aufgrund der niedrigen basalen Expression schwierig, Ct-Werte für die Kontrollen zu generieren.

4.2.4. Immunfluoreszenzzytologie

Da sowohl die PCR als auch die qPCR die ANGPTL-4 Expression nur auf mRNA-Ebene messen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen ANGPTL-4 in verschiedenen Zellkulturen durchgeführt, um die Expression nach Stimulation auch auf Protein-Ebene zu bestimmen. Zunächst wurden mittels Versuchsreihen die optimalen Konzentrationen für den Erst- und Zweitantikörper ermittelt, um eine differenzierte Färbung ohne übersättigte Areale zu gewährleisten. Des Weiteren können so auch unspezifische Bindungen des verwendeten Zweitantikörpers ausgeschlossen werden. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen des Erstantikörpers wurden unspezifische Bindungsstellen vor der Färbung mit BSA blockiert. Eine weitere mögliche Fehlerquelle ist ein ungleichmäßiges Wachstum der Zellen auf dem Objektträger. Diesem wurde begegnet, indem, wann immer möglich, Aufnahmen aus Zonen mit gleichmäßigem Zellrasen angefertigt wurden. Zudem wurde jede Aufnahme aus vier Kacheln bei 40facher Vergrößerung zusammengesetzt, um eine möglichst große Fläche abzudecken. Die gemessenen Intensitätswerte des *Alexa Fluor 488*-Kanals wurden auf die Anzahl der abgebildeten *DAPI*-gefärbten Zellkerne bezogen.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Luciferase-Assay mit MM.1S-Zellen

Zur Konzentrationsfindung für die Stimulation mit Testosteron bzw. Lipopolysacchariden wurden Viabilität- bzw. Apoptose-Assays an hMSC-TERT-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von LPS und Testosteron durchgeführt (Abb. 4, 5). Bei allen Konzentrationen von LPS zeigte sich weder Einfluss auf die Viabilität (Abb. 4) noch auf die Apoptose (Abb. 5), weshalb für die weiteren Experimente eine Konzentration von 1×10^{-2} mol/l gewählt wurde. Auch bei allen Konzentrationen von Testosteron zeigte sich keine Änderung der Apoptose von hMSC-TERT-Zellen (Abb. 5). Da jedoch bei der höchsten gemessenen Konzentration von Testosteron (1×10^{-6} mol/l) ein dezenter Abfall der Viabilität zu beobachten war (Abb. 4), wurde für Testosteron eine Konzentration von 1×10^{-7} mol/l für die folgenden Experimente gewählt. Für die anderen Substanzen waren schon adäquate Konzentrationen zur Stimulation bekannt.

Der Luciferase-Assay wurde mit transfizierten Zellen der Myelom-Zelllinie MM.1S durchgeführt. Alle Substanzen, mit denen stimuliert wurde, führten zu einer mehr oder minder starken Suppression der Luciferaseaktivität, wobei die deutlichste Reduktion bei Dexamethason, EGF, PMA, Testosteron, Wnt-3a und LPS zu sehen war. Die Regulation des ANGPTL-4 Promotors war für diese Substanzen, mit Ausnahme von Wnt-3a und LPS (Abb. 6, 7, 8), mit einem Niveau von 0,05 signifikant, weshalb diese zwei Wirkstoffe für folgende Experimente ausgeschlossen wurden. Forskolin, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und die 9-cis-Retinsäure wurden trotz fehlender Signifikanz und Effektstärke im Luciferase-Assay in den weiteren Experimenten verwendet, da sie aufgrund von schon bekannten Regulationsmechanismen von ANGPTL-4 besonders Erfolg versprechend sind.

Die dabei festgestellte Reduktion der Luciferaseexpression bei den meisten Substanzen steht im Kontrast zu den Ergebnissen der restlichen Experimente. Für diese wurden jene Substanzen verwendet, die einen signifikanten inhibitorischen Effekt im Luciferase-Assay aufwiesen. Dabei zeigten sich dann aber überwiegend stimulatorische Effekte auf die Expression von ANGPTL-4. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte sein, dass es sich bei den transfizierten MM.1S-Zellen um ein artifizielles Modell handelt, bei dem die Promotorregion des ANGPTL-4 Gens isoliert vom restlichen Genom im Reporter Plasmid vorliegt. Die Position, an der dieses Plasmid in das chromosomale Genom integriert wird, kann nicht kontrolliert werden, sodass diverse Regulationsmechanismen der eukaryotischen Transkription, wie beispielsweise DNA-Looping oder Histon Modifikation, von diesem Modell nicht berücksichtigt werden können.⁴⁵ Des Weiteren wurde nur ein Teilstück des ANGPTL-4 Promotors in das Reporter Plasmid kloniert, sodass eventuell weit entfernt liegende Kontrollelemente fehlen. Beides könnte dazu geführt haben, dass zwar ein Effekt einzelner Substanzen nachweisbar war, dieser aber nicht immer das gleiche Vorzeichen wie in einem natürlichen Modell aufwies.

4.3.2. Basale Expression von ANGPTL-4 in verschiedenen Zelltypen

Um geeignete Zelltypen für die weiteren Experimente zu identifizieren, wurde die basale Expression verschiedener Zelltypen untersucht, darunter primäre MSCs und hMSC-TERT. Des Weiteren wurden verschiedene Myelom- und Mammakarzinom-Zelllinien untersucht, da beide Tumorentitäten gehäuft in den Knochen metastasieren. Sämtliche

Myelom-Zelllinien zeigten in der ANGPTL-4 spezifischen PCR nur ein unspezifisches Leiternmuster, weshalb auf eine Fortführung der Experimente mit Myelomzellen verzichtet wurde (Abb. 9). Da sowohl primäre MSCs als auch hMSC-TERT eine deutliche Bande aufwiesen, wurden alle folgenden Experimente unter anderem auch mit primären humanen mesenchymalen Stromazellen durchgeführt (Abb. 9). Ebenso eine deutliche Bande konnte bei MDA-MB-231, eine tripel-negative Mammakarzinom-Zelllinie, beobachtet werden. Auch diese Zelllinie wurde für alle folgenden Experimente verwendet. Die Zellen aus der Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zeigten eine schwache Bande für ANGPTL-4 und wurden für die PCR und qPCR Experimente verwendet.

4.3.3. ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in verschiedenen Zelllinien

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Luciferase-Assay in einem *in vitro* Modell wurden Tumor- und Stromazellen mit den Substanzen, die im Luciferase-Assay signifikante Ergebnisse lieferten, stimuliert und mit PCRs die ANGPTL-4 mRNA-Expression bestimmt. Da die basale Expression von ANGPTL-4 in den verwendeten Zelltypen sehr niedrig war, musste eine hohe Zahl an Zyklen gewählt werden, um eine ausreichende Menge an Produkt für eine densitometrische Auswertung zu erhalten. Damit durch Sättigungseffekte verfälschte Ergebnisse erkannt werden, wurden zusätzlich qPCRs durchgeführt.

Um die Ergebnisse auf Protein-Ebene zu verifizieren, wurde eine Immunzytologiefärbung etabliert (Abb. 21, 22), bei der unstimulierte MDA-MB-231 und MSC-Zellen allein und in Co-Kultur ausgesät und mittels eines Antikörpers gegen ANGPTL-4 angefärbt wurden. Da die Signalintensität in der Co-Kultur geringfügig über der reinen MDA-MB-231-Kultur lag, aber deutlich über der MSC-Kultur, ist davon auszugehen, dass ein Großteil des ANGPTL-4 in der Co-Kultur von MDA-MB-231 produziert wurde (Abb. 21, 22). Allerdings konnte Dotterweich et al zeigen, dass ANGPTL-4 in MSCs durch den Kontakt von MSCs mit Myelomzellen hoch reguliert wird.²⁸ Da dieser Effekt auch bei Mammakarzinomzellen auftreten könnte, liegt es nahe, dass in der Co-Kultur ein relevanter Teil des ANGPTL-4 von MSCs gebildet wird. Dies würde auch die positive Differenz der Signalintensitäten zwischen der Co-Kultur und der MDA-MB-231-Kultur erklären. Dexamethason, 9-cis-Retinsäure und Forskolin wurden

für dieses Experiment ausgewählt, da sie die größten und stabilsten Effekte in den vorherigen Experimenten aufwiesen.

4.3.3.1. ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in MDA-MB-231-Zellen

Sowohl in den PCR- und qPCR Experimenten als auch in der Immunzytologie führte Dexamethason zu einer Steigerung der ANGPTL-4 Expression (Abb. 14, 15, 18, 23, 25, 26). Da durch Genomanalysen bekannt ist, dass sich ein glucocorticoid-responsives Element im ANGPTL-4 Promotor befindet, war dieser Effekt zu erwarten (Tabelle 11). Eine durch Kortikosteroide gesteigerte Expression von ANGPTL-4 könnte den Lipidspiegel im Blut durch Hemmung der Lipoproteinlipase und Verstärkung der cAMP abhängigen Lipolyse erhöhen.²⁰ Dies ist eine bekannte metabolische Nebenwirkung der Kortikosteroide, zu der dieser Mechanismus beitragen könnte. Eine weitere bei langfristiger Therapie häufig auftretende Nebenwirkung ist die kortikosteroid bedingte Knochendestruktion. ANGPTL-4 wird in mehreren malignen und nicht-malignen Erkrankungen in Verbindung mit Knochendestruktion gebracht, da es Osteoklasten stimuliert und die Mineralisierung neu gebildeten Knochens hemmt.²⁵ Die erhöhte ANGPTL-4 Expression könnte einen Teilmechanismus der kortikosteroid bedingten Knochendestruktion darstellen. Die Suppression von ANGPTL-4 könnte also eine Möglichkeit sein, die negativen Folgen der chronischen Steroidtherapie, gerade bei Patienten mit Knochenmetastasen, abzuschwächen.

Wie Dexamethason führte auch die 9-cis-Retinsäure in allen Experimenten, die mit MDA-MB-231-Zellen durchgeführt wurden, zu einer gesteigerten ANGPTL-4 Expression (Abb. 14, 15, 18, 23, 25, 26). Auch dieser Effekt war aus folgenden Gründen zu erwarten: Es ist bekannt, dass ANGPTL-4 von Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie reguliert werden. Diese intrazellulären Rezeptoren binden als Heterodimere mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an ihre Erkennungssequenzen auf der DNA.²³ Der RXR ist der Rezeptor der 9-cis-Retinsäure.^{45,46} Retinoide regulieren die Wundheilung, indem sie unter anderem die Synthese von Matrixproteinen steigern.^{47,48} Dass die 9-cis-Retinsäure die Expression von ANGPTL-4 in Zellen epithelialen Ursprungs steigert, passt gut in diesen Zusammenhang, da ANGPTL-4 zentrale Mechanismen der Wundheilung, wie die Mobilität sowie die Intra- bzw. Extravasation von Zellen und die

Angioneogenese, fördert.²⁶ Neben der physiologischen Funktion in der Wundheilung sind all diese Mechanismen essenziell für invasives Wachstum und die Metastasierung von Tumoren. Verschiedene Subtypen der PPAR-Familie gelten als Promotoren epithelialer Tumore, und eine gesteigerte Aktivität dieser wird mit einer Verschlechterung von Prognose und Lebensqualität in Verbindung gebracht.^{49,50} ANGPTL-4 könnte ein Effektorprotein dieses Mechanismus sein. Modulation der verschiedenen PPAR-Rezeptoren könnte zudem eine therapeutische Möglichkeit sein, die Expression von ANGPTL-4 in vivo zu beeinflussen. Rezeptoren der PPAR-Familie und ANGPTL-4 könnten weiterhin einen möglichen Mechanismus für die Korrelation von Adipositas und höheren Tumorrisiko bzw. schlechterer Prognose, speziell beim Mammakarzinom, darstellen, da sie beide sowohl am Lipidmetabolismus als auch an der Metastasierung von Tumoren beteiligt sind.⁵¹

Forskolin supprimiert in MDA-MB-231-Zellen die ANGPTL-4 Expression in den qPCR-Experimenten und in der Immunzytologie (Abb. 18, 23, 25, 26). In den PCR-Experimenten konnte zwar ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden, allerdings sind aus den im Kapitel „Methodische Limitationen“ genannten Gründen die Ergebnisse aus der qPCR bzw. der Immunzytologie als höherwertig einzustufen (Abb. 14, 15). Forskolin aktiviert die Adenylatcyclase, die den intrazellulären Messenger cAMP synthetisiert. Die Adenylatcyclase wird von der α -Untereinheit Gs-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert. Das von ihr synthetisierte cAMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A, die durch Phosphorylierung anderer Proteine deren Aktivität beeinflusst. Durch Phosphorylierung des cAMP-responsive element binding protein kann die Transkription cAMP-abhängiger Gene reguliert werden.⁴⁵ ANGPTL-4 verstärkt die Wirkung von aktivierten Gs-gekoppelten Rezeptoren, indem es die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht.²⁰ Die Tatsache, dass eine erhöhte cAMP-Konzentration wiederum zu einer Suppression der ANGPTL-4 Expression führt, kann als negativer Rückkopplungsmechanismus angesehen werden. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die wichtigste Hormonrezeptorgruppe dar und bieten so vielfältige Möglichkeiten für die Einflussnahme auf die ANGPTL-4 Expression.

In den PCR-Experimenten konnte auch eine geringfügige Steigerung der ANGPTL-4 mRNA Expression nach Stimulation mit PMA festgestellt werden, welche aber in den

qPCR-Experimenten nicht beobachtet werden konnte. Auf eine Stimulation mit PMA in den Immunzytologie-Experimenten wurde deshalb verzichtet (Abb. 14, 15, 18).

Für Testosteron lieferte die qPCR trotz häufiger Wiederholung beständig unplausibel weit auseinanderliegende Ct-Werte (Abb. 18). Obwohl der Mittelwert, der mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bestimmten Effektstärke eine starke Stimulation suggeriert, liegt aufgrund der extremen Varianz sogar eine maximale Suppression innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls. Aus diesem Grund, und da in den PCR-Experimenten kein Effekt nachweisbar war, wurde auch auf eine Stimulation mit Testosteron in den Immunzytologieexperimenten verzichtet (Abb. 14, 18).

4.3.3.2. ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in MCF-7-Zellen

Die MCF-7-Zellen zeigten in den PCR-Experimenten eine sehr schwache basale ANGPTL-4 Expression, die sich durch Stimulation mit 9-cis-Retinsäure und Dexamethason, epidermalen Wachstumsfaktor, Forskolin und PMA nur geringfügig steigern ließ (Abb. 16, 17). Die qPCR ließ sich nicht mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode auswerten, da für die Kontrollen keine Ct-Werte generiert werden konnten. Auf eine Immunzytologie mit MCF-7-Zellen wurde aus Effizienzgründen verzichtet. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit MCF-7-Zellen sind also als nur eingeschränkt belastbar anzusehen.

Zusätzlich zu der schon bei MDA-MB-231-Zellen beobachteten Expressionssteigerung bei Dexamethason und 9-cis-Retinsäure, die hier allerdings deutlich schwächer ausfiel, konnte eine Steigerung nach Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor, dem Phorbolster PMA und Forskolin festgestellt werden. Da die qPCR nicht mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet werden konnte, wurden die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei konnte bei PMA eine deutliche, bei der Kontrolle nur eine angedeutete und bei allen anderen Substanzen gar keine Bande beobachtet werden (Abb. 19). Der mittlere Ct-Wert für PMA betrug 25,1. Also können zumindest die Ergebnisse für PMA als hinreichend valide angesehen werden.

PMA ist ein Phorbolster und aktiviert die Proteinkinase C (PKC), indem es sich als Struktur analogon des Diacylglycerins (DAG) an die DAG-Bindungsstelle der PKC anlagert. DAG wiederum ist ein Produkt aus der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, welche von der Phospholipase C katalysiert wird. Diese wird durch die α -

Untereinheit von Gq-Proteinen und die β/γ -Untereinheit von Gi-Proteinen aktiviert.⁵² Die PKC ist also Teil der intrazellulären Signalkette von Gi- und Gq-Protein-gekoppelten Rezeptoren.⁴⁵ Dass ANGPTL-4 durch die Aktivierung Gi-Protein-gekoppelter Rezeptoren induziert wird, passt gut zu den Ergebnissen aus den Experimenten mit MDA-MB-231-Zellen, bei denen die Aktivierung von Gs-Protein-gekoppelter Rezeptoren, dem Gegenspieler der Gi-Proteine, zu einer Suppression von ANGPTL-4 führt. Die PKC selbst entfaltet ihre Wirkung durch Phosphorylierung anderer Proteine, darunter die MAP-Kinase und der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Sie spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung und der Apoptose.^{45,53} Des Weiteren ist sie für die Steuerung der Angiogenese und der Endothelpermeabilität zuständig. Phorbolster gelten als Tumorpromotoren, beschleunigen also das Wachstum von Tumoren.^{45,54} Dieser Mechanismus könnte zum Teil auf der Induktion von ANGPTL-4 durch PMA beruhen, da ANGPTL-4 aufgrund seiner physiologischen Funktionen in der Wundheilung auch die Metastasierung und das Wachstum von Tumoren, unter anderem durch Angiogenese und gesteigerte Endothelpermeabilität, begünstigt.^{30,55} Direkte Hemmstoffe der PKC haben aufgrund fehlender Spezifität zwischen den einzelnen Subtypen häufig nicht tolerable Nebenwirkungen, was ihre klinische Anwendung in der Tumorthherapie bisher stark einschränkt.⁴⁵ Zudem wird in klinischen Studien häufig eine mangelnde Effektivität beobachtet.⁵⁶⁻⁵⁸ Die direkte Regulation von ANGPTL-4 könnte hier effektivere und spezifischere therapeutische Möglichkeiten schaffen.

Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) ist eine Rezeptortyrosinkinase, die nach Ligandenbindung die Phospholipase C durch Phosphorylierung aktiviert.⁵⁹ Über die Bildung von DAG wird also auch durch EGF die Proteinkinase C aktiviert.⁶⁰ In den PCR-Experimenten konnte beobachtet werden, dass EGF folgerichtig die ANGPTL-4 Expression in einem ähnlichen Ausmaß wie PMA erhöht (Abb. 16, 17). Allerdings konnte dieser Effekt in der qPCR nicht reproduziert werden, da weder für EGF noch für die Kontrolle Ct-Werte generiert werden konnten (Abb. 19). Da EGF sowohl das Epithelwachstum als auch die Wundheilung reguliert, ist es trotzdem naheliegend, dass die ANGPTL-4 Expression von EGF gesteigert wird.⁶¹ Auch wird der EGF-Rezeptor, wie auch ANGPTL-4, in vielen epithelialen Tumoren gesteigert exprimiert und führt dort zu einer erhöhten Rate an Metastasierung.⁶² Schon zugelassene Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Erlotinib bzw. monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor, wie Cetuximab,

könnten eine vielversprechende Möglichkeit der Einflussnahme auf die ANGPTL-4 Expression *in vivo* sein, was das Einsatzspektrum der genannten Medikamente erweitern würde.^{63,64}

4.3.3.3. ANGPTL-4 Expression nach Stimulation in primären MSCs und hMSC-TERT

Da MSCs eine im Knochenmark häufig vorkommende und funktionell wichtige Zellart sind, wurden alle Experimente auch mit MSCs durchgeführt. Speziell bei den primären MSCs ergab sich hierbei in PCR-Experimenten eine extreme Variation der ANGPTL-4 Expression zwischen den einzelnen Spendern (Abb. 10, 11). Hierbei zeigte sich durch fast alle Substanzen eine Steigerung der Expression von ANGPTL-4, hauptsächlich durch Dexamethason, 9-cis-Retinsäure, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und EGF, jedoch war aufgrund von der hohen Varianz kein Ergebnis signifikant. Deshalb wurden die Experimente mit Telomerase-immortalisierten MSCs wiederholt (Abb. 12, 13). Allerdings konnte auch hier eine hohe Variation der Ergebnisse beobachtet werden, wenn auch geringfügig niedriger. Die Ergebnisse der PCR ergaben eine leichte Erhöhung der Expression durch 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, niedrig dosiertes Dexamethason und Forskolin. Mit hMSC-TERT wurden auch qPCR-Experimente durchgeführt (Abb. 20), worauf bei primären MSCs aus Effizienzgründen verzichtet wurde. Zusammenfassend suggerieren die Ergebnisse eine Stimulation durch Dexamethason, 9-cis-Retinsäure, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und EGF sowie eine Suppression durch Forskolin. Die Ergebnisse sind aufgrund der hohen Variabilität nur sehr eingeschränkt belastbar.

Um ein möglichst natürliches Modell zu verwenden, wurde die Immunzytologie neben MDA-MB-231-Kulturen (Abb. 23) auch an Co-Kulturen aus MDA-MB-231 und MSCs (Abb. 25) sowie an reinen MSC-Kulturen durchgeführt (Abb. 24) und mit 9-cis-Retinsäure, Dexamethason und Forskolin stimuliert. Unterschiede, die deckungsgleich in der Co- und der MDA-MB-231-Kultur nach Stimulation mit 9-cis-Retinsäure und Dexamethason beobachtet wurden, konnten nicht in der MSC-Kultur nachgewiesen werden. Dies ist auch gut an der Gegenüberstellung aller Immunzytologie-Färbungen in Abbildung 26 zu erkennen. Forskolin führte wie bei allen Kulturen zu einer Reduktion der Expression.

4.4. Ausblick

Die aus bisherigen Studien bekannte Rolle von ANGPTL-4 bei der Knochendestruktion wird von den Ergebnissen der Stimulation mit Dexamethason gestärkt. Ebenso verhält es sich bei den Ergebnissen aus der Stimulation mit der 9-cis-Retinsäure in Bezug auf die Wundheilung und den schon bekannten Regulationsmechanismus über PPA-Rezeptoren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ANGPTL-4 cAMP-abhängig inhibiert wird. Es kann also neben den schon bekannten PPA-Rezeptoren, pharmakologisch auch über Gs-Protein gekoppelten Rezeptoren Einfluss auf die ANGPTL-4 Expression genommen werden.

Des Weiteren steigert die Proteinkinase C die ANGPTL-4 Expression. Da Inhibitoren der Proteinkinase C nur eingeschränkt klinisch anwendbar sind, stellen die Aktivatoren der PKC, darunter Gq- bzw. Gi-Protein gekoppelte Rezeptoren und der EGF-Rezeptor, interessante pharmakologische Angriffspunkte dar. Für alle genannten Rezeptoren stehen schon zugelassene Medikamente, wie beispielsweise Tyrosinkinase Inhibitoren und monoklonale Antikörper beim EGF-Rezeptor, zur Verfügung.

Weiterführende Untersuchungen *in vitro* mit diesen Substanzen sind nötig, um beurteilen zu können, ob auch *in vivo* eine selektive und ausreichend starke Beeinflussung der ANGPTL-4 Expression möglich ist. Zudem können Art und Ausmaß der Wirkungen einer solchen Behandlung *in vivo* aktuell nur schwer eingeschätzt werden. Mögliche Anwendungen wären Progress- und Symptomkontrolle bei Knochentumoren, Verringerung von Knochendestruktion bei verschiedenen osteodestruktiven Erkrankungen und die Verbesserung des Lipidstatus beim metabolischen Syndrom. Auch gilt es, möglicherweise auftretende Nebenwirkungen zu berücksichtigen. Denkbar wären beispielsweise metabolische Dysregulationen und Störungen der Wundheilung. Auch diesbezüglich bedarf es weiterer Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Tumorwachstum im Knochen ist entweder Folge von primären Knochentumoren oder wesentlich häufiger von Metastasierung in den Knochen. Es führt zu vielfältigen medizinischen Problemen und schränkt häufig Lebensqualität und Lebenserwartung betroffener Patienten stark ein. Nicht selten geht von Knochenmetastasen die größte Symptomlast maligner Erkrankungen für die Patienten aus. Sie werden sowohl lokal mit Bestrahlung als auch systemisch mit Bisphosphonaten behandelt. Seltener ist eine operative Stabilisierung notwendig. Obwohl die schon bestehenden Therapieverfahren eine temporäre lokale Tumorkontrolle bewirken können, ist eine kurative Behandlung von Knochenmetastasen in der Regel nicht möglich. Angiopoetin-like 4 (ANGPTL-4) ist ein Adipokin, das als Regulator sowohl im Lipidstoffwechsel als auch in der Wundheilung dient. Es ist in der extrazellulären Matrix lokalisiert und wirkt über seine Funktionen in der Wundheilung als Tumorpromotor. Verschiedene Karzinomentitäten exprimieren ANGPTL-4 gesteigert oder induzieren eine gesteigerte Expression in mesenchymalen Stromazellen (MSC). Eine besondere Bedeutung hat es in Knochentumoren, da ihm nicht nur eine Beteiligung bei der Bildung metastatischer Nischen, sondern auch eine fördernde Wirkung beim Knochenabbau zugeschrieben wird. Aus diesen Gründen ist ANGPTL-4 ein potenzielles Ziel für Therapien und molekulare Bildgebung. Über die Regulation der ANGPTL-4 Expression ist bis auf die Induzierbarkeit durch Hypoxie und die Abhängigkeit von PPA-Rezeptoren wenig bekannt. Ziel der Arbeit ist es, mit Expressionsanalysen Substanzen zu identifizieren, die die Expression von ANGPTL-4 beeinflussen.

Hierfür wurden Substanzen nach einer *in silico*-Analyse des ANGPTL-4 Promotors ausgewählt und in einem Luciferase-Reporter-Assay auf ihren Einfluss untersucht. Mit den aussichtsreichsten Substanzen wurden Mammakarzinomzelllinien und mesenchymale Stromazellen stimuliert und sowohl die mRNA-Expression mittels PCR und qPCR als auch die Protein-Expression mittels Immunzytologie bestimmt.

In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 konnte auf mRNA und auf Protein-Ebene eine Steigerung der ANGPTL-4 Expression durch Dexamethason und 9-cis-Retinsäure und eine Suppression durch Forskolin nachgewiesen werden. Bei mesenchymalen Stromazellen ergaben sich Hinweise auf eine Expressionssteigerung

durch Dexamethason und 9-cis-Retinsäure auf mRNA-Ebene. Zudem gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 auf mRNA-Ebene durch PMA und EGF zur Bildung von ANGPTL-4 angeregt wird.

Diese Ergebnisse fügen sich gut in schon bekannte Regulationsmechanismen von ANGPTL-4 ein und zeigen vielfältige Möglichkeiten zur Beeinflussung der ANGPTL-4 Expression *in vivo* durch schon zugelassene Substanzen auf. Dies könnte sowohl im Sinne einer Tumorthherapie als auch zur Erhöhung der Trennschärfe von molekularer Bildgebung hilfreich sein.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 7., überarb. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014.
- 2 Aumüller G, Aust G, Engele J, et al. *Anatomie*. 3., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014.
- 3 Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Rüger R. Molecular Mechanisms of Bone Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016;13(1):1-12.
- 4 Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012.
- 5 Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*. 2004;350(16):1655-1664. doi:10.1056/NEJMra030831.
- 6 Saki N, Abroun S, Farshdousti Hagh M, Asgharei F. Neoplastic bone marrow niche: hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Cell J*. 2011;13(3):131-136. Published September 23, 2011.
- 7 Hofbauer LC, Bozec A, Rauner M, Jakob F, Perner S, Pantel K. Novel approaches to target the microenvironment of bone metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(8):488-505. doi:10.1038/s41571-021-00499-9.
- 8 Dougall WC, Holen I, González Suárez E. Targeting RANKL in metastasis. *Bonekey Rep*. 2014;3:519. doi:10.1038/bonekey.2014.14.
- 9 Udagawa N, Koide M, Nakamura M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(1):19-26. doi:10.1007/s00774-020-01162-6.
- 10 Rucci N, Sanità P, Delle Monache S, Alesse E, Angelucci A. Molecular pathogenesis of bone metastases in breast cancer: Proven and emerging therapeutic targets. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):335-347. doi:10.5306/wjco.v5.i3.335.
- 11 Ye L, Kynaston HG, Jiang WG. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms (Review). *Int J Mol Med*. 2007;20(1):103-111.
- 12 Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Ferng AS, Geffre CP, Mantyh PW. Bone cancer pain. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1198:173-181. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05429.x.

- 13 Clézardin P, Ebetino FH, Fournier PGJ. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res.* 2005;65(12):4971-4974. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0264.
- 14 Holen I, Coleman RE. Anti-tumour activity of bisphosphonates in preclinical models of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(6):214. doi:10.1186/bcr2769.
- 15 Powles T, Paterson S, Kanis JA, et al. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(15):3219-3224. doi:10.1200/JCO.2002.11.080.
- 16 Powles T, Paterson A, McCloskey E, et al. Reduction in bone relapse and improved survival with oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer ISRCTN83688026. *Breast Cancer Res.* 2006;8(2):R13. doi:10.1186/bcr1384.
- 17 Kochen MM. *Allgemeinmedizin und Familienmedizin.* 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012.
- 18 Kersten S, Mandard S, Tan NS, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem.* 2000;275(37):28488-28493. doi:10.1074/jbc.M004029200.
- 19 Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, Furukawa H. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 2002;43(11):1770-1772. doi:10.1194/jlr.c200010-jlr200.
- 20 Koliwad SK, Gray NE, Wang J-C. Angiopoietin-like 4 (Angptl4): A glucocorticoid-dependent gatekeeper of fatty acid flux during fasting. *Adipocyte.* 2012;1(3):182-187. doi:10.4161/adip.20787.
- 21 Talmud PJ, Smart M, Presswood E, et al. ANGPTL4 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and CHD risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(12):2319-2325. doi:10.1161/ATVBAHA.108.176917.
- 22 Lei X, Shi F, Basu D, et al. Proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4 by proprotein convertases modulates its inhibitory effects on lipoprotein lipase activity. *J Biol Chem.* 2011;286(18):15747-15756. doi:10.1074/jbc.M110.217638.
- 23 Mandard S, Zandbergen F, Tan NS, et al. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4)

- is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34411-34420. doi:10.1074/jbc.M403058200.
- 24 Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):61-70. doi:10.1038/nrc1254.
 - 25 Zhang T, Kastrenopoulou A, Larrouture Q, Athanasou NA, Knowles HJ. Angiopoietin-like 4 promotes osteosarcoma cell proliferation and migration and stimulates osteoclastogenesis. *BMC Cancer*. 2018;18(1):536. doi:10.1186/s12885-018-4468-5.
 - 26 Chong HC, Tan CK, Huang R-L, Tan NS. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *J Oncol*. 2012;2012:351089. doi:10.1155/2012/351089.
 - 27 Li X, Chen T, Shi Q, et al. Angiopoietin-like 4 enhances metastasis and inhibits apoptosis via inducing bone morphogenetic protein 7 in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(1):128-134. doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.104.
 - 28 Dotterweich J, Schlegelmilch K, Keller A, et al. Contact of myeloma cells induces a characteristic transcriptome signature in skeletal precursor cells -Implications for myeloma bone disease. *Bone*. 2016;93:155-166. doi:10.1016/j.bone.2016.08.006.
 - 29 Le Jan S, Amy C, Cazes A, et al. Angiopoietin-Like 4 Is a Proangiogenic Factor Produced during Ischemia and in Conventional Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology*. 2003;162(5):1521-1528. doi:10.1016/S0002-9440(10)64285-X.
 - 30 Nakayama T, Hirakawa H, Shibata K, et al. Expression of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in human colorectal cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion and distant metastasis. *Oncol Rep*. 2011;25(4):929-935. doi:10.3892/or.2011.1176.
 - 31 Zhu P, Tan MJ, Huang R-L, et al. Angiopoietin-like 4 protein elevates the prosurvival intracellular O₂(-):H₂O₂ ratio and confers anoikis resistance to tumors. *Cancer Cell*. 2011;19(3):401-415. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.018.
 - 32 Lin EY, Pollard JW. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res*. 2007;67(11):5064-5066. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0912.

- 33 Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796(1):11-18. doi:10.1016/j.bbcan.2009.02.004.
- 34 Swales C, Athanasou NA, Knowles HJ. Angiopoietin-like 4 is over-expressed in rheumatoid arthritis patients: association with pathological bone resorption. *PLoS One*. 2014;9(10):e109524. doi:10.1371/journal.pone.0109524.
- 35 Zhang W, Bado I, Wang H, Lo H-C, Zhang XH-F. Bone Metastasis: Find Your Niche and Fit in. *Trends Cancer*. 2019;5(2):95-110. doi:10.1016/j.trecan.2018.12.004.
- 36 Promega. pGL4.14[luc2/Hygro] Vector Certificate of Analysis 9PIE669.
- 37 Promega. CellTiter-Glo Protocol.
- 38 Promega. Caspase-Glo® 3/7 Assay Protocol.
- 39 Bio-Rad Laboratories. Quick Start™ Bradford Protein Assay Protocol.
- 40 Macherey-Nagel™. NucleoSpin® RNA Protocol.
- 41 Eppendorf. Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen Protokoll.
- 42 Promega. GoTaq® Flexi DNA Polymerase Product Information 9PIM829.
- 43 Promega. GoTaq(R) qPCR Master Mix Technical Manual TM318.
- 44 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- 45 Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Biochemie*. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012.
- 46 Li B, Cai S-Y, Boyer JL. The role of the retinoid receptor, RAR/RXR heterodimer, in liver physiology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021;1867(5):166085. doi:10.1016/j.bbadis.2021.166085.
- 47 Polcz ME, Barbul A. The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutr Clin Pract*. 2019;34(5):695-700. doi:10.1002/ncp.10376.
- 48 Zinder R, Cooley R, Vlad LG, Molnar JA. Vitamin A and Wound Healing. *Nutr Clin Pract*. 2019;34(6):839-849. doi:10.1002/ncp.10420.
- 49 Yoshinaga M, Kitamura Y, Chaen T, et al. The simultaneous expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta and cyclooxygenase-2 may

- enhance angiogenesis and tumor venous invasion in tissues of colorectal cancers. *Dig Dis Sci*. 2009;54(5):1108-1114. doi:10.1007/s10620-008-0465-x.
- 50** Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, et al. Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(31):12890-12895. doi:10.1073/pnas.0705505104.
- 51** Fallone F, Deudon R, Muller C, Vaysse C. Cancer du sein, obésité et tissu adipeux - Un trio à haut risque. *Med Sci (Paris)*. 2018;34(12):1079-1086. doi:10.1051/medsci/2018298.
- 52** Xu X, Jin T. The Novel Functions of the PLC/PKC/PKD Signaling Axis in G Protein-Coupled Receptor-Mediated Chemotaxis of Neutrophils. *J Immunol Res*. 2015;2015:817604. doi:10.1155/2015/817604.
- 53** Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol*. 2018;48:36-52. doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.012.
- 54** Virji MA, Steffes MW, Estensen RD. Phorbol myristate acetate: effect of a tumor promoter on insulin release from isolated rat islets of Langerhans. *Endocrinology*. 1978;102(3):706-711. doi:10.1210/endo-102-3-706.
- 55** Nakayama T, Hirakawa H, Shibata K, Abe K, Nagayasu T, Taguchi T. Expression of angiopoietin-like 4 in human gastric cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion. *Oncol Rep*. 2010;24(3):599-606. doi:10.3892/or_00000897.
- 56** Mizuno K, Noda K, Ueda Y, et al. UCN-01, an anti-tumor drug, is a selective inhibitor of the conventional PKC subfamily. *FEBS Letters*. 1995;359(2-3):259-261. doi:10.1016/0014-5793(95)00042-8.
- 57** Ma CX, Ellis MJC, Petroni GR, et al. A phase II study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137(2):483-492. doi:10.1007/s10549-012-2378-9.
- 58** Li T, Christensen SD, Frankel PH, et al. A phase II study of cell cycle inhibitor UCN-01 in patients with metastatic melanoma: a California Cancer Consortium trial. *Invest New Drugs*. 2012;30(2):741-748. doi:10.1007/s10637-010-9562-8.
- 59** Steelman LS, Chappell WH, Akula SM, et al. Therapeutic resistance in breast cancer cells can result from deregulated EGFR signaling. *Adv Biol Regul*. 2020;78:100758. doi:10.1016/j.jbior.2020.100758.

- 60** Khan S. Wogonin and alleviation of hyperglycemia via inhibition of DAG mediated PKC expression. A brief insight. *Protein Pept Lett.* 2021. doi:10.2174/0929866528666211027113349.
- 61** Moreira KG, do Prado TP, Mendes NF, et al. Accelerative action of topical piperonylic acid on mice full thickness wound by modulating inflammation and collagen deposition. *PLoS One.* 2021;16(10):e0259134. doi:10.1371/journal.pone.0259134.
- 62** Kakkassery V, Wirtz C, Schargus M, et al. Epidermal Growth Factor Is Increased in Conjunctival Malignant Melanoma. *In Vivo.* 2021;35(6):3603-3612. doi:10.21873/invivo.12666.
- 63** Steendam CMJ, Peric R, van Walree NC, et al. Randomized phase III study of docetaxel versus docetaxel plus intercalated erlotinib in patients with relapsed non-squamous non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2021;160:44-49. doi:10.1016/j.lungcan.2021.08.002.
- 64** Naruse T, Yanamoto S, Otsuru M, et al. Multicenter Retrospective Study of Weekly Cetuximab Plus Paclitaxel for Recurrent or Metastatic Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2021;41(11):5785-5791. doi:10.21873/anticancerres.15395.

Appendix

I Abbildungen

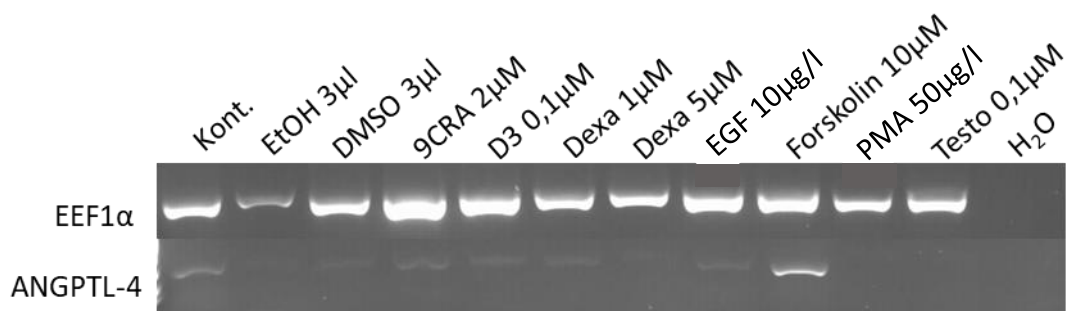


Abb. 27: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten primären MSCs. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

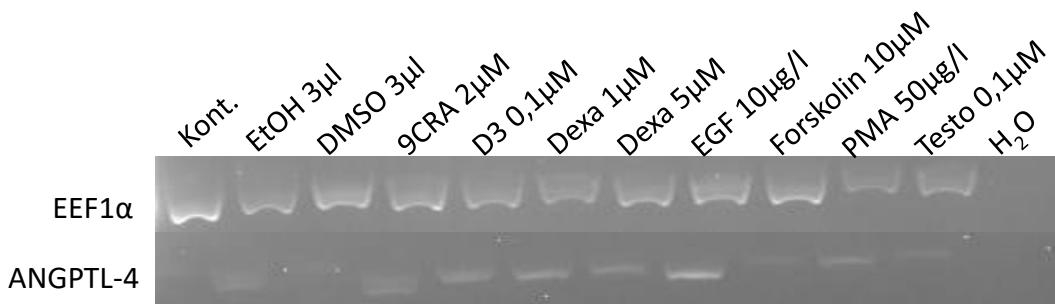


Abb. 28: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten primären MSCs. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

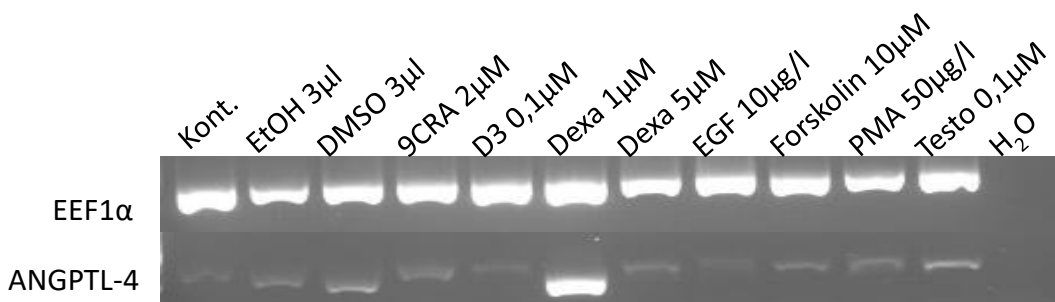


Abb. 29: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

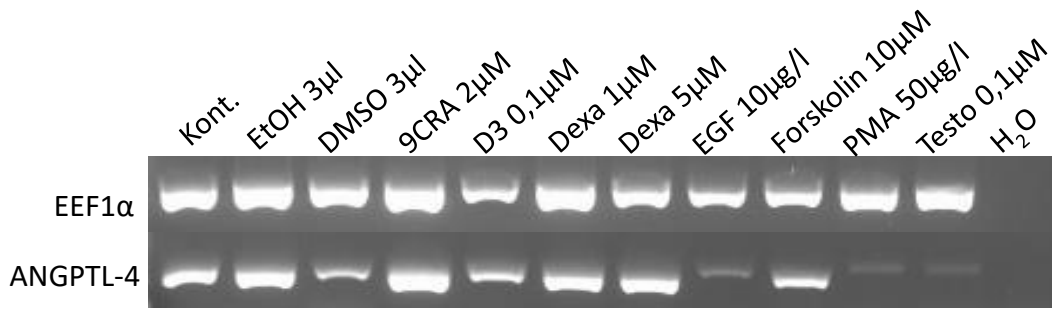


Abb. 30: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

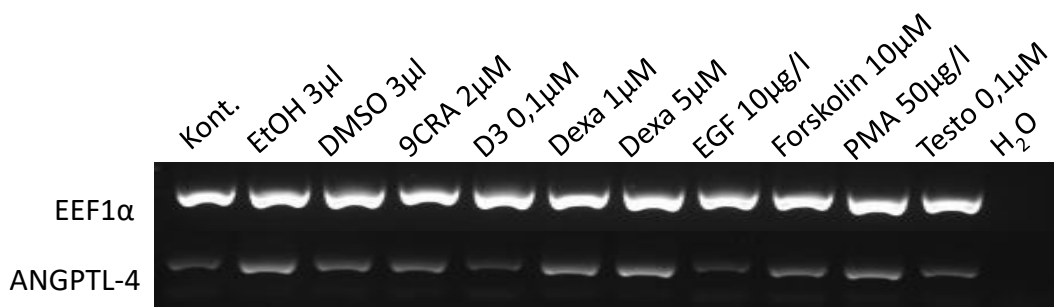


Abb. 31: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

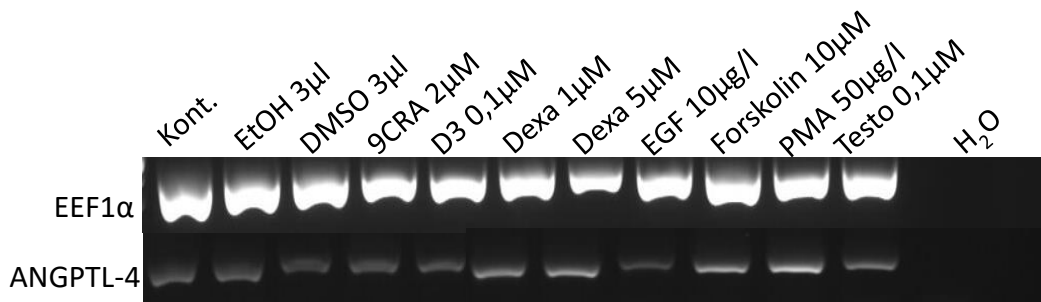


Abb. 32: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

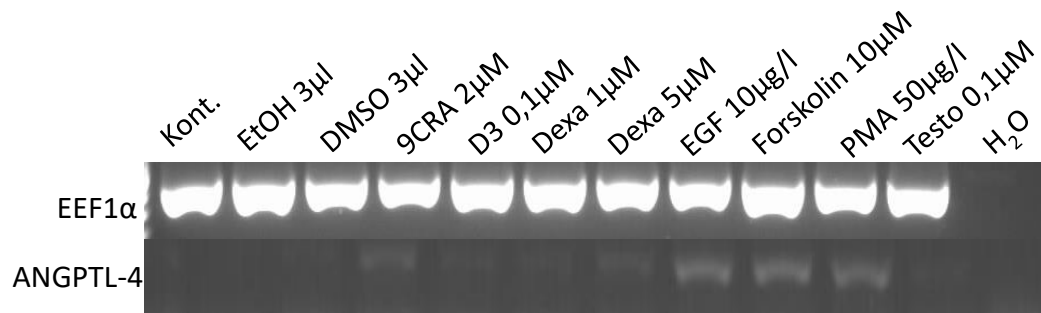


Abb. 33: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

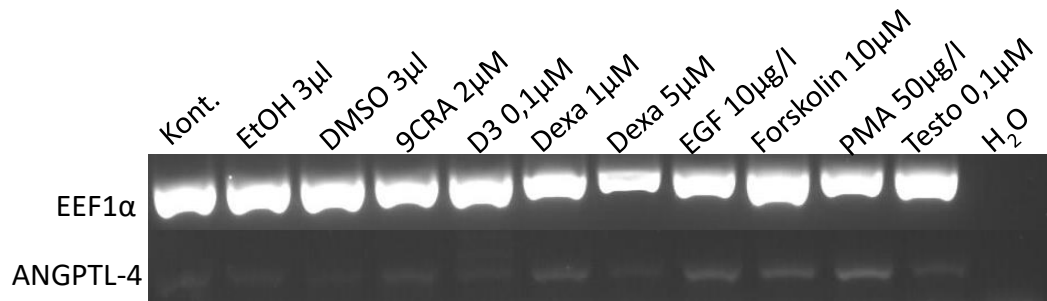


Abb. 34: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer EEF1 α PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen verwendet: Kontrolle aus unstimulierten Zellen, Ethanol, DMSO, 9-cis-Retinsäure (9CRA); 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (D3), Dexamethason (Dexa), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Forskolin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Testosteron (Testo), Negativkontrolle (H₂O).

II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
9CRA	9-cis-Retinsäure
AK	Antikörper
ANGPTL-4	Angiopoetin-like 4
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	All-trans-Retinsäure
BNP	Bone morphogenetic proteins
BSA	Bovines Serumalbumin
C3	Dritter Halswirbel
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomographie
D3	1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEVD	Aminosäuresequenz aus Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure
Dexa	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	Östrogen
EEF1 α	Eukaryotic Elongation Factor 1 Alpha
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EtOH	Ethanol
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HSPCs	Hematopoietic stem and progenitor cell
IL-6	Interleukin-6
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mitogen-activated protein
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSC	Mesenchymale Stromazelle
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cell
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RANK	Rezeptor Aktivator von NF- κ B
RANKL	Rezeptor Aktivator von NF- κ B Ligand
rDNase	Rekombinante Desoxyribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SEM	Standardfehler
SPECT	Einzelphotonen- Emissionscomputertomographie
T3	Triiodthyronin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TERT	Telomerase reverse transcriptase
Testo	Testosteron
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
UV	Ultraviolett
WNT	Wingless Int-1
ZNS	Zentrales Nervensystem
β -ME	β -Mercaptoethanol

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Regulation des Knochenstoffwechsels.....	2
Abb. 2: Schlüsselstellen bei der Entstehung von Knochenmetastasen	9
Abb. 3: Vektor pGL4.14 von Promega.....	18
Abb. 4: Viabilitätsmessung an hMSC-TERT nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lipopolysacchariden (LPS) und Testosteron (Testo).....	30
Abb. 5: Apoptosemessung an hMSC-TERT nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lipopolysacchariden (LPS) und Testosteron (Testo).	31
Abb. 6: Luciferaseaktivität bezogen auf den Gesamtproteingehalt nach Stimulation von mit ANGPTL-4 Promotor in pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen.	32
Abb. 7: Luciferaseaktivität bezogen auf den Gesamtproteingehalt nach Stimulation von mit ANGPTL-4 Promotor in pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen.	33
Abb. 8: Luciferaseaktivität bezogen auf den Gesamtproteingehalt nach Stimulation von mit ANGPTL-4 Promotor in pGL4.14 transfizierten MM.1S-Zellen.	33
Abb. 9: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte einer ANGPTL-4 und einer $EEF1\alpha$ PCR aus unstimulierten Zellen.....	34
Abb. 10: Representative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer $EEF1\alpha$ PCR aus stimulierten primären MSCs.	35
Abb. 11: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten primären MSCs.....	36
Abb. 12: Representative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer $EEF1\alpha$ PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen.	37
Abb. 13: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen.	38
Abb. 14: Representative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer $EEF1\alpha$ PCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen.....	38
Abb. 15: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen.	39
Abb. 16: Representative Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer $EEF1\alpha$ PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen.	40
Abb. 17: Densitometrische Auswertung der ANGPTL-4 PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen.	40
Abb. 18: Auswertung der ANGPTL-4 qPCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode.	41

Abb. 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte einer ANGPTL-4 qPCR aus stimulierten MCF-7-Zellen.	42
Abb. 20: Auswertung der ANGPTL-4 qPCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode	43
Abb. 21: Fluoreszenzimmunzytologie mit unstimulierten Zellkulturen zum Vergleich der basalen ANGPTL-4 Expression zwischen MDA-MB-231-Zellen, primären MSCs und der Co-Kultur.....	44
Abb. 22: Densitometrische Auswertung des Alexa Fluor 488-Kanals der Immunzytologie aus unstimulierten Zellen.....	45
Abb. 23: Fluoreszenzimmunzytologie mit stimulierten MDA-MB-231-Zellen.....	46
Abb. 24: Fluoreszenzimmunzytologie mit stimulierten primären MSCs.....	47
Abb. 25: Fluoreszenzimmunzytologie mit stimulierter Co-Kultur aus MDA-MB-231-Zellen und primären MSCs.	49
Abb. 26: Densitometrische Auswertung des Alexa Fluor 488-Kanals der Immunzytologie aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen, primären MSCs und der Co-Kultur	50
Abb. 27: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten primären MSCs.	Appendix
Abb. 28: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten primären MSCs.	Appendix
Abb. 29: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen.....	Appendix
Abb. 30: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten hMSC-TERT-Zellen.....	Appendix
Abb. 31: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen.	Appendix
Abb. 32: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten MDA-MB-231-Zellen.	Appendix
Abb. 33: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen.....	Appendix
Abb. 34: Elektrophorese der Produkte einer ANGPTL-4 und einer <i>EEF1α</i> PCR aus stimulierten MCF-7-Zellen.....	Appendix

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien	11
Tabelle 2: Zellen.....	14
Tabelle 3: Medien zur Zellkultur.....	14
Tabelle 4: Enzyme.....	15
Tabelle 5: Kits	15
Tabelle 6: Geräte	16
Tabelle 7: Software	16
Tabelle 8: Primer	17
Tabelle 9: Antikörper	17
Tabelle 10: Vektoren.....	18
Tabelle 11: In silico-Analyse des ANGPTL-4 Promotors.	28

VI Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regina Ebert, die mich während meiner Promotion hervorragend betreut hat. Sowohl bei fachlichen als auch organisatorischen Fragen stand sie mir stets mit konkreten Ratschlägen zur Seite, sodass wir immer zügig praxisorientierte Lösungen finden konnten. Außergewöhnlich ist ihr ausgewogener und menschlicher Führungsstil, der mir über die komplette Dauer meiner Promotion die erforderliche Struktur und Leitung vorgab, aber auch die für eigene Ideen und Lösungsvorschläge notwendige Freiheit gewährte.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Torsten Blunk sowie Frau Dr. Ellen Leich für die Erstellung der Zweitgutachten.

Für die hervorragende Arbeitsatmosphäre möchte ich mich auch beim kompletten Team, bestehend aus Frau Dr. Sigrid Müller-Deubert, Herrn Stephan Altmann, Herrn Martin Kuric, Frau Wyonna Rindt, Frau Doris Schneider, Frau Jutta Meißner-Weigel, Frau Melanie Krug und Frau Sabine Zeck bedanken. Bei praktischen Fragen konnte ich mich stets an alle Mitglieder wenden. Dies gilt in besonderem Maße für Frau Sabine Zeck, auf deren Unterstützung im Laborbetrieb ich mich immer verlassen konnte. Vielen Dank auch an Frau Wyonna Rindt für die Hilfe bei diversen IT-Problemen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit und für die Unterstützung im gesamten Studium bedanken.

