

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Direktor: Prof. Dr. med. Nicolai Maass)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Etablierung eines Modells intraossärer Inokulation von  
osteotropen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen im  
Xenograft-Mausmodell zur Untersuchung des  
Tumorstwachstums in Abhängigkeit der Expression von  
TRAIL-Rezeptor 2**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Fiona Leist-Kiessling  
aus Lahnstein

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Schem

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marcus Both

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.11.2021

Gez.: Prof. Dr. Norbert Arnold

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Darstellungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie und Grundlagen des Mammakarzinoms .....	1
1.2 TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)-Rezeptoren .....	2
1.3 Biologische Bedeutung von TRAIL .....	3
1.4 Die Rolle des TRAIL-R2 bei der Metastasierung .....	5
1.5 Die Rolle des epithelialen Phänotyps bei der Metastasierung .....	6
1.6 Fragestellung der vorliegenden Promotionsarbeit .....	7
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Tierexperimentelle Studie .....	9
2.2 Versuchstiere.....	9
2.3 Zellen.....	9
2.4 Versuchsablauf.....	10
2.5 In vivo Biolumineszenz-Bildgebung .....	11
2.6 Mikro-Computertomographie (μCT).....	11
2.7 Histologische Methoden .....	12
2.7.1 Formalinfixierung, Entkalkung und Paraffineinbettung.....	12
2.7.2 Anfertigung von Schnittpräparaten.....	13
2.7.3 Durchführung der Färbungen/ Färbeprotokolle .....	14
2.8 Statistik.....	20
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
3.1 Darstellung der Ergebnisse .....	21
3.2 Allgemeine Beobachtungen.....	21
3.3 Auswertung der in vivo Biolumineszenz-Bildgebung .....	22
3.3.1 Signalfläche .....	22

3.3.2	Signalintensität.....	23
3.3.3	Zusammenfassung der Biolumineszenzergebnisse.....	24
3.4	Auswertung der Mikro-Computertomographie.....	25
3.4.1	Relatives Knochenvolumen (BV/TV).....	25
3.4.2	Relative Knochenmineraldichte (BMD) .....	26
3.4.3	Relative Trabekelanzahl (Tb.N), relative Trabekeldicke (Tb.Th) und relativer Trabekelabstand (Tb.Sp).....	26
3.4.4	Zusammenfassung der Mikro-CT Ergebnisse.....	27
3.5	Auswertung der histologischen Untersuchungen.....	28
3.5.1	Tumorausdehnung anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung....	28
3.5.2	TRAP-Färbung.....	29
3.5.3	Ki-67-Proliferationsindex.....	30
3.5.4	Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse.....	32
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>33</b>
4.1	Methodenkritik .....	34
4.2	Ergebnisdiskussion.....	37
4.3	Klinische Relevanz und Ausblick.....	41
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>59</b>
7.1	Ergebnistabellen.....	59
7.1.1	Ergebnistabellen Biolumineszenzbildgebung.....	59
7.1.2	Ergebnistabellen Mikro-CT-Aufnahmen .....	61
7.1.3	Ergebnistabellen Masson-Goldner-Trichrom-Färbung .....	63
7.1.4	Ergebnistabelle TRAP-Färbung .....	64
7.1.5	Ergebnistabellen Ki-67-Färbung .....	64
7.2	Abbildungen .....	65
7.2.1	Biolumineszenz-Bildgebung.....	65

7.2.2	Histologische Abbildungen: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung.....	66
7.3	Genehmigung des Tierversuchsantrags.....	67
7.4	Teilnahmebestätigung des Seminars „Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung“ .....	68
7.5	Danksagung .....	70
7.6	Veröffentlichung.....	71

## Darstellungsverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Materialien für die Formalinfixierung, Entkalkung und Paraffineinbettung .....	13
<b>Tabelle 2:</b> Angesetzte Lösungen für die Formalinfixierung und Entkalkung.....	13
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Materialien für die HE-Färbung .....	14
<b>Tabelle 4:</b> Angesetzte Lösungen für die HE-Färbung .....	15
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Materialien für die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung .....	16
<b>Tabelle 6:</b> Angesetzte Lösungen für die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung .....	16
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Materialien für die TRAP-Färbung.....	18
<b>Tabelle 8:</b> Angesetzte Lösungen für die TRAP Färbung.....	18
<b>Tabelle 9:</b> Verwendeter Primärantikörper für die KI-67-Färbung .....	19
<b>Tabelle 10:</b> Anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelte Signalfächen (mm <sup>2</sup> ) und Signalintensitäten (cps) in Woche 7 und 9 je Versuchstier. ....	59
<b>Tabelle 11:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Signalfächen (mm <sup>2</sup> ) in Woche 7 und 9 der zwei Gruppen. ....	59
<b>Tabelle 12:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Signalintensitäten (cps) in Woche 7 und 9 der zwei Gruppen. ....	60
<b>Tabelle 13:</b> Anstieg der Signalfäche von Woche 7 zu Woche 9 je Versuchstier. ....	60
<b>Tabelle 14:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Veränderungen der Signalfächen von Woche 7 zu Woche 9 der zwei Gruppen.....	60
<b>Tabelle 15:</b> Anstieg der Signalintensität von Woche 7 zu Woche 9 je Versuchstier. ....	60
<b>Tabelle 16:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Veränderungen der Signalintensitäten (cps) von Woche 7 zu 9 der zwei Gruppen.....	61
<b>Tabelle 17:</b> Anhand der MikroCT-Aufnahmen ermittelten relativen Knochenmineraldichten (BMD), relativen Knochenvolumina (BV/TV), relativen Trabekelanzahlen (Tb.N), relativen Trabekeldicken (Tb.Th) und relativen Trabekelabstände je Versuchstier ab Woche 5. ....	61

<b>Tabelle 18:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der MikroCT-Aufnahmen ermittelten relativen Knochenmineraldichten (BMD) der Versuchsgruppen. ....	62
<b>Tabelle 19:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der MicroCT-Aufnahmen ermittelten relativen Knochenvolumina (BV/TV) der Versuchsgruppen. ....	62
<b>Tabelle 20:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der MicroCT-Aufnahmen ermittelten relativen Trabekelanzahlen (Tb.N) der Versuchsgruppen. ....	62
<b>Tabelle 21:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der MicroCT-Aufnahmen ermittelten relativen Trabekeldicken (Tb.Th) der Versuchsgruppen. ....	63
<b>Tabelle 22:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der MicroCT-Aufnahmen ermittelten relativen Trabekelabstände (Tb.Sp) der Versuchsgruppen. ....	63
<b>Tabelle 23:</b> Anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ermittelte Tumorflächen (mm <sup>2</sup> ) je Versuchstier. ....	63
<b>Tabelle 24:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ermittelten Tumorausdehnungen (mm <sup>2</sup> ) der zwei Gruppen. ....	63
<b>Tabelle 25:</b> Anhand der TRAP-Färbung ermittelte Osteoklastenzahlen pro mm Knochenfläche je Versuchstier. ....	64
<b>Tabelle 26:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der TRAP-Färbung ermittelten Osteoklastenzahlen pro mm Knochenoberfläche der zwei Gruppen. ....	64
<b>Tabelle 27:</b> Anhand der Ki-67-Färbung ermittelte Ki-67-Indexe je Versuchstier. ....	64
<b>Tabelle 28:</b> Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der KI67-Färbung ermittelten Ki-67 Indexe (%) der zwei Gruppen. ....	64
 <b>Abbildung 1:</b> Der Teufelskreis (Circulus vitiosus) der Knochendestruktion bei Knochenmetastasen (modifiziert nach Roodman, 2004 [14]) .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Prozentualer Anteil der Mäusebeine der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe, die einen Tumor entwickelt haben. ....	22

<b>Abbildung 3:</b> Darstellung der Fläche des Biolumineszenzsignals der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe in Woche sieben und neun anhand der Biolumineszenzmessung und Anstieg der Tumorgröße von Woche sieben zu neun. .....	23
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung der Signalintensität der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe in Woche sieben und neun anhand der Biolumineszenzmessung und Anstieg der Signalintensität von Woche sieben zu Woche neun. ....	24
<b>Abbildung 5:</b> Repräsentative Biolumineszenz-Bildgebung eines Versuchstieres in Woche neun. Die mit der TRAIL-R2 Knockdown-Zelllinie behandelte Tibia zeigt im Gegensatz zu der mit der Kontrollzelllinie behandelten Tibia ein stärkeres Biolumineszenz-Signal. ....	24
<b>Abbildung 6:</b> Gezeigt sind die relativen Veränderungen der Knochenvolumina (BV/TV) ab der fünften Woche.....	25
<b>Abbildung 7:</b> Relative Veränderungen der Knochenmineraldichte (BMD) ab der fünften Woche. ....	26
<b>Abbildung 8:</b> Liniendiagramme zur Darstellung des relativen Trabekelabstandes, der relativen Trabekeldicke und der relativen Trabekelanzahl ab Woche fünf.....	27
<b>Abbildung 9:</b> Exemplarische 3D-Rekonstruktion: Wöchentliche Untersuchung der Mäuse mittels in vivo Micro-CT. Die Baseline Scans und Follow-up Scans wurden registriert. Repräsentative linke Tibia einer Maus ohne und repräsentative rechte Tibia einer Maus mit Tumorbefall. ....	28
<b>Abbildung 10:</b> Durchschnittliche Größe der Querschnitte der Tumorareale der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe. ....	29
<b>Abbildung 11:</b> Repräsentative Bilder der Knieregion mit Tumorausdehnung der zwei Gruppen, Masson-Goldner-Trichrom gefärbt. Die Pfeile zeigen auf die Tumorareale. .....	29
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung der mittleren Anzahl der TRAP positiven Osteoklasten pro Millimeter Knochenoberfläche entlang der Tumor-Knochen-Grenze. ....	30
<b>Abbildung 13:</b> Repräsentative TRAP gefärbte Tumorareale der zwei Gruppen.....	30
<b>Abbildung 14:</b> Balkendiagramm zur Darstellung des Ki-67-Proliferationsindex der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe anhand der immunhistochemischen Färbung. .....	31
<b>Abbildung 15:</b> Repräsentative Ki-67 gefärbte Tumorareale der zwei Gruppen.....	31



<b>Abbildung 16:</b> Biolumineszenz-Bildgebung der Versuchstiere mit Tumorausbildung in Woche neun. ....	65
<b>Abbildung 17:</b> Mittels ImageJ zusammengefügte Bilder der Knieregion der Versuchstiere mit Tumorausbildung, Masson-Goldner-Trichrom gefärbt. Die Pfeile zeigen auf die Tumorareale. ....	66

# Abkürzungsverzeichnis

$\mu$ A ..... Mikroampere  
 $\mu$ CT ..... Micro-Computertomographie  
 $\mu$ l ..... Mikroliter  
 $\mu$ m ..... Mikrometer  
abs. .... absolut  
Apaf-1 ..... Apoptose-Protease  
aktivierender Faktor 1  
Aqua dest ..... Aqua destillata  
ATP ..... Adenosintriphosphat  
Bak Bcl-2 homologous antagonist/killer  
Bax ..... Bcl-2-associated X protein  
Bcl-2 ..... B-cell lymphoma 2  
Bid ..... BH3 interacting domain death  
agonist  
BMD ..... Bone Mineral Density  
BV/TV ..... Bone volume/Total volume  
bzw. .... beziehungsweise  
cps ..... Counts per second  
CXCR4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptors  
4  
DcR1 ..... Decoy receptor 1  
DcR2 ..... Decoy receptor 2  
DIABLO Direct IAP binding protein with  
low pl  
DISC ..... Death-Inducing Signalling  
Complex  
DR4 ..... Death receptor 4  
DR5 ..... Death receptor 5  
EDTA ..... Ethylendiamintetraessigsäure  
EMT ..... Epithelial-mesenchymale  
Transition  
ERK .... Extrazellulär regulierte Kinasen

EtOH ..... Ethanol  
FADD.. Fas-assoziiertes Todesdomän-  
Protein  
g ..... Gramm  
GA ..... Georgia  
GmbH & Co. KG ..... Gesellschaft mit  
beschränkter Haftung & Compagnie  
Kommanditgesellschaft  
HCl ..... Chlorwasserstoff  
HE ..... Hämatoxylin-Eosin  
HER2 .. Human epidermal growth factor  
receptor 2  
HMGA2 High mobility group AT-hook 2  
H-Ras ..... Harvey-Ras Protein  
IA ..... Iowa  
IGF-1 ..... Insulin-like Growth Factor-1  
IL ..... Interleukin  
JNK ..... c-Jun-N-terminale Kinasen  
kg ..... Kilogramm  
KG ..... Körpergewicht  
kVp ..... kilovoltage peak  
let-7 ..... Lethal-7  
Lin28B ..... Lin-28-Homolog B  
MAPK ..... Mitogen aktivierte  
Proteinkinasen  
MCP-1 ..... Monocyte chemoattractant  
protein 1  
MET ..... Mesenchymal-epitheliale  
Transition  
mg ..... Milligramm  
miRNA ..... mikro RNA  
mm ..... Millimeter

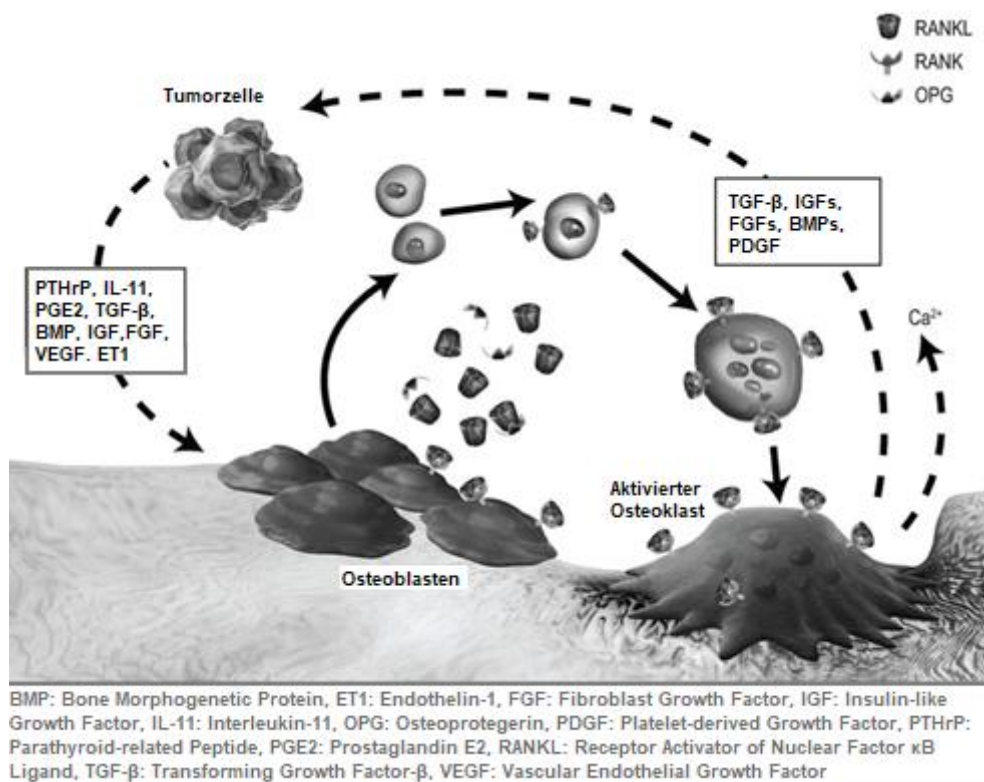
mm <sup>2</sup> .....	Quadratmillimeter	Tb.Sp .....	Trabecular Separation
MMP-9 .....	Matrix-Metalloproteinase-9	Tb.Th .....	Trabecular Thickness
MMPs .....	Matrix-Metalloproteasen	tBid .....	trunkiertes Bid
ms.....	Millisekunde	TGF-β ...	Transforming Growth Factor β
NaOH.....	Natriumhydroxid	TNF .....	Tumornekrosefaktor
NF-κB.....	Nuclear Factor kappa B	TNF-α .....	Tumornekrosefaktor-α
OPG.....	Osteoprotegerin	TRAIL .	TNF-related apoptosis inducing ligand
PBS .....	Phosphate buffered saline	TRAIL-R.....	TRAIL-Rezeptor
PGE2 .....	Prostaglandin E2	TRAP .....	Tartrat-resistente saure Phosphatase
PI3K.....	Phosphoinositid-3-Kinasen	TRICK2 .	TRAIL receptor inducer of cell killing-2
PKB .....	Proteinkinase B	TRID ....	TNF-R1 internalization domain
PKC .....	Proteinkinase C	TRUNDD.....	TRAIL receptor with a truncated death domain
PTHrP.....	Parathormon-related Protein	USA .....	United States of America
RANK.....	Receptor Activator of NF-κB	VOI .....	Volume of interest
RANKL.....	Receptor Activator of NF-κB Ligand	ZEB1 .....	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
RNA.....	Ribonukleinsäure	ZEB2.....	Zinc finger E-box-binding homeobox 2
SCID .....	Severe combined immunodeficiency		
SDF-1 ....	Stromal Cell-derived Factor 1		
Smac .....	Second mitochondria-derived activator of caspases		
Tb.N.....	Trabecular Number		

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Grundlagen des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit [1, 2]. Auch in Deutschland stellt laut Robert-Koch-Institut Brustkrebs mit rund 69.000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung der Frau dar [3]. Etwa jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs und fast 30 Prozent der Frauen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Die Überlebenschancen der an Brustkrebs erkrankten Patienten haben sich im Laufe der letzten Jahre durch Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der Erkrankung verbessert. Die aktuelle relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen liegt bei 87 Prozent. Trotzdem ist das Mammakarzinom nach wie vor die häufigste Krebstodesursache von Frauen in Deutschland [3]. Prognosebestimmend sind unter anderem die Faktoren Größe des Primärtumors, axillärer Lymphknotenbefall, histologischer Grad, Hormonrezeptorstatus, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)-Status und Fernmetastasierung [4]. Brustkrebszellen haben die biologische Eigenschaft, sich über den lymphatischen und hämatologischen Weg auszubreiten und Metastasen zu bilden [5]. Das Risiko für ein Rezidiv, auch in distanten Organen kann bis zu 30 Prozent betragen [4]. Der Knochen ist hier der häufigste Ort der Fernmetastasierung bei Brustkrebs, rund 70 Prozent der Betroffenen im Stadium IV entwickeln skelettale Metastasen [6, 7]. Knochenmetastasen korrelieren mit einer schlechten Langzeitprognose und haben eine negative Auswirkung auf die Lebensqualität der Patienten [6, 7]. Es können Komplikationen wie Knochenschmerz, pathologische Frakturen, Hyperkalzämie und Nervenkompressionssyndrome auftreten [8, 9]. Bei über einem Drittel der Patienten mit primärer Diagnose findet man disseminierende Tumorzellen im Knochenmark, die einen negativen prognostischen Faktor darstellen [10, 11]. Diese ruhenden, inaktiven Tumorzellen sind in der Lage, der zytostatischen Therapie zu entgehen und Jahre später klinisch apparente Metastasen zu bilden [12]. Brustkrebsmetastasen haben meist einen osteolytischen Effekt auf den Knochen und bedingen eine Dysregulation des normalen Knochenremodelings im Sinne einer gestörten Balance von Osteoklasten und Osteoblasten [8]. Brustkrebszellen produzieren in der Knochenmikroumgebung Osteoklasten-stimulierende Faktoren wie das Parathormon-related Protein (PTHrP), sowie

Prostaglandin E2 (PGE2) und Interleukin-11 (IL-11) [8, 13]. Diese Faktoren erhöhen die Expression von Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) durch Osteoblasten [8, 9, 14]. RANKL bindet an seinen Rezeptor RANK auf Osteoklastenvorstufen, es kommt zu der Differenzierung zu Osteoklasten und der Knochenabbau wird induziert [8, 9, 14]. Durch die Knochenresorption werden Wachstumsfaktoren wie der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und der Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) aus der Knochenmatrix freigesetzt und die extrazelluläre Calciumkonzentration steigt an, wodurch die Tumorzellproliferation und damit auch die Produktion von PTHrP gefördert werden [15-17]. Es entsteht ein selbsterhaltender Teufelskreis (Circulus vitiosus) aus Knochenabbau und Tumorwachstum [8, 9, 14].



**Abbildung 1:** Der Teufelskreis (Circulus vitiosus) der Knochendestruktion bei Knochenmetastasen (modifiziert nach Roodman, 2004 [14])

## 1.2 TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)-Rezeptoren

Der Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie, die eine Gruppe von Zytokinen darstellt [18-20]. TRAIL wurde erstmals 1995 von Wiley et al. und 1996 von Pitti et al., beschrieben [18-20]. Es sind fünf verschiedene, zu der TNF-Rezeptor Familie gehörende TRAIL-Rezeptoren

bekannt. Die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5/TRICK2 haben eine zytoplasmatische Todesdomäne („death domain“) und können nach Bindung ihres Liganden TRAIL eine Apoptose auslösen [21-23]. Weiterhin gibt es noch die Decoyrezeptoren TRAIL-R3/DcR1/TRID und TRAIL-R4/DcR2/TRUNDD, die TRAIL binden, aber keine Apoptose induzieren können [21, 24]. Der TRAIL-R3 besitzt keine zytoplasmatische Domäne und ist über eine Glycosylphosphatidylinositolverbindung an der Zelloberfläche verankert [21, 25]. Im Gegensatz zu TRAIL-R3 weist TRAIL-R4 eine zytoplasmatische Domäne auf, diese jedoch mit einer nicht-funktionellen, gekürzten Todesdomäne [26, 27]. Der fünfte TRAIL-Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) liegt in löslicher, dimerer Form vor [28]. Neben TRAIL bindet OPG den Liganden RANKL und ist an der Regulation der Osteoklastogenese beteiligt [28].

### **1.3 Biologische Bedeutung von TRAIL**

Die bekannteste Funktion des Liganden TRAIL ist die durch die Aktivierung der Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 vermittelte Apoptose [29, 30]. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. TRAIL induziert die Apoptose bevorzugt in erkrankten Zellen, während gesunde Zellen ausgespart werden [29, 30]. Die Bindung von TRAIL an die Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 führt zu der Oligomerisation der intrazellulären Todesdomänen der Rezeptoren und damit zu der Rekrutierung des Fas-assoziierten Todesdomän-Proteins (FADD) und der Procaspasen 8 und 10 [31-34]. Durch den sich bildenden Proteinkomplex, der als Death-Inducing Signalling Complex (DISC) bezeichnet wird, kommt es zu der Aktivierung der rekrutierten Caspasen [35]. Die aktivierten Caspasen 8 und 10 können zu der proteolytischen Spaltung und damit zu der Aktivierung der Caspase 3 führen, die durch eine Caspasenkaskade direkt die Apoptose auslösen kann [36, 37]. Außerdem können sie zur Spaltung von BH3 interacting domain death agonist (Bid) führen, einem proapoptotischen Mitglied der B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) Familie [36]. Das gespaltene Bid (tBid) stellt eine Verbindung zwischen dem durch TRAIL-Rezeptoren vermittelten extrinsischen Signalweg und dem intrinsischen Weg dar [20]. Das tBid aktiviert an der äußeren Mitochondrienmembran die proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bcl-2 associated X protein (Bax) und Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak), wodurch es zu einer Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren wie Second mitochondria-derived activator of

caspases/direct IAP binding protein with low pI (Smac/DIABLO) kommt [37, 38]. Cytochrom c und der Apoptose-Protease aktivierende Faktor 1 (Apaf-1) bilden das Apoptosom, das die Caspase 9 aktiviert [20, 37, 39]. Durch die Caspase 9 kommt es zur Spaltung der Procaspase 3, die über verschiedene Effektorcaspasen zur Apoptose führt [20, 37].

Die Fähigkeit von TRAIL, selektiv in Krebszellen eine Apoptose zu induzieren, führte zu der Entwicklung von rekombinantem TRAIL und agonistischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 spezifischen Antikörpern für die Tumorthherapie [40-42]. Klinische Untersuchungen zu TRAIL-Agonisten zeigten jedoch keinen eindeutigen therapeutischen Vorteil für die Patienten [41, 42]. Mögliche Erklärungen dafür waren die Verwendung relativ schwacher Agonisten, das Fehlen von Biomarkern zur Identifizierung der für die TRAIL-R Agonisten Therapie geeigneten Patienten und die Resistenzen vieler Tumorzelllinien gegenüber TRAIL-Monotherapie und TRAIL induzierter Apoptose [41, 42]. Trotz der Entwicklung hoch aktiver TRAIL-Agonisten und verschiedener Mechanismen um die TRAIL-Resistenz zu überwinden, zeigte sich bisher nur ein limitierter therapeutischer Erfolg [41, 42].

Es hat sich gezeigt, dass TRAIL neben der pro-apoptotischen Wirkung auch nicht-apoptotische Signalwege auslösen kann [20, 43]. TRAIL führt unter anderem zu einer Aktivierung der Signalwege des Transkriptionsfaktors Nuclear Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), der Proteinkinase C (PKC), der Proteinkinase B (PKB), der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), der Src-Kinase und der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) [20, 43]. Zu der MAPK Familie gehören die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), die c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) und die p38-Kinasen [20, 43]. Daher kann TRAIL über diese onkogenen Signalwege antiapoptotisch, proinflammatorisch und proliferationsfördernd wirken [44-49]. Außerdem kann es zu einer gesteigerten Migration und Invasion und zu einer vermehrten Metastasierung kommen [50]. Beispiele hierfür sind unter anderem die TRAIL-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C und NF- $\kappa$ B, die in pankreatischen Adenokarzinomzellen zu Apoptoseresistenz führt und die TRAIL-induzierte Expression von den proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-8 und Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in pankreatischen Adenokarzinomzellen [44, 50].

Weiterhin weisen TRAIL-Rezeptoren noch eine nukleäre, Liganden-unabhängige Funktion auf [52]. Neben den TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die für die

oben genannten Funktionen zuständig sind, kommen TRAIL-Rezeptoren auch intrazellulär, im Zytoplasma und im Zellkern, vor [53-55]. Der nukleäre TRAIL-R2 kommt in Komplexen mit Proteinen (Microprocessor complex) vor und ist an der Hemmung der Reifung von miRNAs beteiligt, vor allem an der Reifung von let-7 [52]. Let-7 agiert als Tumorsuppressor [52]. Durch verringerte Level von let-7 kommt es zu einer erhöhten Expression von let-7 Zielproteinen wie High mobility group AT-hook 2 (HMGA2) und Lin-28-Homolog B (Lin28B) und damit zu einer gesteigerten Tumorzellproliferation [52]. Damit wirkt TRAIL-R2 im Zellkern über den negativen Einfluss auf die let-7 Reifung als Onkogen [52].

## **1.4 Die Rolle des TRAIL-R2 bei der Metastasierung**

Ganten et al. zeigten anhand von Gewebeproben von Patienten mit Mammakarzinom, dass die TRAIL-R1 Expression mit der Expression günstiger prognostischer Marker und die Expression von TRAIL-R2 und TRAIL-R4 mit nachteiligen prognostischen Markern und einem verminderten Gesamtüberleben von Brustkrebspatienten korreliert [55]. Im Gegensatz zu TRAIL-R1 korreliert eine hohe TRAIL-R2 Expression positiv mit dem Tumorgrad, dem Ki-67-Index, dem HER2/neu Status und der Präsenz von Lymphknotenmetastasen und negativ mit Bcl-2 und dem Alter der Patienten [55]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass TRAIL-R2 die Fähigkeit der Ausbildung von Knochenmetastasen bei Brustkrebs fördert [56]. Im Rahmen von in vitro und in vivo Versuchen wurde von Fritsche et al. eine osteotrope Variante der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 verwendet [56]. Diese Zelllinie (MDA-MB-231-BO) hat eine erhöhte Affinität zum Knochen als die Ursprungszelllinie MDA-MB-231, sie zeigt höhere Level der aktivierten Kinasen Src und Akt, verminderte Level des EMT Markers E-Cadherin und eine verstärkte Proliferation. Interessanterweise ist auch die TRAIL-R2 Expression in diesen Zellen stark erhöht [56]. Die Herunterregulation von TRAIL-R2 in diesen Zellen führte in vitro zu einer (Re-) Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin, einer verlangsamten Zellproliferation und zu einer verminderten Fähigkeit zur Migration [56]. In einem Tierversuch wurde severe combined immunodeficiency (SCID)-beige Mäusen intrakardial die Zelllinie MDA-MB-231-BO injiziert, entweder die Kontrollzelllinie oder die TRAIL-R2 Knockdown-Zelllinie [56]. Es zeigten sich mittels in vivo-Bildgebung (Tumorzell-Biolumineszenz) weniger Tumore im Knochen der Mäuse nach Herunterregulation von TRAIL-R2, 73 Prozent der Kontrollmäuse entwickelten



Metastasen und nur 27 Prozent der Versuchsmäuse [56]. Auch die Tumoranzahl und die Tumorgroße waren bei den Mäusen nach Injektion der TRAIL-R2 Knockdown-Zelllinie signifikant reduziert [56]. Die Beurteilung der Knochendestruktion anhand von Mikro-Computertomographie-Aufnahmen und histologischer Färbung zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen [56]. Fritsche et al. haben daher die Hypothese aufgestellt, dass die metastasenbedingte Knochendestruktion und die Osteoklastenaktivierung unabhängig vom TRAIL-R2 Expressionsstatus der Tumorzellen sind, der Knockdown von TRAIL-R2 schien also im Hinblick auf das Auswachsen der Metastasen im Knochen keinen hemmenden Einfluss zu haben [56]. Um die verminderte Metastasierungsfrequenz der Zellen mit einem TRAIL-R2 Knockdown zu erklären, wurde die Rolle des TRAIL-R2 beim sogenannten „Homing“, also der Ansiedlung der Tumorzellen aus dem Blutkreislauf in den Knochen, untersucht [56]. Weniger des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4/SDF-1-R) auf der Zelloberfläche, weniger Migration zum Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1) und eine verminderte Aktivität der Src-Kinase nach der Herunterregulation von TRAIL-R2 in MDA-MB-231-Zellen deuteten auf gestörte „Homing“-Mechanismen hin [56].

## **1.5 Die Rolle des epithelialen Phänotyps bei der Metastasierung**

Als Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet man den Vorgang, bei dem eine polarisierte, epitheliale Zelle durch multiple biochemische Veränderungen einen mesenchymalen Phänotyp annimmt und auf diese Weise hoch proliferativ und motil wird [57-59]. Die EMT spielt eine relevante Rolle bei der Tumorprogression und ist in Karzinomzellen mit erhöhter Aggressivität und invasivem und metastatischem Potential assoziiert [59, 60]. Die komplexen Prozesse der metastatischen Kaskade, beginnend mit Ablösen der Zellen von dem Primärtumor, der Intravasation, dem Überleben in der Zirkulation, der Extravasation und der frühen Kolonisation in den Knochen (Gründung ruhender Mikrometastasen in der Mikroumgebung des entfernten Organs), werden offenbar entscheidend durch den Wechsel der Zellen von einem epithelialen Zelltyp zu einem mesenchymalen Zelltyp (EMT) beeinflusst [61]. Die EMT ist charakterisiert durch eine Herunterregulation epithelialer Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und Cytokeratin und einer Heraufregulation mesenchymaler Marker wie Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin [58, 59, 62, 63]. Es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts [58, 59, 62, 63]. Außerdem werden

die phänotypischen Veränderungen durch spezifische Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, Zinc finger E-box-binding homebox 1 und 2 (ZEB1, ZEB2) und Twist beeinflusst [59, 63, 64]. Diese Faktoren haben eine hemmende Wirkung auf E-Cadherin und beeinflussen viele weitere bei der Invasion und Metastasierung beteiligte Moleküle wie unter anderem Matrix-Metalloproteasen (MMPs) [59, 63, 64]. Das Aufweisen epithelialer Eigenschaften von Metastasen führt zu der Annahme, dass der Prozess der EMT umkehrbar ist [63, 65]. Die reziproke Umwandlung von Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften zu Zellen mit epithelialen Eigenschaften wird als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet [63, 65]. Es kommt zu einer Reexpression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin, wodurch die Tumorzellen in der Lage sind, mit dem befallenen Gewebe zu interagieren und Makrometastasen zu bilden [62, 63]. Es wurde gezeigt, dass die Knochenkolonisation von Brustkrebszellen mit erhöhter Zellmigration und -adhäsion und einer vermehrten Expression von Fibronectin, Harvey-Ras Protein (H-Ras) und Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Verbindung steht [62, 63].

## **1.6 Fragestellung der vorliegenden Promotionsarbeit**

In einem vorausgehenden Versuch von Fritsche et al. kam es durch das selektive Ausschalten von TRAIL-R2 in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231-BO zu einer geringeren Frequenz von Tumorzellabsiedlungen in den Knochen der Mäuse nach intrakardialer Injektion humaner Brustkrebszellen [56]. Die Herunterregulation von TRAIL-R2 in vitro führte unter anderem zu einer Expression epithelialer Marker und einer Beeinflussung von Mechanismen, denen im Rahmen von „Homing“-Prozessen eine biologische Rolle zugeschrieben wird [56]. Es konnten nach intrakardialer Injektion der Karzinomzellen frühe Stadien der Metastasierung wie das Überleben, die Proliferation und die Etablierung der Krebszellen zu Tumoren im Knochen untersucht werden [56]. Es ergaben sich jedoch Hinweise, dass der TRAIL-R2-Knockdown in den Brustkrebszellen keinen hemmenden Einfluss auf das Auswachsen von Metastasen im Knochen hat [56]. In der vorliegenden Arbeit soll daher die Entwicklung eines Tiermodells unter Verwendung einer direkten intraossären Tumorzellinokulation zu einem besseren Verständnis des intraossären Wachstums nach Umgehung der Homingschritte führen. Ziel unseres Versuches ist die Etablierung einer intratibialen Injektion von osteotropen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen nach Knockdown von

TRAIL-R2 im Xenograft-Mausmodell. Der Fokus des Modells soll auf dem Auswachsen der Tumorzellen im Knochen und auf der molekularen Interaktion zwischen Tumorzellen, Osteoklasten und Osteoblasten liegen. In der vorliegenden Studie soll anhand der Etablierung eines experimentellen Tiermodells für intratibiale Metastasen des humanen Mammakarzinoms die Hypothese untersucht werden, ob der Knockdown von TRAIL-R2 in den inokulierten Tumorzellen durch einen eher epithelialen Phänotyp das Auswachsen intraossärer Metastasen begünstigt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierexperimentelle Studie**

Für die Beantwortung der oben genannten Fragestellungen wurden bei mehreren Mäusen Tumorzellen direkt intratibial injiziert. Dieser Tierversuch wurde als Ergänzungsantrag durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein-V31-Tierschutz- gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes mit dem Aktenzeichen V 242–7224.121-7(97-7/12) am 15. Januar 2014 genehmigt.

### **2.2 Versuchstiere**

Für den Versuch wurden zwölf weibliche severe combined immunodeficiency (SCID)-beige Mäuse von Charles River (Charles River Laboratories International, Wilmington, MA, USA) verwendet. Die Tiere hatten ein Alter von sechs bis zwölf Wochen und ein durchschnittliches Gewicht von 17 g. Die Tierhaltung erfolgte unter Einhaltung der Tierschutz-Versuchstierverordnung in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel. In der luftfeuchtigkeits- und temperaturkontrollierten Tierhausumgebung wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden eingehalten und die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Futter ad libitum. Die Schmerzbehandlung erfolgte durch die regelmäßige Gabe von 100 mg/kg Tramadol (Tramal, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser.

### **2.3 Zellen**

Die für den Versuch verwendete östrogenunabhängige humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231-BO/luc wurde von Dr. Gabri van der Pluijm (Leiden University Medical Center, Niederlande) zur Verfügung gestellt und weist eine hohe Affinität zum Knochen auf [66]. Die Etablierung dieser osteotropen Mammakarzinomzelllinie erfolgte durch wiederholte Passagen der parentalen MDA-MB-231-Zellen nach intrakardialer Injektion in den Knochen in vivo und durch Expansion der Zellpopulation aus den entstandenen Knochenmetastasen in vitro [66, 67]. Die knochenaffine Zelllinie MDA-

MB-231-BO entwickelt im Gegensatz zu der parenteralen Zelllinie MDA-MB-231 vermehrt osteolytische Knochenmetastasen, sie zeigt eine erhöhte Produktion des Zytokins PTH-rP, erhöhte Level von TRAIL und der Kinasen Src und Akt, einen geringeren E-Cadherin Level und eine Wachstumsstimulation durch IGF-1 [56, 66, 68]. Die Zellen wurden kultiviert in einem RPMI 1640 Medium mit einer Supplementierung von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM GlutaMax und 1 mM Natriumpyruvat (LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland). Außerdem wurde die MDA-MB-231-BO-Zelllinie mit einem das Enzym Luciferase kodierenden Plasmids transfiziert, um Zellansammlungen mittels Biolumineszenzmessung mit der NightOwl (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) sichtbar machen zu können.

## **2.4 Versuchsablauf**

Alle Untersuchungen und Eingriffe wurden unter Allgemeinanästhesie durchgeführt. Die Anästhesie der Mäuse erfolgte über eine intraperitoneale Injektion von 80 mg/kg Ketamin (Aveco Pharmaceutical, IA, USA) als Narkotikum und Analgetikum und 10 mg/kg Xylazin (Rugby Laboratories, GA, USA) als Analgetikum und Sedativum. Bei allen Mäusen erfolgte die Injektion der Tumorzellen in die Tibia. Es wurde jeweils in eine Tibia die Kontrollzelllinie MDA-MB-231-luc-A12-sh-non silencing und in die kontralaterale Tibia die TRAIL-R2 Knockdown-Zelllinie MDA-MB-231-luc-A12-sh-16711 injiziert. Der Knockdown, also die Herunterregulation von TRAIL-R2 in den Zellen, erfolgte wie im vorhergehenden Versuch [56]. Für den transienten Knockdown von TRAIL-R2 wurden die Zellen mittels Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit ON-TARGETplus SMARTpool L-004448-00 transfiziert, als Kontrolle wurde ON-TARGETplus SMARTpool D-001810-10 (Thermo Scientific Dharmacon, Epsom, UK) verwendet [56]. Für den Erhalt von Klonpools mit stabilem Knockdown von TRAIL-R2 wurden die Zellen mit GIPZ lentiviralen shRNA Vektoren für TRAIL-R2 oder mit einer non-silencing Kontrolle (Open Biosystems, Deutschland; CloneID: TRAIL-R2-shRNA-1: V2LHS\_16711, TRAIL-R2-shRNA-2: V3LHS\_328891) transduziert und mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert [56]. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen der Mammakarzinomzelllinie wurden als Suspension in 10 µl PBS (Gibco® DPBS, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mittels einer 27-Gauge-Nadel in Beugehaltung in die Tibia injiziert. Die Versuchstiere wurden daraufhin über einen Zeitraum von neun Wochen wöchentlich anästhesiert, anschließend gewogen und

mittels Micro-Computertomographie und einer Night-Owl-Kamera untersucht. Nach der letzten Messung erfolgte die Euthanasie der anästhesierten Tiere mittels Genickluxation, die zu einer Durchtrennung der Medulla oblongata führt.

## **2.5 In vivo Biolumineszenz-Bildgebung**

Das Prinzip der Biolumineszenz beruht auf einer lichtproduzierenden Enzym-Substrat-Reaktion [69]. Bei der Oxidation des Substrats Luciferin durch das Enzym Luciferase unter der Anwesenheit von ATP wird Energie frei, die als Licht sichtbar wird [69]. Mittels der Biolumineszenztechnik kann die Ausbildung und Entwicklung der Tumore des jeweiligen Versuchstieres beobachtet und quantitativ ausgewertet werden [69]. Damit das Tumorwachstum über die Biolumineszenz-Bildgebung verfolgt werden konnte, mussten Luciferase exprimierende Brustkrebszellen in die Unterschenkel der Versuchstiere injiziert werden. Die Biolumineszenz-Messung erfolgte mit der NightOwl II LB 983 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland). Den Mäusen wurde in den ersten sechs Wochen 100 mg/kg und ab der siebten Woche 150 mg/kg KG des Substrates d-Luciferin (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) in den intraperitonealen Raum injiziert. Für die Bildauswertung wurde die IndiGo Software (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) verwendet. Die Signale wurden in der Einheit Counts per second (cps), also in Photons pro Sekunde angegeben. Es wurde jeweils die Fläche (Area in mm<sup>2</sup>), die Gesamtanzahl (Overall in cps) und der Durchschnitt (Average in cps/mm<sup>2</sup>) errechnet.

## **2.6 Mikro-Computertomographie (μCT)**

Für die μCT-Untersuchung wurde das vivaCT 40 in vivo Mikro-CT (ScancoMedical, Brüttisellen, Schweiz) verwendet. Die Aufnahmen erfolgten unter folgenden Einstellungen:

- Voxelgröße 19 μm
- Röhrenspannung 70 kVp
- Stromstärke 114 μA
- Integrationszeit 250 ms,
- 1000 Projektionen pro 180°

Für die Aufnahmen wurden die Mäuse in einen  $\mu$ CT Ganzkörperhalter eingebracht und nach Ausrichten der Tibia fixiert. Die Scans wurden über einen Zeitraum von neun Wochen wöchentlich durchgeführt. Im sogenannten Baseline-Scan wurde zunächst für jedes Tier ein 200 Schichten (3,5 mm) umfassendes Volume of Interest (VOI) mittels einer automatischen Konturierungsmethode definiert, um den kortikalen und trabekulären Knochen zu separieren [70, 71]. Die Konturen wurden nochmals mit der Hand korrigiert. Als VOI wurde der Bereich distal der Epiphysenfuge mit Ausdehnung in die Metaphysen- und Diaphysenregion der Tibia gewählt. Die Baseline VOIs wurden auf die nachfolgenden Scans mit Hilfe eines Registrierungsverfahrens übertragen. Anschließend erfolgte die Kontrolle der Registrierungen mittels 3D Visualisierung der überlagerten Volumen [71]. Die Knochenmineraldichte (BMD) wurde für jedes VOI mit den Grauskalawerten der Mikro-CT Bilder bestimmt und beruht auf der Einheit  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Weiterhin wurde das Verhältnis von Knochenvolumen zum gemessenen Gesamtgewebe (BV/TV) ermittelt. Dem Knochenvolumen (BV) und dem Gewebevolumen (TV) liegt die Einheit  $\text{mm}^3$  zu Grunde. Außerdem erfolgte die Bestimmung der trabekulären Anzahl (Tb.N pro mm), der trabekulären Separation (Tb.Sp in mm) und der trabekulären Dicke (Tb.Th in  $\mu\text{m}$ ). Die Auswertung wurde mit der  $\mu$ CT Software Image Processing Language v 5.15 (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) durchgeführt.

## **2.7 Histologische Methoden**

### **2.7.1 Formalinfixierung, Entkalkung und Paraffineinbettung**

Nach Euthanasie der Tiere nach neun Wochen wurden die Hintergliedmaße freipräpariert und anschließend für sechs Tage in 10%iger gepufferter Formaldehyd-Lösung fixiert. Danach wurden sie für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und mit destilliertem Wasser gespült. Das Entkalken erfolgte für sechs Wochen bei 37 °C in 0,5 mol gepufferter EDTA-Lösung mit einem pH-Wert von 7,5. Das Wechseln der Lösung erfolgte zweimal pro Woche. Das nun fixierte und entkalkte Gewebe wurde dann in flüssiges Paraffin überführt, indem es mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) entwässert und in Xylol inkubiert wurde. Im Anschluss wurden die Gewebeproben in Förmchen

gegeben und mit dem erwärmten und flüssigen Paraffin eingebettet. Danach musste das Paraffin erkalten.

**Tabelle 1:** Verwendete Materialien für die Formalinfixierung, Entkalkung und Paraffineinbettung

Reagenz/ Verbrauchsmaterial/ Gerät	Hersteller
Aqua dest	Klax, CHEMICA, Chemische Produkte Abfüll- und Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, Deutschland
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
EDTA Na <sub>2</sub> -Salt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 37%	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium Hydroxide (NaOH) Pellets	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraffin	MEDITE PURE™ Paraffin, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin Streckbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

**Tabelle 2:** Angesetzte Lösungen für die Formalinfixierung und Entkalkung

Angesetzte Lösungen	Bestandteile
Formaldehyd-Lösung	10,8 ml Formaldehyd 37%+ 89,2 ml DPBS-Lösung, pH 7
EDTA-Lösung	186,15 g EDTA Na <sub>2</sub> -Salt+ 1000 ml Aqua dest., pH 7,5 (Einstellung mit NaOH-Pellets)

## 2.7.2 Anfertigung von Schnittpräparaten

Mit einem Schlittenmikrotom (Reichert Jung Hn40, New York, USA) wurden aus den auf -20 °C gekühlten Paraffinblöcken Gewebeschnitte mit einer Dicke von etwa 4 µm angefertigt, die anschließend auf beschichtete Glasobjektträger (SuperFrost, Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht wurden. Es folgte die Trocknung der Präparate bei 37 °C für etwa zwölf Stunden. Alle durchgeführten und im Folgenden aufgeführten Färbungen erfolgten an diesen Paraffin-Gewebeschnitten.



### 2.7.3 Durchführung der Färbungen/ Färbeprotokolle

An jedem ersten und zwölften Schnittpräparat wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt, um die Stelle der größten Tumorausdehnung mittels Mikroskopie zu finden. Für alle folgenden Färbungen, die Masson-Goldner-Standardfärbung, die enzymhistochemische TRAP-Färbung und die immunhistochemische Ki-67-Färbung, wurden Präparate aus diesem Bereich gewählt.

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine Standardfärbung zur Darstellung von Gewebestrukturen [72]. Durch den basischen Farbstoff Hämatoxylin färben sich die Zellkerne blau, der saure Farbstoff Eosin führt zu einer Rotfärbung des Zytoplasmas, des Kollagens und der Erythrozyten [72]. Die HE-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Entparaffinierung der Präparate in Xylol für zwei Mal zehn Minuten
2. Rehydratisieren der Präparate mittels absteigender Alkoholkonzentrationsreihe (jeweils für 15 Sekunden: Xylol, 2x 100%, 2x 96%, 70%)
3. Schwenken der Präparate unter fließend kaltem Wasser, anschließend unter destilliertem Wasser
4. Färben der Präparate für zehn Minuten in Mayers Hämalaunlösung
5. Differenzieren in HCl-Alkohol
6. Schwenken/wässern der Präparate unter fließend warmem Wasser, anschließend unter destilliertem Wasser
7. Gegenfärbung für sieben Minuten in Eosin-Lösung
8. Dehydratisieren der Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe (jeweils für drei Sekunden: 70%, 2x 96%, 2x 100%, 3x Xylol)
9. 3x Spülen in Xylol
10. Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte mit einem Tropfen Pertex® Eindeckmittel und einem Deckglas

**Tabelle 3:** Verwendete Materialien für die HE-Färbung

Reagenz/ Verbrauchsmaterial/ Gerät	Hersteller
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	BÜFA Chemikalien GmbH & Co, Hude, Deutschland
HCl (37%)	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland

Mayers Hämalalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Menzel Deckgläser, 24x 50mm	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V.&Co, Braunschweig, Deutschland
Pertex®	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Xylol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

**Tabelle 4:** Angesetzte Lösungen für die HE-Färbung

<b>Angesetzte Lösungen</b>	<b>Bestandteile</b>
Eosin-Lösung	17 g Eosin + 1000 ml Ethanol (96%) + 1 ml Eisessig
HCl-Alkohol	375 ml Ethanol (100%)+ 125 ml Aqua dest. + 5 ml HCl (37%)

### **Masson-Goldner-Trichrom-Färbung**

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung führt zu einer sehr guten Differenzierung der verschiedenen Gewebsbestandteile, besonders zur Darstellung bindegewebiger Strukturen wie Knochen [72]. Bei der Färbung werden die Zellkerne braunschwarz, der Knochen und das kollagene Bindegewebe grün und die Muskulatur und das Zytoplasma rot dargestellt [72]. Um den Tumor besser von dem restlichen Gewebe abgrenzen zu können, wurde diese Färbung an den Schnitten mit dem größten Tumoreal nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Entparaffinieren und Rehydratisieren der Präparate nach typischer Vorgehensweise (siehe HE Färbung)
2. Färben der Präparate für 30 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin
3. Kurzes Differenzieren in HCl-Alkohol (375 ml 100% EtOH, 125 ml aq. dest., 5 ml 37% HCL)
4. 3-minütige Spülung der Präparate unter fließend warmem Wasser, anschließend unter destilliertem Wasser
5. Färbung für fünf Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lösung
6. Spülen in Essigsäure 1%
7. 2-minütige Differenzierung in Orange-G-Lösung
8. Spülen in Essigsäure 1%
9. Gegenfärbung für fünf Minuten in Lichtgrün SF-Lösung 0,5%
10. Spülen in 100% Alkohol

11. 3x Spülen in Alkohol/Xylolgemisch

12. 3x Spülen in Xylol

13. Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte (siehe HE Färbung)

**Tabelle 5:** Verwendete Materialien für die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Reagenz/ Verbrauchsmaterial/ Gerät	Hersteller
Aqua dest.	Klax, CHEMICA, Chemische Produkte Abfüll- und Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, Deutschland
Azophloxin	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	Mallinckrodt, Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol abs.	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Goldner-Lösung I (Ponceau-Säurefuchsin-Lösung)	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland
Goldner-Lösung II (Orange-G-Lösung)	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland
HCl (37%)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lichtgrün SF gelblich	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Menzel Deckgläser, 24x 50mm	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V.&Co, Braunschweig, Deutschland
Pertex®	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Weigerts Eisenhämatoxylin Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Baker, Deventer, Niederlande

**Tabelle 6:** Angesetzte Lösungen für die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Angesetzte Lösungen	Bestandteile
Lichtgrün-Lösung (0,5 %)	1 g Lichtgrün SF gelblich (0,5%)+ 200 ml Essigsäure (0,2%)
Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin	40 ml Goldner- Lösung I+ 20 ml Azophloxin + 2 Tropfen Eisessig+ 140 ml Aqua dest.
Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung	100 ml Lösung I+ 100 ml Lösung II aus Weigerts Eisenhämatoxylin Kit

Die Schnittpräparate mit der größten Tumorausdehnung wurden Goldner gefärbt, um die Tumorfläche zu identifizieren und anschließend histomorphometrisch auszumessen. Die Ausmessung erfolgte mit der Software (Fiji Is Just) ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health Bethesda,

Maryland, USA). Dafür wurde zunächst ein Bild gegen bekannte Werte (Objektmikrometer, Einheit: 1 DIV = 0,01 mm) kalibriert und dieses anschließend auf die Tumorbilder angewendet. Die Aufnahmen der angefärbten Präparate und des Objektmikrometers erfolgten unter 5-facher Objektivvergrößerung an einem Axiolab Mikroskop mit einer AxioCam MRc Farbkamera und der AxioVision LE Software (Zeiss, Jena, Deutschland). Die abfotografierten Teilaufnahmen wurden mittels des Image J Plugins MosaicJ (Philippe Thévenaz, Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne, Schweiz) zusammengefügt. Anschließend wurde durch das programmgesteuerte Zeichnen einer Linie um den Tumorrund mittels des Tools „Freehand selections“ die Querschnittsfläche der Tumore bestimmt. Mit Hilfe des Plugins ColorTypeSeparator (Dr. Arndt Rohwedder, School of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Leeds, UK) und mittels Mikroskop wurde die Tumorausdehnung kontrolliert.

### **TRAP-Färbung**

Die TRAP-Färbung ist eine enzymhistochemische Färbung. Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) ist ein Metalloenzym und katalysiert unter sauren Bedingungen die Hydrolyse von Phosphatestern [73-75]. TRAP wird in großer Menge von Osteoklasten sezerniert und die TRAP Aktivität korreliert mit einer erhöhten Knochenresorption [73-75]. In mehreren Studien wurde TRAP als Marker für Knochenbefall bei Krebspatienten eingesetzt [73-75]. Bei der TRAP-Färbung kommt es zu einer enzymatischen Reaktion, wobei sich das Produkt und damit die Osteoklasten rot darstellen [76, 77].

Die TRAP-Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Entparaffinieren und Rehydratisieren der Präparate nach typischer Vorgehensweise (siehe HE-Färbung)
2. Spülen der Präparate in destilliertem Wasser
3. 20-minütiges Bewegen der Präparate im TRAP-Puffer, nach zehn Minuten wird der TRAP-Puffer langsam auf 37 °C erwärmt
4. Inkubieren der Präparate für zwei bis vier Stunden bei 37 °C in der TRAP-Färbelösung
5. Spülen der Präparate in destilliertem Wasser
6. Gegenfärbung in Mayers Hämalaunlösung

7. Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte mit einem Tropfen Aquatex® Eindeckmittel und einem Menzel-Deckglas

**Tabelle 7:** Verwendete Materialien für die TRAP-Färbung

Reagenz/ Verbrauchsmaterial/ Gerät	Hersteller
Aqua dest.	Klax, CHEMICA, Chemische Produkte Abfüll- und Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, Deutschland
Aquatex®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol abs.	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Fast Red TR Salt	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-(+)-Tartaric Acid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mayers Hämalunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Menzel Deckgläser, 24x 50mm	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V.&Co, Braunschweig, Deutschland
Naphtol-AS-MX-Phosphate	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

**Tabelle 8:** Angesetzte Lösungen für die TRAP Färbung

Angesetzte Lösungen	Bestandteile
TRAP-Färbelösung	40 mg Naphtol-AS-MX-Phosphate + 2 ml N-N-Dimethylformamid+ 240 mg Fast Red TR Salt + 4 ml N-N-Dimethylformamid+ 1 ml Triton X-100+ 200 ml TRAP Puffer
TRAP-Puffer	3,28 g 0.2 M Sodiumacetat, 46,01 mg 50mM L-(+)-Tartaric Acid, pH 5.0

Die Auswertung der TRAP gefärbten Präparate wurde unter 200-facher Vergrößerung an einem Axiolab Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Es wurden fünf zufällige Regionen in der Tumorregion der proximalen Tibia ausgewählt und dort die TRAP positiven Zellen an der endostealen Oberfläche ausgezählt. Die Darstellung erfolgte als Anzahl TRAP+-Zellen/Knochenoberfläche (mm<sup>2</sup>).

## Immunhistochemische Färbung Ki-67

Die Spezifität von Antikörpern und die damit verbundene Antigen-Antikörper-Reaktion ist die Grundlage der Immunhistochemie [72]. Antikörper bilden mit Antigenen, die als Proteinstrukturen an Zellen vorkommen, Immunkomplexe [71]. Die Reaktion wird durch spezielle, an den Antikörper gekoppelte Farbstoffe sichtbar gemacht. Man nutzt die Immunhistochemie unter anderem zur Identifizierung von Zelltypen und Zellstrukturen [72]. Das Ki-67-Antigen ist ein Proliferationsmarker und färbt die sich teilenden Zellen an.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte im Institut für Pathologie (UKSH Kiel) mittels eines Leica BOND-MAX Färbeautomaten (Leica Biosystems GmbH, Nussloch) an den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten mit einem Primärantikörper. Für die Antigendemaskierung, also die Wiederherstellung der Immunreaktivität wurde die BOND Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems GmbH, Nussloch) mit einem pH-Wert von 9,0 verwendet. Die Lösung ist speziell für das Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) im Bond-System geeignet. Folgender Primärantikörper wurde verwendet:

**Tabelle 9:** Verwendeter Primärantikörper für die Ki-67-Färbung

Name	Klon	Firma	Verdünnung
Ki67 (Rabbit Monoclonal)	SP6	Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA	1: 300

Die Färbung wurde mit dem BOND Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems GmbH, Nussloch) durchgeführt. Es besteht aus einem Peroxidblock zur Unterdrückung der Peroxidaseaktivität, einem nach dem Primärreagenz zu verwendenden Reagenz, einem Polymer-Reagenz, DAB-Chromogen zur Sichtbarmachung des Komplexes und Hämatoxylin zur Gegenfärbung.

Die Auswertung der gefärbten Ki-67-Präparate erfolgte unter 200-facher Vergrößerung an einem Axiolab Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Die Aufnahmen der Präparate wurden mit einer AxioCam MRc Farbkamera und der AxioVision LE Software (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. In jedem Tumor wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt (fünf Gesichtsfelder à 100 Zellen). Die Intensität der Zellkernfärbung wurde mit positiv und negativ beurteilt. Der Ki-67-Index ergab sich aus dem prozentualen Anteil der positiven Zellkerne an allen Zellkernen.

## 2.8 Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Programm SPSS (©IBM SPSS Statistics, Version 26, Armonk, USA) durchgeführt und Mittelwerte und Standardabweichungen im Zuge der deskriptiven Statistik bestimmt. Die Verteilung der Daten wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf eine Normalverteilung hin überprüft. Für normalverteilte Daten wurde für den Vergleich von Mittelwerten zwischen zwei unabhängigen Variablen ein t-Test angewendet. Lag keine Normalverteilung vor wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test herangezogen, um die Mittelwerte zwischen zwei Gruppen zu vergleichen. Ein Konfidenzintervall von 95% wurde für alle Tests festgelegt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner fünf Prozent ( $p < 0,05$ ) angesehen. Auch die Visualisierung der Daten erfolgte mit Hilfe von SPSS.

## **3 Ergebnisse**

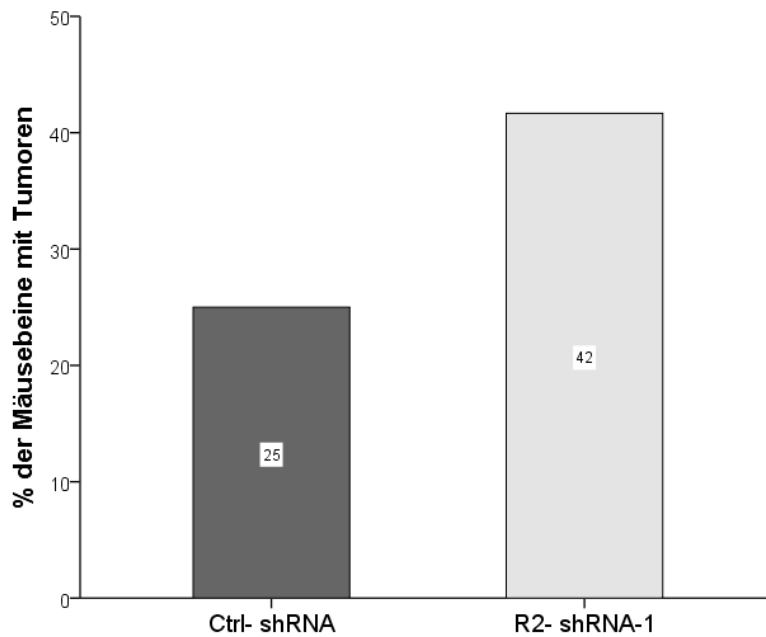
### **3.1 Darstellung der Ergebnisse**

Das Erstellen der Tabellen erfolgte mittels des Tabellenkalkulationssystem Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Diagramme wurden mit SPSS 26 (©IBM SPSS Statistics, Version 26, Armonk, USA) angefertigt. Für die Beschreibung der Ergebnisse wurde die Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung gewählt. Die wichtigsten Mittelwerte und Standardabweichungen sind in den folgenden Ergebnisbeschreibungen zu finden, im Anhang sind alle weiteren Daten in den Ergebnistabellen aufgeführt. Die Kontrollgruppe (Ctrl-shRNA) ist immer dunkelgrau und die Gruppe der Tumore mit einem TRAIL-R2 Knockdown (Versuchsgruppe/R2-shRNA-1) hellgrau gekennzeichnet. In dem Versuch zeigten sich bis auf den Ki-67-Proliferationsindex (die Signifikanz ist mit einem Sternchen (\*= $p < 0,05$ ) gekennzeichnet) als Ausnahme keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Tumorwachstum der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe.

### **3.2 Allgemeine Beobachtungen**

Der Versuch lief über neun Wochen und alle zwölf Versuchstiere überlebten. Die Entwicklung der Tumore wurde wöchentlich über NightOwl- und Mikro-CT Messungen beobachtet. Für jedes Versuchstier liegen uns also neun Mikro-CT Messungen vor, aufgrund eines technischen Substratfehlers jedoch nur drei NightOwl-Messungen ab der siebten Woche. Die Entstehung eines Tumors in der Tibia wurde bei sieben Versuchstieren beobachtet, wobei ein Tier in beiden unteren Extremitäten einen Tumor entwickelte. Insgesamt konnten somit acht Beine ausgewertet werden, davon fünf aus der Versuchsgruppe und drei aus der Kontrollgruppe. Die Entstehung von Tumoren wurde bei 30 Prozent aller Versuchstierbeine in der Tibiaregion beobachtet. 25 Prozent der Mäusebeine aus der Kontrollgruppe und 42 Prozent der Mäusebeine aus der Versuchsgruppe entwickelten Tumore (s. Abb. 2).





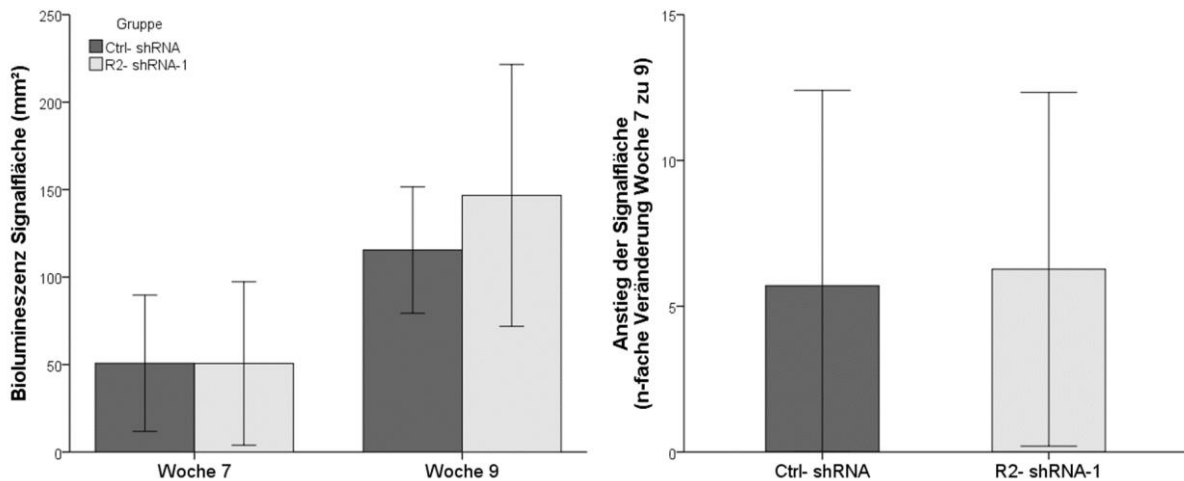
**Abbildung 2:** Prozentualer Anteil der Mäusebeine der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe, die einen Tumor entwickelt haben.

### 3.3 Auswertung der in vivo Biolumineszenz-Bildgebung

Auch mittels der Biolumineszenzuntersuchung konnte die Entstehung von acht Tumoren in sieben Mäusen beobachtet werden. Aufgrund der Verwendung eines vermutlich defekten d-Luciferin Substrats zu Beginn des Versuches, erfolgte die Darstellung der Tumore erst ab Woche 7.

#### 3.3.1 Signalfläche

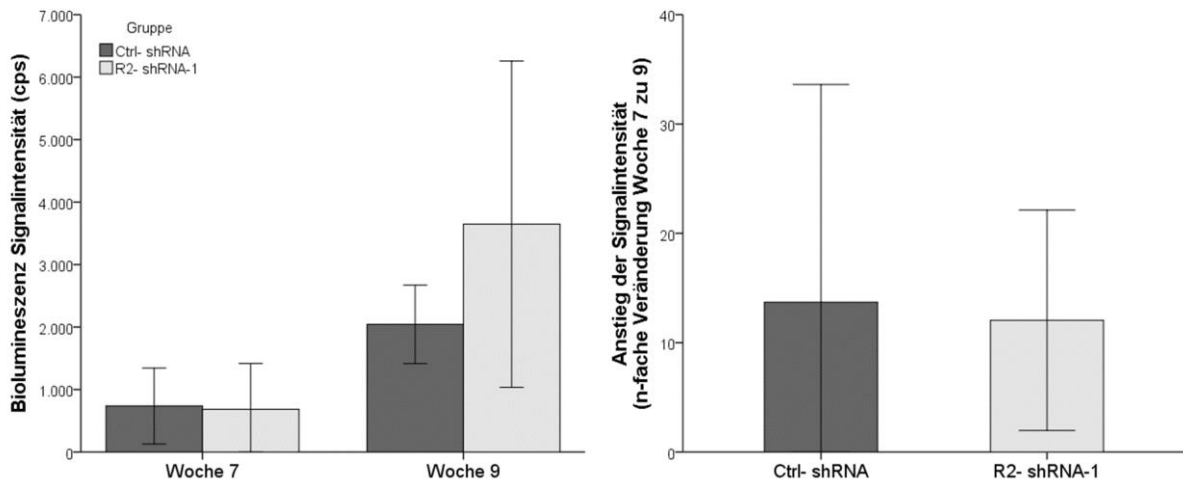
Die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe weisen in Woche sieben ein etwa gleich großes durchschnittliches Biolumineszenzsignalareal auf (Kontrollgruppe:  $50,75 \pm 31,799 \text{ mm}^2$ , Versuchsgruppe:  $50,62 \pm 41,759 \text{ mm}^2$ ). In Woche neun zeigt sich ein Unterschied der Fläche des Biolumineszenzsignals zwischen den Gruppen. Der Mittelwert der Signalflächen der Versuchsgruppe ist mit  $146,71 \pm 66,951 \text{ mm}^2$  höher als der der Kontrollgruppe mit  $115,46 \pm 29,532 \text{ mm}^2$  (s. Abb. 7). Der Anstieg der Signalfläche von Woche sieben zu Woche neun ist in der Gruppe der Tumore nach einem TRAIL-R2 Knockdown geringfügig höher. Es lässt sich ein 6,27-facher Anstieg in der Versuchsgruppe und ein 5,2-facher Anstieg in der Kontrollgruppe beobachten (s. Abb. 3).



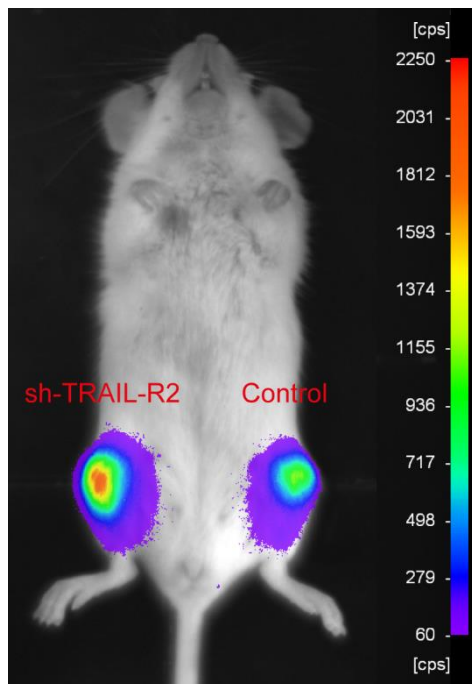
**Abbildung 3:** Darstellung der Fläche des Biolumineszenzsignals der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe in Woche sieben und neun anhand der Biolumineszenzmessung und Anstieg der Signalfäche von Woche sieben zu neun.

### 3.3.2 Signalintensität

In Woche sieben zeigt die Gruppe der Tumore nach einem TRAIL-R2 Knockdown eine durchschnittliche Signalintensität im Bereich des Tumors von  $684,00 \pm 655,133$  cps und die Kontrollgruppe eine durchschnittliche Intensität von  $737,33 \pm 496,522$  cps. Woche neun weist einen größeren Unterschied zwischen den zwei Gruppen auf, die durchschnittliche Signalintensität im Tumorbereich der Tibia der Versuchsgruppe beträgt  $3636,40 \pm 2334,642$  cps, die der Kontrollgruppe  $2034,00 \pm 512,502$  cps (s. Abb. 8). Es ist ein 12,05-facher Anstieg der Signalintensität in der Versuchsgruppe und ein 13,71-facher Anstieg der Signalintensität in der Kontrollgruppe von Woche sieben zu Woche neun zu beobachten (s. Abb. 4).



**Abbildung 4:** Darstellung der Signalintensität der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe in Woche sieben und neun anhand der Biolumineszenzmessung und Anstieg der Signalintensität von Woche sieben zu Woche neun.



**Abbildung 5:** Repräsentative Biolumineszenz-Bildgebung eines Versuchstieres in Woche neun. Die mit der TRAIL-R2 Knockdown-Zelllinie behandelte Tibia zeigt im Gegensatz zu der mit der Kontrollzelllinie behandelten Tibia ein stärkeres Biolumineszenz-Signal.

### 3.3.3 Zusammenfassung der Biolumineszenzergebnisse

Die Gruppe der Tumore mit einem TRAIL-R2 Knockdown zeigt in Woche neun im Tumorbereich eine höhere mittlere Signalintensität und eine größere mittlere Signalfläche als die Kontrollgruppe. Aufgrund der Standardabweichungen zeigt sich

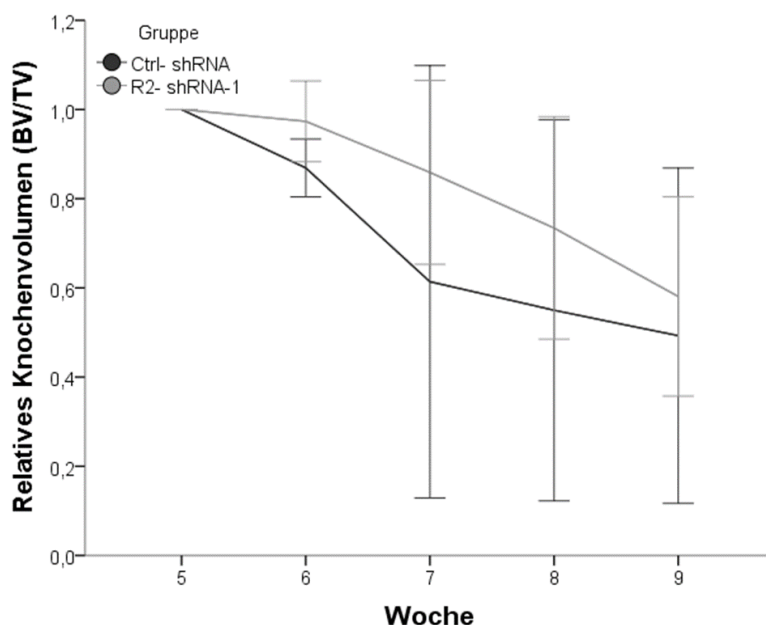
zwischen den Gruppen allerdings nur ein geringer Unterschied den Anstieg der Signalintensität und der Signalfäche betreffend.

### 3.4 Auswertung der Mikro-Computertomographie

Mittels der Mikro-Computertomographie konnte der Einfluss von TRAIL-R2 in den Tumorzellen auf verschiedene Knochenparameter untersucht werden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt ab Woche 5, da zu diesem Zeitpunkt eine Veränderung der Knochenparameter festgestellt wurde.

#### 3.4.1 Relatives Knochenvolumen (BV/TV)

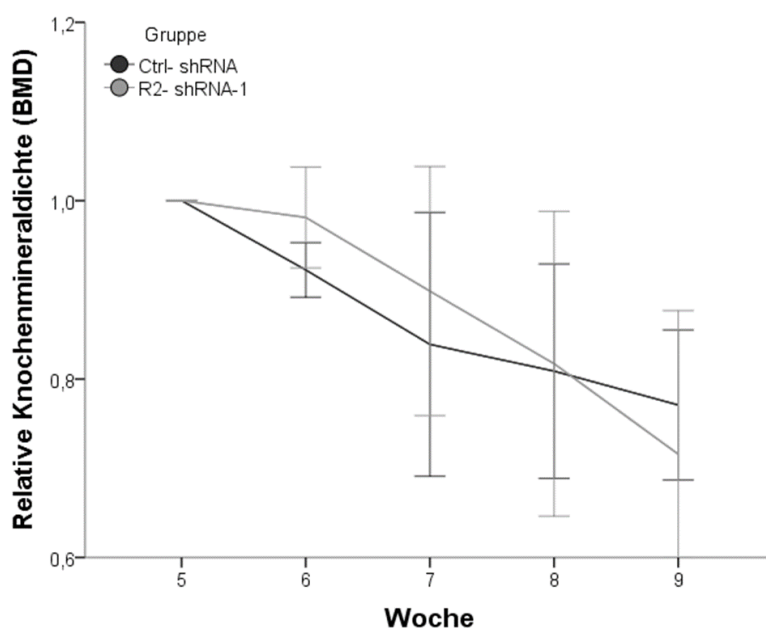
Das relative Knochenvolumen nimmt im Laufe der neun Wochen durch die Tumorausdehnung in der Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe ab. Das mittlere relative Knochenvolumen der Kontrollgruppe erreicht nach Ablauf der neunten Woche einen Wert von  $0,49 \pm 0,307$ , das der Versuchsgruppe einen Wert von  $0,58 \pm 0,200$ . Von Woche fünf bis Woche sieben ist eine steilere Verringerung des Knochenvolumens in der Kontrollgruppe zu beobachten, von Woche sieben bis Woche neun ist diese in der Versuchsgruppe steiler (s. Abb. 6).



**Abbildung 6:** Gezeigt sind die relativen Veränderungen der Knochenvolumina (BV/TV) ab der fünften Woche.

### 3.4.2 Relative Knochenmineraldichte (BMD)

Durch das Tumorwachstum kommt es innerhalb der neun Wochen in der Gruppe der Tumore nach einem TRAIL-R2 Knockdown und in der Kontrollgruppe zu einer Verringerung der relativen Knochenmineraldichte. Es lässt sich ein steilerer Abfall der mittleren relativen Knochenmineraldichte in der Versuchsgruppe beobachten. Außerdem zeigt die Versuchsgruppe nach den neun Wochen einen etwas geringeren relativen BMD als die Kontrollgruppe (Kontrollgruppe:  $0,77 \pm 0,069$ , Versuchsgruppe:  $0,72 \pm 0,144$ ) (s. Abb. 7).

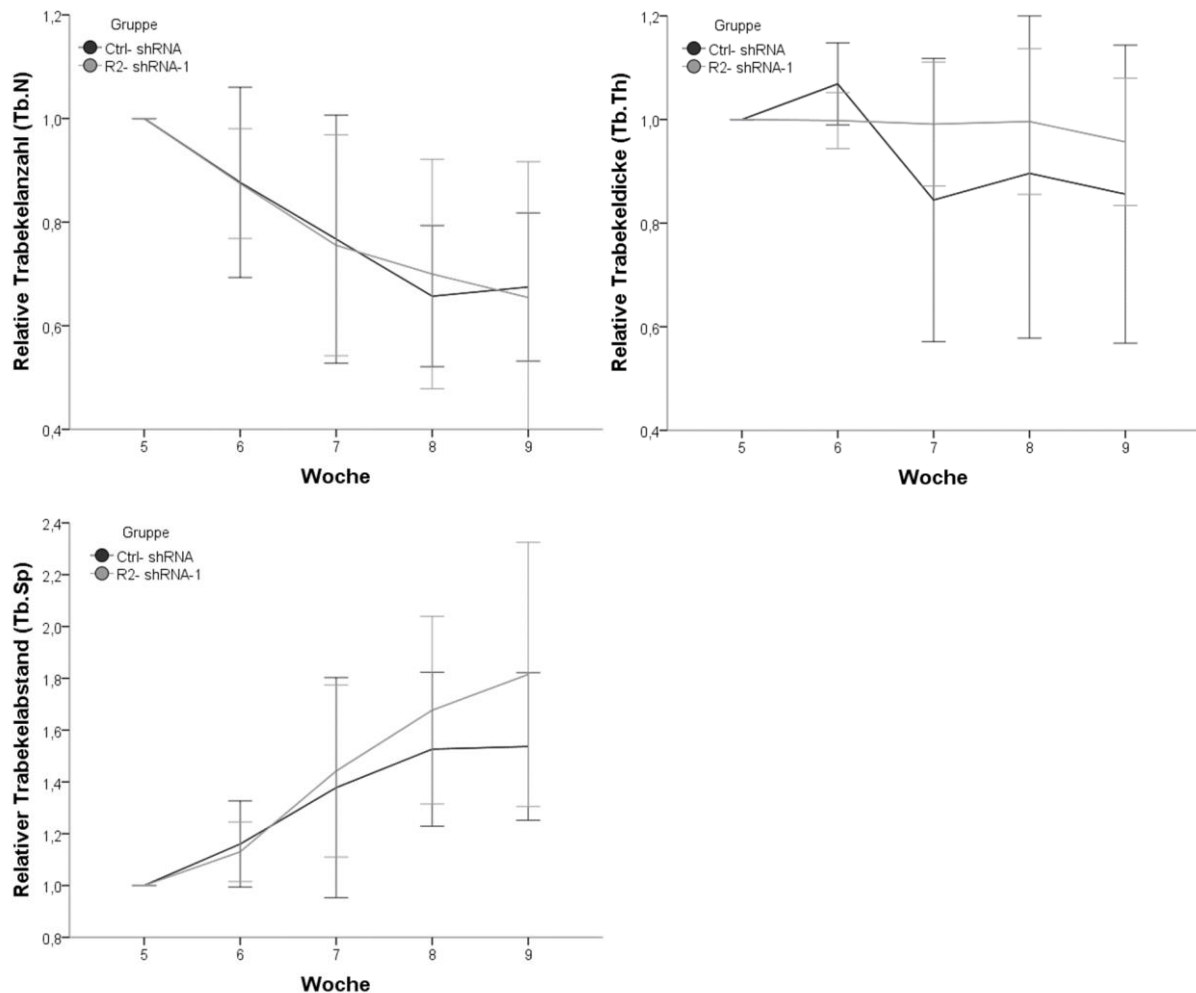


**Abbildung 7:** Relative Veränderungen der Knochenmineraldichte (BMD) ab der fünften Woche.

### 3.4.3 Relative Trabekelanzahl (Tb.N), relative Trabekeldicke (Tb.Th) und relativer Trabekelabstand (Tb.Sp)

Innerhalb der neun Wochen kommt es in der Gruppe der Tumore nach einem TRAIL-R2 Knockdown und in der Kontrollgruppe zu einer Abnahme der relativen Trabekelanzahl. Die Abnahme der relativen Trabekelanzahl auf  $0,65 \pm 0,234$  ist in der Versuchsgruppe kaum geringer als die Abnahme der Trabekelanzahl in der Kontrollgruppe auf  $0,67 \pm 0,117$ . Der relative Trabekelabstand zeigt einen deutlicheren Unterschied zwischen den zwei Gruppen. Mit einem mittleren Anstieg auf  $1,81 \pm 0,456$  ist die trabekuläre Separation in der Versuchsgruppe etwas höher als die in der

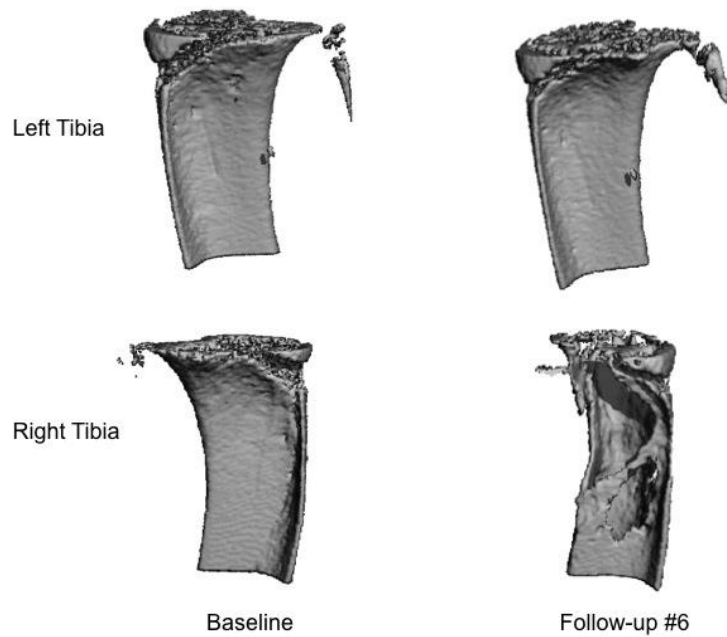
Kontrollgruppe mit einem Anstieg auf  $1,54 \pm 0,233$ . Die relative Trabekeldicke nimmt in der Kontrollgruppe etwas stärker ab als in der Versuchsgruppe (Kontrollgruppe:  $0,86 \pm 0,235$ , Versuchsgruppe:  $0,96 \pm 0,110$ ) (s. Abb. 8).



**Abbildung 8:** Liniendiagramme zur Darstellung des relativen Trabekelabstandes, der relativen Trabekeldicke und der relativen Trabekelanzahl ab Woche fünf.

### 3.4.4 Zusammenfassung der Mikro-CT Ergebnisse

Die Mikro-CT Ergebnisse weisen keinen deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen auf. Die Gruppe der Tumore nach einem TRAIL-R2 Knockdown zeigt gegenüber der Kontrollgruppe nach der letzten Versuchswoche eine etwas geringere relative Knochenmineraldichte und einen größeren relativen Abstand zwischen den Trabekeln, das relative mittlere Knochenvolumen und die relative Trabekeldicke haben jedoch in der Kontrollgruppe geringfügig stärker abgenommen.

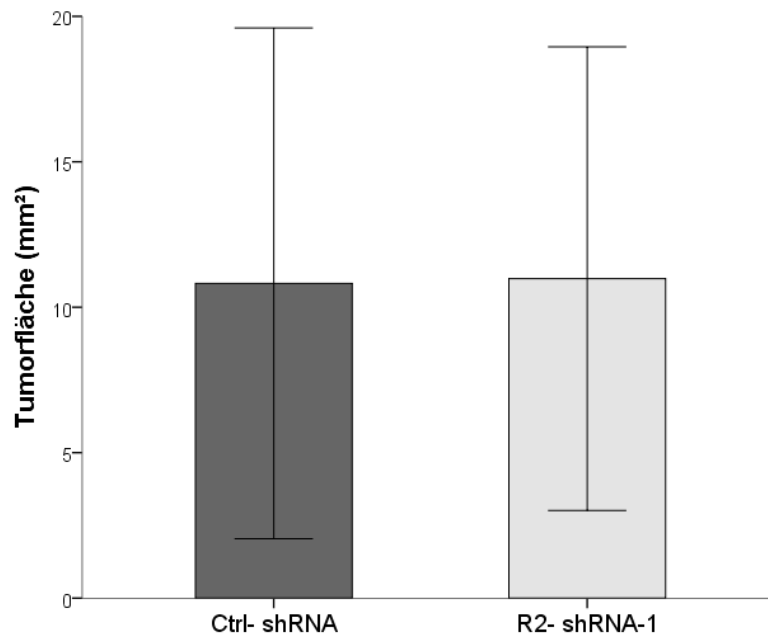


**Abbildung 9:** Exemplarische 3D-Rekonstruktion: Wöchentliche Untersuchung der Mäuse mittels in vivo Micro-CT. Die Baseline Scans und Follow-up Scans wurden registriert. Repräsentative linke Tibia einer Maus ohne und repräsentative rechte Tibia einer Maus mit Tumorbefall.

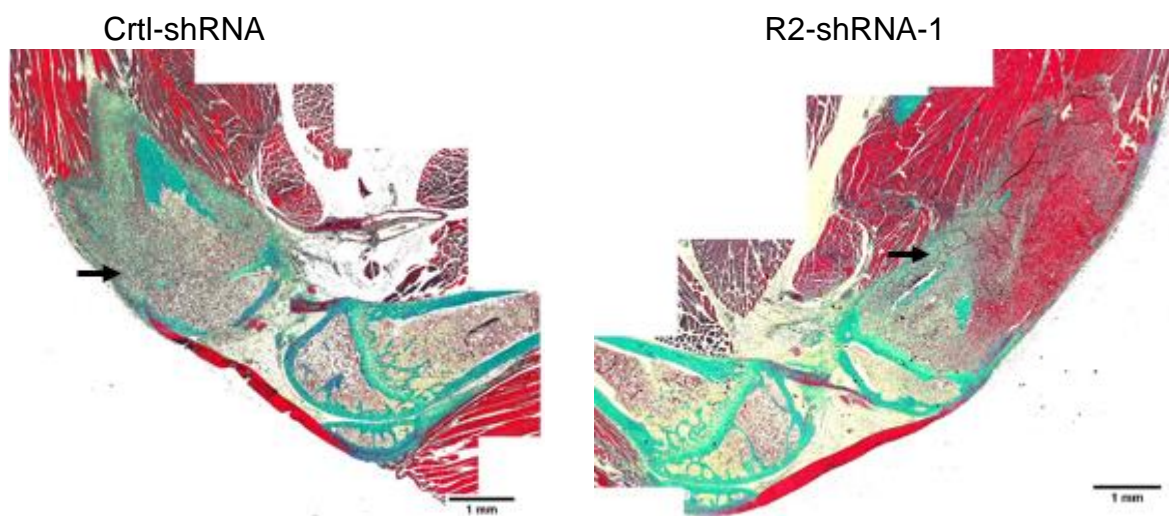
### 3.5 Auswertung der histologischen Untersuchungen

#### 3.5.1 Tumorausdehnung anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Zur Bestimmung der Tumorflächenausdehnung wurde die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung durchgeführt. Die histologische Ausmessung der Querschnittsfläche der Tumorareale zeigt keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe. Die durchschnittliche Tumorausdehnung der Kontrollgruppe beträgt  $10,82 \pm 7,169 \text{ mm}^2$  und die der Versuchsgruppe  $10,98 \pm 7,129 \text{ mm}^2$  (s. Abb. 10). Es ist eine große Spannweite der Querschnittsflächen der Tumorareale von  $2 \text{ mm}^2$  bis  $21 \text{ mm}^2$  zu beobachten.



**Abbildung 10:** Durchschnittliche Größe der Querschnitte der Tumorareale der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe.



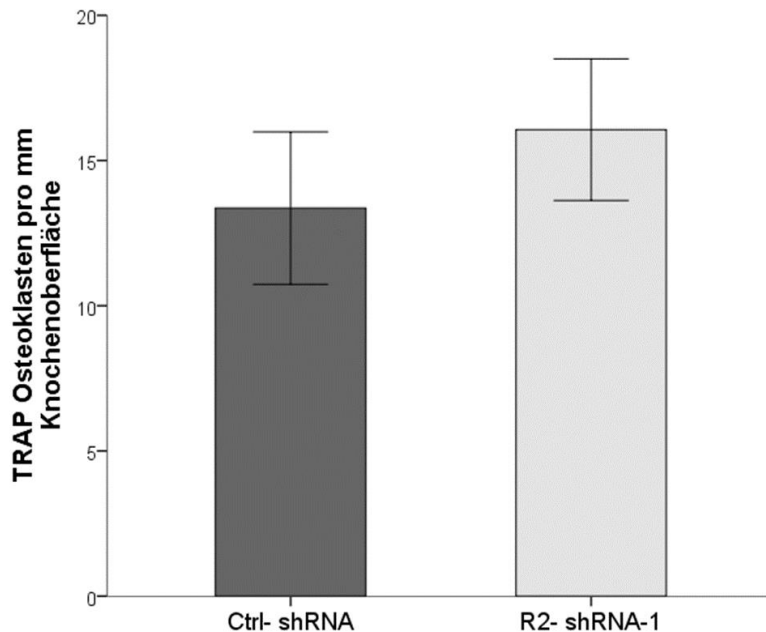
**Abbildung 11:** Repräsentative Bilder der Knieregion mit Tumorausdehnung der zwei Gruppen, Masson-Goldner-Trichrom gefärbt. Die Pfeile zeigen auf die Tumorareale.

### 3.5.2 TRAP-Färbung

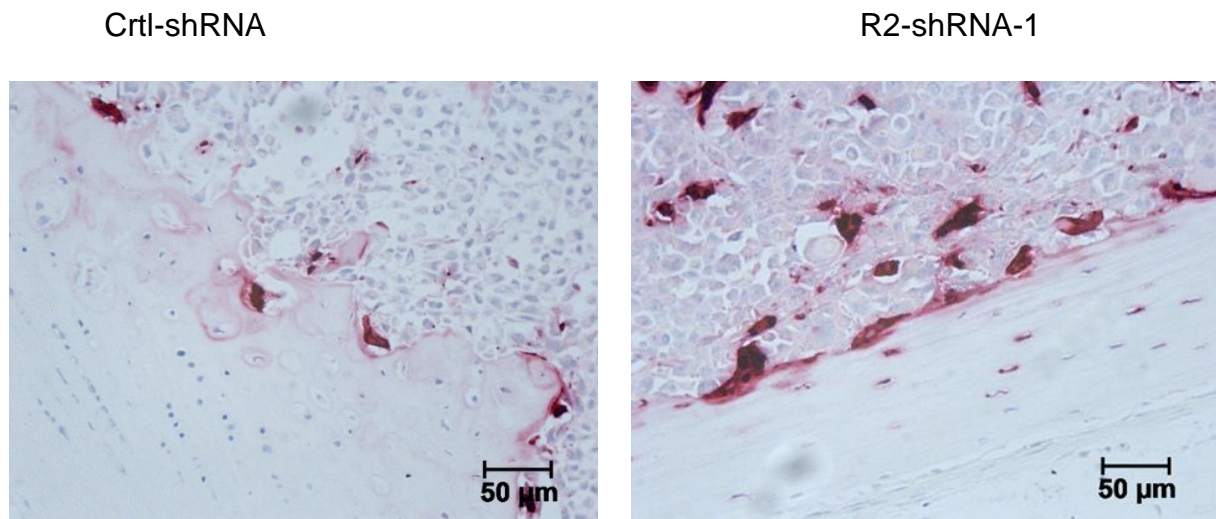
Durch das Anfärben der Tartrat-resistenten Phosphatasen in Osteoklasten stellen sich diese rot dar. Alle TRAP gefärbten Schnitte zeigen angefärbte Osteoklasten entlang der Tumor-Knochen-Grenze. Die Osteoklastenanzahl variiert zwischen 11 und 19. Die



durchschnittliche Osteoklastenanzahl der Kontrollgruppe liegt bei  $13,36 \pm 2,143$  und ist damit geringer als die der Versuchsgruppe mit  $16,06 \pm 2,182$  (s. Abb. 12).



**Abbildung 12:** Darstellung der mittleren Anzahl der TRAP positiven Osteoklasten pro Millimeter Knochenoberfläche entlang der Tumor-Knochen-Grenze.

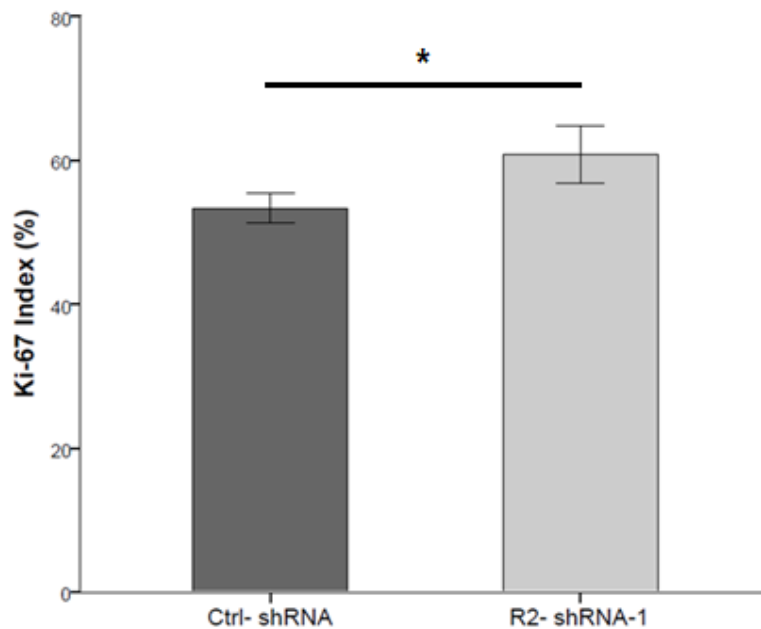


**Abbildung 13:** Repräsentative TRAP gefärbte Tumorareale der zwei Gruppen.

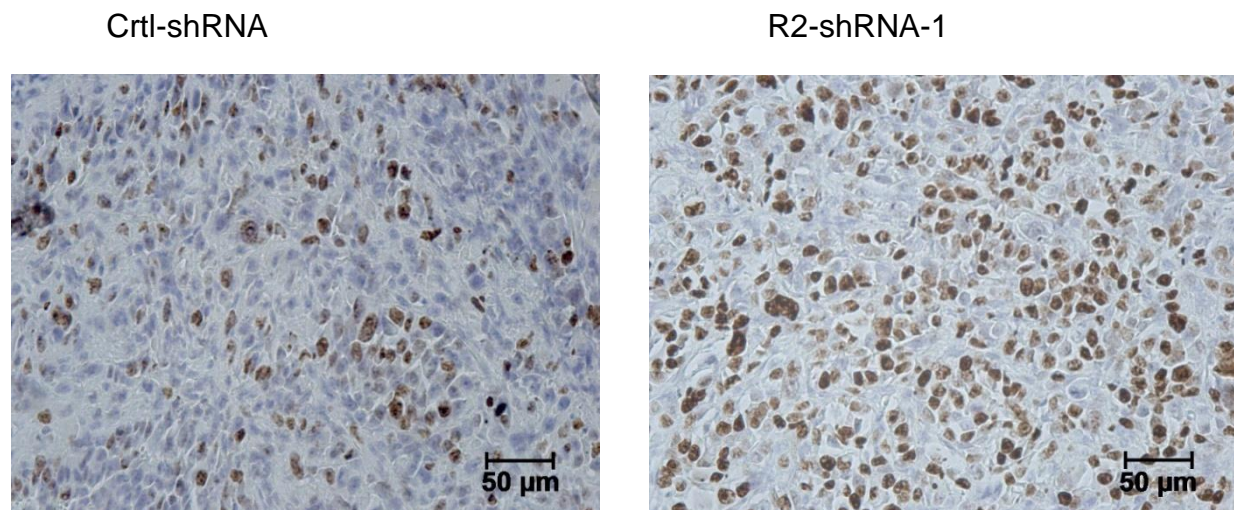
### 3.5.3 Ki-67-Proliferationsindex

Der Ki-67-Proliferationsindex gibt die positiven Tumorzellen bezogen auf die Gesamtzahl der Tumorzellen an. Ki-67 wird im Zellkern angefärbt. Alle ausgewerteten Tumore sind hochproliferierend. Die Auszählung der positiv gefärbten Zellen ergab in

der Kontrollgruppe einen Mittelwert von 53 Prozent mit einer Spannweite von 51 bis 55 Prozent. Mit einem mittleren Ki-67-Index von 61 Prozent und einer Spannweite von 55 bis 66 Prozent weist die Versuchsgruppe einen höheren Index auf. Der Ki-67-Index unterscheidet sich damit zwischen den Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ). (s. Abb. 14)



**Abbildung 14:** Balkendiagramm zur Darstellung des Ki-67-Proliferationsindex der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe anhand der immunhistochemischen Färbung.



**Abbildung 15:** Repräsentative Ki-67 gefärbte Tumorareale der zwei Gruppen.

#### **3.5.4 Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse**

Es zeigt sich kein Unterschied in Bezug auf die Ausdehnung der Tumorfläche zwischen den Gruppen, jedoch weist die Gruppe der Tumore nach einem TRAIL-R2 Knockdown im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant höheren Ki-67-Proliferationsindex und eine höhere Anzahl an Osteoklasten entlang der Tumor-Knochen-Grenze auf.

## 4 Diskussion

Die Ausbildung von Metastasen ist die Haupttodesursache von Patienten mit Brustkrebs und stellt einen komplexen, aus mehreren Stufen bestehenden Prozess einschließlich der Interaktion der Krebszellen mit der Mikroumgebung dar [78, 79]. Knochenmetastasen bedingen eine gestörte Balance von Osteoklasten und Osteoblasten, die mit der Dysregulation des normalen Knochenremodelings einhergeht [8]. Es entsteht ein Teufelskreis (Circulus vitiosus) aus Knochenabbau und Tumorwachstum [8, 9, 14]. Das bessere Verständnis einzelner Schritte der Metastasierungskaskade und der Bedeutung der TRAIL-Rezeptor-Expression kann zu gezielten Therapieansätzen zur Vorbeugung und Behandlung von Metastasen führen [79].

Als Beitrag zur Erweiterung des Wissens um den Einfluss der TRAIL-Rezeptor-Expression auf das Tumorwachstum wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese untersucht, dass die selektive Herabregulation von TRAIL-R2 in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231-BO nach direkter intratibialer Injektion zu einem epithelialen Phänotyp führt und damit das Auswachsen intratibialer Metastasen begünstigt. Es wird davon ausgegangen, dass das Tumorwachstum nach Ansiedlung im Knochen nicht negativ von TRAIL-R2 beeinflusst wird und TRAIL-R2 in Bezug auf seine protumorale Wirkung auf einen früheren Schritt der Metastasen-kaskade einwirkt [56]. Es zeigte sich nach intrakardialer Brustkrebszellinjektion zwar eine verminderte Frequenz an Metastasen, aber kein Unterschied in der Knochendestruktion zwischen den Gruppen [56]. Die Herunterregulation von TRAIL-R2 in der Brustkrebszelllinie führt zu einem erhöhten E-Cadherin Level und einem verminderten Level des SDF-1 Chemokinrezeptors CXCR4, der eine wichtige Rolle bei der Migration von Brustkrebszellen spielt [56, 80].

Im Folgenden sollen die angewandten Methoden evaluiert werden, um die Belastbarkeit der Ergebnisse beurteilen zu können, bevor diese eingeordnet und bewertet werden. Abschließend werden die Ergebnisse und die klinische Relevanz des durchgeführten Versuches verdeutlicht und ein Ausblick auf zukünftige und erweiterte Untersuchungen gegeben.

## 4.1 Methodenkritik

Wie auch Fisher et al. für ihr Modell zur Untersuchung des Wachstums und der Invasion des Prostatakarzinoms im Knochen beschreiben, ist es wichtig, ein zuverlässiges und reproduzierbares Modell für die Untersuchungen der zellulären und molekularen Interaktionen, die dem Verhalten von skelettalen Metastasen zugrunde liegen, zu etablieren [81]. Um ein möglichst aussagekräftiges Brustkrebsmodell zu etablieren, orientierte sich die vorliegende Studie bei ihrem Vorgehen an bereits verwendeten murinen intratibialen Tiermodellen.

Ein zentraler Schritt der Untersuchung besteht in der Injektion der Brustkrebszellen in den Körper der Versuchstiere. Bei verschiedenen Xenograft-Modellen werden die intrakardiale Injektion, die intratibiale Injektion und die Inokulation von Brustkrebszellen in das Brustfettpolster unterschieden [82, 83]. Bei dem vorangegangenen Tierversuch von Fritsche et al. wurden die Brustkrebszellen intrakardial injiziert und es wurde gezeigt, dass es nach dem selektiven Ausschalten von TRAIL-Rezeptoren in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231-BO zu einer geringeren Absiedlungsfrequenz von Tumorzellen in die Maustibia kommt [56]. Die intrakardiale Injektion hat den Vorteil, dass frühere Stadien der Metastasierung wie die initiale Ansiedlung der Karzinomzellen im Zielorgan, die Proliferation und die Etablierung der Krebszellen zu Tumoren dargestellt werden können, sie erlaubt aber keine dezidierte Aussage über das Auswachsen der Zellen im Knochen [83]. Um weiterführende Erkenntnisse über das in vivo Wachstum der Mammakarzinomzellen im Knochen in Abhängigkeit von der TRAIL-Rezeptorexpression zu gewinnen, wurde eine intratibiale Tumorzellinjektion für die vorliegende Studie ausgewählt. Mit der intratibialen Injektion wird das finale Stadium der Knochenkolonisation dargestellt, wodurch die Beziehung der Krebszellen zum Knochen und das Tumorwachstum im Knochen unabhängig von „Homing“-Mechanismen untersucht werden können [82]. Durch die intratibiale Injektion soll eine hohe Inzidenz der Tumorentwicklung im Knochen erreicht werden können [81]. Wie in vielen intratibialen Brustkrebsmodellen wurde auch in dieser Studie eine Subpopulation der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 verwendet [84-89]. Dabei bewährte sich die intraperitoneale Anästhesie der Mäuse mit Ketamin und Xylazin [81, 89] und die Injektion der Brustkrebszellen mit einer 27-Gauge-Nadel [85-88]. Wie von Wright et al. und Dai et al. beschrieben, wurde die Tumorzellsuspension, nach Bewegen der Nadel durch das Zentrum des Patellarligaments und in das

proximale Ende der Tibia, direkt in den Knochenmarksraum injiziert [90, 91]. Die Entstehung von intratibialen Tumoren ließ sich in den kommenden Wochen beobachten, jedoch mit einer geringeren Frequenz als vermutet. Um das Gelingen der Injektion zu verbessern und diese sicher zu stellen, kann zukünftig eine Inzision durch die Haut durchgeführt werden, um die Tibia und die Patellarsehne besser zu visualisieren [90, 91]. Außerdem kann in Erwägung gezogen werden, für die Penetration des kortikalen Knochens und die Injektion der Zellen separate Nadeln zu verwenden, da feine Nadeln beim Eindringen in den Knochen häufig blockieren oder beschädigt werden [90-92]. Dai et al. beschreibt beispielsweise die Verwendung einer 30-Gauge-Nadel für das Durchdringen des Knochens und einer feineren 27-Gauge-Nadel für die anschließende Injektion, um das beschriebene Risiko zu minimieren [91]. Weiterhin ist es wichtig, bei der intratibialen Injektion ein Austreten der Tumorzellen nach Injektion, bedingt durch den erhöhten Druck nach Tumorzellinjektion und den limitierten Platz im Markraum der Tibia, zu vermeiden [91-93]. Auch hier kann eine Injektion unter Sicht nach Inzision zur besseren Kontrolle und die Verwendung von Knochenwachs zum Abdichten der Injektionsstelle einen Austritt von Krebszellen vermeiden [91, 93]. Der Austritt von Zellen kann zu einem veränderten Auftreten von Tumoren und damit zu erheblichen experimentellen Variationen führen [93]. Zwar wurde, wie vorgeschrieben, lediglich ein maximales Volumen von 10 µl Zellsuspension injiziert, welches ohne Leckage möglich ist, jedoch kann ein Austritt von Zellen bei dieser Studie nicht final ausgeschlossen werden und ein möglicher Grund für die geringe Metastasierungsfrequenz sein [87, 88, 90].

Um mögliche Probleme durch die eigene Immunabwehr der Versuchstiere zu umgehen, wurden Versuchstiere mit Immundefizienz verwendet. Im Gegensatz zu den bereits erwähnten intratibialen Brustkrebsmodellen wurden keine Nacktmäuse, sondern SCID (Severe combined immunodeficiency) Mäuse verwendet, die eine stärkere Immundefizienz aufweisen [94]. Durch eine angezüchtete Thymusaplasie haben die Nacktmäuse ein defizientes T-Lymphozytensystem, besitzen durch das Vorhandensein von B-Lymphozyten aber noch eine Restimmunität [95]. Die SCID-Mäuse haben ein Defizit sowohl an T- als auch an B-Lymphozyten, wodurch angenommen wird, dass einige Krebszelllinien in diesen Mäusen im Vergleich zu den Nacktmäusen schneller wachsen und zu einer gesteigerten Inzidenz von Metastasen führen [94, 96-98].

Für die Untersuchung standen insgesamt zwölf SCID-Mäuse zur Verfügung, daraus ergibt sich eine Fallzahl von 24 Mäusebeinen. Von den 24 Fällen kam es in acht Fällen zu der Entwicklung von Tumoren. Durch die geringe Fallanzahl an Events (Metastasen) konnten die Ergebnisse größtenteils nur deskriptiv beschrieben werden. Um aussagekräftigere, statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, müsste eine größere Fallzahl gewählt werden. Aus ethischen Überlegungen sind bei Tierversuchen und vor allem bei der Überprüfung und Etablierung neuer Verfahren jedoch häufig nur kleine Fallzahlen möglich.

Im Verlauf der Studie wurde das Tumorwachstum mittels der Biolumineszenzmessung dargestellt. Diese war jedoch erst ab Woche 7 umsetzbar. Mögliche Erklärungen hierfür sind eine zu geringe Anzahl an Tumorzellen in den ersten Wochen und ein damit verbundenes Signal unter der Detektionsschwelle [99], eine anfänglich zu geringe Gabe von Luciferin [100 mg/kg Körpergewicht] oder, wovon wir am ehesten ausgehen, die Verwendung eines defekten Luciferin-Substrats zu Beginn der Untersuchung. Für das Biolumineszenz Tumormonitoring wurde eine minimale Dosis von 75 mg/kg beschrieben [100], jedoch hat die erhöhte Dosis von 150 mg/kg den Vorteil, über einen langen Erfassungszeitraum das Plateau zu halten [99].

Ein weiterer, möglicherweise kritischer Aspekt innerhalb der Methodik liegt in der Histologie. Histologische Schnitte, wie sie in dieser Studie verwendet wurden, haben den Nachteil, dass man die Strukturen nicht dreidimensional darstellen kann. Es erfolgt demnach eine zweidimensionale Auswertung der eigentlich dreidimensionalen Tumorausdehnung. Um eine möglichst gute Annäherung an die Ausdehnung zu bekommen und damit den Fehler so klein wie möglich zu halten, wurden die aufeinanderfolgenden Schnittpräparate mikroskopiert und so die Präparate mit der größten Tumorausdehnung ermittelt. Es ist jedoch hervorzuheben, dass die Kombination der hier eingesetzten Untersuchungsverfahren, bestehend aus den Biolumineszenz- und Micro-CT-Untersuchungen in vivo und den post mortem durchgeführten histologischen Analysen, eine Vielzahl von Ergebnissen generiert, die Rückschlüsse auf das Metastasierungsverhalten auf verschiedenen Ebenen erlauben.

Die Untersuchung des Tumorwachstums in Abhängigkeit der TRAIL-R2 Expression wurde in dieser Studie, wie beschrieben, an Mäusen vorgenommen. An Tiermodellen gewonnene Erkenntnisse sind durch Speziesunterschiede nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar [101]. Die geringen Unterschiede zwischen Maus- und

Menschengenom sprechen aber für die Verwendung der Maus als Modellobjekt [102]. Das Mausgenom ist zwar um 14% kleiner als das humane Genom, jedoch haben etwa 99% der Gene des Menschen Homologe im Mausgenom [102]. Vorteilhaft bezüglich der Übertragbarkeit des Mausmodells auf den Menschen ist, wie in dieser Studie angewendet, außerdem die Verwendung einer humanen Brustkrebszelllinie [103]. Dieses in vivo Transplantationsmodell wird als Xenograft-Modell bezeichnet und steht dem syngenetischen Modell gegenüber, bei dem die injizierten Tumorzellen der gleichen Spezies angehören wie die Empfängertiere [103]. Doch auch das Xenograft-Modell zeigt Schwächen. Um bei der Injektion der humanen Krebszellen eine Immunreaktion zu vermeiden, müssen immungeschwächte Tiere verwendet werden, wodurch der Einfluss des Immunsystems auf die Tumor- und Metastasenentstehung nicht berücksichtigt wird [82, 103]. Außerdem bestehen die resultierenden Tumore aus einem Gemisch humaner Krebszellen und muriner Stromazellen und die Interaktion zwischen diesen Zellen muss berücksichtigt werden [82, 103].

## **4.2 Ergebnisdiskussion**

Die der Arbeit zugrunde liegende Hypothese ist, dass der epitheliale Phänotyp der Tumorzellen nach einem Knockdown von TRAIL-R2 zu einem Vorteil beim Auswachsen im Knochen führt. Die histomorphometrische Auswertung der histologischen Präparate weist jedoch keinen Unterschied der Tumorgroße zwischen den Gruppen auf. Auch zeigt die Auswertung anhand der Micro-CT Aufnahmen keinen eindeutigen Knochenverlust und damit keine deutliche Beeinflussung der Knochenparameter durch den TRAIL-R2 Knockdown in den Tumorzellen. In der Auswertung der Knochenparameter relative Knochenmineraldichte (BMD), relatives Knochenvolumen (BV/TV), relative Trabekelanzahl (Tb.N) und relative Trabekeldicke (Tb.Th)) ist kein eindeutiger Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu sehen. Lediglich der Parameter der trabekulären Separation (relativer Trabekelabstand (Tb.Sp)) ist in der Versuchsgruppe etwas größer als in der Kontrollgruppe und der mittlere BMD der Gruppe der Tumore nach einem TRAIL-R2 Knockdown zeigt einen leicht steileren Abfall als der BMD der Kontrollgruppe. Dies könnte für einen erhöhten tumorassoziierten Knochenverlust durch die Herunterregulation von TRAIL-R2 in der Brustkrebszelllinie sprechen. Betrachtet man die Biolumineszenzmessungen erkennt man in Woche neun eine höhere mittlere



Signalintensität der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, den Anstieg der Signalintensität von Woche sieben zu Woche neun betreffend ist jedoch kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Anhand der histologischen Auswertungen zeigt sich allerdings nach der Herabregulation von TRAIL-R2 eine signifikant erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit und eine deutliche Tendenz einer erhöhten Knochenresorption, denn sowohl der Ki-67-Proliferationsindex als auch die Anzahl der Osteoklasten sind in der Versuchsgruppe höher als in der Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass die intratibiale Injektion der TRAIL-R2 Knockdown-Zelllinie im Gegensatz zu der intrakardialen Injektion in der vorangegangenen Studie nicht zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt [56]. Die Korrelation von TRAIL-R2 mit einem höheren Tumorgrad, einem höheren Ki-67-Index, einer höheren Her2/neu Expression, einem positiven Nodalstatus und einem verringerten Bcl-2 in Primärtumoren zeigten Ganten et al. [55]. Weiterhin zeigten Fritsche et al. in vivo und in vitro, dass die Hemmung von TRAIL-R2 die metastatische Kapazität von MDA-MB-231-BO-Zellen beeinträchtigt, sowohl die Proliferation und Migration der Krebszellen als auch die Formation von Metastasen ist reduziert [56]. Sie gehen davon aus, dass TRAIL-R2 bezogen auf seine onkogene Wirkung vor allem in der Regulation der Knochenhomingkapazität von Zellen und während der frühen Kolonisation zum Knochen und weniger beim Tumorwachstum im Knochen eine Rolle spielt [56]. Diese Annahme wird durch unsere Mikro-CT- und Biolumineszenzergebnisse, die nach dem selektiven Ausschalten von TRAIL-R2 in den Tumorzellen keinen eindeutigen Unterschied bzw. eher eine Tendenz zu einem verstärkten Wachstum zu der Kontrollgruppe aufweisen, bestärkt. Ein möglicher Mechanismus für die hemmende Wirkung von einem TRAIL-R2 Knockdown auf die Ausbildung von Knochenmetastasen beim Knochenhoming wurde beschrieben [56]. Es wurde gezeigt, dass der Knockdown von TRAIL-R2 in den MDA-MB-231-BO-Brustkrebszellen zu einem erhöhten E-Cadherin Level führt und zu einer verminderten Kapazität zu SDF-1, die sich durch einen verringerten Expressionslevel des SDF-1 Rezeptors CXCR4 erklären lässt [56]. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird im Brustkrebsgewebe hoch exprimiert und erleichtert die Migration und Invasion von Brustkrebszellen [80]. Fritsche et al. stellten die Hypothese auf, dass die nukleäre TRAIL-R2 Funktion als let-7 Regulator bei der TRAIL-R2 vermittelten Regulation der CXCR4 Expression eine Rolle spielt, da der durch let-7 vermittelte verminderte HMGA2 Level in einer Herunterregulation von CXCR4 resultiert [52, 56, 104].

Unsere Ergebnisse bestärken die Annahme, dass der Knochenmetastasen fördernde Mechanismus durch TRAIL-R2, wie oben beschrieben, beim Knochenhoming stattfindet, lassen jedoch auch vermuten, dass TRAIL-R2 nach Ansiedlung im Knochen eine andere Wirkung aufweist. Unsere Hypothese, dass das selektive Ausschalten von TRAIL-R2 in der Brustkrebszelllinie nach Ansiedlung im Knochen sogar zu einem verstärkten Tumorwachstum führt, wird vor allem durch die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Ki-67- und der TRAP-Färbung nahegelegt. Sowohl der Ki-67-Proliferationsindex als auch die Anzahl der Osteoklasten entlang der Tumor-Knochen-Grenze sind nach intratibialer Tumorzellinjektion in der Gruppe der Tumore mit einem TRAIL-R2 Knockdown höher als in der Kontrollgruppe. Außerdem zeigen die Ergebnisse der Mikro-CT- und Biolumineszenz-Auswertung Tendenzen zu stärkerem Tumorwachstum in der Versuchsgruppe. Die Versuchsgruppe weist in Woche neun eine größere Separation der Trabekel und eine größere Fläche und Intensität des Biolumineszenzsignals auf. Eine mögliche Erklärung für ein verstärktes Tumorwachstum nach der Herunterregulation von TRAIL-R2 in der Brustkrebszelllinie ist der wiedererstandene epitheliale Phänotyp. Die epithelial-mesenchymale Transition ist die favorisierte Erklärung für das Erlangen der Tumorzellen von migrations- und invasionsfähigen Eigenschaften, die Tumorzellen verlieren epitheliale Eigenschaften, verlassen den Primärtumor, gelangen in das Nachbargewebe und treten in die Blutzirkulation ein [105, 106]. Es wird angenommen, dass nach Extravasation in das entfernte Organ eine Umkehrung dieses Prozesses im Sinne einer mesenchymal-epithelial Transition (MET) stattfindet, um Metastasen zu formen, da mesenchymale Zellen eine reduzierte Proliferationsrate aufweisen und die Karzinommetastasen häufig den gleichen Differenzierungsgrad wie die primären Tumore, eine apico-basale Polarität und intakte Zell-Zell-Kontakte, wie die Zonula occludens und adhaerens, aufzeigen [105-107]. Nach dem Knockdown von TRAIL-R2 zeigt der Phänotyp der osteotropen Zelllinie MDA-MB-231-BO in vitro einen erhöhten E-Cadherin Level, eine verminderte Sensitivität zum TRAIL-induzierten Zelltod, reduzierte Level von p-Akt und p-Src und eine beeinträchtigte Zellproliferation und Migrationskapazität [56]. Wir nehmen an, dass der erhöhte E-Cadherin Level nach dem Knockdown von TRAIL-R2 in unserer Studie zu einem Wachstumsvorteil dieser Tumorzellen gegenüber den Kontrolltumorzellen führt. E-Cadherin induziert die Zell-Zell-Adhäsion und limitiert die Zellmotilität, wodurch die Tumorzellen in der Lage sind mit dem kolonisierten Gewebe zu interagieren und die Tumorausbildung erleichtert

wird [63]. Es wird davon ausgegangen, dass die sekundäre Organumgebung die Reexpression von E-Cadherin und damit die MET induzieren kann [108]. Metastasen zeigen häufig sogar eine höhere E-Cadherin Expression als der Primärtumor [109]. Im Gegensatz zum Phänotyp der osteotropen Zelllinie weisen die Tumore nach der Herunterregulation von TRAIL-R2 und intratibialer Zellinjektion eine verstärkte Zellproliferation auf, die auf den Ansiedlungsvorteil durch E-Cadherin zurückgeführt werden kann. Hugo et al. zeigten in vitro, dass E-Cadherin überexprimierende MDA-MB-468 Brustkrebszellen eine gesteigerte Proliferation und eine verminderte Migration aufweisen [110]. Außerdem wurde in Magentumorzellen nachgewiesen, dass die E-Cadherin Expression über die NF- $\kappa$ B Aktivierung und den c-myc Signalweg die Zellproliferation erhöhen kann [111]. Es wurde in mehreren Studien eine Korrelation zwischen E-Cadherin und der Kinase Src gezeigt, die mit den Eigenschaften des epithelialen Phänotyps nach Herunterregulation von TRAIL-R2, verminderter Src Level und gesteigerter E-Cadherin Level, übereinstimmt [56]. Eine hohe Src Aktivität führt über die Destabilisierung der Zelladhäsionkontakte zu verminderten E-Cadherin Leveln und in Brustkrebszellen wurde die Reexpression von E-Cadherin durch die Hemmung der Src Kinase nachgewiesen [112-114]. Ein geringer Level an Src ist dagegen notwendig für die E-Cadherin basierten Zell-Zell Kontakte [115, 116]. In Brustkrebsgewebe wurde eine erhöhte Aktivität und Expression der Kinase Src gefunden [117]. Die Src Aktivität spielt eine Rolle beim Knochenremodeling und das Ausschalten von Src führt zu einer beeinträchtigten Osteoklastendifferenzierung [118]. Interessanterweise zeigt sich in unserem Versuch nach der Herunterregulation von TRAIL-R2 jedoch eine leicht gesteigerte Osteoklastenaktivität. Diese lässt sich durch die erhöhte Tumorzellproliferation und die damit verbundenen gesteigerte Tumorvermittelte Stimulation der Osteoklastenaktivität erklären [119]. Die Krebszellen sezernieren Osteoklasten aktivierende Faktoren wie PTHrP, IL-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die die Osteoklastenformation und die Knochenresorption anregen [119, 120]. Durch die gesteigerte Knochenresorption werden Wachstumsfaktoren aus dem Knochen freigesetzt, die wiederum das Tumorwachstum steigern [119, 120].

Eine weitere mögliche Erklärung für die Tendenz des verstärkten Tumorwachstums nach dem Knockdown von TRAIL-R2 und nach intratibialer Tumorzellinjektion kann neben dem epithelialen Phänotyp in den unterschiedlichen Rezeptorlokalisationen und den damit verbundenen unterschiedlichen, durch TRAIL vermittelten

Wirkmechanismen liegen [41, 43]. Je nach Lokalisation und Signalweg der TRAIL-Rezeptoren können sie proapoptotisch, proinflammatorisch, proliferationsfördernd und onkogen wirken und so das Tumorwachstum unterschiedlich beeinflussen [20, 44, 50, 52]. Auf Basis der hier dargestellten Studienergebnisse wird angenommen, dass sich die Auswirkungen nach einem Knockdown von TRAIL-R2 in den osteotropen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen zwischen den Wirkorten unterscheiden. Es wird vermutet, dass eine onkogene TRAIL-R2 Funktion durch den nukleären TRAIL-R2 zustande kommt [51, 55]. Nachzuweisen wäre ein Vergleich der TRAIL-R2 Lokalisation während des „Homings“ und nach Ansiedlung im Knochen. Es wurde gezeigt, dass die Herkunft der nukleären TRAIL-Rezeptoren die Plasmamembran ist und die nukleäre Translokation TRAIL abhängig über Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgt [121]. Zhang et al. beobachtete die Endozytose von TRAIL-Rezeptoren nach deren Aktivierung in Brustkrebszellen in vitro [122]. TRAIL wurde in hoher Konzentration in metastatischen Brustkrebsproben aus humanem Knochen nachgewiesen und es wurde gezeigt, dass die Src-Aktivität mit der Resistenz der Tumorzellen gegenüber proapoptotischer Effekte durch TRAIL und der Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweges korreliert [123, 124]. Der Knockdown von TRAIL-R2 führt in Tumorzellen zu einem verminderten Src Level und dementsprechend müssten abgeschwächte apoptotische Signale die Folge sein [123, 124].

### **4.3 Klinische Relevanz und Ausblick**

Die Fähigkeit von TRAIL, in Krebszellen selektiv eine Apoptose zu induzieren, führte zu der Entwicklung von rekombinantem TRAIL und agonistischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 spezifischen Antikörpern für die Tumorthherapie, die bisher jedoch nur einen limitierten therapeutischen Erfolg erzielten [40-42]. Neben der Induktion von Apoptose haben TRAIL-Rezeptoren auch die Fähigkeit nicht apoptotische Signalwege auszulösen, die zu erhöhter Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierung führen und damit zur Malignität beizutragen [50]. Eine hohe TRAIL-R2 Expression korreliert bei Brustkrebspatienten mit ungünstigen prognostischen Parametern und fördert die Ausbildung von Knochenmetastasen [56]. Die Herunterregulation von TRAIL-R2 wirkt beim Knochenhoming reduzierend auf die Anzahl der Metastasen hemmt jedoch nicht das Auswachsen der Tumore im Knochen [56]. Daher lag bei dem

vorliegenden Versuchsaufbau der Fokus auf der Überprüfung des Einflusses eines TRAIL-R2 in den Karzinomzellen mit dem expliziten Ziel der Umgehung der initialen Metastasierungsschritte. Unsere Ergebnisse bestätigen tendenziell unsere Hypothese. Es sind jedoch Folgeversuche notwendig, um eine entsprechend statistische Power zu erlangen und somit abschließende Aussagen treffen zu können. Weitere tierexperimentelle Studien sollten mit höheren Fallzahlen und auf Grundlage unseres beschriebenen Versuchsaufbaus mit methodenbedingten Verbesserungen in Bezug auf die Injektion der Tumorzellen durchgeführt werden. Eine Injektion der Zellen unter Sicht und die Verwendung unterschiedlicher Nadeln für die Penetration des Knochens und die anschließende Zellinjektion könnten die Anzahl an auftretenden Events erhöhen [90, 91]. Die Annahme, dass TRAIL-R2 „Homing“-Mechanismen beeinflusst, führt zu der Überlegung, dass die Therapie mit Ziel der Reduktion der TRAIL-R2 Level zur Verhinderung der Ausbildung von Knochenmetastasen am besten zum Zeitpunkt des primären Mammakarzinoms oder der zirkulierenden Krebszellen erfolgen sollte [56]. Die weitere Forschungsarbeit sollte zu einem besseren Verständnis der Wirkung der TRAIL-R2-Expression auf das Tumorstadium und der TRAIL-Rezeptor-Regulation führen, um gezielte Wirkmechanismen auf Mammakarzinomzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Metastasierung zu ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit und die häufigste Krebstodesursache von Frauen in Deutschland [1, 2, 3]. Fast ein Drittel der Patienten entwickeln Rezidive, die in den meisten Fällen mit Metastasen einhergehen, in rund 70 % mit Knochenmetastasen [4, 5, 6].

Es konnte in der vorangegangenen Studie von Fritsche et al. gezeigt werden, dass die Herunterregulation des onkogenen TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand)-Rezeptors 2 in einer osteotropen Subpopulation von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen zu einer verminderten Metastasierungsfrequenz nach intrakardialer Injektion im Mausmodell führt [52, 56]. Es wird angenommen, dass eine Modulation von „Homing“-Mechanismen (durch eine Herabregulation von CXCR4 auf der Zelloberfläche) und ein eher epithelialer Phänotyp der Zellen nach einem TRAIL-R2 Knockdown diesen Effekt erklären [56]. Um diese Hypothese weiter zu stützen und um Faktoren, die durch „Homing“-Effekte zu erklären sind, weitestgehend auszuschließen, wurde im Rahmen eines ergänzenden Tierversuches die Entstehung und das Wachstum von Knochenmetastasen nach intratibialer Injektion von Mammakarzinomzellen mit unterschiedlicher TRAIL-R2-Expression untersucht.

Nach dem Knockdown von TRAIL-R2 in vitro wurden die Tumorzellen in einem Xenograft-Mausmodell in die Tibia der Versuchstiere injiziert. Die Entstehung der intraossären Metastasen wurde mittels Biolumineszenz über neun Wochen verfolgt. Der tumorassoziierte Knochenverlust der Tibia wurde mittels einer Micro-Computertomografie erfasst. Außerdem wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. HE- und Goldner-Färbungen an den tumortragenden Knochenabschnitten ermöglichten eine Histomorphometrie und die Ki-67- und TRAP-Färbungen die Untersuchung weiterführender biologischer Eigenschaften der Tumore.

Es wurde die Entstehung von fünf Tumoren in der TRAIL-R2 Knockdowngruppe und drei Tumoren in der Kontrollgruppe beobachtet. Die Auswertung der Biolumineszenzsignale sowie die Bestimmung des tumorassoziierten Knochenverlustes zeigen keine eindeutigen Unterschiede bzw. sprechen eher für ein Tumorwachstum zu Gunsten der TRAIL-R2-Knockdown-Zellen. Die histologische Aufarbeitung der Tumore konnte keinen Größenunterschied zwischen den Gruppen

zeigen, jedoch war der Ki-67-Proliferationsindex signifikant und die anhand der TRAP-Färbung ermittelte Osteoklastenanzahl in der Gruppe der Tumore mit einem Knockdown von TRAIL-R2 erhöht.

Der epitheliale Phänotyp von osteotropen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen nach einem Knockdown von TRAIL-R2 scheint das intraossäre Auswachsen von Metastasen nach intratibialer Tumorzellinjektion im Xenograft-Mausmodell zu begünstigen. Außerdem bestärkt der Versuch die Annahme, dass der Metastasen fördernde Effekt von TRAIL-R2 durch den Einfluss auf „Homing“-Mechanismen zustande kommt. Die intratibiale Tumorzellinjektion zur Darstellung intraossärer Prozesse wurde als Methodik bestätigt. Verlaufskontrollen der sich entwickelnden Tumore können mittels Biolumineszenz- und Mikro-CT-Bildgebung erfolgen, post mortem können die Veränderungen der Tumor- und Knochenbiologie durch histologische Analysen bestätigt werden. Um die hier präsentierten Ergebnisse zu bestätigen und um ein noch besseres Verständnis der Wirkung der TRAIL-R2-Expression auf das Tumorwachstum zu erlangen, sind weitere tierexperimentelle Studien mit höheren Fallzahlen notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D.; Bray, F., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. 136(5): p. E359-86.
2. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. 65(2): p. 87-108.
3. Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2019): *Krebs in Deutschland 2015/2016*, 12. Ausgabe, p. 17,78. Robert-Koch-Institut, Berlin.
4. Gonzalez-Angulo, A.M., F. Morales-Vasquez, and G.N. Hortobagyi, *Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer*. Adv Exp Med Biol, 2007. 608: p. 1-22.
5. Alkabban, F.M. and T. Ferguson, *Cancer, Breast*, in *StatPearls*. 2018, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
6. Brook, N., Brook, E., Dharmarajan, A., Dass, C. R., Chan, A., *Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets*. Int J Biochem Cell Biol, 2018. 96: p. 63-78.
7. Kuchuk, I., Hutton, B., Moretto, P., Ng, T., Addison, C. L., Clemons, M., *Incidence, consequences and treatment of bone metastases in breast cancer patients-Experience from a single cancer centre*. J Bone Oncol, 2013. 2(4): p. 137-44.
8. Mundy, G.R., *Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 584-93.
9. Kozlow, W. and T.A. Guise, *Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005. 10(2): p. 169-80.
10. Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., Schlimok, G., Diel, I. J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J. Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E. F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G. Y., Bliss, J., Vincent-Salomon, A., Pantel, K., Braun, *A pooled analysis*



- of bone marrow micrometastasis in breast cancer.* N Engl J Med, 2005. 353(8): p. 793-802.
11. Pantel, K., Muller, V., Auer, M., Nusser, N., Harbeck, N., Braun, S., *Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer.* Clin Cancer Res, 2003. 9(17): p. 6326-34.
  12. Braun, S., Kantenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., Pantel, K., *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients.* J Clin Oncol, 2000. 18(1): p. 80-6.
  13. Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T., Mundy, G. R., *Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis.* J Clin Invest, 1996. 98(7): p. 1544-9.
  14. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone metastasis.* N Engl J Med, 2004. 350(16): p. 1655-64.
  15. Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G. R., Guise, T. A., *TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development.* J Clin Invest, 1999. 103(2): p. 197-206.
  16. Hiraga, T., Myoui, A., Hashimoto, N., Sasaki, A., Hata, K., Morita, Y., Yoshikawa, H., Rosen, C. J., Mundy, G. R., Yoneda, T., *Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases.* Cancer Res, 2012. 72(16): p. 4238-49.
  17. Buchs, N., Manen, D., Bonjour, J.P., Rizzoli, R., *Calcium stimulates parathyroid hormone-related protein production in Leydig tumor cells through a putative cation-sensing mechanism.* Eur J Endocrinol, 2000. 142(5): p. 500-5.
  18. Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., Raymond G.G., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.* Immunity, 1995. 3(6): p. 673-82.
  19. Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., Ashkenazi, A., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family.* J Biol Chem, 1996. 271(22): p. 12687-90.

20. Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B., Walczak, H., *TRAIL signalling: decisions between life and death*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(7-8): p. 1462-75.
21. Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V. M., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science, 1997. 277(5327): p. 815-8.
22. Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., Bell, J. I., *TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL*. Curr Biol, 1997. 7(9): p. 693-6.
23. Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., *TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL*. Embo j, 1997. 16(17): p. 5386-97.
24. MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., Alnemri, E. S., *Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 1997. 272(41): p. 25417-20.
25. Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., Smith, C. A., *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. J Exp Med, 1997. 186(7): p. 1165-70.
26. Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y. F., Dixit, V. M., *TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling*. FEBS Lett, 1998. 424(1-2): p. 41-5.
27. Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., Goodwin, R. G., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. Immunity, 1997. 7(6): p. 813-20.
28. Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., Young, P. R., *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 1998. 273(23): p. 14363-7.
29. Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z., Schwall, R.

- H., *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. J Clin Invest, 1999. 104(2): p. 155-62.
30. Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., Lynch, D. H., *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. Nat Med, 1999. 5(2): p. 157-63.
  31. Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., Ashkenazi, A., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5*. Immunity, 2000. 12(6): p. 611-20.
  32. Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., Tschopp, J., *TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8*. Nat Cell Biol, 2000. 2(4): p. 241-3.
  33. Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., Walczak, H., *FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2*. Immunity, 2000. 12(6): p. 599-609.
  34. Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. 276(49): p. 46639-46.
  35. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. Embo j, 1995. 14(22): p. 5579-88.
  36. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. 94(4): p. 491-501.
  37. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors*. Oncogene, 2003. 22(53): p. 8628-33.
  38. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. 94(4): p. 481-90.
  39. Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., Korsmeyer, S. J., *Distinct BH3 domains either sensitize or activate*

- mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics.* Cancer Cell, 2002. 2(3): p. 183-92.
40. von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., Montinaro, A., Hartwig, T., Lemke, J., Legler, K., Annewanter, F., Campbell, A. D., Taraborrelli, L., Grosse-Wilde, A., Coy, J. F., El-Bahrawy, M. A., Bergmann, F., Koschny, R., Werner, J., Ganten, T. M., Schweiger, T., Hoetzenecker, K., Kenessey, I., Hegedus, B., Bergmann, M., Hauser, C., Egberts, J. H., Becker, T., Rocken, C., Kalthoff, H., Trauzold, A., Anderson, K. I., Sansom, O. J., Walczak, H., *Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-driven cancer progression, invasion, and metastasis.* Cancer Cell, 2015. 27(4): p. 561-73.
  41. von Karstedt, S., A. Montinaro, and H. Walczak, *Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy.* Nat Rev Cancer, 2017. 17(6): p. 352-366.
  42. Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., Walczak, H., *Getting TRAIL back on track for cancer therapy.* Cell Death Differ, 2014. 21(9): p. 1350-64.
  43. Bertsch, U., Roder, C., Kalthoff, H., Trauzold, A., *Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2.* Cell Death Dis, 2014. 5: p. e1390.
  44. Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schutze, S., Schafer, H., Oestern, S., Roder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., Walczak, H., Kalthoff, H., *CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells.* Oncogene, 2001. 20(31): p. 4258-69.
  45. Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K. M., Jeremias, I., *TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB.* Oncogene, 2003. 22(25): p. 3842-52.
  46. Baader, E., Toloczko, A., Fuchs, U., Schmid, I., Beltinger, C., Ehrhardt, H., Debatin, K. M., Jeremias, I., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects.* Cancer Res, 2005. 65(17): p. 7888-95.
  47. Son, J.K., S. Varadarajan, and S.B. Bratton, *TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1.* Cell Death Differ, 2010. 17(8): p. 1288-301.

48. Leverkus, M., Sprick, M. R., Wachter, T., Denk, A., Brocker, E. B., Walczak, H., Neumann, *TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2*. J Invest Dermatol, 2003. 121(1): p. 149-55.
49. Morel, J., Audo, R., Hahne, M., Combe, B., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*. J Biol Chem, 2005. 280(16): p. 15709-18.
50. Trauzold, A., Siegmund, D., B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., Wajant, H., *TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncogene, 2006. 25(56): p. 7434-9.
51. Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S. F., Gores, G. J., *Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. 290(1): p. G129-36.
52. Haselmann, V., Kurz, A., Bertsch, U., Hubner, S., Olempska-Muller, M., Fritsch, J., Hasler, R., Pickl, A., Fritsche, H., Annawanter, F., Engler, C., Fleig, B., Bernt, A., Roder, C., Schmidt, H., Gelhaus, C., Hauser, C., Egberts, J. H., Heneweer, C., Rohde, A. M., Boger, C., Knippschild, U., Rocken, C., Adam, D., Walczak, H., Schutze, S., Janssen, O., Wulczyn, F. G., Wajant, H., Kalthoff, H., Trauzold, *Nuclear death receptor TRAIL-R2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells*. Gastroenterology, 2014. 146(1): p. 278-90.
53. Leithner, K., Stacher, E., Wurm, R., Ploner, F., Quehenberger, F., Wohlkoenig, C., Balint, Z., Polachova, J., Olschewski, A., Samonigg, H., Popper, H. H., Olschewski, H., *Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy*. Lung Cancer, 2009. 65(1): p. 98-104.
54. Kojima, Y., Nakayama, M., Nishina, T., Nakano, H., Koyanagi, M., Takeda, K., Okumura, K., Yagita, H., *Importin beta1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells*. J Biol Chem, 2011. 286(50): p. 43383-93.
55. Ganten, T. M., Sykora, J., Koschny, R., Batke, E., Aulmann, S., Mansmann, U., Stremmel, W., Sinn, H. P., Walczak, H., *Prognostic significance of tumour*

- necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer.* J Mol Med (Berl), 2009. 87(10): p. 995-1007.
56. Fritsche, H., Heilmann, T., Tower, R. J., Hauser, C., von Au, A., El-Sheikh, D., Campbell, G. M., Alp, G., Schewe, D., Hübner, S., Tiwari, S., Kownatzki, D., Boretius, S., Adam, D., Jonat, W., Becker, T., Glüer, C. C., Zöller, M., Kalthoff, H., Schem, C., Trauzold, A., *TRAIL-R2 promotes skeletal metastasis in a breast cancer xenograft mouse model.* Oncotarget, 2015. 6(11): p. 9502-16.
  57. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* J Clin Invest, 2009. 119(6): p. 1420-8.
  58. Yang, J. and R.A. Weinberg, *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.* Dev Cell, 2008. 14(6): p. 818-29.
  59. Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., Palacios, J., *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype.* Cancer Res, 2008. 68(4): p. 989-97.
  60. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.* Nat Rev Cancer, 2002. 2(6): p. 442-54.
  61. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, *Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?* Cancer Res, 2005. 65(14): p. 5991-5; discussion 5995.
  62. Nutter, F., Holen, I., Brown, H. K., Cross, S. S., Evans, C. A., Walker, M., Coleman, R. E., Westbrook, J. A., Selby, P. J., Brown, J. E., Ottewill, P. D., *Different molecular profiles are associated with breast cancer cell homing compared with colonisation of bone: evidence using a novel bone-seeking cell line.* Endocr Relat Cancer, 2014. 21(2): p. 327-41.
  63. Wells, A., C. Yates, and C.R. Shepard, *E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas.* Clin Exp Metastasis, 2008. 25(6): p. 621-8.
  64. Makdissi, F. B., Machado, L. V., Oliveira, A. G., Benvenuti, T. T., Katayama, M. L., Brentani, M. M., Osorio, C. A., Mourao Netto, M., Lyra, E. C., Carvalho, F., Goes, J. C., Folgueira, M. A., *Expression of E-cadherin, Snail and Hkai in epithelial cells isolated from the primary tumor and from peritumoral tissue of invasive ductal breast carcinomas.* Braz J Med Biol Res, 2009. 42(12): p. 1128-37.

65. Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E. Jung, A., Kirchner, T., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. Cells Tissues Organs, 2005. 179(1-2): p. 56-65.
66. Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M., Nishimura, R., *A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro*. J Bone Miner Res, 2001. 16(8): p. 1486-95.
67. Wetterwald, A., van der Pluijm, G., Que, I., Sijmons, B., Buijs, J., Karperien, M., Lowik, C. W., Gautschi, E., Thalmann, G. N., Cecchini, M., *Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease*. Am J Pathol, 2002. 160(3): p. 1143-53.
68. van der Pluijm, G., Sijmons, B., Vloedgraven, H., Deckers, M., Papapoulos, S., Lowik, C., *Monitoring metastatic behavior of human tumor cells in mice with species-specific polymerase chain reaction: elevated expression of angiogenesis and bone resorption stimulators by breast cancer in bone metastases*. J Bone Miner Res, 2001. 16(6): p. 1077-91.
69. Sato, A., B. Klaunberg, and R. Tolwani, *In vivo bioluminescence imaging*. Comp Med, 2004. 54(6): p. 631-4.
70. Buie, H. R., Campbell, G. M., Klinck, R. J., MacNeil, J. A., Boyd, S. K., *Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis*. Bone, 2007. 41(4): p. 505-15.
71. Campbell, G. M., Tiwari, S., Grundmann, F., Purcz, N., Schem, C., Gluer, C., *Three-dimensional image registration improves the long-term precision of in vivo micro-computed tomographic measurements in anabolic and catabolic mouse models*. Calcif Tissue Int, 2014. 94(3): p. 282-92.
72. Lüllmann-Rauch, R. (2009): *Taschenlehrbuch Histologie*, 3. Auflage, p. 600-604. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
73. Honig, A., Rieger, L., Kapp, M., Krockenberger, M., Eck, M., Dietl, J., Kammerer, U., *Increased tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression in malignant breast, ovarian and melanoma tissue: an investigational study*. BMC Cancer, 2006. 6: p. 199.

74. Halleen, J. M., Tiitinen, S. L., Ylipahkala, H., Fagerlund, K. M., Vaananen, H. K., *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption*. Clin Lab, 2006. 52(9-10): p. 499-509.
75. Chao, T. Y., Yu, J. C., Ku, C. H., Chen, M. M., Lee, S. H., Janckila, A. J., Yam, L. T., *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a useful serum marker for extensive bone metastasis in breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2005. 11(2 Pt 1): p. 544-50.
76. van de Wijngaert, F.P. and E.H. Burger, *Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: a possible marker for (pre)osteoclast identification*. J Histochem Cytochem, 1986. 34(10): p. 1317-23.
77. Schem, C., Bauerschlag, D., Bender, S., Lorenzen, A. C., Loermann, D., Hamann, S., Rosel, F., Kalthoff, H., Gluer, C. C., Jonat, W., Tiwari, S., *Preclinical evaluation of sunitinib as a single agent in the prophylactic setting in a mouse model of bone metastases*. BMC Cancer, 2013. 13: p. 32.
78. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(8): p. 591-602.
79. Kimbung, S., N. Loman, and I. Hedenfalk, *Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases*. Semin Cancer Biol, 2015. 35: p. 85-95.
80. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., Zlotnik, A., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. 410(6824): p. 50-6.
81. Fisher, J. L., Schmitt, J. F., Howard, M. L., Mackie, P. S., Choong, P. F., Risbridger, G. P., *An in vivo model of prostate carcinoma growth and invasion in bone*. Cell Tissue Res, 2002. 307(3): p. 337-45.
82. Thibaudeau, L., Taubenberger, A. V., Holzapfel, B. M., Quent, V. M., Fuehrmann, T., Hesami, P., Brown, T. D., Dalton, P. D., Power, C. A., Hollier, B. G., Hutmacher, D. W., *A tissue-engineered humanized xenograft model of human breast cancer metastasis to bone*. Dis Model Mech, 2014. 7(2): p. 299-309.
83. Campbell, J. P., Merkel, A. R., Masood-Campbell, S. K., Elefteriou, F., Sterling, J. A., *Models of bone metastasis*. J Vis Exp, 2012(67): p. e4260.



84. Lau, W. M., Doucet, M., Stadel, R., Huang, D., Weber, K. L., Kominsky, S. L., *Enpp1: a potential facilitator of breast cancer bone metastasis*. PLoS One, 2013. 8(7): p. e66752.
85. Luo, K. W., Ko, C. H., Yue, G. G., Gao, S., Lee, J. K., Li, G., Fung, K. P., Leung, P. C., Evdokiou, A., Lau, C. B., *The combined use of Camellia sinensis and metronomic zoledronic acid in a breast cancer-induced osteolysis mouse model*. J Cancer Res Clin Oncol, 2015. 141(6): p. 1025-36.
86. Rucci, N., Recchia, I., Angelucci, A., Alamanou, M., Del Fattore, A., Fortunati, D., Susa, M., Fabbro, D., Bologna, M., Teti, A., *Inhibition of protein kinase c-Src reduces the incidence of breast cancer metastases and increases survival in mice: implications for therapy*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 318(1): p. 161-72.
87. Swami, S., Johnson, J., Bettinson, L. A., Kimura, T., Zhu, H., Albertelli, M. A., Johnson, R. W., Wu, J. Y., *Prevention of breast cancer skeletal metastases with parathyroid hormone*. JCI Insight, 2017. 2(17).
88. Zinonos, I., Labrinidis, A., Lee, M., Liapis, V., Hay, S., Ponomarev, V., Diamond, P., Zannettino, A. C., Findlay, D. M., Evdokiou, A., *Apomab, a fully human agonistic antibody to DR5, exhibits potent antitumor activity against primary and metastatic breast cancer*. Mol Cancer Ther, 2009. 8(10): p. 2969-80.
89. Ko, C. H., Yue, G. G., Gao, S., Luo, K. W., Siu, W. S., Shum, W. T., Shiu, H. T., Lee, J. K., Li, G., Leung, P. C., Evdokiou, A., Lau, C. B., *Evaluation of the combined use of metronomic zoledronic acid and Coriolus versicolor in intratibial breast cancer mouse model*. J Ethnopharmacol, 2017. 204: p. 77-85.
90. Wright, L. E., Ottewell, P. D., Rucci, N., Peyruchaud, O., Pagnotti, G. M., Chiechi, A., Buijs, J. T., Sterling, J. A., *Murine models of breast cancer bone metastasis*. Bonekey Rep, 2016. 5: p. 804.
91. Dai, J., Hensel, J., Wang, N., Kruithof-de Julio, M., Shiozawa, Y., *Mouse models for studying prostate cancer bone metastasis*. Bonekey Rep, 2016. 5: p. 777.
92. Kumar, R. M., Arlt, M. J., Kuzmanov, A., Born, W., Fuchs, B., et al., *Sunitinib malate (SU-11248) reduces tumour burden and lung metastasis in an intratibial human xenograft osteosarcoma mouse model*. Am J Cancer Res, 2015. 5(7): p. 2156-68.
93. Sasaki, H., Iyer, S. V., Sasaki, K., Tawfik, O. W., Iwakuma, T., *An improved intrafemoral injection with minimized leakage as an orthotopic mouse model of osteosarcoma*. Anal Biochem, 2015. 486: p. 70-4.

94. Hibberd, C., D.A. Cossigny, and G.M. Quan, *Animal cancer models of skeletal metastasis*. Cancer Growth Metastasis, 2013. 6: p. 23-34.
95. Wortis, H.H., *Immunological responses of 'nude' mice*. Clin Exp Immunol, 1971. 8(2): p. 305-17.
96. Taghian, A., Budach, W., Zietman, A., Freeman, J., Gioioso, D., Ruka, W., Suit, H. D., *Quantitative comparison between the transplantability of human and murine tumors into the subcutaneous tissue of NCr/Sed-nu/nu nude and severe combined immunodeficient mice*. Cancer Res, 1993. 53(20): p. 5012-7.
97. Bosma, G.C., R.P. Custer, and M.J. Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse*. Nature, 1983. 301(5900): p. 527-30.
98. Phillips, R.A., M.A. Jewett, and B.L. Gallie, *Growth of human tumors in immune-deficient scid mice and nude mice*. Curr Top Microbiol Immunol, 1989. 152: p. 259-63.
99. Cosette, J., Ben Abdelwahed, R., Donnou-Triffault, S., Sautes-Fridman, C., Flaud, P., Fisson, S., *Bioluminescence-Based Tumor Quantification Method for Monitoring Tumor Progression and Treatment Effects in Mouse Lymphoma Models*. J Vis Exp, 2016(113).
100. Inoue, Y., Kiryu, S., Watanabe, M., Tojo, A., Ohtomo, K., *Timing of imaging after d-luciferin injection affects the longitudinal assessment of tumor growth using in vivo bioluminescence imaging*. Int J Biomed Imaging, 2010. 2010: p. 471408.
101. de Jong, M. and T. Maina, *Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research*. J Nucl Med, 2010. 51(4): p. 501-4.
102. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E. Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B. Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P. Eyraas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N.,

- Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe, D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., mdaas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E. M., Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S. P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C., Lander, E. S., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 2002. 420(6915): p. 520-62.
103. Khanna, C. and K. Hunter, *Modeling metastasis in vivo*. Carcinogenesis, 2005. 26(3): p. 513-23.
104. Yun, J., Frankenberger, C. A., Kuo, W. L., Boelens, M. C., Eves, E. M., Cheng, N., Liang, H., Li, W. H., Ishwaran, H., Minn, A. J., Rosner, M. R., *Signalling pathway for RKIP and Let-7 regulates and predicts metastatic breast cancer*. Embo j, 2011. 30(21): p. 4500-14.

105. Christiansen, J.J. and A.K. Rajasekaran, *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. Cancer Res, 2006. 66(17): p. 8319-26.
106. Bill, R. and G. Christofori, *The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality?* FEBS Lett, 2015. 589(14): p. 1577-87.
107. Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M., Christofori, G., *EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells*. Semin Cancer Biol, 2012. 22(3): p. 194-207.
108. Chao, Y.L., C.R. Shepard, and A. Wells, *Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition*. Mol Cancer, 2010. 9: p. 179.
109. Kowalski, P.J., M.A. Rubin, and C.G. Kleer, *E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases*. Breast Cancer Res, 2003. 5(6): p. R217-22.
110. Hugo, H.J., Gunasinghe N.P.A.D., Hollier B.G., Tanaka T., Blick T., Toh A., Hill P., Gilles C., Waltham M., Thompson E.W., *Epithelial requirement for in vitro proliferation and xenograft growth and metastasis of MDA-MB-468 human breast cancer cells: oncogenic rather than tumor-suppressive role of E-cadherin*. Breast Cancer Res, 2017. 19(1): p. 86.
111. Park, S.Y., J.H. Shin, and S.H. Kee, *E-cadherin expression increases cell proliferation by regulating energy metabolism through nuclear factor-kappaB in AGS cells*. Cancer Sci, 2017. 108(9): p. 1769-1777.
112. Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A. Brunton, V. G., Frame, M. C., *Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling*. Nat Cell Biol, 2002. 4(8): p. 632-8.
113. Dosch, A. R., Dai, X., Gaidarski Iii, A. A., Shi, C., Castellanos, J. A., VanSaun, M. N., Merchant, N. B., Nagathihalli, N. S., *Src kinase inhibition restores E-cadherin expression in dasatinib-sensitive pancreatic cancer cells*. Oncotarget, 2019. 10(10): p. 1056-1069.
114. Nam, J. S., Ino, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., *Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis*. Clin Cancer Res, 2002. 8(7): p. 2430-6.
115. McLachlan, R. W., Kraemer, A., Helwani, F. M., Kovacs, E. M., Yap, A. S., *E-cadherin adhesion activates c-Src signaling at cell-cell contacts*. Mol Biol Cell, 2007. 18(8): p. 3214-23.

116. Liu, W., Kovacevic, Z., Peng, Z., Jin, R., Wang, P., Yue, F., Zheng, M., Huang, M. L., Jansson, P. J., Richardson, V., Kalinowski, D. S., Lane, D. J., Merlot, A. M., Sahni, S., Richardson, D. R., *The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: new therapeutic targets.* Oncotarget, 2015. 6(34): p. 35522-41.
117. Reissig, D., Clement, J., Sanger, J., Berndt, A., Kosmehl, H., Bohmer, F. D., *Elevated activity and expression of Src-family kinases in human breast carcinoma tissue versus matched non-tumor tissue.* J Cancer Res Clin Oncol, 2001. 127(4): p. 226-30.
118. Miyazaki, T., Tanaka, S., Sanjay, A., Baron, R., *The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function.* Mod Rheumatol, 2006. 16(2): p. 68-74.
119. Roodman, G.D., *Biology of osteoclast activation in cancer.* J Clin Oncol, 2001. 19(15): p. 3562-71.
120. Pederson, L., Winding, B., Foged, N. T., Spelsberg, T. C., Oursler, M. J., *Identification of breast cancer cell line-derived paracrine factors that stimulate osteoclast activity.* Cancer Res, 1999. 59(22): p. 5849-55.
121. Mert, U., Adawy, A., Scharff, E., Teichmann, P., Willms, A., Haselmann, V., Colmorgen, C., Lemke, J., von Karstedt, S., Fritsch, J., Trauzold, A., *TRAIL Induces Nuclear Translocation and Chromatin Localization of TRAIL Death Receptors.* Cancers (Basel), 2019. 11(8).
122. Zhang, Y., T. Yoshida, and B. Zhang, *TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells.* Cancer Biol Ther, 2009. 8(10): p. 917-22.
123. Zhang, X. H., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C. A., Norton, L., Smid, M. Foekens, J. A., Massague, J., *Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals.* Cancer Cell, 2009. 16(1): p. 67-78.
124. Sgroi, D.C., *Breast cancer SRC activity: bad to the bone.* Cancer Cell, 2009. 16(1): p. 1-2.

## 7 Anhang

### 7.1 Ergebnistabellen

#### 7.1.1 Ergebnistabellen Biolumineszenzbildgebung

##### 7.1.1.1 Signalfäche und Signalintensität Woche 7 und Woche 9

**Tabelle 10:** Anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelte Signalfächen (mm<sup>2</sup>) und Signalintensitäten (cps) in Woche 7 und 9 je Versuchstier.

ID	Gruppe	Woche	Signalfäche (mm <sup>2</sup> )	Signalintensität (cps)
2	Ctrl-shRNA	7	73,32	1118
8	Ctrl-shRNA	7	5,78	36
11a	Ctrl-shRNA	7	73,15	1058
5	R2-shRNA-1	7	3,64	23
7	R2-shRNA-1	7	104,56	1621
10	R2-shRNA-1	7	95,59	1309
11b	R2-shRNA-1	7	35,45	365
12	R2-shRNA-1	7	13,88	102
2	Ctrl-shRNA	9	149,77	2349
8	Ctrl-shRNA	9	77,68	1321
11a	Ctrl-shRNA	9	118,93	2459
5	R2-shRNA-1	9	60,97	663
7	R2-shRNA-1	9	213,14	5939
10	R2-shRNA-1	9	228,04	6178
11b	R2-shRNA-1	9	148,16	4306
12	R2-shRNA-1	9	83,22	1146

**Tabelle 11:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Signalfächen (mm<sup>2</sup>) in Woche 7 und 9 der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert ± SD (mm <sup>2</sup> )	
		Woche 7	Woche 9
Ctrl-shRNA	3	50,75 ± 31,799	115,46 ± 29,532
R2-shRNA-1	5	50,62 ± 41,759	146,71 ± 66,950

**Tabelle 12:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Signalintensitäten (cps) in Woche 7 und 9 der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD (cps)	
		Woche 7	Woche 9
Ctrl-shRNA	3	737,33 $\pm$ 496,522	2043 $\pm$ 512,502
R2-shRNA-1	5	684 $\pm$ 655,134	3646,4 $\pm$ 2334,64

#### 7.1.1.2 Anstieg Signalfäche und Signalintensität von Woche 7 zu Woche 9

**Tabelle 13:** Anstieg der Signalfäche von Woche 7 zu Woche 9 je Versuchstier.

ID	Gruppe	Anstieg Signalfäche (n-fache Veränderung Woche 7 zu Woche 9)
2	Ctrl-shRNA	2,043
8	Ctrl-shRNA	13,44
11a	Ctrl-shRNA	1,625
5	R2-shRNA-1	16,75
7	R2-shRNA-1	2,038
10	R2-shRNA-1	2,386
11b	R2-shRNA-1	4,179
12	R2-shRNA-1	5,996

**Tabelle 14:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Veränderungen der Signalfächen von Woche 7 zu Woche 9 der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD (n-fache Veränderung Woche 7 zu Woche 9)
Ctrl-shRNA	3	5,702 $\pm$ 5,4734
R2-shRNA-1	5	6,270 $\pm$ 5,4272

**Tabelle 15:** Anstieg der Signalintensität von Woche 7 zu Woche 9 je Versuchstier.

ID	Gruppe	Anstieg Signalintensität (n-fache Veränderung Woche 7 zu Woche 9)
2	Ctrl-shRNA	2,101
8	Ctrl-shRNA	36,69
11a	Ctrl-shRNA	2,324
5	R2-shRNA-1	28,83
7	R2-shRNA-1	3,664
10	R2-shRNA-1	4,720

11b	R2-shRNA-1	11,80
12	R2-shRNA-1	11,23529412

**Tabelle 16:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Biolumineszenzaufnahmen ermittelten Veränderungen der Signalintensitäten (cps) von Woche 7 zu 9 der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert ± SD (n-fache Veränderung Woche 7 zu Woche 9)
Ctrl-shRNA	3	13,71 ± 16,255
R2-shRNA-1	5	12,05 ± 9,0136

## 7.1.2 Ergebnistabellen Mikro-CT-Aufnahmen

**Tabelle 17:** Anhand der MikroCT-Aufnahmen ermittelten relativen Knochenmineraldichten (BMD), relativen Knochenvolumina (BV/TV), relativen Trabekelanzahlen (Tb.N), relativen Trabekeldicken (Tb.Th) und relativen Trabekelabstände je Versuchstier ab Woche 5.

ID	Gruppe	Woche	Relativer BMD	Relatives BV/TV	Relative Tb.N	Relative Tb.Th	Relative Tb.Sp
2	Ctrl-shRNA	5	1	1	1	1	1
8	Ctrl-shRNA	5	1	1	1	1	1
11a	Ctrl-shRNA	5	1	1	1	1	1
5	R2-shRNA-1	5	1	1	1	1	1
7	R2-shRNA-1	5	1	1	1	1	1
10	R2-shRNA-1	5	1	1	1	1	1
11b	R2-shRNA-1	5	1	1	1	1	1
12	R2-shRNA-1	5	1	1	1	1	1
2	Ctrl-shRNA	6	0,8876	0,7956	0,7227	1,1576	1,2946
8	Ctrl-shRNA	6	0,9343	0,8937	1,0799	1,0059	0,9746
11a	Ctrl-shRNA	6	0,9452	0,9177	0,8275	1,0426	1,2115
5	R2-shRNA-1	6	0,9349	0,8969	0,7134	0,9590	1,3059
7	R2-shRNA-1	6	0,9130	0,8699	0,9114	0,9279	1,1727
10	R2-shRNA-1	6	1,0008	1,0067	0,8447	1,0352	1,1005
11b	R2-shRNA-1	6	1,0051	1,0002	1,0008	1,0077	1,0087
12	R2-shRNA-1	6	1,0522	1,0933	0,9014	1,0597	1,0634
2	Ctrl-shRNA	7	0,6755	0,0598	0,5101	0,5333	1,8573
8	Ctrl-shRNA	7	0,9635	0,9607	0,9837	0,9548	1,048
11a	Ctrl-shRNA	7	0,8777	0,8209	0,8077	1,0455	1,2283
5	R2-shRNA-1	7	0,7833	0,6932	0,5327	0,9191	1,7312
7	R2-shRNA-1	7	0,7160	0,5863	0,9583	0,8236	1,7506
10	R2-shRNA-1	7	0,9651	0,9617	0,5753	1,0484	1,1845
11b	R2-shRNA-1	7	1,0064	0,9991	0,9944	1,0371	1,0091
12	R2-shRNA-1	7	1,0222	1,0542	0,7151	1,1276	1,5348



2	Ctrl-shRNA	8	0,6755	0,0598	0,5100	0,5333	1,8573
8	Ctrl-shRNA	8	0,9085	0,8440	0,6821	1,1287	1,4399
11a	Ctrl-shRNA	8	0,8426	0,7454	0,7789	1,0260	1,2821
5	R2-shRNA-1	8	0,7064	0,5701	0,5262	0,9240	1,7632
7	R2-shRNA-1	8	0,5784	0,3868	0,9501	0,8127	1,9216
10	R2-shRNA-1	8	0,8684	0,8120	0,5388	1,0281	1,5584
11b	R2-shRNA-1	8	0,9799	0,9749	0,9341	1,0232	1,1116
12	R2-shRNA-1	8	0,9530	0,9268	0,5496	1,1925	2,0297
2	Ctrl-shRNA	9	0,6755	0,0598	0,5101	0,5333	1,8573
8	Ctrl-shRNA	9	0,8345	0,7379	0,7467	1,0858	1,4408
11a	Ctrl-shRNA	9	0,8027	0,6806	0,7674	0,9486	1,3118
5	R2-shRNA-1	9	0,6549	0,4953	0,4954	0,9353	1,8603
7	R2-shRNA-1	9	0,4733	0,2451	0,9342	0,7981	2,4866
10	R2-shRNA-1	9	0,7358	0,6072	0,3973	1,0060	1,6515
11b	R2-shRNA-1	9	0,8744	0,8060	0,9411	0,9132	1,0871
12	R2-shRNA-1	9	0,8404	0,7504	0,5045	1,1311	1,9887

**Tabelle 18:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Mikro-CT-Aufnahmen ermittelten relativen Knochenmineraldichten (BMD) der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD			
		Woche 6	Woche 7	Woche 8	Woche 9
Ctrl-shRNA	3	0,922 $\pm$ 0,0250	0,839 $\pm$ 0,1207	0,809 $\pm$ 0,0981	0,771 $\pm$ 0,0687
R2-shRNA-1	5	0,981 $\pm$ 0,0506	0,899 $\pm$ 0,1249	0,817 $\pm$ 0,1529	0,716 $\pm$ 0,1440

**Tabelle 19:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Micro-CT-Aufnahmen ermittelten relativen Knochenvolumina (BV/TV) der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD			
		Woche 6	Woche 7	Woche 8	Woche 9
Ctrl-shRNA	3	0,869 $\pm$ 0,0528	0,614 $\pm$ 0,3958	0,550 $\pm$ 0,3488	0,493 $\pm$ 0,3071
R2-shRNA-1	5	0,973 $\pm$ 0,0810	0,859 $\pm$ 0,1845	0,734 $\pm$ 0,2230	0,581 $\pm$ 0,2001

**Tabelle 20:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Micro-CT-Aufnahmen ermittelten relativen Trabekelanzahlen (Tb.N) der Versuchsgruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD			
		Woche 6	Woche 7	Woche 8	Woche 9
Ctrl-shRNA	3	0,877 $\pm$ 0,1499	0,767 $\pm$ 0,1955	0,657 $\pm$ 0,1112	0,675 $\pm$ 0,1167
R2-shRNA-1	5	0,874 $\pm$ 0,0948	0,755 $\pm$ 0,1907	0,700 $\pm$ 0,1981	0,654 $\pm$ 0,1987

**Tabelle 21:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Micro-CT-Aufnahmen ermittelten relativen Trabekeldicken (Tb.Th) der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD			
		Woche 6	Woche 7	Woche 8	Woche 9
Ctrl-shRNA	3	1,069 $\pm$ 0,0646	0,845 $\pm$ 0,2232	0,896 $\pm$ 0,2599	0,856 $\pm$ 0,2349
R2-shRNA-1	5	0,998 $\pm$ 0,0484	0,991 $\pm$ 0,1070	0,996 $\pm$ 0,1258	0,957 $\pm$ 0,1098

**Tabelle 22:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Micro-CT-Aufnahmen ermittelten relativen Trabekelabstände (Tb.Sp) der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD			
		Woche 6	Woche 7	Woche 8	Woche 9
Ctrl-shRNA	3	1,160 $\pm$ 0,1356	1,378 $\pm$ 0,3469	1,526 $\pm$ 0,2427	1,537 $\pm$ 0,2328
R2-shRNA-1	5	1,130 $\pm$ 0,1027	1,442 $\pm$ 0,2970	1,677 $\pm$ 0,3242	1,814 $\pm$ 0,4560

### 7.1.3 Ergebnistabellen Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

**Tabelle 23:** Anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ermittelte Tumorflächen (mm<sup>2</sup>) je Versuchstier.

ID	Gruppe	Tumorfläche (mm <sup>2</sup> )
2	Ctrl-shRNA	21
8	Ctrl-shRNA	7
11a	Ctrl-shRNA	5
5	R2-shRNA-1	2
7	R2-shRNA-1	18
10	R2-shRNA-1	21
11b	R2-shRNA-1	9
12	R2-shRNA-1	5

**Tabelle 24:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ermittelten Tumorausdehnungen (mm<sup>2</sup>) der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD (mm <sup>2</sup> )
Ctrl-shRNA	3	10,82 $\pm$ 7,168
R2-shRNA-1	5	10,98 $\pm$ 7,129

#### 7.1.4 Ergebnistabelle TRAP-Färbung

**Tabelle 25:** Anhand der TRAP-Färbung ermittelte Osteoklastenzahlen pro mm Knochenfläche je Versuchstier.

ID	Gruppe	Osteoklasten/mm Knochenoberfläche
2	Ctrl-shRNA	12,99
8	Ctrl-shRNA	16,15
11a	Ctrl-shRNA	10,94
5	R2-shRNA-1	12,27
7	R2-shRNA-1	16,78
10	R2-shRNA-1	15,36
11b	R2-shRNA-1	18,76
12	R2-shRNA-1	17,13

**Tabelle 26:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der TRAP-Färbung ermittelten Osteoklastenzahlen pro mm Knochenoberfläche der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD (Osteoklasten/mm Knochenoberfläche)
Ctrl-shRNA	3	13,36 $\pm$ 2,143
R2-shRNA-1	5	10,98 $\pm$ 2,182

#### 7.1.5 Ergebnistabellen Ki-67-Färbung

**Tabelle 27:** Anhand der Ki-67-Färbung ermittelte Ki-67-Indexe je Versuchstier.

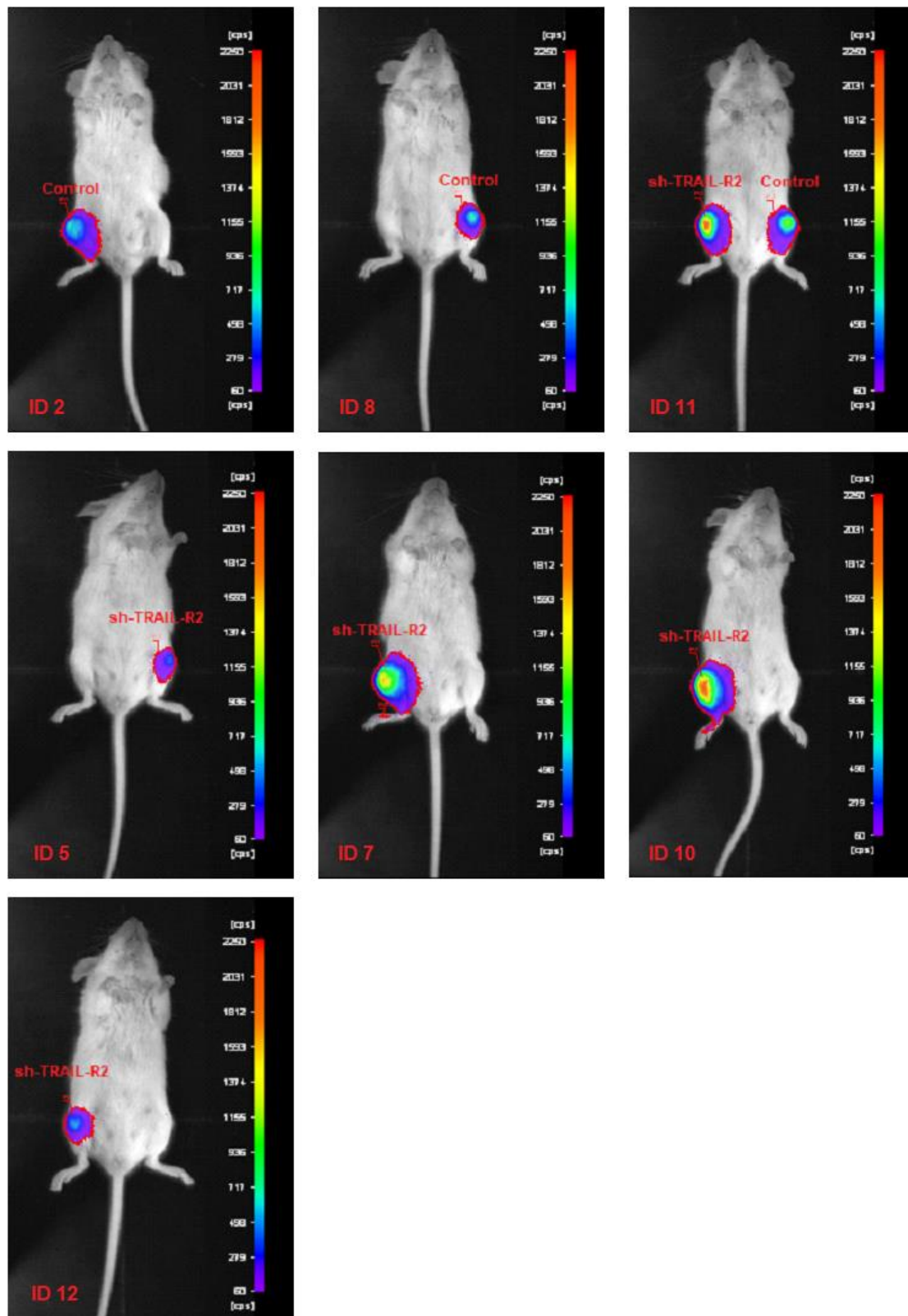
ID	Gruppe	Ki-67 Index (%)
2	Ctrl-shRNA	55
8	Ctrl-shRNA	54
11a	Ctrl-shRNA	51
5	R2-shRNA-1	55
7	R2-shRNA-1	61
10	R2-shRNA-1	62
11b	R2-shRNA-1	60
12	R2-shRNA-1	66

**Tabelle 28:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der KI67-Färbung ermittelten Ki-67 Indexe (%) der zwei Gruppen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SD (%)
Ctrl-shRNA	3	53,33 $\pm$ 1,699
R2-shRNA-1	5	60,80 $\pm$ 3,544

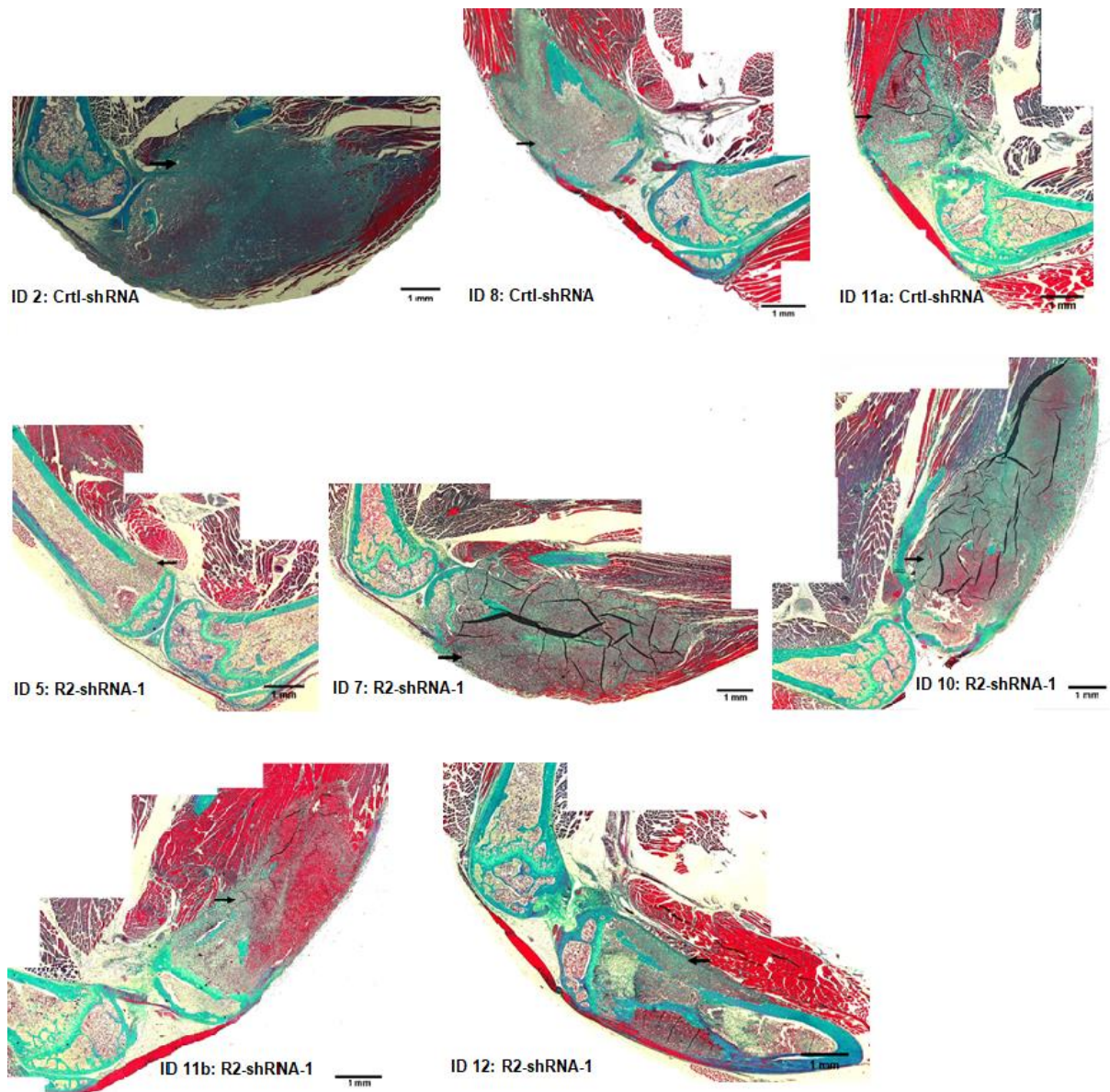
## 7.2 Abbildungen

### 7.2.1 Biolumineszenz-Bildgebung



**Abbildung 16:** Biolumineszenz-Bildgebung der Versuchstiere mit Tumorausbildung in Woche neun.

## 7.2.2 Histologische Abbildungen: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung



**Abbildung 17:** Mittels ImageJ zusammengefügte Bilder der Knieregion der Versuchstiere mit Tumorausbildung, Masson-Goldner-Trichrom gefärbt. Die Pfeile zeigen auf die Tumorareale.

### 7.3 Genehmigung des Tierversuchsantrags

*⇒ Anfrage Butcherit Mail 16.1.  
eig. Ergänzungsantrag!!  
Was ist mit Ros Towers? → Email 17.1.  
⇒ hat Butcherit in AAZ umgewandelt*

#636

Ministerium für Energiewende,  
Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Antrag vom: 10.01.2014

Mein Zeichen: V 242-7224.121-7 (97-7/12)

Herr Butcherit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042

Frau  
Dr. Charlotte Hauser  
Klinik für Allgemeine Chirurgie  
und Thoraxchirurgie  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Arnold-Heller-Str. 3  
24105 Kiel

nachrichtlich:  
Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß  
Tierschutzbeauftragter der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40  
24098 Kiel

EINGEGANGEN  
16. JAN. 2014

15. Januar 2014

**Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken**

Sehr geehrte Frau Dr. Hauser,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 29. Oktober 2012 für das Versuchsvorhaben „In vivo Testung der Auswirkung der Expression von TRAIL-Rezeptoren auf die Osteoblasten-Tumormetastasenzellen-Interaktion des Mammakarzinoms“ weitere 12 Mäuse verwendet werden.

Gegen die Mitwirkung von Herrn Dr. Thorsten Heilmann erhebe ich keine Einwände.

Mit freundlichen Grüßen

*Butcherit*  
Butcherit

Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |  
poststelle@melur.landsh.de | www.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte  
Dokumente. Das Landeswappen ist gesetzlich geschützt.

## 7.4 Teilnahmebestätigung des Seminars „Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung“

C | A | U

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Präsidium

### Teilnahmebestätigung über das Einführungsseminar "Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung" - Theorieteil -

Sehr geehrte Frau / sehr geehrter Herr

**Fiona Leist- Kiessling**

hiermit bestätigen wir Ihnen die Teilnahme am Theorieteil des Einführungsseminars, bei dem folgende Punkte behandelt wurden:

- Einführung
- Ziele und Inhalte
- Relevante Gesetze (TierSchG, AVV)
- Versuchsplanung und Biometrie, Genetik und Zucht
- Hygiene und Infektionskrankheiten
- tierschutzgerechtes Töten
- relevante physiologische Grundlagen der Labornager

Mit freundlichen Grüßen  
Kiel, den 25.03.2014



Prof. Dr. G. Schultheiß  
TSchB / Tierhausleitung  
CAU zu Kiel

Das Präsidium  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
- Der Tierschutzbeauftragte -  
Prof. Dr. med. vet. Gerhard Schultheiß  
Telefon (0431) 880 - 1525  
Olshausenstraße 40 - D 24098 Kiel



## Teilnahmebestätigung über das Einführungsseminar "Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung" - Praxisteil -

Sehr geehrte Frau / sehr geehrter Herr

**Fiona Leist- Kiessling**

– hiermit bestätigen wir Ihnen die Teilnahme am Praxisteil des Einführungsseminars, bei dem folgende Punkte behandelt wurden:

- Handling von Versuchsnagern
- Durchführung gängiger Applikationstechniken (s.c., i.p., i.v., p.o.)
- Anwendung einer Injektionsnarkose
- Probengewinnung (z.B. Blut)
- Tötungsverfahren

Mit freundlichen Grüßen  
Kiel, den 10.04.2014



Prof. Dr. G. Schultheiß  
TSchB / Tierhausleitung  
CAU zu Kiel

Das Präsidium  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
- Der Tierschutzbeauftragte -  
Prof. Dr. med. vet Gerhard Schultheiß  
Telefon (0431) 880 - 1525  
Olshausenstraße 40 - D 24098 Kiel



## 7.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung einiger Menschen nicht möglich gewesen, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Ich möchte mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Christian Schem für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Studie bedanken.

Ein besonders großer Dank geht an Herrn Dr. Thorsten Heilmann für seine engagierte Betreuung bei der Durchführung des Versuches und seine konstruktive Kritik sowie die hilfreichen Tipps bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Sanjay Tiwari, Herrn Dr. Robert Tower und Herrn Dr. Graeme Campbell für die Betreuung während der Versuchsdurchführung.

Außerdem danke ich Frau Gabriele Trompke für die Aufarbeitung der Mäuseknochen und Anfertigung der histologischen Schnitte sowie die Einführung in die histologischen Färbetechniken und bei Frau Sigrid Hamann für Ihre Unterstützung bei der Durchführung der Antikörperfärbung in Zusammenarbeit mit der Pathologie und der Einweisung in die Auswertung der histologischen Präparate.

Des Weiteren möchte ich mich bei Elena Hengstmann für das Korrekturlesen der Arbeit, die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen, die Einweisung in die Statistik und vor allem für die Motivation bedanken.

## 7.6 Veröffentlichung

05/2016

T. Heilmann, F. Leist-Kiessling, R. Tower, G. Campbell, C.C. Glüer, N. Maass, S. Tiwari, A. Trauzold, C. Schem, „Der epitheliale Phänotyp von osteotropen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen nach Knockdown von TRAIL-R2 führt zu einem vermehrten Tumorwachstum nach intratibialer Tumorzellinjektion im Xenograft-Mausmodell“, *Abstract Nr. A-800-0008-00131 als Vortrag, 36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Dresden 2016*