



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Körperliche Aktivität und mediterrane Ernährung als potentielle Modulatoren von  
Osteoprotegerin und sRANKL bei *BRCA1/2* Keimbahnmutationsträgerinnen:  
Ergebnisse der Lebensstilinterventionsstudie LIBRE-1**

Leonie Elfriede Neirich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer **Doktorin der Medizin** genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer\*innen der Dissertation

1. Prof. Dr. Marion B. Kiechle
2. Prof. Dr. Johann J. Hauner

Die Dissertation wurde am 27.01.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022 angenommen.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1. Die physiologische Rolle von <i>BRCA1/2</i> .....	3
2.2. Pathophysiologie der <i>BRCA1/2</i> Keimbahnmutation .....	3
2.3. Der OPG/RANK/RANKL Signalweg.....	4
2.3.1. Der OPG/RANK/RANKL Signalweg im Knochenstoffwechsel.....	4
2.3.2. Weitere Funktionen des OPG/RANK/RANKL Signalwegs .....	6
2.3.3. Der OPG/RANK/RANKL Signalweg im Brustdrüsengewebe .....	7
2.4. Schlüsselrolle des OPG/RANK/RANKL Signalwegs in der Entstehung des Mammakarzinoms.....	8
2.5. OPG/RANK/RANKL Dysfunktion bei <i>gBRCA1/2</i> Keimbahnmutation.....	9
2.6. Therapeutische Einflussnahme auf den OPG/RANK/RANKL Signalweg .....	10
2.7. Beeinflussung des OPG/RANK/RANKL Signalwegs durch körperliche Aktivität.....	11
2.8. Die Beeinflussung des OPG/RANK/RANKL Signalwegs durch Ernährung.....	13
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
3.1. Studiendesign und Rekrutierung.....	14
3.2. Interventionsprogramm SE-VI der LIBRE-1 Studie .....	15
3.3. Erhebung der klinischen Daten.....	16
3.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assays.....	17
3.5. Statistische Auswertung.....	20
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
4.1. Studienpopulation.....	22

4.2. Veränderungen von OPG und sRANKL .....	23
4.3. Veränderungen von interventionsassoziierten Parametern .....	24
4.4. PUFA Korrelationsanalyse.....	25
4.5. Multivariate lineare Regression .....	26
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>28</b>
5.1. Einfluss körperlicher Aktivität auf OPG und sRANKL .....	28
5.2. Einfluss des metabolischen Status auf OPG und sRANKL .....	31
5.3. Einfluss von PUFA auf OPG und sRANKL.....	33
5.4. Einfluss konstitutioneller Parameter auf OPG und sRANKL .....	35
5.5. Limitationen.....	37
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>38</b>
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>41</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>61</b>
9.1. Ergänzungstabelle 1.....	61
9.2. Ein- und Ausschlusskriterien nach LIBRE-1 Studienprotokoll .....	63
9.3. Materialien zur Durchführung der ELISA Tests.....	64
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>66</b>
<b>11. Veröffentlichungen.....</b>	<b>67</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALA	Linolensäure
ARA	Arachidonsäure
BMI	Body mass index
CLA	Linolsäure
CV	Coefficient of variation
CPET	Cardiopulmonary exercise testing
DGLA	Dihomo-gamma-Linolensäure
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPA	Docosapentaensäure
EDA	Eicosadiensäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assays
EPA	Eicosapentaensäure
ER	Östrogenrezeptor
ETA	Eicosatriensäure
FDR	False Discovery Rate
<i>gBRCA1/2</i>	Keimbahnmutation in den Brustkrebsgenen <i>BRCA1</i> oder <i>BRCA2</i>
GLA	gamma-Linolensäure
HR	Homologe Rekombination
HRT	Hormonersatztherapie
IG	Interventionsgruppe
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IKK- $\alpha$	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
IL	Interleukin
KG	Kontrollgruppe
LIBRE-1	Lebensstilintervention bei Frauen mit erblichem Brust- und Eierstockkrebs – Pilotstudie
LIBRE-2	Lebensstilintervention bei Frauen mit erblichem Brust- und Eierstockkrebs – Hauptstudie
MEDAS	Mediterranean Diet Adherence Screener
MedD	Mediterrane Diät

MET-h	Metabolic equivalent of task/-hour
MPA	Medroxyprogesteronazetat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MUFA	Monounsaturated fatty acid
n-3	Omega-3
n-6	Omega-6
n-9	Omega-9
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OC	Ovarialkarzinom
OPG	Osteoprotegerin
PBSO	Prophylaktische bilaterale Salpingoophorektomie
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
PR	Progesteronrezeptor
PTHrP	Parathormon-related Protein
RANK	receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B
RBCM	Red blood cell membranes
REF	Referenznummer
SE	Studieneinschluss
(s)RANKL	(Soluble) receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
V1	Studienvisite drei Monate nach Studieneinschluss in die LIBRE-1 Studie
V2	Studienvisite 12 Monate nach Studieneinschluss in die LIBRE-1 Studie
V3	Studienvisite 24 Monate nach Studieneinschluss in die LIBRE-1 Studie
V4	Studienvisite 36 Monate nach Studieneinschluss in die LIBRE-1 Studie
VO <sub>2</sub> peak	Maximal erreichte Sauerstoffaufnahme (ml/min/kg)

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Der OPG/RANK/RANKL Signalwegs im Knochenmetabolismus.....	5
<b>Abbildung 2.</b> Der OPG/RANK/RANKL Signalwegs im Brustdrüsengewebe. ....	8
<b>Abbildung 3.</b> Assoziation zwischen körperlicher Aktivität, metabolischer Inflammation und dem <i>gBRCA1/2</i> -assoziierten Mammakarzinom.....	<del>13</del> <u>12</u>
<b>Abbildung 4.</b> Design und Ablauf der LIBRE-1 Studie. ....	15
<b>Abbildung 5.</b> Aufbau und Arbeitsschritte der (A) sRANKL und (B) OPG ELISA. ....	19
<b>Abbildung 6.</b> Flussdiagramm der Probandenselektion aus der LIBRE-1 Studienkohorte.....	20
<b>Abbildung 7.</b> Veränderungen der OPG und sRANKL Serumkonzentrationen während der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta V1$ -SE) in den beiden Studiengruppen.....	24
<b>Abbildung 8.</b> Veränderungen in $VO_2$ peak und dem MEDAS Score in den Studiengruppen im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta V1$ -SE). ....	25
<b>Abbildung 9.</b> Assoziation zwischen Veränderungen der OPG Serumkonzentrationen und Veränderungen von n-3 PUFA im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta V1$ -SE). ...	26

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1.</b> Probandencharakteristika beim Studieneinschluss.....	22
<b>Tabelle 2.</b> Veränderungen der OPG und sRANKL Serumkonzentrationen während der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ VI -SE) innerhalb der Studiengruppen und im Gruppenvergleich .....	23
<b>Tabelle 3.</b> Multivariate lineare Regressionsanalyse für den Einfluss konstitutioneller Parameter auf Veränderungen von OPG und sRANKL über im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ VI -SE). .....	27
<b>Ergänzungstabelle 1 (Tabelle 4).</b> Zusammenhang zwischen Veränderung der sRANKL und OPG Serumkonzentrationen und Veränderungen in n-6, n-9 und n-9 Fettsäuren während der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ VI -SE). .....	<del>61</del> <sup>62</sup>

## 1. Einleitung und Fragestellung

Frauen mit pathogenen Keimbahnmutationen der Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* gelten als Hochrisikopatientinnen, da sie im Vergleich zu 10-12% für Brustkrebs und 1-2% für das Ovarialkarzinom in der Allgemeinbevölkerung mit einer kumulativen Lebenszeitwahrscheinlichkeit von 69-72% und/oder 16-59% an einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom erkranken (Kuchenbaecker et al., 2017; Pearce et al., 2015). Diese Zahlen zeigen eine hohe, jedoch keine vollständige Penetranz für die Krebsentstehung, sodass die Existenz von risikomodulierenden endogenen und exogenen Faktoren vermutet wird (M.-C. King, 2003; Lubinski et al., 2012).

Erkenntnisse in der onkologischen Forschung zum sporadischen Mammakarzinom lassen einen Zusammenhang zwischen regelmäßiger körperlicher Aktivität und einer Senkung der Krebsinzidenz, des Rezidivrisikos und der Mortalität vermuten (Friedenreich, 2010; Holmes et al., 2005). Auch das Ernährungsverhalten beeinflusst das Brustkrebsrisiko, insbesondere durch eine Adipositas (Chlebowski et al., 2006; Eliassen et al., 2006; Rosato et al., 2011). Für erblich bedingten *gBRCA1/2*-assoziierten Brustkrebs ist ein solcher Zusammenhang bisher nicht beschrieben worden, insbesondere fehlen prospektive Daten. Für diese Fragestellung wurde die Lebensstil-Intervention bei Frauen mit Erblichem Brust- und Eierstockkrebs (LIBRE-1) Studie unter Förderung der Deutschen Krebshilfe ins Leben gerufen. Ziel ist es, nicht-invasive primärpräventive Strategien für dieses Hochrisikokollektiv zu etablieren, da derzeit den Betroffenen außerhalb von Studien meist nur radikale Operationen, wie die prophylaktische Mastektomie oder prophylaktische bilaterale Salpingoophorektomie (PBSO), zur primären Prävention zur Verfügung stehen. Diese sind unter anderem mit einschneidenden Konsequenzen verbunden, so führt die PBSO zu einer iatrogen-induzierten prämaternen Menopause. Die aktuellen Empfehlungen sehen die PBSO bei *gBRCA1*-Mutationsträgerinnen zum 40. Lebensjahr und bei *gBRCA2*-Mutationsträgerinnen zum 45. Lebensjahr vor, bzw. 5 Jahre vor der frühesten Erkrankung in der Familie (Liede et al., 2017). Dahingehend wird nicht an Brustkrebs-erkrankten Mutationsträgerinnen die Einnahme einer Hormonersatztherapie nach einer PBSO bis zum 50. Lebensjahr empfohlen.



Um nun neue Präventionsstrategien für *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen ableiten zu können, ist ein Verständnis der zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen und mutationsmodulierenden Faktoren in der Entstehung des *gBRCA1/2*-assoziierten Brustkrebses notwendig. Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Progesteron-mediierte Osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK)/RANK-Ligand (RANKL) Signalweg eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese des genetischen Brustkrebses spielt (Schramek et al., 2010), bei *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen hyperaktiviert zu sein scheint (Sigl et al., 2016), und sich durch Gesundheitsverhalten modulieren lässt (S. Ziegler et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit postuliert die Hypothese, dass sich das strukturierte dreimonatige Lebensstil-Interventionsprogramm der LIBRE-1 Studie günstig auf das OPG/sRANKL-Verhältnis in *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen im Sinne einer Reduktion von sRANKL und Erhöhung von OPG auswirken könnte. Sollte ein regelmäßiges körperliches Training und die Einhaltung einer mediterran-basierten Ernährung die OPG und sRANKL Expression in *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen nachhaltig positiv beeinflussen können, wäre auch von einer günstigen Beeinflussung des Knochenstoffwechsels auszugehen (Bergström et al., 2012). Dieser Umstand ist insbesondere für diejenigen Frauen relevant, welche – bedingt durch eine prophylaktische Adnektomie und infolgedessen einsetzenden, chirurgischen Menopause – ein erhöhtes Osteoporose-Risiko aufweisen.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden als *Clinical Trial* im Springer Nature Journal *Breast Cancer Research and Treatment* publiziert (Neirich et al., 2021).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Die physiologische Rolle von *BRCA1/2*

*BRCA1* und *BRCA2* sind als Tumorsuppressorgene maßgeblich an der Gewährleistung der genomischen Integrität und an einer Vielzahl von Zellprozessen beteiligt. Während *BRCA2* bisher vor allem mit DNA-Rekombinations- und Reparaturprozessen im Rahmen der homologen Rekombination (HR) assoziiert werden konnte (Foulkes & Shuen, 2013; Pellegrini et al., 2002), erfüllt das *BRCA1* Protein viele weitere ubiquitäre Zellfunktionen. Als maßgeblicher Initiator der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels HR aktiviert es den einzigen potentiell fehlerfreien Reparaturmechanismus in eukaryotischen Zellen (Turner et al., 2005; Venkitaraman, 2014). Zudem ist es über die Beeinflussung von H2A Histonen in die Regulation von Heterochromatin nach DNA-Schädigung (Narod & Foulkes, 2004) und im Rahmen von Replikationsstress an der post-translationalen Modifikation von Proteinen beteiligt (Hashizume et al., 2001; Morris & Solomon, 2004). Eine *BRCA1* Defizienz führt so über den Ausfall verschiedener zellulärer und nukleärer Regulationsfunktionen zu einer Akkumulation von DNA-Schäden (Venkitaraman, 2014). Zudem spielt *BRCA1* eine wichtige Rolle in der Differenzierung des Brustgewebes. Über eine Inhibition der Sexualhormonrezeptoren Östrogenrezeptor (ER)  $\alpha$  und Progesteronrezeptor (PR) supprimiert *BRCA1* physiologisch die Proliferation von sexualhormonabhängigen Brustepithelzellen (Ma et al., 2006).

### 2.2. Pathophysiologie der *BRCA1/2* Keimbahnmutation

Gemäß der Knudson-Hypothese stellt eine *gBRCA1/2* Keimbahnmutation durch Allelheterozygotie mit einer mutierten und einer intakten Wildtyp-Ausprägung des *BRCA1/2* Allels eine genetische Prädisposition („first hit“) für eine Tumorentwicklung dar (Knudson, 1971, 2001). Der somatische Verlust des Wildtyp Allels („second hit“) führt im Laufe des Lebens zum *loss of heterozygosity* und somit zum rezessiven Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen und zur Tumorentstehung. Da molekularbiologisch durchschnittlich 6-7 unabhängige Mutationen für eine Tumorentwicklung erforderlich sind, ist dies bei einer schon bestehenden Keimbahnmutation wahrscheinlicher. Außerdem kommt es bei einer *gBRCA1* Mutation durch den Wegfall des genomischen Reparatursystems zur chromosomalen Instabilität mit deutlich erhöhtem Risiko für die Akkumulation weiterer somatischer Mutationen (Pettapiece-Phillips et al., 2015; Salmena & Narod, 2012).

Trotz der ubiquitären Funktionen von *BRCA1* lässt sich klinisch eine ausgeprägte Gewebespezifität feststellen; so entstehen bei *gBRCA1*-Mutationsträgerinnen fast ausschließlich Mamma- und Ovarialkarzinome, bei *gBRCA2* Mutationsträger/innen auch Pankreas- und Prostatakarzinome (Nolan et al., 2017). Bisher ist der Mechanismus der Gewebespezifität ungeklärt. Da es Hinweise für eine sexualhormonabhängige Regulation der *BRCA1* Expression gibt, könnten die anti-apoptischen Signale von Östrogen eine wichtige Rolle spielen (Marquis et al., 1995). Dies würde erklären, warum sowohl durch Adnektomie als auch postmenopausal das Brustkrebsrisiko bei *gBRCA1/2*-Defizienz reduziert ist (Elledge & Amon, 2002).

### 2.3. Der OPG/RANK/RANKL Signalweg

#### 2.3.1. Der OPG/RANK/RANKL Signalweg im Knochenstoffwechsel

Die Moleküle RANK (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B), RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) und Osteoprotegerin (OPG) gehören zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und modulieren verschiedene zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Sie zählen seit Jahren zu den Schlüsselmolekülen im Knochenmetabolismus und haben zu einem neuen Verständnis der osteologischen Zellbiologie geführt (Smith et al., 1994).

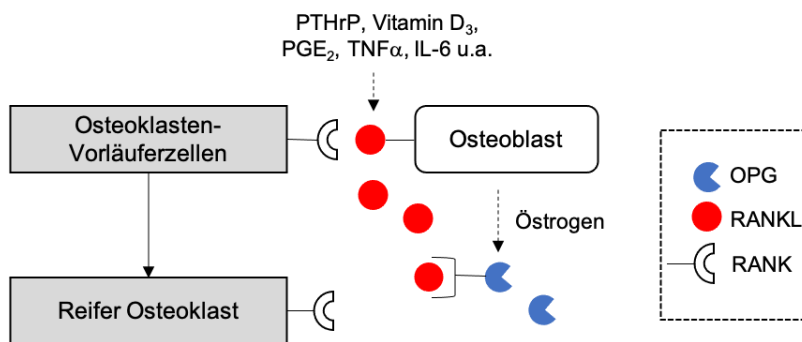
Osteoprotegerin (OPG) wurde 1997 als erstes Molekül dieser Triade als sezerniertes Glykoprotein der TNF-Rezeptor-Superfamilie 11b beschrieben (Simonet et al., 1997; Tsuda et al., 1997). Es wird von verschiedenen Zelltypen, insbesondere von Osteoblasten, als löslicher Rezeptorantagonist produziert. Als sog. *decoy receptor* für RANKL agiert es im Knochenstoffwechsel als physiologischer Inhibitor der Osteoklastogenese, indem es durch hochaffine Bindung und Neutralisierung von löslichem RANKL die Differenzierung von Osteoklasten hemmt (Yasuda et al., 1998) (Abbildung 1).

RANKL ist neben dem *macrophage colony stimulating factor* das Hauptstimulanz für die Reifung von Osteoklasten (Nagy & Penninger, 2015). Eine vermehrte Expression von RANKL führt so zu vermehrter Knochenresorption und damit Knochenverlust. Das Molekül wird von Osteoblasten und aktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert und fungiert als Ligand für seinen Rezeptor RANK, der nach Bindung aktiviert wird (Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998). RANKL

kommt membrangebunden (Isoform 1) und als sezerniertes lösliches Molekül (sRANKL, Isoform 2) vor (Hikita et al., 2006).

Das RANK Molekül wird als Rezeptor von Osteoklasten-(Vorläufern), dendritischen Zellen, B- und T Lymphozyten und Fibroblasten exprimiert (Anderson et al., 1997). Nach Bindung von RANKL bildet der RANK Rezeptor Trimere aus, die auf der zytosolischen Seite spezielle Adaptorproteine, insbesondere der *TNF receptor-associated-factor 6* binden. Nach dessen Rekrutierung werden diverse weitere Signalkaskaden, unter anderem den NF- $\kappa$ B Pathway, aktiviert, welche konsekutiv zu einer Aktivierung von Osteoklasten und somit Knochenresorption führen (Armstrong et al., 2002) (Abbildung 1).

**Abbildung 1.** Der OPG/RANK/RANKL Signalwegs im Knochenmetabolismus.



Durch Parathormon-related Protein (PTHrP), Vitamin D<sub>3</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) TNF- $\alpha$  und Interleukin 6 (IL-6) wird die Expression von RANKL in Osteoblasten im Knochen stimuliert. RANKL bindet an den Rezeptor RANK auf Osteoklasten Vorläuferzellen, was die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu reifen Osteoklasten induziert. OPG als löslicher Rezeptorantagonist zu RANK wird durch Östrogen stimuliert, bindet an RANKL und führt durch Neutralisierung von RANKL zur Inhibition der Osteoklastogenese. OPG, Osteoprotegerin; RANK, receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B; RANKL, receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand; TNF- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor alpha. Abbildung adaptiert nach Sigl, Schramek et al. (2012), S. 28.

Dysbalancen im OPG/RANK/RANKL Signalweg resultieren in Pathologien im Knochenstoffwechsel. Während RANK oder RANKL-Knockout Mäuse eine schwere Osteopetrose entwickeln, zeigt sich bei selektivem OPG-Knockout eine Osteoporose (Dougall et al., 1999; Kong, Yoshida, et al., 1999). Insbesondere bei der postmenopausalen Osteoporose scheint der OPG/RANK/RANKL Signalweg hyperaktiviert zu sein (Sigl, Schramek, et al., 2012). Östrogen hat eine Schlüsselfunktion bei der Induktion der OPG-Expression und der Hemmung von RANKL. Da die Östrogenlevel in der Menopause abfallen, steigt die RANKL Expression bei gleichzeitiger Hemmung der OPG Synthese an. Mit dem monoklonalen Antikörper Denosumab, der an RANKL bindet und dessen Funktion inhibiert, kann das Gleichgewicht zwischen

Osteoblasten und Osteoklasten postmenopausal therapeutisch wiederhergestellt werden (Cummings et al., 2009).

Die Moleküle werden neben den Sexualhormonen Östrogen und Progesteron durch eine Vielzahl weiterer Hormone und Zytokine reguliert (Zallone, 2006). Zu den wichtigsten Mediatoren zählen das Parathormon-related Protein (PTHrP), Vitamin D<sub>3</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub>, welche Osteoblasten zur Synthese von RANKL anregen, zudem TNF- $\alpha$  und Interleukin 6 (IL-6) (Akatsu et al., 2009; Evely et al., 2009; Takahashi et al., 1988) (Abbildung 1).

### 2.3.2. Weitere Funktionen des OPG/RANK/RANKL Signalwegs

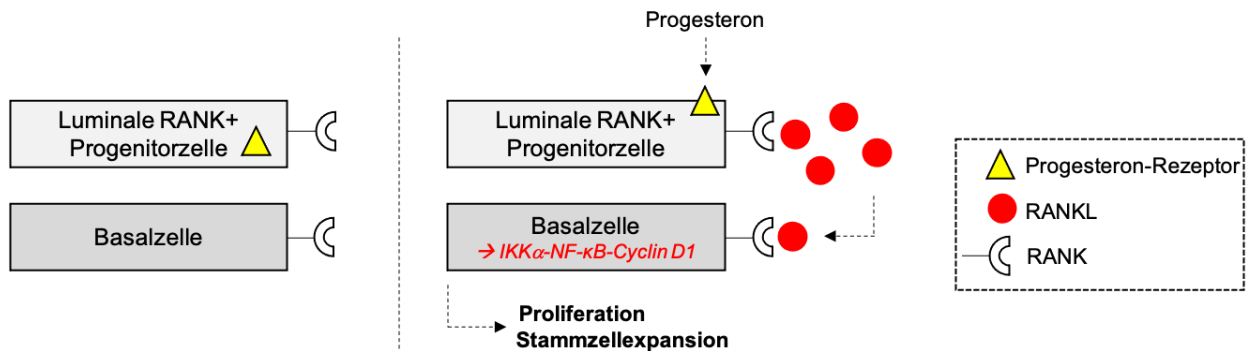
RANKL spielt auch eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunantwort durch Verstärkung der Interaktion zwischen T- und B-Lymphozyten und dendritischen Zellen (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997), zudem auch in der Entwicklung lymphatischer Progenitorzellen (Kong, Yoshida, et al., 1999) und medullärer Thymuszellen (Akiyama et al., 2008), sowie in der Organogenese von Lymphknoten (Dougall et al., 1999). RANKL Mutationen können so nachweislich zu Defekten der B-Zell-Immunologie (Guerrini et al., 2008) und zu Autoimmunerkrankungen führen (Nagy & Penninger, 2015). Die duale Funktion von RANK/RANKL im Knochenstoffwechsel und im Immunsystem spiegelt sich auch in der Pathogenese einiger Krankheiten wider: aktivierte T-Zellen greifen über RANKL direkt in die Osteoklastogenese ein und führen so zum Knochensubstanzverlust bei Erkrankungen mit chronischer Entzündung und autoimmunem Charakter wie rheumatoide Arthritis oder Parodontitis (Kong, Feige, et al., 1999; Teng et al., 2000). Zudem spielt der OPG/RANK/RANKL Signalweg auch eine Rolle im zentralen Nervensystem. RANKL ist im Hypothalamus bei der Entstehung von Fieber beteiligt (Blatteis et al., 2005) und spielt in der weiblichen zentralen Thermoregulation eine Rolle, was einen Erklärungsansatz für Hitzewallungen während des weiblichen Zyklus und in der Menopause bieten könnte (Hanada et al., 2009). Zudem wurde eine neuroprotektive und anti-inflammatorische Funktion der Triade im Rahmen ischämischer Insulte im zentralen Nervensystem beschrieben (Shimamura et al., 2014).

### 2.3.3. Der OPG/RANK/RANKL Signalweg im Brustdrüsenewebe

Neuere Erkenntnisse schreiben dem OPG/RANK/RANKL Signalweg einen bedeutenden Einfluss in der Brustdrüsenentwicklung und -differenzierung zu (Nagy & Penninger, 2015; Schramek et al., 2010). Die Signalkaskade fördert die Entwicklung von laktierendem Brustgewebe während der Schwangerschaft durch die Induktion der Differenzierung von terminalen Endknospen zu laktierenden, lobulo-alveolären Strukturen (Fata et al., 2000). Evolutionsbiologisch ist die Kopplung von Knochenstoffwechsel und Brustdrüsenentwicklung nachvollziehbar, um neben der Versorgung mit Muttermilch auch eine ausreichende Kalziumzufuhr für ein Neugeborenes zu gewährleisten (Kovacs & Kronenberg, 1997). Progesteron ist neben Prolaktin und PTHrP das Schlüsselmolekül in der Regulation von RANKL in der Brustdrüsenentwicklung.

Die RANK/RANKL Expression wird im Brustgewebe zeitlich und räumlich streng kontrolliert (Abbildung 2). Die Proliferation des Brustdrüsenepithels wird nach hormoneller Stimulation in 2 Phasen gegliedert. Cyclin D1 ist bedeutend für die unmittelbare Proliferation von epithelialen Brustzellen in den ersten 24 Stunden nach einem Progesteron-Stimulus. Die weitere, über ca. 8 Tage anhaltende Proliferationsphase ist unabhängig von Cyclin D1 und basiert auf RANKL-induzierter Proliferation (Beleut et al., 2010; Sigl, Schramek, et al., 2012). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass RANK/RANKL primär über den  $IKK\alpha$ -NF- $\kappa$ B-Cyclin D1-Signalweg die Differenzierung und Proliferation im Brustdrüsenewebe induziert (Yixue Cao et al., 2001). Zudem besteht für den Einfluss der Signalkaskade eine Abhängigkeit vom Zelltyp. Progesteron führt im luminalen Kompartiment zu einer Erhöhung der RANKL Expression, während im basalen Kompartiment selektiv die RANK Expression gesteigert wird (Gonzalez-Suarez et al., 2007). Da RANK/RANKL die Expansion von Bruststammzellen im myoepithelialen (basalen) Kompartiment fördert, führt nur die basale RANK Inhibition zu einer Insuffizienz der lobulo-alveolären Differenzierung; bei reiner RANK Hemmung im luminalen Kompartiment bleibt dieser Effekt aus (Asselin-Labat et al., 2010; Joshi et al., 2010; Tiede & Kang, 2011). Dies weist darauf hin, dass Ausgangspunkt für die Entwicklung der laktierenden Brust die basalen Stammzellen und nicht die luminalen Epithelzellen sind (Schramek et al., 2010).

**Abbildung 2.** Der OPG/RANK/RANKL Signalwegs im Brustdrüsenewebe.



RANK wird sowohl auf luminalen als auch auf basalen Epithelzellen im Brustgewebe exprimiert, während der Progesteronrezeptor nur im luminalen Kompartiment exprimiert wird. Durch Stimulation mit Progesteron transloziert der Progesteronrezeptor in den Nucleus der luminalen Progenitorzelle und stimuliert die Expression von RANKL. RANKL bindet an RANK auf den basalen Epithelzellen und aktiviert den Ikk- $\alpha$ -NF $\kappa$ B-Cyclin-D1 Signalweg. Dies führt zur Proliferation und Expansion der Stammzellen in der Brust. Ikk- $\alpha$ , inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha; NF $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; OPG, Osteoprotegerin. RANK, receptor activator of nuclear factor kappa B; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; Abbildung adaptiert nach Sigl, Schramek et al. (2012), S. 29.

#### 2.4. Schlüsselrolle des OPG/RANK/RANKL Signalwegs in der Entstehung des Mammakarzinoms

Die aktuelle Datenlage beschreibt zudem eine gesicherte Evidenz für den entscheidenden Einfluss des OPG/RANK/RANKL Signalwegs auf die Tumorgenese des hormonsensiblen Mammakarzinoms (Gonzalez-Suarez et al., 2010; Schramek et al., 2010). Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass RANKL in frühen Stadien der Tumorentstehung hormonreguliert auf das Brustepithel wirkt und dass Progesteron als Schlüsselhormon über den OPG/RANK/RANKL Signalweg zur Brustkrebsentstehung führt (Asselin-Labat et al., 2010; Fata et al., 2000; Joshi et al., 2010; Nolan et al., 2016). Gemäß der „Million Women“-Studie und der „Women’s Health Initiative“-Studie ergibt sich ab einer Einnahmedauer von 5 Jahren ein nahezu verdoppeltes Mammakarzinomrisiko unter einer kombinierten Hormonersatztherapie verglichen mit einer Östrogenmonotherapie (Beral, Million Women Study Collaborators, 2003; Rossouw, 2002). Im Tiermodell ließ sich bestätigen, dass Progesteron über die RANK/RANKL Kaskade einen entscheidenden Beitrag zur Mammakarzinogenese leistet. Die Anwendung des Progesteronderivates Medroxyprogesteronazetat (MPA) resultierte in einer massiven Expression von RANKL in mammären Progesteronrezeptor-positiven (PR+) luminalen Zellen. Schramek et al. zeigten, dass sich nach MPA-Stimulus die RANKL mRNA um das 2000-fache erhöhte (Schramek et al., 2010), und zwar sowohl in histologisch unauffälligen als auch in präneoplastischen und neoplastischen Gewebeproben (Gonzalez-Suarez et al., 2010). Überdies weist die MPA-medierte

RANKL Expression antiapoptotische Eigenschaften auf: in Verbindung mit DNA-Schäden durch  $\gamma$ -Irradiation blockiert RANKL über den  $IKK\alpha$ -NF- $\kappa$ B Pathway die Freisetzung proapoptotischer Zytokine und bietet so Schutz vor Zelltod (Schramek et al., 2011). Damit scheint Progesteron über RANK/RANKL auf zwei Wege hyperproliferativ zu wirken: nicht nur kann es den Zellzyklus aktivieren, sondern kann Zellen vor Apoptose selbst bei Vorliegen von DNA-Schäden schützen. Durch die Inhibition von RANKL konnte wiederum die Entstehung von MPA-induzierten Tumoren nachweislich reduziert werden (Schramek et al., 2010). Gonzales-Suarez et al. konnten zeigen, dass die RANKL Inhibition insbesondere den Proliferationsindex von präneoplastischem Gewebe senken konnte (Gonzalez-Suarez et al., 2010). Dies weist darauf hin, dass die RANKL-vermittelte Tumorgenese insbesondere bei frühen Tumorstadien eine Rolle spielt.

### *2.5. OPG/RANK/RANKL Dysfunktion bei gBRCA1/2 Keimbahnmutation*

Gerade bei gBRCA1/2-Mutationsträgerinnen scheint der OPG/RANK/RANKL Signalweg hyperaktiviert zu sein (T. A. King et al., 2004; Ma et al., 2006; Poole et al., 2006; Widschwendter et al., 2013). Diese Dysregulation wurde unlängst in unabhängigen und hochrangig publizierten Studien als essentieller Mechanismus in der Pathophysiologie des gBRCA1-assozierten Mammakarzinoms identifiziert (Nolan et al., 2016; Sigl et al., 2016). Da die Kaskade, wie oben beschrieben, einer hormonellen Regulation unterliegt, ist es umso interessanter, als dass insbesondere bei prämenopausalen gBRCA1/2-Mutationsträgerinnen erhöhte Konzentrationen freier Sexualhormone vorzuliegen scheinen. Widschwendter et al. zeigten, dass prämenopausale gBRCA1/2-Mutationsträgerinnen im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgerinnen deutlich erhöhte Östrogen- und Progesteron-Spiegel aufweisen (Widschwendter et al., 2013). Da, wie eingangs beschrieben, das BRCA1 Protein die transkriptionale Aktivität der Progesteron- und Östrogenrezeptoren herunterreguliert (Ma et al., 2006), führt eine gBRCA1/2 Mutation konsekutiv zu einer verstärkten Aktivierung der sexualhormonabhängigen Signalwege (Eakin et al., 2007; T. A. King et al., 2004). Dies könnte auch den klinisch eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Progesteronlevel und Brustkrebsrisiko erklären: während insbesondere in der Schwangerschaft das Brustkrebsrisiko bei gBRCA1/2-Mutationsträgerinnen erhöht ist (Narod, 2001), lässt sich nach der Menopause eine deutliche Reduktion des Erkrankungsrisikos feststellen (Antoniou et al., 2003). Zwei unabhängige Analysen von Nolan et al. sowie Sigl et al. konnten im Mausmodell nachweisen, dass prämaligene Läsionen sowie invasive Mammakarzinome bei gBRCA1/2 Mutation signifikant



erhöhte RANK-Level exprimierten (Nolan et al., 2016; Sigl et al., 2016). In *gBRCA1*-defizienten Mäusen konnten die Forscher zeigen, dass die genetische Deletion von RANK die Entstehung von intraepithelialen Neoplasien und invasiven Karzinomen im Brustdrüsengewebe bzw. eine Tumorprogression unterdrückte. Eine pharmakologische Inhibition von RANKL in *gBRCA1*-defizienten Mäusen beugte weiterhin einer Entstehung von präneoplastischen Läsionen im mammären Drüsengewebe vor und führte zu deutlich späterem Auftreten von Mammakarzinomen (Sigl et al., 2016). Auch in Gewebeproben von *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen, die im Rahmen der BRCA-D Studie mit Denosumab behandelt wurden, konnte ein deutlich geringerer Proliferationsindex (Ki67) nachgewiesen werden. Diese Übertragung vom Mausmodell auf den Menschen gelang in einer aktuellen Arbeit zu diesem Thema von Lindeman et al.. Die Autoren zeigten, dass Zellen von *gBRCA1*-assoziierten Mammakarzinomen eine hohe RANK-Expression von mehr als 40% aufweisen, insbesondere in PR+ RANK+ luminalen Progenitorzellen (Abbildung 2) (Lindeman et al., 2017). Diese Zellsubpopulation zeigt zudem eine molekulargenetische Signatur, die eine große Ähnlichkeit mit der des tripelnegativen, *BRCA1*-positiven Mammakarzinoms aufweist (Lim et al., 2009). Dies ist ein Hinweis dafür, dass in der Tumorgenese des *BRCA1/2*-assoziierten Mammakarzinoms die PR+ RANK+ luminalen Progenitorzellen eine wesentliche Rolle spielen und ein potentieller Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien darstellen (S. Liu et al., 2008).

Neben einer erhöhten RANK Expression berichten einige Studien zudem über nachweislich geringere zirkulierende OPG Serumspiegel bei prämenopausalen *gBRCA1* Mutationsträgerinnen (Widschwendter et al., 2013). Als *decoy receptor* für RANKL wird so die bestehende Dysbalance des Molekülsystems bei erhöhter RANK Expression durch eine fehlende Hemmung durch OPG weiter verstärkt. Odén et al. zeigten, dass *gBRCA1* Mutationsträgerinnen mit überdurchschnittlichen OPG-Konzentrationen gegenüber Frauen mit unterdurchschnittlichen OPG-Konzentrationen ein um 75% reduziertes Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms aufweisen (Odén et al., 2016). Demnach scheint eine inverse Assoziation zwischen OPG-Serumwerten und Brustkrebsrisiko zu bestehen.

## 2.6. Therapeutische Einflussnahme auf den OPG/RANK/RANKL Signalweg

Die Erforschung der Rolle des Progesteron-medierten OPG/RANK/RANKL Signalwegs in der Tumorgenese des *gBRCA1/2*-assoziierten Mammakarzinoms hat Strukturen für einen neuen

potentiellen Therapieansatz geschaffen. Aberrationen im RANKL Signalweg als Ausgangspunkt für zielgerichtete Therapien zu nutzen, wäre eine überaus vielversprechende Möglichkeit der Chemoprävention für das *gBRCA1/2* Hochrisikokollektiv. Über eine Blockade des RANK/RANKL Signalwegs mit dem monoklonalen Antikörper Denosumab könnte der Proliferationsreiz auf RANK+ Luminalzellen reduziert werden (Gonzalez-Suarez et al., 2010; Schramek et al., 2010). Zugelassen ist Denosumab bisher in der Osteoporosetherapie sowie in der Prävention von pathologischen Frakturen bei Knochenmetastasen (Scott & Muir, 2011). Jedoch weist Denosumab einige erhebliche Nebenwirkungen auf. Kieferosteonekrosen und Femurfrakturen gelten als seltene, aber wichtige Nebenwirkungen, zudem entwickeln Patienten gehäuft Hypokalzämien und schwere dermatologische Reaktionen (Loser et al., 2006). Da Nebenwirkungen jedoch insbesondere im Rahmen von Hochdosistherapien auftreten, wurde an Patientinnen mit Brustkrebs einer niedrig dosierten Therapie getestet, die ein relativ sicheres Risikoprofil aufwies (Gnant et al., 2015).

### *2.7. Beeinflussung des OPG/RANK/RANKL Signalwegs durch körperliche Aktivität*

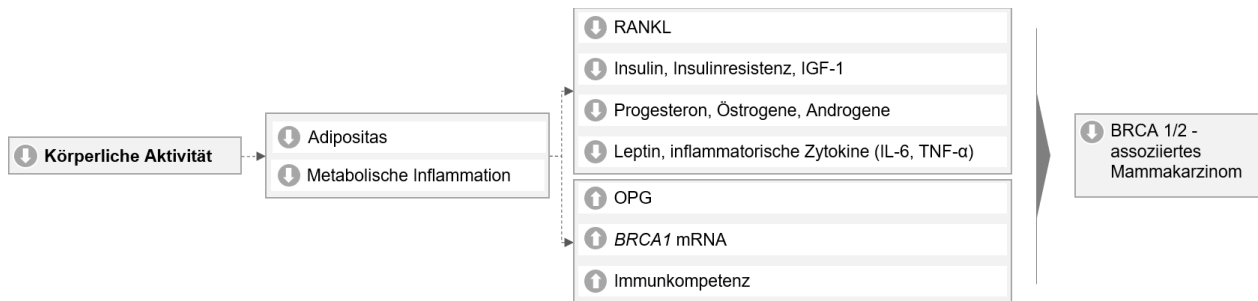
Für das sporadische Mammakarzinom konnte in mehreren prospektiven klinischen Studien ein Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und einer Senkung der Krebsinzidenz, des Rezidivrisikos und der Mortalität gezeigt werden (Friedenreich et al., 2001; Lagerros et al., 2004), z.T. mit einer Risikoreduktion von 25-30% (Lynch et al., 2011), insbesondere bei tripel-negativem Brustkrebs (Phipps et al., 2011). Auch im *gBRCA1/2* Hochrisikokollektiv konnte ein protektiver Effekt von körperlicher Aktivität auf eine Brustkrebserkrankung im Sinne einer Risikoreduktion festgestellt werden (Kiechle, Engel, Berling, Hebestreit, Bischoff, Dukatz, Siniatchkin, et al., 2016; Manders et al., 2011), insbesondere bei regelmäßiger körperlicher Aktivität in der Jugend (M.-C. King, 2003) bzw. bei einer Gewichtsreduktion zwischen 18 und 30 Jahre (Kotsopoulos et al., 2005).

Studien an prämenopausalen Frauen der allgemeinen Bevölkerung sowie im Hochrisikokollektiv haben gezeigt, dass Ausdauertraining die Progesteron-Spiegel in der Lutealphase des Menstruationszyklus signifikant reduzieren kann (El-Lithy et al., 2015). Auch Östrogen- und Androgenlevel werden durch körperliche Aktivität gesenkt (Kossmann et al., 2011). Ein Extremfall stellen prämenopausale Hochleistungssportlerinnen dar, bei denen es durch exzessive körperliche Betätigung zu Lutealphasendefizienz und Amenorrhö kommen kann (Williams et al., 2001).

Weiterhin scheinen sowohl OPG als auch RANK/RANKL durch körperliche Aktivität moduliert zu werden, was insbesondere im Kontext nicht-invasiver und nicht-pharmakologischer präventiver Strategien für Hochrisikopatientinnen relevant ist. Erste Studiendaten in der allgemeinen Bevölkerung legen nahe, dass ausdauerorientiertes Training die zirkulierenden OPG Serumwerte signifikant steigern kann (Bergström et al., 2012), z.T. bei gleichzeitiger Reduktion der sRANKL-Konzentration (S. Ziegler et al., 2005). Zudem unterliegen die OPG Konzentrationen in prämenopausalen Frauen, im großen Gegensatz zu Progesteronkonzentrationen, keinerlei Menstruationszyklus-abhängigen Schwankungen. Jedoch kommt es geschlechtsunabhängig mit steigendem Alter zu einer erhöhten OPG-Expression, was für postmenopausale Frauen eine günstigere Risikokonstellation darstellt. Dies unterstützt die klinische Beobachtung für ein erhöhtes Risiko der Brustkrebsmanifestation bei prämenopausalen *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen (Widschwendter et al., 2015; Yano et al., 1999).

Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die sRANKL Konzentration ist noch weitgehend unklar. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die sRANKL Expression insbesondere durch metabolische Einflüsse moduliert wird (Abbildung 3). So fördert Adipositas als chronische Inflammation mit veränderten Zytokin- und Hormonlevel unter anderem direkt die Osteoklastenaktivierung via NF- $\kappa$ B OPG/RANK/RANKL Signalweg und führt so zu erhöhten RANKL Werten (J. J. Cao, 2011; Chen & Yang, 2015). Körperliche Aktivität kann durch Reduktion des Insulinspiegels und des *Insulin-like growth factors* (IGF-1), Adipozytokine, wie Leptin und Adiponectin, sowie proinflammatorischer Zytokine, einen positiven Beitrag zum metabolischen Status leisten (Irwin et al., 2009; Olsen et al., 2008; Pollak, 2012; Shafrir et al., 2014). IGF-1 und Leptin gelten wiederum als wichtige Aktivatoren von RANKL (G.-Y. Liu et al., 2014). Im Mausmodell konnten Wang et al. zudem zeigen, dass präpubertäre körperliche Aktivität das Expressionslevel der BRCA1 mRNA anhebt, was die Effekte der *gBRCA1/2* Defizienz abzuschwächen scheint (Pettapiece-Phillips et al., 2015; Wang et al., 2009). Im Gegensatz dazu scheint Adipositas zu einer verminderten Genexpression von *BRCA1* im Brustgewebe zu führen (Di et al., 2010) (Abbildung 3).

**Abbildung 3.** Assoziation zwischen körperlicher Aktivität, metabolischer Inflammation und dem *gBRCA1/2*-assoziierten Mammakarzinom.



Körperliche Aktivität führt durch die Reduktion von Adipositas und inflammatorischen Prozessen zu einer Verbesserung des metabolischen Status, zur Modulation verschiedener hormoneller und endogener Signalwege und zu einem reduzierten Risiko für BRCA1/2-assoziiertes Mammakarzinom. BRCA1/2, breast cancer Gene 1/2 1; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IL-6, Interleukin-6; OPG, Osteoprotegerin. RANKL, receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand; TNF- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor-alpha.

## 2.8. Die Beeinflussung des OPG/RANK/RANKL Signalwegs durch Ernährung

Neben körperlicher Aktivität scheint auch gesunde Ernährung, insbesondere die Einhaltung einer mediterranen Diät (MedD), über eine Verbesserung des metabolischen Status modulierende Effekte auf den OPG/RANK/RANKL Signalweg zu haben (Pasanisi et al., 2018; Tamtaji et al., 2019). Die MedD beschreibt ein ausgewogenes Ernährungskonzept, welches vorwiegend auf dem Konsum von Gemüse, Getreide, Nüssen, Olivenöl und Fisch mit hohem Anteil der ungesättigten n-3 und n-9 Fettsäuren beruht. Zudem wird ein moderater Konsum von Milchprodukten und geringer Konsum von rotem Fleisch, welches vorwiegend n-6 Fettsäuren enthält, und Zucker empfohlen (Davis et al., 2015). Viele Studien belegen, dass die Einhaltung einer MedD das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen, chronischer Entzündungen und die Prävalenz von Brustkrebs senken kann (Estruch et al., 2018; Schwingshackl et al., 2017; Sureda et al., 2018). Während ein vermehrter Konsum von mehrfach ungesättigten n-3 Fettsäuren (PUFA) und der einfach ungesättigten n-9 Fettsäure (MUFA) Ölsäure mit einem reduzierten Brustkrebsrisiko sowie mit erhöhten OPG und erniedrigten sRANKL Konzentrationen assoziiert wurden (Martin-Moreno et al., 1994; Shannon et al., 2007), konnten n-6 PUFA und gesättigte Fettsäuren in einen Zusammenhang mit Brustkrebsentstehung und erhöhten sRANKL Werten gebracht werden (Xia et al., 2015). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine MedD-assoziierte Ernährungsintervention bei *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen zu einer Reduktion von IGF-1 und somit RANKL führte (Bruno et al., 2018; Pasanisi et al., 2018), insbesondere durch eine vermehrte Aufnahme von n-3 Fettsäuren (Fonolla-Joya et al., 2016).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Studiendesign und Rekrutierung

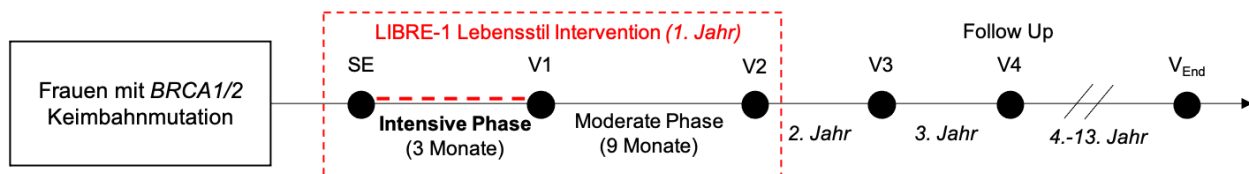
Die LIBRE-1 Studie ist eine Lebensstil-Interventionsstudie für gesunde oder an Brust- und/oder Eierstockkrebs erkrankte *gBRCA1/2* Mutationsträgerinnen. Das Studiendesign ist multizentrisch, prospektiv, zweiarmig und kontrolliert-randomisiert mit einem Randomisationsverhältnis von 1:1 zwischen Interventions- (IG) und Kontrollgruppe (KG). Als Pilotprojekt für die Hauptstudie LIBRE-2 wurde als primärer Endpunkt die Machbarkeit einer strukturierten Lebensstilintervention (definiert als Teilnahme der Probandinnen bei mindestens 70% aller Interventionseinheiten) und die Akzeptanz bei den Teilnehmerinnen untersucht. Beide primären Endpunkte bestätigten sich: während die Machbarkeit über beide Studiengruppen bei 73% lag, gaben 80% der Teilnehmerinnen an, dass sie nochmals an der Studie teilnehmen würden. Es zeigten sich zudem keine Prädiktoren für Drop-Outs oder Non-Compliance sowie ein positiver Einfluss der Lebensstilintervention auf die sekundären Endpunkte Body Mass Index (BMI), Ernährungsverhalten und Stressbewältigung (Kiechle et al., 2017; Kiechle, Engel, Berling, Hebestreit, Bischoff, Dukatz, Gerber, et al., 2016). Zwischen Februar und Juli 2014 wurden 69 *gBRCA1/2* Mutationsträgerinnen an den drei Studienzentren des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs in München, Kiel und Köln rekrutiert. Die obligaten Einschlusskriterien umfassten den Nachweis einer pathogenen Keimbahnmutation in den *BRCA1* oder *BRCA2* Genen, ein Alter zwischen 18 und 69 Jahren und die informierte schriftliche Einwilligung für die Studienteilnahme. Ausschlusskriterien beinhalteten unter anderem das Vorliegen einer metastasierten Tumorerkrankung, Veganismus, ein  $BMI < 15 \text{ kg/m}^2$  und eine bestehende Schwangerschaft. Eine detaillierte Auflistung der Ausschlusskriterien gemäß Studienprotokoll befindet sich im Anhang. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Studienzentren Technische Universität München, Köln sowie Kiel, genehmigt (München REF: 5686/13, Köln REF: 13-053, Kiel REF: B-235/13) und im Deutschen Studienregister für klinische Studien (DRKS REF: DRKS00005736) und bei ClinicalTrials.gov (REF: NCT02087592) registriert.

Die hier vorliegende Biomarker-Auswertung wurde 2019 als Sekundäranalyse initiiert und untersucht damit keinen primären Endpunkt der LIBRE-1 Studie. Für die vorliegende Arbeit wurden OPG und sRANKL Serumwerte bei allen LIBRE-1 Probandinnen gemessen, für die sowohl Blutproben als auch alle klinischen Daten, inklusive Fragebögen, anthropometrische und

spiroergometrische Untersuchungen, sowie Daten zu Fettsäureprofilen zu den beiden Studienzeitpunkten Studieneinschluss (SE) und nach drei Monaten (V1) vorlagen. Dies führte zum Einschluss von 49 gBRCA1/2 Mutationsträgerinnen.

Die Gesamtdauer der LIBRE-1 Studie betrug 36 Monate mit anschließend geplanten jährlichen telefonischen Nachbeobachtungen über 10 Jahre. Es fanden 5 Studienvisiten statt: Studieneinschluss (SE), 3 Monate nach SE (V1, intensivierte Interventionsphase), 12 Monate nach SE (V2, moderate Interventionsphase), 24 Monate nach SE (V3), 36 Monate nach SE (V4) (Abbildung 4). Die vorliegenden Analysen beziehen sich ausschließlich auf den dreimonatigen Zeitraum der intensiven Lebensstilintervention (SE bis V1), da es Hinweise darauf gibt, dass insbesondere hochintensives Training zu Veränderungen von OPG und sRANKL (Esen et al., 2009) führt. Aufgrund der kleinen Studienkohorte und limitierten Detektionskapazitäten der Immunoassays wäre zudem davon auszugehen, dass geringere Effekte schwieriger zu detektieren sind.

**Abbildung 4.** Design und Ablauf der LIBRE-1 Studie.



Bei Vorliegen der obligaten Einschlusskriterien und schriftlicher Einwilligung erfolgte zum Studieneinschluss (SE) die Randomisation zur Interventionsgruppe (IG) oder Kontrollgruppe (KG). Die Lebensstilintervention für die IG umfasste 12 Monate, von denen die ersten 3 Monate (SE bis zur ersten Studienvisite, V1) intensiviert, die folgenden 9 Monate (V1 bis zur zweiten Studienvisite, V2) moderat durchgeführt wurde. In der intensiven Phase erfolgte die Sportintervention dreimal wöchentlich (2x unter sportmedizinischer Aufsicht, 1x selbstständig), die Ernährungsintervention gruppenbasiert alle zwei Wochen. V3, 24 Monate nach SE; V4, 36 Monate nach SE; V\_End, letzte Studienvisite.

### 3.2. Interventionsprogramm SE-V1 der LIBRE-1 Studie

Die Lebensstilintervention umfasste für die IG ein strukturiertes Ausdauertraining und ein Ernährungsprogramm auf Basis der MedD, welches in den ersten drei Monaten des Studienprogramms (SE bis V1) intensiviert und in den folgenden 9 Monaten (V1 bis V2) moderat durchgeführt wurde. Für die Interventionsgruppe erfolgte in der intensiven Phase die Sportintervention 2x/Woche unter sportmedizinischer Aufsicht und 1x/Woche selbstständig mit dem Ziel, den Metabolic Equivalent Task (MET)-h/Woche auf > 18 bei einer Intensität von 50-60% des VO<sub>2</sub>peak (Woche 1-6) und 60-75% des VO<sub>2</sub>peak (Woche 7-12) zu erhöhen. Ein metabolisches

Äquivalent beschreibt den Stoffwechselumsatz bezogen auf den Ruheumsatz, so entsprechen 18 MET-h annähernd einem schnellen Spazierengehen über 4 Stunden pro Woche, ein Aktivitätsniveau, welches mit einer Reduktion von Morbidität und Mortalität in Brustkrebspatientinnen assoziiert werden konnte (Holmes et al., 2005). Zur Trainingssteuerung wurde die wöchentliche Aktivität mittels Trainingstagebüchern, Fragebögen und Bewegungssensoren erfasst.

Die Ernährungsintervention basierte auf den Prinzipien der MedD mit dem Ziel der langfristigen Änderung des Ernährungsverhaltens. Bei Vorliegen einer Adipositas ( $\text{BMI} > 35 \text{ kg/m}^2$ ) wurde zusätzlich eine Begrenzung der Energiezufuhr angestrebt. Die Ernährungsberatung fand gruppenbasiert in zweiwöchentlichem Rhythmus statt. Die KG erhielt zu Beginn der Studie eine einmalige verpflichtende Gruppenberatung über die positiven Effekte körperlicher Aktivität im Kontext des Mammakarzinoms und eine Vorstellung der Ernährungsempfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung. Die Erfassung von Verhaltensänderungen in Bezug auf körperliche Aktivität und Ernährung erfolgte analog zur IG.

### *3.3. Erhebung der klinischen Daten*

Die Material- und Datenerhebung erfolgte bei SE und im Rahmen der nachfolgenden Studienvisiten. Als Messinstrumente wurden strukturierte und validierte Frage- und Interviewbögen, Tagebücher, körperliche und apparative Untersuchungen sowie Blut- und Stuhluntersuchungen verwendet. Die Daten wurden zeitnah von den Studienzentren in einer elektronischen Datenbank (OpenClinica<sup>®</sup>, Waltham, MA) hinterlegt. Folgende Parameter der klinischen Basis-Anamnese wurden in Interviewform im Rahmen der Studienvisiten erhoben und für die nachfolgenden Analysen herangezogen: Brust- oder Eierstockkrebskrankung vor Studieneinschluss (Art der Krebserkrankung und Diagnosezeitpunkt), Menopausenstatus (letzter Tag der Periode), Einnahme einer Hormonersatztherapie (HRT) (ja/nein), Einnahme hormoneller Kontrazeption für einen Zeitraum länger als ein Monat (ja/nein), Raucheranamnese vor/zum Studieneinschluss (ja/nein), ausgetragene Schwangerschaften (ausgenommen Fehlgeburten) (ja/nein) und Stillzeit für einen Zeitraum länger als ein Monat (ja/nein). Der BMI (in  $\text{kg/m}^2$ ) wurde im Rahmen anthropometrischer Untersuchungen bestimmt. Als objektiver Parameter der körperlichen Leistungsfähigkeit wurde die (sub-)maximale Sauerstoffaufnahme ( $\text{VO}_2\text{peak}$  in  $\text{ml/min/kg}$ ) in spiroergometrischen Untersuchungen (Cardiopulmonary exercise testing, CPET) gemessen. CPET beschreibt ein validiertes Rampenprotokoll, bei dem kontinuierlich die Atemgase

bei graduell erhöhtem Widerstand bis hin zur physischen Erschöpfung gemessen werden (Kroidl et al., 2015). Die aktuellen Essgewohnheiten wurden durch den validierten Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS) erfasst. Dieser umfasst 14 Fragen zum aktuellen Ernährungsverhalten und wurde zur Bewertung der Einhaltung einer MedD genutzt (Hebestreit et al., 2017). Um eine Verzerrung durch unbeantwortete Fragen zu minimieren, wurde der absolute MEDAS Wert in einen Score als Prozent der positiv beantworteten Fragen (1 = stärkere Einhaltung der MedD, 0 = weniger Einhaltung der MedD) an allen beantworteten Fragen umgerechnet (Seethaler et al., 2020). Die Messung der Blutwerte erfolgte mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen der Firma Sarstedt<sup>®</sup> für Serum und Plasma aus venösem Blut. Die Probandinnen hielten vor der Blutentnahme mindestens 12 Stunden Nahrungs- und Alkoholkarenz ein. Die Blutproben wurden sofort zentrifugiert, aliquotiert und entweder innerhalb von 48 Stunden weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Exploration der Zusammenhänge zwischen dem Konsum spezifischer ungesättigter Fettsäuren und Veränderungen der Biomarker OPG und sRANKL wurden publizierte Daten von Seethaler et al. herangezogen, die an der LIBRE-1 Kohorte Fettsäureprofile in Erythrozytenmembranen (RBCM) und im Plasma analysierten (Seethaler et al., 2020). In RBCM wurden folgende Fettsäuren bestimmt und in der vorliegenden Arbeit verwendet: Eicosatriensäure (ETA, 20:3 n-3), Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 n-3), Docosapentaensäure (DPA, 22:5 n-3), Docosahexaensäure (DHA, 22:6 n-3), Arachidonsäure (ARA, 20:4 n-6), Linolsäure (CLA, 18:2 n-6), Ölsäure (18:1 n-9), Gondoensäure (20:1 n-9), Nervonsäure (24:1 n-9). Im Plasma wurde alpha-Linolensäure (ALA, 18:3 n-3), gamma-Linolensäure (GLA, 18:3, n-6), Dihomo-gamma-Linolensäure (DGLA, 20:3 n-6), Eicosadiensäure (EDA, 20:2 n-6) EPA, DPA, DHA, CLA und ARA bestimmt.

#### *3.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assays*

Für die nachfolgenden Analysen wurden insgesamt 98 Aliquots von 49 gBRCA1/2-Mutationsträgerinnen von den Zeitpunkten SE und VI auf den Proteingehalt von OPG und sRANKL ausgewertet. Für die quantitative Messung von total sRANKL (REF: K1016) und OPG (REF: K1011) wurden kommerziell verfügbare Sandwich Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits der Firma Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland) verwendet. Die OPG Systeme sind spezifisch sowohl für monomere und dimere OPG Moleküle als auch für

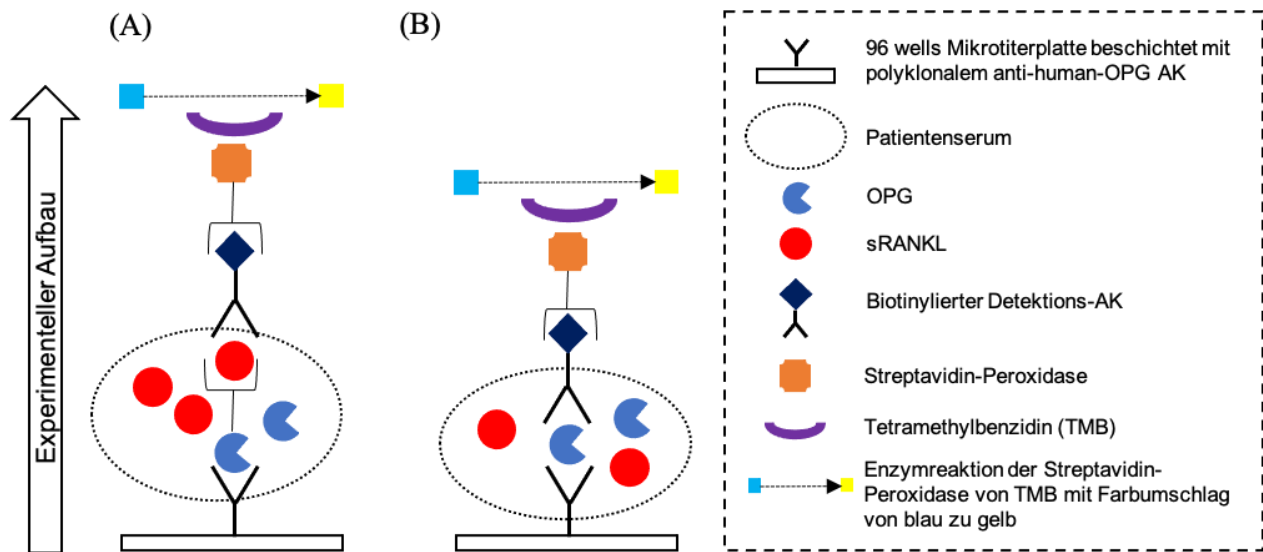


OPG/RANKL Komplexe mit einer Sensitivität von 0,08pmol/l. Die sRANKL Systeme sind spezifisch sowohl für lösliches als auch an OPG gebundenes RANKL mit einer Sensitivität von 0,025pmol/l. Die Tests wurden nach Arbeitsanleitung des Herstellers in einem zertifizierten SL Genlabor der gynäkologischen Tumorgenetik des Klinikums rechts der Isar durchgeführt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung auf der gleichen Mikrotiterplatte gemessen. Messwiederholungen wurden durchgeführt sofern die Messungen außerhalb der Kalibrationskurve lagen. Die bei 450 nm photometrisch gemessenen Rohdaten in optischer Dichte wurden über mitgeführte Standardkurven in Konzentrationen umgerechnet. Die Standardkurven wurde über im Testkit enthaltenen Standards nach Abzug der mitgeführten Leerwerte als polynomische Trendfunktionen erstellt.

Nach Herstellerangaben wurden insgesamt 6 Standards und 2 Kontrollen für sRANKL und 6 Standards und 1 Kontrolle für OPG bei jedem Kit mitgeführt. Insgesamt wurden 6 Kits für sRANKL und 4 Kits für OPG verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurden die intra- und inter-Assay Variationskoeffizienten (CV) für jedes Kit berechnet. Der Inter-assay CV beschreibt die Übereinstimmung der Kontrollen zwischen den Kits während der intra-assay CV angibt, um wieviel Prozent die Messwiederholungen einer Probe im Kit voneinander abweichen. Die inter-assay CV lagen zwischen 5,6% für sRANKL und 6,5% für OPG. Die intra-assay CV lagen bei 3,5% für OPG, 12,6% für die niedrige sRANKL Kontrolle und 8,7% für die hohe sRANKL Kontrolle. Intra- und inter-assay CV unter 15% bzw. 10% werden in der Literatur als ausreichend angesehen (Schultheiss & Stanton, 2009). Der CV wird als Verhältnis von Standardabweichung zum Mittelwert in Prozent als Abweichung vom Mittelwert angegeben (Hanneman et al., 2011). Alle Standards und Kontrollen befanden sich im vom Hersteller angegebenen Standardbereich, mit Ausnahme einer niedrigen sRANKL Kontrolle, welche 6% über der oberen Norm der Herstellerangaben lag.

Die Standardkurven für sRANKL wurden mittels Verdünnungsreihen aus dem Herstellerkonzentrat in 1:3 Verdünnungsschritten erstellt. Für OPG wurden fertige Standardkonzentrate (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 pmol/l) verwendet. Für beide Proteine wurden mit polyklonalen anti-human-OPG Antikörper beschichtete 96-wells Mikrotiterplatten verwendet (Abbildung 5).

**Abbildung 5.** Aufbau und Arbeitsschritte der (A) sRANKL und (B) OPG ELISA.



Eine mit polyklonalem anti-human OPG-Fänger-Antikörper (AK) beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit Patientenserum inkubiert. Bei sRANKL als Doppelsandwich-ELISA wurde der anti-human OPG-Fänger-AK zunächst mit OPG inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die schrittweise Inkubation zunächst mit einem biotinylierten monoklonalen anti-sRANKL-Detektionsantikörper und dann mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zur Komplexbildung. In einer enzymatischen Reaktion durch das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) erfolgte der Farbumschlag von blau zu gelb, welcher im Photometer als optische Dichte gemessen wurde.

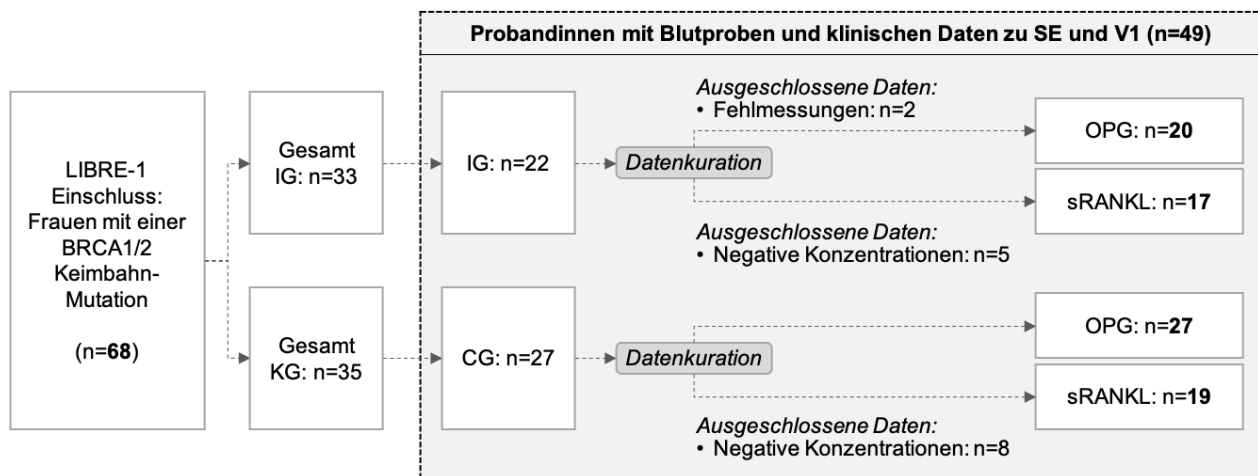
Für sRANKL wurden die Serumproben im Verhältnis 1:10 mit Waschpuffer verdünnt, für OPG wurden unverdünnte Serumproben verwendet. Standards, Kontrollen, Serumproben, sowie die OPG-Lösung für den sRANKL-ELISA wurden zu je 50 µl (sRANKL) bzw. 20 µl (OPG) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Bei sRANKL als Doppelsandwich-ELISA erfolgte zunächst eine Inkubation für 16-24 Stunden bei 4°C für die Inkubation von sRANKL und OPG an den fixierten anti-OPG-Fängerantikörper. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit einem biotinylierten monoklonalen anti-sRANKL-Detektionsantikörper (Abbildung 5A). Im sRANKL-ELISA wurde dieser im Verhältnis 1:1001 angesetzt und jeweils 100 µl für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubiert. Bei OPG wurden 50 µl unverdünnt für 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubiert (Abbildung 5B). Nach der Inkubation wurde der überschüssige Detektionsantikörper durch Auswaschen mit Waschpuffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zur Komplexbildung der Streptavidin-Peroxidase und des Detektionsantikörpers über die spezifische Bindung an Biotin. Im sRANKL-ELISA wurde dieses im Verhältnis 1:1001 angesetzt und mit jeweils 100 µl für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Im OPG-ELISA wurden 200 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für 1 Stunde bei

Raumtemperatur (18-26°C) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der überschüssige Detektionsantikörper durch Auswaschen mit Waschpuffer entfernt. Als enzymatisches Substrat für die Streptavidin-Peroxidase wurde Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet und 100 µl TMB (sRANKL) bzw. 200 µl (OPG) für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl einer ELISA-Stopplösung abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau zu gelb erfolgte. Die chromogene Verbindung wurde bei 450nm in einem automatisierten Mikrotiterplatten-Photometer (MultiSkan™ FC Version 1.00.96, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) gemessen. Für eine detaillierte Auflistung der Testkit Inhalte, Materialliste und die Spezifizierung der Laborgeräte siehe Anhang.

### 3.5. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 8.4.3. für MacOS (GraphPad Software, San Diego, California, USA) durchgeführt. Für sRANKL wurden Daten von 13 Probandinnen aufgrund von Messfehlern ausgeschlossen, da die Serumkonzentrationen dieser Probandinnen unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA Tests lagen. Für OPG wurden bei 2 Probandinnen keine Konzentrationen gemessen. Dies führte somit für OPG zu einer Reduktion der Studienteilnehmerinnen auf 20 in der IG und 27 in der KG und für sRANKL zu einer Reduktion auf 15 in der IG und 13 in der KG (Abbildung 6).

**Abbildung 6.** Flussdiagramm der Probandenselektion aus der LIBRE-1 Studienkohorte.



Von den 68 in die LIBRE-1 Studie eingeschlossenen Patienten lagen bei 22 Probandinnen der Interventionsgruppe (IG) und bei 27 Probandinnen der Kontrollgruppe (KG) Blutproben und alle klinischen Daten zu SE und V1 vor. Von dieser Kohorte wurden wegen fehlender oder negativ gemessener Konzentrationen bei 7 Probandinnen in der IG (2 für OPG und 5 für sRANKL) und 8 Probandinnen in der CG (alle für sRANKL) keine Messwerte in der

vorliegenden Analyse verwendet. *BRCA1/2*, Breast Cancer Genes 1 und 2; KG, Kontrollgruppe; IG, Interventionsgruppe; OPG, Osteoprotegerin; SE, Studieneinschluss; sRANKL, soluble receptor of nuclear factor  $\kappa$ B ligand; V1, drei Monate nach SE.

Für die Bewertung der Daten auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk Test sowie Histogramme zur graphischen Einschätzung verwendet. sRANKL als ein Endpunkt der Analyse stellte sich nicht normalverteilt dar, sodass für eine konsistente Darstellung alle metrischen Daten als nicht normalverteilt angenommen und als Median mit Interquartilsabstand dargestellt wurden. Der Mann-Whitney *U* Test wurde für den Test auf Unterschied zwischen zwei unabhängigen Gruppen verwendet. Für kategoriale Variablen wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen der Fisher's Exact Test verwendet (H.-Y. Kim, 2017). Der Wilcoxon matched-pairs signed-rank Test wurde für den Test auf Unterschiede zwischen den abhängigen Zeitpunkten SE und V1 innerhalb der klinischen Gruppen verwendet. Assoziationen zwischen zwei Variablen wurden mit dem Spearmans rank Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), Assoziationen zwischen mehr als zwei Variablen mittels multivariaten linearen Regressionsmodellen getestet. Multiples Testen wurde nach der Methode von Benjamini und Hochberg auf eine 5%-False Discovery Rate (FDR) adjustiert (Benjamini & Hochberg, 1995). Adjustierte p-Werte ( $q$ )  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Alle Tests wurden als per Protokoll Auswertungen durchgeführt.

Einige sRANKL Messungen zeigten eine starke Streuung um den Median, was zu großen Varianzen in den Daten führte. Daher wurde eine statistische Ausreißeranalyse mittels der Tukey Methode für Boxplots durchgeführt (Tukey, 1949), welche Proteinkonzentrationen von 8 Probandinnen als potentielle Ausreißer identifizierte. Es wurde jedoch auf den Ausschluss dieser Daten aus den folgenden Gründen verzichtet: es gibt derzeit keine klinischen Referenzwerte für OPG und sRANKL im Kontext familiärer Brustkrebserkrankungen, daher sind auch keine Aussagen in Bezug auf klinische Implausibilität möglich. Zweitens ergaben sich keine Hinweise für Fehlmessungen, sodass durch den Einschluss aller gemessenen Konzentratione eine Beliebigkeit in der Datenauswahl ausgeschlossen wird. Drittens führte der Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Ausreißer zu ähnlichen Ergebnissen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Studienpopulation

Die klinischen Basisdaten waren für alle Probandinnen (n=49) verfügbar, von denen 7 in Köln, 8 in Kiel und 34 in München rekrutiert und betreut wurden. Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses zeigten sich hinsichtlich der beschriebenen Probandencharakteristika keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen (Tabelle 1). Auch ergab sich kein Hinweis auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der in dieser Arbeit verwendeten Kohorte (n=49) und der LIBRE-1 Gesamtkohorte (n=68, Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 1.** Probandencharakteristika beim Studieneinschluss.

Variablen	IG (n=22)	KG (n=27)	Gesamt (n=49)
<i>gBRCA1</i> Mutation, <i>n</i> (%)	15 (68%)	17 (63%)	32 (65%)
<i>gBRCA2</i> Mutation, <i>n</i> (%)	7 (32%)	10 (37%)	17 (35%)
Alter, Jahre	41 (33-48)	43 (35-50)	41 (34-49)
Vorerkrankung mit Brust- oder Eierstockkrebs, <i>n</i> (%) <sup>a</sup>	15 (68%)	17 (63%)	32 (65%)
Postmenopausal, <i>n</i> (%) <sup>b</sup>	11 (50%)	14 (52%)	25 (51%)
Einnahme HRT, <i>n</i> (%) <sup>c</sup>	2 (9%)	5 (19%)	7 (14%)
Einnahme orale Kontrazeption, <i>n</i> (%) <sup>d</sup>	19 (86%)	27 (100%)	46 (94%)
BMI > 24,9, <i>kg/m</i> <sup>2</sup> , <i>n</i> (%)	8 (36%)	11 (41%)	19 (39%)
Raucheranamnese, <i>n</i> (%)	14 (64%)	17 (63%)	31 (63%)
Schwangerschaft, <i>n</i> (%) <sup>e</sup>	15 (68%)	18 (67%)	33 (68%)
Stillzeit, <i>n</i> (%) <sup>f</sup>	12 (55%)	15 (56%)	27 (55%)
VO <sub>2</sub> peak, <i>ml/min/kg</i> <sup>g</sup>	23 (21-28)	28 (22-32)	26 (22-31)
MEDAS score, % <sup>h</sup>	46 (36-64)	36 (29-50)	46 (36-64)
OPG, <i>pg/ml</i>	59 (44-71) <sup>i</sup>	54 (40-70)	57 (43-70) <sup>j</sup>
sRANKL, <i>ng/ml</i>	126.4 (39.7-5673.9) <sup>k</sup>	176.4 (52.2-2341.9) <sup>l</sup>	152.5 (44.1-422.8) <sup>m</sup>

Darstellung der Werte als Mediane mit Interquartilsabstand (Alter, VO<sub>2</sub>peak, MEDAS score, OPG, sRANKL) oder Anzahl (n). Der statistische Vergleich auf Unterschiede zwischen stetigen Variablen erfolgte mittels Mann-Whitney *U* Test, zwischen kategorialen Variablen mittels Fisher's exact Test. Multiples Testen wurde adjustiert auf eine false discovery rate (FDR) von 5% basierend auf Tabelle 1, hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen IG und KG in allen dargestellten Probandencharakteristika. BMI, body mass index; KG, Kontrollgruppe; HRT, hormone replacement therapy (Hormonersatztherapie); IG, Interventionsgruppe; MEDAS, Mediterranean Diet Adherence Screener; OPG, Osteoprotegerin; sRANKL, soluble receptor of nuclear factor κB ligand; VO<sub>2</sub>peak, maximale Sauerstoffaufnahme.

<sup>a</sup> Erkrankungsstatus (Art der Krebserkrankung und Datum der Erstdiagnose)

<sup>b</sup> Menopausenstatus (Datum der letzten regelmäßigen Menstruation)

<sup>c</sup> Einnahme einer Hormonersatztherapie über einen Mindestzeitraum von einem Monat (ja/nein)

<sup>d</sup> Einnahme oraler hormoneller Kontrazeptiva über einen Mindestzeitraum von einem Monat (ja/nein)

<sup>e</sup> Ausgetragene Schwangerschaften (ausgenommen Fehlgeburten)

<sup>f</sup> Stillen über einen Mindestzeitraum von einem Monat (ja/nein)

<sup>g</sup> VO<sub>2</sub>peak (maximale Sauerstoffaufnahme) gemessen durch Spiroergometrie (CPET)

<sup>h</sup> Nach dem validierten Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS)

<sup>i</sup> n=20, <sup>j</sup> n=47, <sup>k</sup> n=17, <sup>l</sup> n=19, <sup>m</sup> n=36

#### 4.2. Veränderungen von OPG und sRANKL

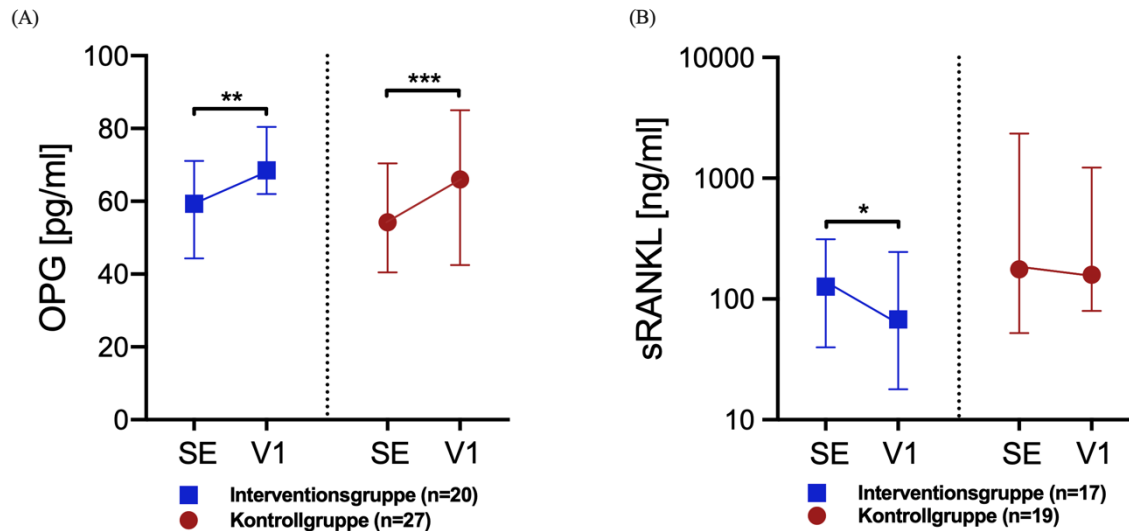
Sowohl die Interventions- als auch die Kontrollgruppe zeigten einen signifikanten Anstieg in OPG Serumkonzentrationen im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase (Tabelle 2, Abbildung 7A). Die IG zeigte eine signifikante mediane Reduktion von sRANKL, während dies in der KG nicht statistisch signifikant war (Tabelle 2, Abbildung 7B). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen.

**Tabelle 2.** Veränderungen der OPG und sRANKL Serumkonzentrationen während der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ V1-SE) innerhalb der Studiengruppen und im Gruppenvergleich

	IG				KG				Differenz zwischen Gruppen in $\Delta p$ (q)
	SE	V1	$\Delta$ V1-SE	Differenz innerhalb der Gruppe p (q)	SE	V1	$\Delta$ V1-SE	Differenz innerhalb der Gruppe p (q)	
OPG (pg/ml) (IG: n=20, KG: n=27)	59.4	68.5	+9.1	0.0073 <b>(0.0219)</b>	54.2	66.0	+11.8	0.0004 <b>(0.0024)</b>	0.8230 (0.8230)
sRANKL (ng/ml) (IG: n=17, KG: n=19)	126.4	67.6	-58.8	0.0232 <b>(0.0464)</b>	176.4	159.2	-17.2	0.4653 (0.5584)	0.3626 (0.5439)

Zeitliche Veränderungen der Serumkonzentrationen von Osteoprotegerin (OPG) und sRANKL nach einer dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ V1-SE) wurden mit dem Wilcoxon matched-pairs signed rank Test getestet. Unterschiede der Veränderungen der Biomarker im Gruppenvergleich wurden mit dem Mann-Whitney U Test getestet. Multiples Testen wurde adjustiert auf eine false discovery rate (FDR) von 5% basierend auf Tabelle 2. Die resultierenden q-Werte sind in Klammern angegeben. KG, Kontrollgruppe; IG, Interventionsgruppe; sRANKL, soluble receptor of nuclear factor  $\kappa$ B ligand; V1, drei Monate nach Studienbeginn.

**Abbildung 7.** Veränderungen der OPG und sRANKL Serumkonzentrationen während der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ V1-SE) in den beiden Studiengruppen.

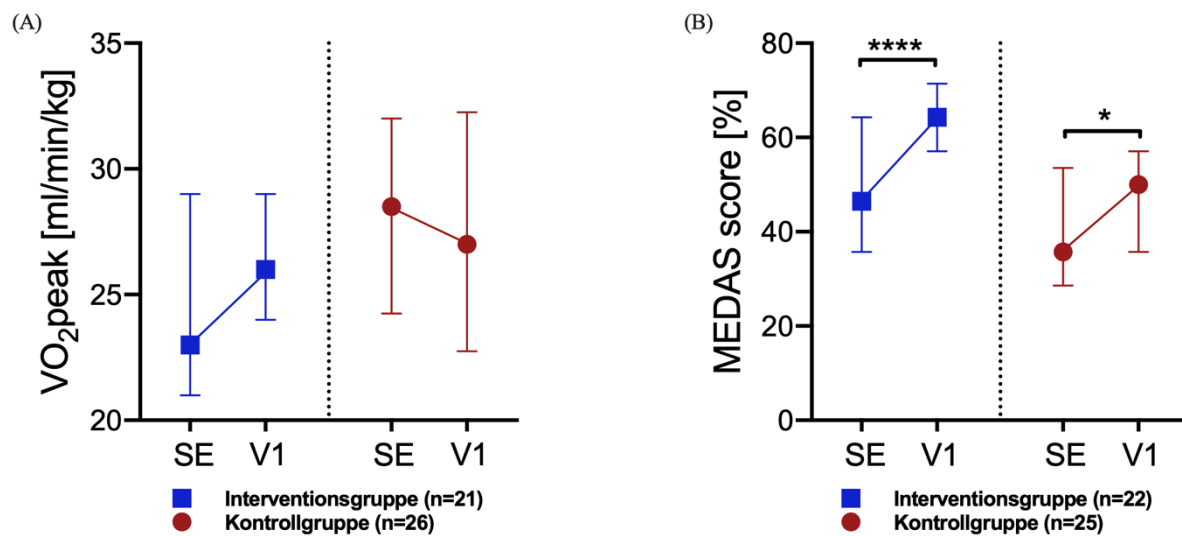


Darstellung der Daten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Veränderung innerhalb der Gruppen im Vergleich zum Studienbeginn ( $\Delta$ V1-SE) wurde mit dem Wilcoxon matched-pairs signed rank Test berechnet und oberhalb der Graphen mit Sternchen markiert.  $\Delta$ V1-SE Unterschiede im Gruppenvergleich wurden mit dem Mann-Whitney U Test berechnet. Multiples Testen wurde adjustiert auf eine false discovery rate (FDR) von 5% basierend auf Tabelle 2. Die resultierenden q-Werte sind in Klammern angegeben. \*\* $p < 0.0073$  ( $q < 0.0219$ ); \*\*\* $p < 0.0004$  ( $q < 0.0024$ ). KG, Kontrollgruppe; IG, Interventionsgruppe; OPG, Osteoprotegerin; sRANKL, soluble receptor of nuclear factor  $\kappa$ B ligand V1, drei Monate nach Studienbeginn.

#### 4.3. Veränderungen von interventionsassoziierten Parametern

Für  $VO_2$ peak zeigten sich weder innerhalb noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede nach der dreimonatigen Interventionsphase, jedoch verbesserte sich die IG, während sich der Wert für die KG leicht reduzierte (Abbildung 8A). Beide Studiengruppen verbesserten signifikant den MEDAS Score (IG:  $q = 0.0002$ , KG:  $q = 0.0165$ ), auch wenn sich kein signifikanter Unterschied zwischen beidem Gruppen zeigte (Abbildung 8B).

**Abbildung 8.** Veränderungen in VO<sub>2</sub>peak und dem MEDAS Score in den Studiengruppen im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase (ΔV1-SE).



Darstellung der Daten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Veränderung innerhalb der Gruppen im Vergleich zum Studienbeginn (ΔV1-SE) wurde mit dem Wilcoxon matched-pairs signed rank Test berechnet und oberhalb der Graphen mit Sternchen markiert. ΔV1-SE Unterschiede im Gruppenvergleich wurden mit dem Mann-Whitney U Test berechnet. Multiples Testen wurde adjustiert auf eine false discovery rate (FDR) von 5% basierend auf p-Werten aus Abbildung 7. Die resultierenden q-Werte sind in Klammern angegeben. Beide Studiengruppen verbesserten den MEDAS Score signifikant von SE zu V1. \*p (q) < 0.0165, \*\*\*\*p < 0.0001 (q < 0.0002). KG, Kontrollgruppe; IG, Interventionsgruppe; MEDAS, Mediterranean Diet Adherence Screener; V1, drei Monate nach Studienbeginn; VO<sub>2</sub>peak, maximale Sauerstoffaufnahme.

#### 4.4. PUFA Korrelationsanalyse

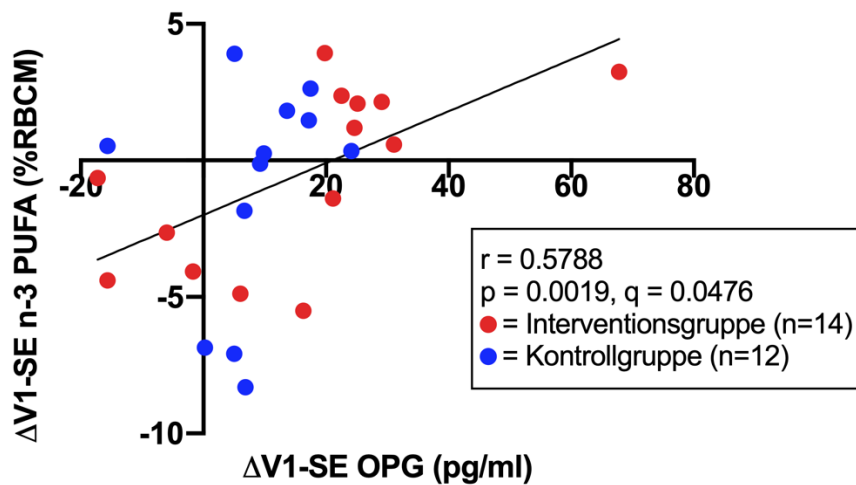
Die Korrelationsanalyse der PUFA Konzentrationen mit den Biomarkern sRANKL und OPG für beide Studiengruppen (n=26) zeigte eine positive Korrelation zwischen einer Zunahme an n-3 PUFA, speziell EPA (Ergänzungstabelle 1 im Anhang), in der RBCM und einer Zunahme an OPG im Serum (Abbildung 9). Die Betrachtung der beiden Studiengruppen ergab für die IG eine positive Korrelation zwischen der Zunahme an n-3 PUFA und OPG. Diese Korrelation zeigte sich nach FDR-Korrektur jedoch als nicht statistisch signifikant (r=0.6176, p=0.0212, q=0.1201). Im Gegensatz dazu ergaben die Analysen keine signifikante Assoziation zwischen n-3 PUFA und OPG in der KG (r=0.4545, p=0.1404, q=0.3978).

Für sRANKL ergaben sich weder für die Messungen in RBCM noch im Plasma signifikante Korrelation zwischen Veränderungen von n-3, n-6 und n-9 PUFA und Veränderungen des Biomarkers (Ergänzungstabelle 1 im Anhang).



Vor der FDR-Korrektur zeigten sowohl n-6 PUFA als auch n-9 Ölsäure eine signifikante Assoziation mit im Plasma gemessenen Veränderungen von sRANKL und OPG. Ein Anstieg der n-6 PUFA war positiv korreliert mit einem Anstieg von sRANKL, während es mit OPG invers korrelierte. Ölsäure zeigte eine gegensätzliche Assoziation (Ergänzungstabelle 1 im Anhang).

**Abbildung 9.** Assoziation zwischen Veränderungen der OPG Serumkonzentrationen und Veränderungen von n-3 PUFA im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ V1-SE).



n-3 PUFA-Konzentrationen sind dargestellt als Prozentsatz der Erythrozytenmembran (RBCM). Korrelationsanalysen wurden mit dem Spearman's Rank Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) durchgeführt. Multiples Testen wurde adjustiert auf eine false discovery rate (FDR) von 5% basierend auf den p-Werten aus der Ergänzungstabelle 1 im Anhang. Die resultierenden q-Werte sind in Klammern angegeben. n-3, omega-3 Fettsäure; PUFA, polyunsaturated fatty acid; RANKL, soluble receptor of nuclear factor  $\kappa$ B ligand; SE, Studieneinschluss; V1, 3 Monate nach Studienstart.

#### 4.5. Multivariate lineare Regression

Im explorativ durchgeführten multivariaten Regressionsmodell demonstrierten die bei SE gemessenen Ausgangswerte von sRANKL einen signifikanten Einfluss auf die Veränderung der sRANKL Level über den 3-monatigen Interventionszeitraum ( $q=0.0018$ ) (Tabelle 3). Probandinnen mit hohen initialen sRANKL Werten zeigten demnach eine stärkere Reduktion der sRANKL Konzentrationen im Interventionsverlauf im Gegensatz zu Frauen mit initial niedrigen sRANKL Werten. Zudem deutete die Analyse auf eine Assoziation zwischen Nikotinkonsum und erhöhten sRANKL Konzentrationen hin. Diese Assoziation zeigte sich nach FDR-Korrektur jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0.0815$ ;  $q=0.4541$ ). Für OPG demonstrierte die multivariate Regression einen signifikanten positiven Einfluss der Ausgangswerte von  $VO_2$ peak auf Veränderungen der OPG Konzentrationen, jedoch zeigte sich die Assoziation nach FDR-Korrektur

statistisch nicht signifikant ( $p=0.0319$ ,  $q=0.2871$ ). Bei Probandinnen mit initial höherer körperlicher Leistungsfähigkeit zu Studienbeginn konnte also ein stärkerer Anstieg der OPG Konzentrationen im Studienverlauf im Vergleich zu Frauen mit initial niedrigeren  $VO_2\text{peak}$  Werten gemessen werden.

**Tabelle 3.** Multivariate lineare Regressionsanalyse für den Einfluss konstitutioneller Parameter auf Veränderungen von OPG und sRANKL über im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta V1$ -SE).

Unabhängige Variable	Abhängige Variable			
	$\Delta V1$ -SE sRANKL		$\Delta V1$ -SE OPG	
	Schätzer	p (q)	Schätzer	p (q)
Randomisation zur IG	382.1	0.6463 (0.8310)	-4.87	0.4214 (0.7814)
Alter	-6.82	0.8704 (0.9216)	-0.27	0.4083 (0.7814)
Prämenopausal	1190	0.2213 (0.6638)	4.55	0.5036 (0.8241)
Vorerkrankung mit Brust- oder Eierstockkrebs	-1191	0.1283 (0.4619)	2.71	0.6252 (0.8310)
BMI zu SE	-78.06	0.4049 (0.7814)	0.93	0.1009 (0.4541)
Raucheranamnese	1642	0.0815 (0.4541)	-1.37	0.7957 (0.9216)
$VO_2\text{peak}$ , ml/min/kg	-65.95	0.4341 (0.7814)	1.33	0.0319 (0.2871)
MEDAS score, %	-4.4	0.8571 (0.9216)	-0.01	0.5520 (0.8280)
Serum sRANKL zu SE	-0.6977	<0.0001 ( <b>0.0018</b> )	0.004	0.9646 (0.9646)
$R^2$ (adj. $R^2$ )	0.6397 (0.5150)		0.2080 (0.01002)	

Multivariate lineare Regressionsmodelle für den Einfluss konstitutioneller Parameter auf Veränderungen von OPG und sRANKL im Verlauf der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta V1$ -SE). Multiples Testen wurde adjustiert auf eine false discovery rate (FDR) von 5% basierend auf den p-Werten aus Tabelle 3. Die resultierenden q-Werte sind in Klammern angegeben. BMI, body mass index; IG, Interventionsgruppe; MEDAS, Mediterranean Diet Adherence Screener; OPG, Osteoprotegerin; SE, Studieneintritt; sRANKL, soluble receptor of nuclear factor  $\kappa B$  ligand;  $VO_2\text{peak}$ , maximale Sauerstoffaufnahme  $V1$ , drei Monate nach Studienbeginn.

## 5. Diskussion

Experimentelle Studien weisen darauf hin, dass die Hyperaktivierung des OPG/RANK/RANKL Signalwegs eine wichtige Rolle in der Differenzierung der weiblichen Brustdrüse, Stammzellexpansion und in der Karzinogenese des *gBRCA1/2*-assoziierten Mammakarzinoms spielt (Fata et al., 2000; Schramek et al., 2010; Tiede & Kang, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde das Potential einer strukturierten Lebensstilintervention auf Veränderungen von OPG und sRANKL Serumkonzentrationen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Einhaltung einer mediterranen Ernährung in Kombination mit einer regelmäßigen körperlichen Aktivität wirkungsvolle Einflussfaktoren auf die Faktoren OPG und sRANKL darstellen. Nach bestem Wissen ist dies die erste Analyse, die den Einfluss einer Lebensstilintervention auf die Serumkonzentrationen von OPG und sRANKL im Kontext von *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen untersucht hat.

### *5.1. Einfluss körperlicher Aktivität auf OPG und sRANKL*

Körperliche Aktivität gilt als einer der wichtigsten Reize für den adaptiven Knochenbau. Mechanische Belastung führt über Mechanotransduktion und komplexe biophysikalische Signale zu physiologischen Anpassungsvorgängen im Knochen, was zu einer messbaren Erhöhung der Knochenmassendichte führt (Hong & Kim, 2018). Ursächlich ist dabei die Inhibition der Osteoklastogenese, welche insbesondere durch den OPG/RANK/RANKL Signalweg vermittelt wird (Yuan et al., 2016).

In klinischen Studien wurde beobachtet, dass sowohl kurzfristiges intensives als auch langfristiges regelmäßiges körperliches Ausdauertraining die OPG und RANKL Serumkonzentrationen moduliert (Tobeiha et al., 2020). Zudem zeigte sich, dass insbesondere die OPG Konzentration durch den Reiz mechanischer Belastung moduliert werden kann (Hur et al., 2018; West et al., 2009), während der Einfluss körperlicher Aktivität auf sRANKL bisher nicht eindeutig verstanden ist (Bergström et al., 2012).

Ziegler et al. konnten einen sofortigen signifikanten Anstieg von OPG und eine Reduktion von sRANKL 30 Minuten nach einem Langstreckenlauf nachweisen und zeigten eine Abhängigkeit der Konzentrationsveränderung von der Laufdistanz und -dauer (S. Ziegler et al., 2005). In einer Studie an postmenopausalen Frauen konnte nach einstündigem intensivem körperlichen Training

hingegen nur ein signifikanter Anstieg der OPG Serumkonzentration, nicht jedoch von sRANKL, demonstriert werden (C.-S. Kim et al., 2017). Dieser Zusammenhang wurde auch in einer in vitro Studie von Saunders et al. bestätigt, wonach eine kurzfristige mechanische Stimulation von humanen Osteoblasten zu einer selektiven Erhöhung von OPG führte (Saunders et al., 2006).

Nicht nur temporäres, intensives Training, sondern auch ein langfristiges Trainingsprogramm scheint zu einer Veränderung von OPG und sRANKL zu führen, woraus sich eine wichtige Beobachtung hinsichtlich des LIBRE-1 Studiendesigns ergibt. Die intensive Phase der LIBRE-1 Studie hatte als mittelfristige Sportintervention das Ziel einer langfristigen, über die Studie hinausgehenden Lebensstilumstellung. Über einen Interventionszeitraum von drei Monaten konnte bereits nachweislich eine signifikante Steigerung von OPG erreicht werden. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse einer Analyse von Bergström et al. bestätigt (Bergström et al., 2012). Hierbei führte eine vergleichbare, ebenfalls ausdauerorientierte, einjährige Sportintervention bei postmenopausalen Frauen zu signifikant erhöhten OPG Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Sportintervention (Bergström et al., 2012).

Die hier vorliegende und andere Arbeiten stellen überdies heraus, dass sportlich aktive Individuen höhere basale OPG Werte aufweisen im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Referenzwerten (S. Ziegler et al., 2005), was den Einfluss eines dauerhaften aktiven Lebensstils auf eine persistierende Erhöhung von OPG vermuten lässt. Im Regressionsmodell zeigte sich konklusiv ein positiver Einfluss der initialen körperlichen Fitness, gemessen als  $VO_2\text{peak}$  in der Spiroergometrie, auf die Veränderung von OPG während der Lebensstilintervention. Je höher der initiale  $VO_2\text{peak}$  desto stärker konnten die Probandinnen OPG Konzentrationen über drei Monate steigern. Dies suggeriert ebenfalls eine Assoziation zwischen genereller kardiopulmonaler Leistungsfähigkeit und OPG Serumkonzentrationen. So lässt sich vermuten, dass die Lebensstilumstellung durch die LIBRE-1 Intervention möglicherweise für die Frauen, die bereits sportlich aktiv waren, einfacher zu gestalten war und insbesondere die nicht supervidierten Trainingseinheiten effektiver umsetzen konnten. Dennoch weist  $VO_2\text{peak}$  in seiner Eigenschaft als Näherungswert für körperliche Leistungsfähigkeit auch mögliche Einschränkungen auf, da einige Studien einen multifaktoriellen Einfluss epigenetischer, konstitutionell-individueller wie auch umwelt-assoziiertes Faktoren sowie die Art des Trainings auf die Ansprechbarkeit von  $VO_2\text{peak}$  im Rahmen körperlicher Belastung beschreiben (Fiuza-Luces et al., 2018; Grund et al., 2001; Mattioni Maturana et al., 2021).

Die meisten Studien konnten einen Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und OPG demonstrieren, wohingegen der Einfluss auf sRANKL bisher unklar ist (Bergström et al., 2012). Während Rubin et al. in vitro an murinen Stromazellen nachweisen konnten, dass sRANKL grundsätzlich durch mechanische Reize inhibiert werden kann (Rubin et al., 2000), und auch einige tierexperimentelle Studien eine sRANKL Reduktion durch Trainingsinterventionen nachwies (J. Kim et al., 2019; J. P. R. Scott et al., 2011), zeigen viele klinische Studien, dass nur sehr intensives Ausdauertraining zu einer Reduktion von sRANKL führt (Esen et al., 2009). Zudem ist bislang unklar, ob körperliche Aktivität direkt inhibitorisch auf sRANKL wirkt, oder ob dies indirekt auf eine Erhöhung des inhibitorischen OPG zurückzuführen ist.

Ziegler et al. suggerierten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Reduktion von sRANKL und körperlicher Aktivität. So waren reduzierte sRANKL Serumkonzentrationen ausschließlich bei Probanden nachweisbar, die eine Marathondistanz absolvierten, nicht jedoch bei einer kürzeren Distanz von 15km (S. Ziegler et al., 2005). Scott et al. wiesen nach, dass Ausdauertraining unmittelbar die OPG Konzentrationen steigerte, jedoch nur hochintensives Ausdauertraining zusätzlich zu einer sRANKL Reduktion führte (J. P. R. Scott et al., 2011). Auch führte ein 10-wöchiges Training bei Männern nur bei hoher Intensität (70-75% VO<sub>2</sub>peak) zu einer Reduktion von sRANKL, nicht jedoch ein Training mit moderater Intensität (50-65% VO<sub>2</sub>peak) (Esen et al., 2009). Die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützen diese Beobachtungen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die sRANKL Konzentrationen zwar in beiden Studiengruppen verminderten, die Veränderung nach dreimonatiger Intervention jedoch nur in der IG signifikant war (Abbildung 7B). Dies könnte darauf hinweisen, dass nur ein strukturiertes und supervidiertes Interventionsprogramm wie in der LIBRE-1 Studie, in der Lage ist, eine ausreichende Intensität sicherzustellen, die laut aktueller Datenlage für eine suffiziente Reduktion von sRANKL notwendig ist. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Studiengruppen nachgewiesen werden. Die Sportintervention für die IG zielte auf ein moderates Aktivitätsniveau ab mit einer durchschnittlichen Zielbelastung von 60% VO<sub>2</sub>peak. Während dieses Aktivitätsniveau mit einer Reduktion von Morbidität und Mortalität bei Brustkrebspatientinnen assoziiert ist (Holmes et al., 2005) und die IG im Gegensatz zur KG die kardiopulmonale Leistungsfähigkeit (gemessen als VO<sub>2</sub>peak) steigern konnte (Abbildung 8A), könnte der Unterschied im Vergleich zu einem ebenfalls hohen Aktivitätsniveau in der sehr gesundheitsorientierten Kontrollgruppe insgesamt nicht ausreichend gewesen sein, um einen signifikanten Unterschied zwischen beiden

Studiengruppen in der Reduktion von sRANKL Konzentrationen zu erzielen. Demnach sind weitere groß angelegte Studien mit einem intensiveren Studiendesign erforderlich, um den Einfluss körperlicher Aktivität auf sRANKL bewerten zu können.

Weitere Arbeiten verweisen überdies auf den entscheidenden Einfluss der Art der mechanischen Belastung, wie axiale oder biegende Kräfte, sowie hormoneller Einflüsse, auf die Zellantwort und damit Veränderungen von OPG und sRANKL Serumkonzentrationen (Liegibel et al., 2002; Saunders et al., 2006). Confounder-Effekte, wie Menopausenstatus, systemische Knochenerkrankungen oder Traumata, könnten so auch eine mögliche Erklärung für die große Streuung in den hier vorliegenden sRANKL Daten darstellen. Einige Studien, die keine Effekte von Trainingsinterventionen auf OPG und sRANKL postulierten, zeigten jedoch Veränderungen anderer Proteine, insbesondere der RANKL-aktivierenden Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6, die sich durch langfristige Ausdauerinterventionen deutlich reduzierten (J. Kim et al., 2019; Marques et al., 2013). Daher könnte die Bewertung des Nutzens von Trainingsinterventionen nur in Bezug auf Veränderungen von OPG und RANKL klinisch zu kurz greifen, da diese Zytokine ebenfalls knochenresorptiv wirken und sich direkt oder indirekt auf den OPG/RANK/RANKL Signalweg auswirken.

Konkludierend zeigt die derzeitige Studienlage, dass körperliche Aktivität zu einer Erhöhung der OPG Serumkonzentration und möglicherweise einer Reduktion von sRANKL führt. Dies konnte in der vorliegenden Analyse anhand einer dreimonatigen ausdauerbasierten Lebensstilintervention auch im Hochrisikokollektiv der *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen gezeigt und damit der primäre Endpunkt der hier vorliegenden Analyse bestätigt werden.

### *5.2. Einfluss des metabolischen Status auf OPG und sRANKL*

Während, wie oben beschrieben, der direkte, physikalische Effekt körperlicher Aktivität auf sRANKL bisher unklar ist, scheint sRANKL maßgeblich vom metabolischen Status abhängig zu sein (Irwin et al., 2009). Adipositas führt zu ubiquitären metabolischen Dysfunktionen durch Förderung pro-inflammatorischer Prozesse, Angiogenese und Aktivierung anaboler Signalwege, wie zirkulierende Sexualhormone, Insulin und Zytokinen (Goto et al., 2011; G.-Y. Liu et al., 2014), und konnte darüber mit einer Erhöhung der sRANKL Konzentration assoziiert werden (Kalkan & Becer, 2019). So führen beispielsweise erhöhte Konzentrationen angiogenetischer Biomarker, wie

dem *vascular endothelial growth factor*, und Leptin, als zentraler Aktivator der RANKL-vermittelten Osteoklastenaktivierung, zu signifikant erhöhten sRANKL Serumkonzentrationen bei Adipositas (J. J. Cao, 2011; Yihai Cao, 2007; Chen & Yang, 2015; Duggan et al., 2016; Guo et al., 2021; G.-Y. Liu et al., 2014; Min et al., 2003; Stofkova, 2009). Neben dem Einfluss auf OPG und RANKL gibt es Hinweise dafür, dass der metabolische Status direkt das Expressionslevel der BRCA1 mRNA modulieren (Wanget al., 2009). Während körperliche Aktivität die physiologische mRNA-Expression von BRCA1 steigert und so möglicherweise die Effekte der *BRCA1/2* Defizienz abschwächen kann (Pettapiece-Phillips et al., 2015; Salmena & Narod, 2012), führen Adipositas und speziell das pro-inflammatorische und diabetogene Zytokin IGF-1 zu einer verminderten Genexpression von *BRCA1* (Di et al., 2010). (Hudelist et al., 2007; Werner & Bruchim, 2012).

Diverse Studien zeigen, dass die Einhaltung einer MedD den metabolischen Status verbessern kann (Godos et al., 2017; Rumawas et al., 2009). Studien berichten über eine Reduktion der Prävalenz des metabolischen Syndroms um 70% zwei Jahre nach Umstellung auf eine MedD (Esposito et al., 2004). Bruno et al. zeigten in einer der LIBRE-1 Studie ähnlichen Interventionsstudie mit *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen, dass eine MedD-basierte Ernährungsintervention über 6 Monate zu einer signifikanten Verbesserung des MEDAS Score führte und sich Parameter des metabolischen Syndroms deutlich reduzierten (Bruno et al., 2018). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Zusammenhänge. Die dreimonatige LIBRE-1 Intervention führte zu einer signifikanten Verbesserung des MEDAS Score (Abbildung 8B) bei den Studienteilnehmerinnen und so möglicherweise zu einer Verbesserung des metabolischen Status. Daher könnte die hier beschriebene signifikante sRANKL Reduktion in der IG über drei Monate (Abbildung 7B) nicht nur durch die Sportintervention, sondern maßgeblich auch durch die Ernährungsumstellung auf eine MedD bedingt sein. Pasanisi et al. zeigten in einer ähnlichen Studie an *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen, dass eine diätetische MedD Intervention durch Verminderung von IGF-1 zu einer Reduktion von sRANKL führte (Pasanisi et al., 2018).

Die Bewertung des metabolischen Einflusses auf die Biomarker OPG und sRANKL bei *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen ist von großem wissenschaftlichem Interesse. Einerseits besteht ein direkter Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom und Brustkrebs (Iyengar et al., 2018; Nkondjock & Ghadirian, 2004; Sellers, 2002; Zahid et al., 2016), andererseits gibt es

Hinweise für ein erhöhtes Risiko metabolischer Erkrankungen bei Anlageträgerinnen einer pathogenen Variante der *BRCA1/2* Gene (Bordeleau et al., 2011; Dumais et al., 2017).

### 5.3. Einfluss von PUFA auf OPG und sRANKL

Einige Studien konnten den Einfluss konkreter Nahrungsmittel, insbesondere ungesättigter Fettsäuren, auf das Brustkrebsrisiko nachweisen. So ist ein hoher Konsum von n-3 PUFA und der n-9 MUFA Ölsäure (18:1) mit einem reduzierten Brustkrebsrisiko assoziiert (Martin-Moreno et al., 1994; Shannon et al., 2007). Insbesondere die n-3 PUFA EPA und DHA, welche vor allem in Kaltwasserfischen wie Lachs vorkommen, scheinen invers mit dem Brustkrebsrisiko assoziiert zu sein (Fabian et al., 2015; Jiang et al., 2012; Kuriki et al., 2007; Shannon et al., 2007; Zheng et al., 2013). Studien berichten über eine Risikoreduktion für Brustkrebs bis zu 20-35% bei einer Erhöhung der n-3/n-6 Ratio, jedoch ist eine optimale risikoreduktive Dosis bisher nicht bekannt (MacLennan et al., 2013; Signori et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnten n-6 PUFA und gesättigte Fettsäuren in einen Zusammenhang mit Brustkrebsentstehung gebracht werden (Xia et al., 2015). In Hinblick auf die Biomarker OPG und sRANKL berichten viele Studien über erhöhte OPG und verringerte RANKL Konzentrationen nach n-3 und n-9 PUFA Aufnahme sowie eine inverse Assoziation zu n-6 PUFA (Bhattacharya et al., 2005; Naranjo et al., 2016). So beobachteten Martin-Bautista et al. an einer Kohorte von 72 hyperlipidämischen Patienten und Fonolla-Joya et al. in einer Ernährungsstudie an postmenopausalen Frauen nach einem einjährigen Konsum von EPA und DHA-angereicherter Milch einen signifikanten Anstieg von OPG und eine signifikante Reduktion von sRANKL Serumkonzentrationen. (Fonolla-Joya et al., 2016; Martin-Bautista et al., 2010)

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer vermehrten Aufnahme von n-3 PUFA, insbesondere von EPA, und einer Erhöhung von OPG gezeigt werden (Abbildung 9). In der Subgruppenanalyse der Studienarme zeigte sich zudem nur für die IG ein (vor FDR-Korrektur) signifikanter positiver Zusammenhang zwischen n-3 PUFA und OPG. Dies könnte darauf hinweisen, dass insbesondere eine strukturierte Ernährungsintervention, wie in der LIBRE-1 Studie, sich positiv auf das n-3 PUFA Profil auswirken kann. Der in der Literatur beschriebene negative Zusammenhang zwischen einer vermehrten n-3 PUFA Aufnahme und reduzierten sRANKL Konzentrationen konnte in dieser Arbeit nicht repliziert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der Fokus der LIBRE-1 MedD sein. Nicht nur der n-3 PUFA



Konsum per se, sondern auch die spezifische nutritive Quelle scheint insbesondere bei n-3 PUFA eine entscheidende Rolle in Bezug auf die in vivo Wirkung zu spielen. So scheinen n-3 PUFA aus Fisch oder Fischöl deutlich protektiver zu wirken als solche aus pflanzlichen Ölen (Hillyer et al., 2020). Die LIBRE-1 MedD Intervention fokussierte sich jedoch weniger auf Nüsse und Fisch mit hohem n-3 PUFA Anteil, sondern insbesondere auf den Konsum von Ölsäure-reichem Olivenöl.

Während die aktuelle Datenlage der n-3 PUFA eine Risikoreduktion für Brustkrebs zuschreibt, ist der Einfluss der n-6 PUFA auf das Brustkrebsrisiko bisher nicht eindeutig. Während manche Ergebnisse keine oder sogar eine inverse Assoziation zwischen n-6 PUFA und Brustkrebs zeigen (Burns et al., 2018; Rissanen et al., 2003; Sakai et al., 2012), konnten die meisten Studien hohe Konzentrationen von n-6 PUFA, vor allem von Arachidonsäure (ARA, 20:4) und dem Metaboliten Linolsäure (18:2) eindeutig mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert werden (Chang et al., 2013; Shannon et al., 2007; R. G. Ziegler et al., 1993). Im Knochen führt ARA durch Förderung der Osteoklastenaktivität zu erhöhten RANKL und verminderten OPG Konzentrationen (Casado-Díaz et al., 2013; Coetzee et al., 2007; Poulsen et al., 2008). Die vorliegenden Ergebnisse für n-6 PUFA und OPG/RANKL scheinen die derzeitige Datenlage zu unterstützen. n-6 PUFA, gemessen im Plasma, konnten positiv mit sRANKL und negativ mit OPG assoziiert werden. Da sich die n-6 PUFA in beiden Studiengruppen der Gesamtkohorte im Verlauf der Intervention reduzierten (Seethaler et al., 2020), ist auch hier von einer günstigen Beeinflussung der Fettsäureprofile durch die LIBRE-1 Intervention auszugehen.

Die 18:1 n-9 MUFA Ölsäure, die mit 72-84% ein Hauptbestandteil von kaltgepresstem Olivenöl ist und somit ein wichtiger Bestandteil der MedD darstellt, scheint ähnlich wie n-3 PUFA protektive Effekte auf Inflammation und Brustkrebsentstehung zu haben (Carrillo et al., 2012; Zhou et al., 2016). So konnte in einer mediterranen Ernährungsstudie eine Reduktion des Brustkrebsrisikos von 62% bei Patientinnen, die Olivenöl supplementieren, nachgewiesen werden im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mourouti & Panagiotakos, 2016). Zudem gilt Ölsäure als potenter Inhibitor der Osteoklastogenese (Martin-Bautista et al., 2010; Naranjo et al., 2016), wobei im Vergleich zu marinen n-3 PUFA nur geringere modulierende Effekte auf OPG und RANKL nachgewiesen werden konnten (Hillyer et al., 2020). Während sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Ergebnisse zeigten, konnten Seethaler et al. an PUFA Messungen in RBCM von LIBRE-1 Probandinnen demonstrieren, dass sich n-9 MUFA in beiden Studiengruppen im Verlauf der LIBRE-1 Lebensstilintervention deutlich erhöhten (Seethaler et al., 2020).

Zusammenfassend zeigen sich die hier gezeigten Korrelationsanalysen verschiedener PUFA mit den Biomarkern OPG und sRANKL konklusiv in Bezug auf die aktuellen Forschungsergebnisse. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die MedD über die Veränderung der PUFA Aufnahme die Serumkonzentrationen von OPG und sRANKL positiv beeinflussen kann und leisten somit möglicherweise einen Beitrag zum Verständnis der onkoprotektiven Effekte mediterraner Diät sowie zur Ableitung alimentärer Präventionsstrategien im Hochrisikokollektiv.

Ein häufiges Problem bei Lebensstilinterventionen stellt zum einen die Compliance der Studienteilnehmer da, welche jedoch bei der MedD im Vergleich zu anderen Ernährungskonzepten hoch ist, zum anderen basiert die Datenerhebung meist auf Eigenangaben. Es gibt zwar validierte Ernährungsfragebögen, wie den MEDAS Fragebogen, jedoch besteht insgesamt ein hohes Risiko für Reporting Bias (Cook, 2010), auch variiert die qualitative Fettzusammensetzung in Lebensmitteln der gleichen Kategorie. Ein großer Vorteil der hier vorliegenden Analyse ist daher, dass die PUFA Profile in RBCM als ein objektiverer Parameter in Hinblick auf das Ernährungsverhalten von Fett verwendet wurden (Sun et al., 2007). In diesem Zusammenhang zeigten Poppitt et al., dass insbesondere Ölsäure, EPA und DHA serologische Marker für Compliance im Rahmen kurz- bis mittelfristiger Lebensstilinterventionen darstellen und Veränderungen im Ernährungsverhalten objektiv widerspiegeln (Poppitt et al., 2005). Andere Studien verweisen jedoch auf prolongierte Veränderungen in RBCM durch eine Ernährungsumstellung (Fabian et al., 2015; Katan et al., 1997), sodass sich einige Effekte der LIBRE-1 MedD Intervention in den Messungen nach 3 Monaten möglicherweise noch nicht widerspiegeln. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass in RBCM gemessene PUFA sich auch durch körperliche Aktivität verändern können ohne Änderungen im Ernährungsverhalten (Tutino et al., 2018), damit wären Veränderungen in der RBCM nicht als isolierter Effekt der MedD Ernährungsintervention zu werten.

#### *5.4. Einfluss konstitutioneller Parameter auf OPG und sRANKL*

In der explorativen multiplen linearen Regressionsanalyse wurde der Einfluss ausgewählter Patientencharakteristika zum Zeitpunkt SE auf die Veränderungen der sRANKL und OPG Serumkonzentrationen im Verlauf der dreimonatigen Intervention eruiert, um mögliche Hinweise auf konstitutionelle und klinische Abhängigkeiten zu erlangen.

Hinsichtlich sRANKL deuten die hier vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen mit initial erhöhten sRANKL-Konzentrationen bei stärkerer Reduktion des Biomarkers im Studienverlauf mehr von der Lebensstilintervention profitieren als Anlageträgerinnen mit niedrigeren sRANKL Ausgangswerten. So scheinen insbesondere diejenigen Probandinnen, die zuvor einen weniger gesunden Lebensstil führten, ihren metabolischen Status verbessern zu können (Irwin et al., 2009). Bei Frauen mit initial niedrigen sRANKL Werten und einem möglicherweise bereits vor Studienbeginn aktiveren Lebensstil könnte eine Art Sättigungseffekt vorliegen. Einschränkend lässt sich keine reine Kausalität zwischen Lebensstil und sRANKL Serumwerten ableiten, da weitere endogene Faktoren, wie beispielsweise chronisch-entzündliche Erkrankungen oder ko-segregierende genetische Modifier eine Rolle spielen könnten, die sich nur bedingt durch Lebensstilveränderungen modulieren lassen. Dennoch lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass die initiale Serumkonzentration von sRANKL möglicherweise ein potentieller Prädiktor für das Ansprechen des Biomarkers auf eine Lebensstilumstellung darstellt und sich die relative Veränderung des Biomarkers auf das modulierende Potential von Gesundheitsverhalten auswirkt.

Die vorliegende Arbeit zeigt den potentiellen Einfluss von Lebensstilmodifikationen auf Veränderungen von OPG und sRANKL, kann jedoch keinen prognostischen Beitrag in Bezug auf Brustkrebsinzidenz oder -mortalität leisten. Derzeit ist noch unklar, ob OPG und sRANKL prognostische serologische Marker für das Risiko einer späteren Brustkrebserkrankung darstellen. Vik et al. beschrieben eine inverse Assoziation zwischen OPG und *gBRCA1/2*-assoziiertem Brustkrebs und zeigten, dass Frauen mit hohen initialen OPG Werten ein signifikant geringeres Brustkrebsrisiko aufwiesen (Vik et al., 2015). Kiechl et al. beschrieben ein fünffach erhöhtes Brustkrebsrisiko bei Frauen mit erhöhten Progesteron- und RANKL Werten (Kiechl et al., 2017). Demgegenüber fanden Kotsopoulos et al. keine Beziehung zwischen OPG oder sRANKL und einem erhöhten Brustkrebsrisiko (Kotsopoulos et al., 2020; Zaman et al., 2019). Zusammenfassend scheint die aktuelle Datenlage von einem limitierten prognostischen Potential von OPG und sRANKL Konzentrationen auf die Risikoabschätzung für eine Brustkrebserkrankung auszugehen. Alle hier beschriebenen Studien postulierten jedoch, dass bereits eine *einmalige* Messung von OPG und sRANKL das Brustkrebsrisiko viele Jahre später vorhersagen könnte. Dies steht deutlich im Gegensatz zu dieser Arbeit, die zeigt, dass OPG und sRANKL dynamische Biomarker sind und sich bereits durch mittelfristige Lebensstilmodifikation beeinflussen lassen. Dahingehend sollte in

die Bewertung des prognostischen Potentials der Biomarker auch die dynamische Veränderung im Zeitverlauf eingehen. Hierzu bedarf es weiterer klinischer prospektiver Studien.

### *5.5. Limitationen*

Während sich die Serumkonzentrationen von OPG und sRANKL im Interventionsverlauf stärker in der IG veränderten, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen erreicht werden. Dies weist darauf hin, dass alle Probandinnen der LIBRE-1 Studie, unabhängig vom Studienarm, Veränderungen im Gesundheitsverhalten zeigten. Eine Erklärung dafür stellt ein Selektionsbias der LIBRE-1 Kohorte dar für Probandinnen mit einem Interesse an gesundem Lebensstil und einer Offenheit gegenüber Lebensstilveränderungen (Bonanni & Lazzeroni, 2013). Viele Studien zeigten, dass sich eine Krebsprädisposition oder -diagnose positiv auf das langfristige Gesundheitsverhalten auswirkt und das Risikobewusstsein stark beeinflusst (Meisel et al., 2017; Tercyak et al., 2019; Tsay et al., 2017). Insbesondere die Randomisierung zur Kontrollgruppe kann für eben solche Individuen eine große Enttäuschung bedeuten. Passend dazu beschrieben Kiechle et al., dass dies in 5 von 6 Fällen in der KG der Hauptgrund für ein Drop-Out darstellte (Kiechle, Engel, Berling, Hebestreit, Bischoff, Dukatz, Siniatchkin, et al., 2016). Möglicherweise hat diese Enttäuschung bei KG Probandinnen auch zu einer Eigenmotivation für vermehrtes selbstständiges Training oder einer Ernährungsumstellung geführt, wodurch einige Effekte, die nur in der IG erwartet wurden, auch in der KG vorkamen. Durch das offene Studiendesign der LIBRE-1 Studie können diese Effekte weiterhin verstärkt werden, da eine regelmäßige Kommunikation zwischen allen Studienteilnehmerinnen möglich war.

Die geringe Anzahl an Probandinnen stellt die größte Limitierung der vorliegenden Arbeit dar. Ziel der Auswertung war jedoch ein explorativer Ansatz mit dem Ziel, neue Erkenntnisse in Bezug auf mögliche Beziehungen zwischen Änderungen im Gesundheitsverhalten und den Biomarkern OPG und sRANKL im Hochrisikokollektiv zu gewinnen. Demnach müssen selbst signifikante Ergebnisse als rein hypothesengenerierend interpretiert werden. Die hier dargestellten Zusammenhänge werden in der multizentrischen, Hauptstudie LIBRE-2, die im Jahr 2015 initiiert wurde, mit einer größeren Kohorte (n=487, Stand: 01/2022) und in einem längerfristigen Verlauf weiter untersucht. In diesem Zusammenhang ist zudem anzumerken, dass die vorliegende Arbeit als Sekundäranalyse der LIBRE-1 Studie durchgeführt und somit kein primärer oder sekundärer Endpunkt der Studie darstellt. Daher wurden die Auswahl und damit Größe der untersuchten

Kohorte nicht auf Basis statistischer Berechnungen erstellt, weshalb eine klinische Repräsentativität der hier verwendeten Kohorte (n=49) in Bezug auf die Ergebnisse der gesamten LIBRE-1 Kohorte (n=68) nicht gewährleistet werden kann.

## **6. Ausblick**

Wissenschaftliche Erkenntnisse zu den Chancen rechtzeitiger und umfassender Maßnahmen der Gesundheitsförderung und Prävention ebnen den Weg für ein gezieltes, im Gesundheitssystem verankertes Präventionskonzept für Hochrisikopatientinnen. Bislang werden jedoch bei der Indikationsstellung zur Teilnahme am intensivierten Früherkennung- und Nachsorgeprogramm oder zur Durchführung einer prophylaktischen Operation keine dieser risikomodifizierenden (Lebensstil-)Faktoren berücksichtigt. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass eine dreimonatige kontrolliert-randomisierte Lebensstilintervention, basierend auf körperlicher Aktivität und Einhaltung einer MedD, die Serumwerte von sRANKL und OPG bedeutsam beeinflussen kann und kann so zur Aufklärung der zugrunde liegenden, biologischen Mechanismen von körperlicher Bewegung und ausgewogener Ernährung in der Brustkrebsprävention beitragen. Insbesondere in Kombination mit potentiellen zielgerichteten Chemopräventionen, wie der anti-RANKL Antikörper Denosumab (Lindeman et al., 2017), leistet ein proaktives Gesundheitsverhalten einen wertvollen präventiven Beitrag und sollte langfristig in evidenzbasierte und effektive Handlungsempfehlungen für das Hochrisikokollektiv der *gBRCA1/2* Mutationsträgerinnen integriert werden.

## 7. Zusammenfassung

Neue Erkenntnisse in der onkologischen Forschung zeigen, dass der Progesteron-medierte OPG/RANK/RANKL Signalweg eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des Mammakarzinoms zu spielen scheint. Bei Frauen mit einer pathogenen Keimbahnmutation in den *BRCA1/2* Genen scheint dieser Signalweg stärker dysreguliert zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer dreimonatigen Lebensstilintervention auf die Serumkonzentrationen von OPG und sRANKL bei *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen untersucht. Die Hypothese bestand darin, dass eine intensive Lebensstilintervention über eine Erhöhung der OPG und Reduktion der sRANKL Konzentration die vorliegende Dysregulation positiv beeinflussen könnte.

In die Arbeit gingen Daten von 49 *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen der LIBRE-1 Studie, eine prospektiv randomisierte Lebensstilinterventionsstudie, ein. Die Probandinnen wurden hierbei im Verhältnis 1:1 in eine Kontroll (KG)- bzw. Interventionsgruppe (IG) randomisiert. Die Lebensstilintervention der IG basierte auf einer Steigerung der körperlichen Aktivität und einer Ernährung nach den Prinzipien der mediterranen Diät durch supervidierte Trainingseinheiten und gruppenbasierte Schulungen. Anhand vorliegender Blutproben aus der Studienbiobank erfolgte die Bestimmung der OPG und sRANKL Serumkonzentrationen mittels quantitativer Immunoassays zu den zwei Studienzeitpunkten Studieneinschluss (SE) und nach 3 Monaten (V1).

Durch die LIBRE-1 Lebensstilintervention konnte eine signifikante Steigerung von OPG sowohl für die IG ( $q=0.022$ ) als auch für die KG ( $q=0.002$ ) erzielt werden. sRANKL konnte in beiden Studienarmen gesenkt werden, wobei die Reduktion von sRANKL nur in der IG signifikant war (IG:  $q=0.0464$ , KG:  $q=0.5584$ ). Ein erhöhter Konsum von ungesättigten Omega-3 Fettsäuren konnte signifikant mit einer Erhöhung von OPG assoziiert werden ( $r=0.579$ ,  $q=0.045$ ). Zudem schienen die Serumkonzentrationen von sRANKL zu Studienbeginn ein Prädiktor für die Veränderung des Biomarkers im Interventionsverlauf darzustellen ( $\beta$ -Schätzer= $-0.70$ ;  $q=0.0018$ ). So konnten Probandinnen mit hohen initialen sRANKL Werten eine stärkere Senkung von sRANKL nach drei Monaten erzielen im Vergleich zu Frauen mit initial niedrigen sRANKL Werten. Ähnlich zeigten Frauen mit initial höherer körperlicher Leistungsfähigkeit zu Studienbeginn (gemessen als  $VO_2\text{peak}$ ) eine stärkere Erhöhung von OPG im Gegensatz zu Frauen mit initial niedrigeren  $VO_2\text{peak}$  Werten ( $\beta$ -Schätzer= $0.133$  pg/ml/ml/min/kg;  $p=0.0319$ ;  $q=0.2871$ ).

Zusammenfassend unterstützen die hier vorliegenden Ergebnisse die Hypothese und zeigen, dass Lebensstilveränderungen über drei Monate zu einer Erhöhung von OPG und Reduktion von sRANKL führen kann und somit körperliche Aktivität und mediterrane Ernährung potente Modulatoren von OPG und sRANKL bei *gBRCA1/2*-Mutationsträgerinnen sein können.

## 8. Literaturverzeichnis

- Akatsu, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Imamura, K., Yamaguchi, A., Sato, K., Nagata, N., & Suda, T. (2009). Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, *6*(2), 183–190. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650060212>
- Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J. M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y., & Inoue, J. (2008). The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance. *Immunity*, *29*(3), 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.015>
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., & Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, *390*(6656), 175–179. <https://doi.org/10.1038/36593>
- Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, Å., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., ... Easton, D. F. (2003). Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *The American Journal of Human Genetics*, *72*(5), 1117–1130. <https://doi.org/10.1086/375033>
- Armstrong, A. P., Tometsko, M. E., Glaccum, M., Sutherland, C. L., Cosman, D., & Dougall, W. C. (2002). A RANK/TRAF6-dependent Signal Transduction Pathway Is Essential for Osteoclast Cytoskeletal Organization and Resorptive Function. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(46), 44347–44356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202009200>
- Asselin-Labat, M.-L., Vaillant, F., Sheridan, J. M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E. R., Yasuda, H., Smyth, G. K., Martin, T. J., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*, *465*(7299), 798–802. <https://doi.org/10.1038/nature09027>
- Beleut, M., Rajaram, R. D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., & Brisken, C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(7), 2989–2994. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915148107>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300.
- Beral, V., & Collaborators, M. W. S. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet*, *362*(9382), 419–427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14065-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14065-2)



- Bergström, I., Parini, P., Gustafsson, S. A., Andersson, G., & Brinck, J. (2012). Physical training increases osteoprotegerin in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *30*(2), 202–207. <https://doi.org/10.1007/s00774-011-0304-6>
- Bhattacharya, A., Rahman, M., Banu, J., Lawrence, R. A., McGuff, H. S., Garrett, I. R., Fischbach, M., & Fernandes, G. (2005). Inhibition of Osteoporosis in Autoimmune Disease Prone MRL/Mpj- Fas lpr Mice by N-3 Fatty Acids. *Journal of the American College of Nutrition*, *24*(3), 200–209. <https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719466>
- Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Feleder, C., & Perlik, V. (2005). Cytokines, PGE2 and endotoxemic fever: a re-assessment. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *76*(1–4), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.01.001>
- Bonanni, B., & Lazzaroni, M. (2013). Acceptability of chemoprevention trials in high-risk subjects. *Annals of Oncology*, *24*, viii42–viii46. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt328>
- Bordeleau, L., Lipscombe, L., Lubinski, J., Ghadirian, P., Foulkes, W. D., Neuhausen, S., Ainsworth, P., Pollak, M., Sun, P., & Narod, S. A. (2011). Diabetes and breast cancer among women with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer*, *117*(9), 1812–1818. <https://doi.org/10.1002/cncr.25595>
- Bruno, E., Manoukian, S., Venturelli, E., Oliverio, A., Rovera, F., Iula, G., Morelli, D., Peissel, B., Azzolini, J., Roveda, E., & Pasanisi, P. (2018). Adherence to Mediterranean Diet and Metabolic Syndrome in BRCA Mutation Carriers. *Integrative Cancer Therapies*, *17*(1), 153–160. <https://doi.org/10.1177/1534735417721015>
- Burns, J. L., Nakamura, M. T., & Ma, D. W. L. (2018). Differentiating the biological effects of linoleic acid from arachidonic acid in health and disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *135*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.05.004>
- Cao, J. J. (2011). Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *6*(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-6-30>
- Cao, Yihai. (2007). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(9), 2362–2368. <https://doi.org/10.1172/JCI32239>
- Cao, Yixue, Bonizzi, G., Seagroves, T. N., Greten, F. R., Johnson, R., Schmidt, E. V., & Karin, M. (2001). IKK $\alpha$  Provides an Essential Link between RANK Signaling and Cyclin D1 Expression during Mammary Gland Development. *Cell*, *107*(6), 763–775. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00599-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00599-2)
- Carrillo, C., Cavia, M. del M., & Alonso-Torre, S. (2012). Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutricion Hospitalaria*, *27*(4), 978–990. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5783>
- Casado-Díaz, A., Santiago-Mora, R., Dorado, G., & Quesada-Gómez, J. M. (2013). The omega-6 arachidonic fatty acid, but not the omega-3 fatty acids, inhibits osteoblastogenesis and induces adipogenesis of human mesenchymal stem cells: potential implication in

- osteoporosis. *Osteoporosis International*, 24(5), 1647–1661. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2138-z>
- Chang, N.-W., Wu, C.-T., Chen, D.-R., Yeh, C.-Y., & Lin, C. (2013). High levels of arachidonic acid and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  in breast cancer tissues are associated with promoting cancer cell proliferation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.06.005>
- Chen, X. X., & Yang, T. (2015). Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 33(5), 474–485. <https://doi.org/10.1007/s00774-014-0569-7>
- Chlebowski, R. T., Blackburn, G. L., Thomson, C. A., Nixon, D. W., Shapiro, A., Hoy, M. K., Goodman, M. T., Giuliano, A. E., Karanja, N., McAndrew, P., Hudis, C., Butler, J., Merkel, D., Kristal, A., Caan, B., Michaelson, R., Vinciguerra, V., Del Prete, S., Winkler, M., ... Elashoff, R. M. (2006). Dietary Fat Reduction and Breast Cancer Outcome: Interim Efficacy Results From the Women's Intervention Nutrition Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 98(24), 1767–1776. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj494>
- Coetzee, M., Haag, M., & Kruger, M. C. (2007). Effects of arachidonic acid, docosahexaenoic acid, prostaglandin E2 and parathyroid hormone on osteoprotegerin and RANKL secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.03.002>
- Cook, C. (2010). Mode of administration bias. *Journal of Manual & Manipulative Therapy*, 18(2), 61–63. <https://doi.org/10.1179/106698110X12640740712617>
- Cummings, S. R., Martin, J. S., McClung, M. R., Siris, E. S., Eastell, R., Reid, I. R., Delmas, P., Zoog, H. B., Austin, M., Wang, A., Kutilek, S., Adami, S., Zanchetta, J., Libanati, C., Siddhanti, S., & Christiansen, C. (2009). Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 361(8), 756–765. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0809493>
- Davis, C., Bryan, J., Hodgson, J., & Murphy, K. (2015). Definition of the Mediterranean Diet; A Literature Review. *Nutrients*, 7(11), 9139–9153. <https://doi.org/10.3390/nu7115459>
- Di, L.-J., Fernandez, A. G., De Siervi, A., Longo, D. L., & Gardner, K. (2010). Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(12), 1406–1413. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1941>
- Dougall, W. C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M. E., Maliszewski, C. R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P. J., Peschon, J. J., & Schuh, J. (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes & Development*, 13(18), 2412–2424. <https://doi.org/10.1101/gad.13.18.2412>
- Duggan, C., Tapsoba, J. de D., Wang, C.-Y., & McTiernan, A. (2016). Dietary Weight Loss and Exercise Effects on Serum Biomarkers of Angiogenesis in Overweight Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *Cancer Research*, 76(14), 4226–4235.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0399>

- Dumais, V., Lumingu, J., Bedard, M., Paquet, L., Verma, S., & Fontaine-Bisson, B. (2017). Prevalence of Insulin Resistance, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes in Canadian Women at High Risk for Breast Cancer. *The Breast Journal*, 23(4), 482–483. <https://doi.org/10.1111/tbj.12772>
- Eakin, C. M., MacCoss, M. J., Finney, G. L., & Kleivit, R. E. (2007). Estrogen receptor is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), 5794–5799. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610887104>
- El-Lithy, A., El-Mazny, A., Sabbour, A., & El-Deeb, A. (2015). Effect of aerobic exercise on premenstrual symptoms, haematological and hormonal parameters in young women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 35(4), 389–392. <https://doi.org/10.3109/01443615.2014.960823>
- Eliassen, A. H., Colditz, G. A., Rosner, B., Willett, W. C., & Hankinson, S. E. (2006). Adult Weight Change and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. *JAMA*, 296(2), 193. <https://doi.org/10.1001/jama.296.2.193>
- Elledge, S. J., & Amon, A. (2002). The BRCA1 suppressor hypothesis: An explanation for the tissue-specific tumor development in BRCA1 patients. *Cancer Cell*, 1(2), 129–132. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00041-7)
- Esen, H. (2009). Do walking programs affect C-reactive protein, osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappa $\beta$  ligand? *Turkish Journal of Biochemistry*, 34(3), 178–186.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F., & Giugliano, D. (2004). Effect of a Mediterranean-Style Diet on Endothelial Dysfunction and Markers of Vascular Inflammation in the Metabolic Syndrome. *JAMA*, 292(12), 1440. <https://doi.org/10.1001/jama.292.12.1440>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventós, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., ... Martínez-González, M. A. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *New England Journal of Medicine*, 378(25), e34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>
- Evely, R. S., Bonomo, A., Schneider, H.-G., Moseley, J. M., Gallagher, J., & Martin, T. J. (2009). Structural requirements for the action of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on bone resorption by isolated osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 6(1), 85–93. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650060114>
- Fabian, C. J., Kimler, B. F., & Hursting, S. D. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research*, 17(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0571-6>

- Fata, J. E., Kong, Y.-Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R. A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E. B., Lacey, D. L., Boyle, W. J., Khokha, R., & Penninger, J. M. (2000). The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. *Cell*, *103*(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00103-3)
- Fiuza-Luces, C., Santos-Lozano, A., Joyner, M., Carrera-Bastos, P., Picazo, O., Zugaza, J. L., Izquierdo, M., Ruilope, L. M., & Lucia, A. (2018). Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(12), 731–743. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0065-1>
- Fonolla-Joya, J., Reyes-García, R., García-Martín, A., López-Huertas, E., & Muñoz-Torres, M. (2016). Daily Intake of Milk Enriched with n-3 Fatty Acids, Oleic Acid, and Calcium Improves Metabolic and Bone Biomarkers in Postmenopausal Women. *Journal of the American College of Nutrition*, *35*(6), 529–536. <https://doi.org/10.1080/07315724.2014.1003114>
- Foulkes, W. D., & Shuen, A. Y. (2013). In Brief: BRCA1 and BRCA2. *The Journal of Pathology*, *230*(4), 347–349. <https://doi.org/10.1002/path.4205>
- Friedenreich, C. M. (2010). The Role of Physical Activity in Breast Cancer Etiology. *Seminars in Oncology*, *37*(3), 297–302. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.05.008>
- Friedenreich, C. M., Courneya, K. S., & Bryant, H. E. (2001). Influence of Physical Activity in Different Age and Life Periods on the Risk of Breast Cancer. *Epidemiology*, *12*(6), 604–612. <https://doi.org/10.1097/00001648-200111000-00005>
- Gnant, M., Pfeiler, G., Dubsy, P. C., Hubalek, M., Greil, R., Jakesz, R., Wette, V., Balic, M., Haslbauer, F., Melbinger, E., Bjelic-Radiscic, V., Artner-Matuschek, S., Fitzal, F., Marth, C., Sevela, P., Mlineritsch, B., Steger, G. G., Manfreda, D., Exner, R., ... Singer, C. F. (2015). Adjuvant denosumab in breast cancer (ABCSG-18): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, *386*(9992), 433–443. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60995-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60995-3)
- Godos, J., Zappalà, G., Bernardini, S., Giambini, I., Bes-Rastrollo, M., & Martinez-Gonzalez, M. (2017). Adherence to the Mediterranean diet is inversely associated with metabolic syndrome occurrence: a meta-analysis of observational studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *68*(2), 138–148. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1221900>
- Gonzalez-Suarez, E., Branstetter, D., Armstrong, A., Dinh, H., Blumberg, H., & Dougall, W. C. (2007). RANK Overexpression in Transgenic Mice with Mouse Mammary Tumor Virus Promoter-Controlled RANK Increases Proliferation and Impairs Alveolar Differentiation in the Mammary Epithelia and Disrupts Lumen Formation in Cultured Epithelial Acini. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(4), 1442–1454. <https://doi.org/10.1128/MCB.01298-06>
- Gonzalez-Suarez, E., Jacob, A. P., Jones, J., Miller, R., Roudier-Meyer, M. P., Erwert, R., Pinkas, J., Branstetter, D., & Dougall, W. C. (2010). RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature*, *468*(7320), 103–107.

<https://doi.org/10.1038/nature09495>

- Goto, H., Hozumi, A., Osaki, M., Fukushima, T., Sakamoto, K., Yonekura, A., Tomita, M., Furukawa, K., Shindo, H., & Baba, H. (2011). Primary human bone marrow adipocytes support TNF- $\alpha$ -induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. *Cytokine*, *56*(3), 662–668. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.005>
- Grund, A., Krause, H., Kraus, M., Siewers, M., Rieckert, H., & Müller, M. J. (2001). Association between different attributes of physical activity and fat mass in untrained, endurance- and resistance-trained men. *European Journal of Applied Physiology*, *84*(4), 310–320. <https://doi.org/10.1007/s004210000369>
- Guerrini, M. M., Sobacchi, C., Cassani, B., Abinun, M., Kilic, S. S., Pangrazio, A., Moratto, D., Mazzolari, E., Clayton-Smith, J., Orchard, P., Coxon, F. P., Helfrich, M. H., Crockett, J. C., Mellis, D., Vellodi, A., Tezcan, I., Notarangelo, L. D., Rogers, M. J., Vezzoni, P., ... Frattini, A. (2008). Human Osteoclast-Poor Osteopetrosis with Hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) Mutations. *The American Journal of Human Genetics*, *83*(1), 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.06.015>
- Guo, Y., Xu, C., Wu, X., Zhang, W., Sun, Y., & Shrestha, A. (2021). Leptin regulates OPG and RANKL expression in Gingival Fibroblasts and Tissues of Chronic Periodontitis Patients. *International Journal of Medical Sciences*, *18*(11), 2431–2437. <https://doi.org/10.7150/ijms.56151>
- Hanada, R., Leibbrandt, A., Hanada, T., Kitaoka, S., Furuyashiki, T., Fujihara, H., Trichereau, J., Paolino, M., Qadri, F., Plehm, R., Klaere, S., Komnenovic, V., Mimata, H., Yoshimatsu, H., Takahashi, N., von Haeseler, A., Bader, M., Kilic, S. S., Ueta, Y., ... Penninger, J. M. (2009). Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*, *462*(7272), 505–509. <https://doi.org/10.1038/nature08596>
- Hanneman, S. K., Cox, C. D., Green, K. E., & Kang, D.-H. (2011). Estimating Intra- and Inter-Assay Variability in Salivary Cortisol. *Biological Research For Nursing*, *13*(3), 243–250. <https://doi.org/10.1177/1099800411404061>
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H., & Ohta, T. (2001). The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(18), 14537–14540. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000881200>
- Hebestreit, K., Yahiaoui-Doktor, M., Engel, C., Vetter, W., Siniatchkin, M., Erickson, N., Halle, M., Kiechle, M., & Bischoff, S. C. (2017). Validation of the German version of the Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS) questionnaire. *BMC Cancer*, *17*(1), 341. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3337-y>
- Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M., & Tanaka, S. (2006). Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(48), 36846–36855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606656200>

- Hillyer, L., Hucik, B., Baracuhy, E., Lin, Z., Muller, W., Robinson, L., & Ma, D. (2020). Her-2 Breast Cancer Outcomes Are Mitigated by Consuming n-3 Polyunsaturated, Saturated, and Monounsaturated Fatty Acids Compared to n-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Nutrients*, *12*(12), 3901. <https://doi.org/10.3390/nu12123901>
- Holmes, M. D., Chen, W. Y., Feskanich, D., Kroenke, C. H., & Colditz, G. A. (2005). Physical Activity and Survival After Breast Cancer Diagnosis. *Obstetrical & Gynecological Survey*, *60*(12), 798–800. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000189128.67822.6b>
- Hong, A. R., & Kim, S. W. (2018). Effects of Resistance Exercise on Bone Health. *Endocrinology and Metabolism*, *33*(4), 435. <https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.4.435>
- Hudelist, G., Wagner, T., Rosner, M., Fink-Retter, A., Gschwantler-Kaulich, D., Czerwenka, K., Kroiss, R., Tea, M., Pischinger, K., Kostler, W. J., Attems, J., Mueller, R., Blaukopf, C., Kubista, E., Hengstschlager, M., & Singer, C. F. (2007). Intratumoral IGF-I protein expression is selectively upregulated in breast cancer patients with BRCA1/2 mutations. *Endocrine Related Cancer*, *14*(4), 1053–1062. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0075>
- Hur, S., Cho, S.-H., Song, B.-K., & Cho, B.-J. (2018). Effect of Resistance Exercise on Serum Osteoprotegerin Levels and Insulin Resistance in Middle-Aged Women with Metabolic Syndrome. *Medical Science Monitor*, *24*, 9385–9391. <https://doi.org/10.12659/MSM.911548>
- Irwin, M. L., Varma, K., Alvarez-Reeves, M., Cadmus, L., Wiley, A., Chung, G. G., DiPietro, L., Mayne, S. T., & Yu, H. (2009). Randomized Controlled Trial of Aerobic Exercise on Insulin and Insulin-like Growth Factors in Breast Cancer Survivors: The Yale Exercise and Survivorship Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *18*(1), 306–313. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0531>
- Iyengar, N. M., Chen, I.-C., Zhou, X. K., Giri, D. D., Falcone, D. J., Winston, L. A., Wang, H., Williams, S., Lu, Y.-S., Hsueh, T.-H., Cheng, A.-L., Hudis, C. A., Lin, C.-H., & Dannenberg, A. J. (2018). Adiposity, Inflammation, and Breast Cancer Pathogenesis in Asian Women. *Cancer Prevention Research*, *11*(4), 227–236. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0283>
- Jiang, W., Zhu, Z., McGinley, J. N., El Bayoumy, K., Manni, A., & Thompson, H. J. (2012). Identification of a Molecular Signature Underlying Inhibition of Mammary Carcinoma Growth by Dietary N-3 Fatty Acids. *Cancer Research*, *72*(15), 3795–3806. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1047>
- Joshi, P. A., Jackson, H. W., Beristain, A. G., Di Grappa, M. A., Mote, P. A., Clarke, C. L., Stingl, J., Waterhouse, P. D., & Khokha, R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*, *465*(7299), 803–807. <https://doi.org/10.1038/nature09091>
- Kalkan, R., & Becer, E. (2019). RANK/RANKL/OPG pathway is an important for the epigenetic regulation of obesity. *Molecular Biology Reports*, *46*(5), 5425–5432. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04997-z>

- Kartsogiannis, V., Zhou, H., Horwood, N. ., Thomas, R. ., Hards, D. ., Quinn, J. M. ., Niforas, P., Ng, K. ., Martin, T. ., & Gillespie, M. . (1999). Localization of RANKL (receptor activator of NFκB ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*, *25*(5), 525–534. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00214-8)
- Katan, M. B., Deslypere, J. P., van Birgelen, A. P., Penders, M., & Zegwaard, M. (1997). Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *Journal of Lipid Research*, *38*(10), 2012–2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374124>
- Kiechl, S., Schramek, D., Widschwendter, M., Fourkala, E.-O., Zaikin, A., Jones, A., Jaeger, B., Rack, B., Janni, W., Scholz, C., Willeit, J., Weger, S., Mayr, A., Teschendorff, A., Rosenthal, A., Fraser, L., Philpott, S., Dubeau, L., Keshtgar, M., ... Penninger, J. M. (2017). Aberrant regulation of RANKL/OPG in women at high risk of developing breast cancer. *Oncotarget*, *8*(3), 3811–3825. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14013>
- Kiechle, M., Dukatz, R., Yahiaoui-Doktor, M., Berling, A., Basrai, M., Staiger, V., Niederberger, U., Marter, N., Lammert, J., Grill, S., Pfeifer, K., Rhiem, K., Schmutzler, R. K., Laudes, M., Siniatchkin, M., Halle, M., Bischoff, S. C., & Engel, C. (2017). Feasibility of structured endurance training and Mediterranean diet in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers – an interventional randomized controlled multicenter trial (LIBRE-1). *BMC Cancer*, *17*(1), 752. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3732-4>
- Kiechle, M., Engel, C., Berling, A., Hebestreit, K., Bischoff, S. C., Dukatz, R., Siniatchkin, M., Pfeifer, K., Grill, S., Yahiaoui-Doktor, M., Kirsch, E., Niederberger, U., Enders, U., Löffler, M., Meindl, A., Rhiem, K., Schmutzler, R., Erickson, N., & Halle, M. (2016). Effects of lifestyle intervention in BRCA1/2 mutation carriers on nutrition, BMI, and physical fitness (LIBRE study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, *17*(1), 368. <https://doi.org/10.1186/s13063-016-1504-0>
- Kiechle, M., Engel, C., Berling, A., Hebestreit, K., Bischoff, S., Dukatz, R., Gerber, W.-D., Siniatchkin, M., Pfeifer, K., Grill, S., Yahiaoui-Doktor, M., Kirsch, E., Niederberger, U., Marter, N., Enders, U., Löffler, M., Meindl, A., Rhiem, K., Schmutzler, R., ... Halle, M. (2016). Lifestyle intervention in BRCA1/2 mutation carriers: study protocol for a prospective, randomized, controlled clinical feasibility trial (LIBRE-1 study). *Pilot and Feasibility Studies*, *2*(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s40814-016-0114-7>
- Kim, C.-S., Kim, H.-J., Kim, J.-Y., Kim, J.-W., Park, D.-H., Lim, S.-T., & Min, S.-K. (2017). The Effects of Exercise Intensity Difference on Bone Metabolic Markers and Cytokines of the RANKL/RANK/OPG System in Korean Osteopenia Elderly Women. *Exercise Science*, *26*(1), 87–95. <https://doi.org/10.15857/ksep.2017.26.1.87>
- Kim, H.-Y. (2017). Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher's exact test. *Restorative Dentistry & Endodontics*, *42*(2), 152–155. <https://doi.org/10.5395/rde.2017.42.2.152>
- Kim, J., Kim, H.-J., & Kim, C.-S. (2019). Effects of 12-week combined exercise on RANKL/RANK/OPG signaling and bone-resorption cytokines in healthy college females.

*Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 23(1), 13–20.  
<https://doi.org/10.20463/jenb.2019.0003>

- King, M.-C. (2003). Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), 643–646. <https://doi.org/10.1126/science.1088759>
- King, T. A., Gemignani, M. L., Li, W., Giri, D. D., Panageas, K. S., Bogomolny, F., Arroyo, C., Olvera, N., Robson, M. E., Offit, K., Borgen, P. I., & Boyd, J. (2004). Increased Progesterone Receptor Expression in Benign Epithelium of BRCA1 -Related Breast Cancers. *Cancer Research*, 64(15), 5051–5053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1283>
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820–823. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>
- Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 157–162. <https://doi.org/10.1038/35101031>
- Kong, Y.-Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E. R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., Lacey, D. L., Fish, E., ... Penninger, J. M. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402(6759), 304–309. <https://doi.org/10.1038/46303>
- Kong, Y.-Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.-L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveiras-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J., & Penninger, J. M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717), 315–323. <https://doi.org/10.1038/16852>
- Kossman, D. A., Williams, N. I., Domchek, S. M., Kurzer, M. S., Stopfer, J. E., & Schmitz, K. H. (2011). Exercise lowers estrogen and progesterone levels in premenopausal women at high risk of breast cancer. *Journal of Applied Physiology*, 111(6), 1687–1693. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00319.2011>
- Kotsopoulos, J., McGee, E. E., Lozano-Esparza, S., Garber, J. E., Ligibel, J., Collins, L. C., Polyak, K., Brown, M., Narod, S., Tamimi, R. M., & Eliassen, A. H. (2020). Premenopausal Plasma Osteoprotegerin and Breast Cancer Risk: A Case–Control Analysis Nested within the Nurses’ Health Study II. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 29(6), 1264–1270. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1154>
- Kotsopoulos, J., Olopade, O. I., Ghadirian, P., Lubinski, J., Lynch, H. T., Isaacs, C., Weber, B., Kim-Sing, C., Ainsworth, P., Foulkes, W. D., Eisen, A., Sun, P., & Narod, S. A. (2005). Changes in body weight and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research*, 7(5), R833. <https://doi.org/10.1186/bcr1293>
- Kovacs, C. S., & Kronenberg, H. M. (1997). Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation\*. *Endocrine Reviews*, 18(6), 832–872.



<https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0319>

- Kroidl, R. E., Schwarz, S., Lehnigk, B., & Fritsch, J. (2015). *Kursbuch Spiroergometrie* (3rd ed.). Georg Thieme Verlag.
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K.-A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., McGuffog, L., Evans, D. G., Barrowdale, D., Frost, D., ... Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, *317*(23), 2402. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
- Kuriki, K., Hirose, K., Wakai, K., Matsuo, K., Ito, H., Suzuki, T., Hiraki, A., Saito, T., Iwata, H., Tatematsu, M., & Tajima, K. (2007). Breast cancer risk and erythrocyte compositions of n-3 highly unsaturated fatty acids in Japanese. *International Journal of Cancer*, *121*(2), 377–385. <https://doi.org/10.1002/ijc.22682>
- Lacey, D. ., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M. ., Dunstan, C. ., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.-X., Kaufman, S., Sarosi, I., ... Boyle, W. . (1998). Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, *93*(2), 165–176. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81569-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81569-X)
- Lagerros, Y. T., Hsieh, S.-F., & Hsieh, C.-C. (2004). Physical activity in adolescence and young adulthood and breast cancer risk: a quantitative review. *European Journal of Cancer Prevention*, *13*(1), 5–12. <https://doi.org/10.1097/00008469-200402000-00002>
- Liede, A., Mansfield, C. A., Metcalfe, K. A., Price, M. A., Snyder, C., Lynch, H. T., Friedman, S., Amelio, J., Posner, J., Narod, S. A., Lindeman, G. J., & Evans, D. G. (2017). Preferences for breast cancer risk reduction among BRCA1/BRCA2 mutation carriers: a discrete-choice experiment. *Breast Cancer Research and Treatment*, *165*(2), 433–444. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4332-3>
- Liegibel, U. M., Sommer, U., Tomakidi, P., Hilscher, U., van den Heuvel, L., Pirzer, R., Hillmeier, J., Nawroth, P., & Kasperk, C. (2002). Concerted Action of Androgens and Mechanical Strain Shifts Bone Metabolism from High Turnover into an Osteoanabolic Mode. *Journal of Experimental Medicine*, *196*(10), 1387–1392. <https://doi.org/10.1084/jem.20021017>
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D. E., Ward, T., Partanen, A., Feleppa, F., Huschtscha, L. I., Thorne, H. J., Fox, S. B., Yan, M., French, J. D., Brown, M. A., Smyth, G. K., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine*, *15*(8), 907–913. <https://doi.org/10.1038/nm.2000>
- Lindeman, G., Nolan, E., Vaillant, F., Branstetter, D., Pal, B., Giner, G., Whitehead, L., Lok, S., Mann, G., KConFab, C., Rohrbach, K., Huang, L.-Y., Soriano, R., Smyth, G., Dougall, W.,

- & Visvader, J. (2017). Abstract S2-04: RANK ligand as a target for breast cancer prevention in BRCA1 mutation carriers. *General Session Abstracts*, S2-04-S2-04. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS16-S2-04>
- Liu, G.-Y., Liang, Q.-H., Cui, R.-R., Liu, Y., Wu, S.-S., Shan, P.-F., Yuan, L.-Q., & Liao, E.-Y. (2014). Leptin Promotes the Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells From Female Mice by Increasing RANKL Expression. *Endocrinology*, *155*(2), 558–567. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1298>
- Liu, S., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Foco, H., Kleer, C. G., Merajver, S. D., Dontu, G., & Wicha, M. S. (2008). BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(5), 1680–1685. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711613105>
- Loser, K., Mehling, A., Loeser, S., Apelt, J., Kuhn, A., Grabbe, S., Schwarz, T., Penninger, J. M., & Beissert, S. (2006). Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nature Medicine*, *12*(12), 1372–1379. <https://doi.org/10.1038/nm1518>
- Lubinski, J., Huzarski, T., Byrski, T., Lynch, H. T., Cybulski, C., Ghadirian, P., Stawicka, M., Foulkes, W. D., Kilar, E., Kim-Sing, C., Neuhausen, S. L., Armel, S., Gilchrist, D., Sweet, K., Gronwald, J., Eisen, A., Gorski, B., Sun, P., & Narod, S. A. (2012). The risk of breast cancer in women with a BRCA1 mutation from North America and Poland. *International Journal of Cancer*, *131*(1), 229–234. <https://doi.org/10.1002/ijc.26369>
- Lynch, B. M., Neilson, H. K., & Friedenreich, C. M. (2011). Physical Activity and Breast Cancer Prevention. *Cancer Research*, *186*, 13–42. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04231-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04231-7_2)
- Ma, Y., Katiyar, P., Jones, L. P., Fan, S., Zhang, Y., Furth, P. A., & Rosen, E. M. (2006). The Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Regulates Progesterone Receptor Signaling in Mammary Epithelial Cells. *Molecular Endocrinology*, *20*(1), 14–34. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0488>
- MacLennan, M. B., Clarke, S. E., Perez, K., Wood, G. A., Muller, W. J., Kang, J. X., & Ma, D. W. L. (2013). Mammary tumor development is directly inhibited by lifelong n-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(1), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.08.002>
- Manders, P., Pijpe, A., Hooning, M. J., Kluijft, I., Vasen, H. F. A., Hoogerbrugge, N., van Asperen, C. J., Meijers-Heijboer, H., Ausems, M. G. E. M., van Os, T. A., Gomez-Garcia, E. B., Brohet, R. M., van Leeuwen, F. E., & Rookus, M. A. (2011). Body weight and risk of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Breast Cancer Research and Treatment*, *126*(1), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1120-8>
- Marques, E. A., Mota, J., Viana, J. L., Tuna, D., Figueiredo, P., Guimarães, J. T., & Carvalho, J. (2013). Response of bone mineral density, inflammatory cytokines, and biochemical bone markers to a 32-week combined loading exercise programme in older men and women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *57*(2), 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2013.03.014>

- Marquis, S. T., Rajan, J. V., Wynshaw-Boris, A., Xu, J., Yin, G.-Y., Abel, K. J., Weber, B. L., & Chodosh, L. A. (1995). The developmental pattern of *Brcal* expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nature Genetics*, *11*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1038/ng0995-17>
- Martin-Bautista, E., Muñoz-Torres, M., Fonolla, J., Quesada, M., Poyatos, A., & Lopez-Huertas, E. (2010). Improvement of bone formation biomarkers after 1-year consumption with milk fortified with eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, oleic acid, and selected vitamins. *Nutrition Research*, *30*(5), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.05.007>
- Martin-Moreno, J. M., Willett, W. C., Gorgojo, L., Banegas, J. R., Rodriguez-Artalejo, F., Fernandez-Rodriguez, J. C., Maisonneuve, P., & Boyle, P. (1994). Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, *58*(6), 774–780. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910580604>
- Mattioni Maturana, F., Martus, P., Zipfel, S., & Nieß, A. M. (2021). Effectiveness of HIIE versus MICT in Improving Cardiometabolic Risk Factors in Health and Disease: A Meta-analysis. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *53*(3), 559–573. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002506>
- Meisel, S. F., Fraser, L. S. M., Side, L., Gessler, S., Hann, K. E. J., Wardle, J., & Lanceley, A. (2017). Anticipated health behaviour changes and perceived control in response to disclosure of genetic risk of breast and ovarian cancer: a quantitative survey study among women in the UK. *BMJ Open*, *7*(12), e017675. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017675>
- Min, J.-K., Kim, Y.-M., Kim, Y.-M., Kim, E.-C., Gho, Y. S., Kang, I.-J., Lee, S.-Y., Kong, Y.-Y., & Kwon, Y.-G. (2003). Vascular Endothelial Growth Factor Up-regulates Expression of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(41), 39548–39557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300539200>
- Morris, J. R., & Solomon, E. (2004). BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Human Molecular Genetics*, *13*(8), 807–817. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh095>
- Mourouti, N., & Panagiotakos, D. B. (2016). The beneficial effect of a Mediterranean diet supplemented with extra virgin olive oil in the primary prevention of breast cancer among women at high cardiovascular risk in the PREDIMED Trial. *Evidence Based Nursing*, *19*(3), 71–71. <https://doi.org/10.1136/ebnurs-2016-102303>
- Nagy, V., & Penninger, J. M. (2015). The RANKL-RANK Story. *Gerontology*, *61*(6), 534–542. <https://doi.org/10.1159/000371845>
- Naranjo, M. C., Garcia, I., Bermudez, B., Lopez, S., Cardelo, M. P., Abia, R., Muriana, F. J. G., & Montserrat-de la Paz, S. (2016). Acute effects of dietary fatty acids on osteoclastogenesis via RANKL/RANK/OPG system. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(11), 2505–2513. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600303>

- Narod, S. A. (2001). Hormonal Prevention of Hereditary Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 952(1), 36–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02726.x>
- Narod, S. A., & Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 665–676. <https://doi.org/10.1038/nrc1431>
- Neirich, L., Yahiaoui-Doktor, M., Lammert, J., Basrai, M., Seethaler, B., Berling-Ernst, A., Ramser, J., Quante, A. S., Schmidt, T., Niederberger, U., Rhiem, K., Schmutzler, R., Engel, C., Bischoff, S. C., Halle, M., Kiechle, M., & Grill, S. (2021). Physical activity and Mediterranean diet as potential modulators of osteoprotegerin and soluble RANKL in gBRCA1/2 mutation carriers: results of the lifestyle intervention pilot study LIBRE-1. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06400-7>
- Nkondjock, A., & Ghadirian, P. (2004). Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers: an overview. *Cancer Letters*, 205(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.10.005>
- Nolan, E., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2017). Out-RANKing BRCA1 in Mutation Carriers. *Cancer Research*, 77(3), 595–600. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2025>
- Nolan, E., Vaillant, F., Branstetter, D., Pal, B., Giner, G., Whitehead, L., Lok, S. W., Mann, G. B., Rohrbach, K., Huang, L.-Y., Soriano, R., Smyth, G. K., Dougall, W. C., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2016). RANK ligand as a potential target for breast cancer prevention in BRCA1-mutation carriers. *Nature Medicine*, 22(8), 933–939. <https://doi.org/10.1038/nm.4118>
- Odén, L., Akbari, M., Zaman, T., Singer, C. F., Sun, P., Narod, S. A., Salmena, L., & Kotsopoulos, J. (2016). Plasma osteoprotegerin and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Oncotarget*, 7(52), 86687–86694. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13417>
- Olsen, C. M., Green, A. C., Nagle, C. M., Jordan, S. J., Whiteman, D. C., Bain, C. J., & Webb, P. M. (2008). Epithelial ovarian cancer: testing the “androgens hypothesis.” *Endocrine Related Cancer*, 15(4), 1061–1068. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0075>
- Pasanisi, P., Bruno, E., Venturelli, E., Morelli, D., Oliverio, A., Baldassari, I., Rovera, F., Iula, G., Taborelli, M., Peissel, B., Azzollini, J., & Manoukian, S. (2018). A Dietary Intervention to Lower Serum Levels of IGF-I in BRCA Mutation Carriers. *Cancers*, 10(9), 309. <https://doi.org/10.3390/cancers10090309>
- Pearce, C. L., Stram, D. O., Ness, R. B., Stram, D. A., Roman, L. D., Templeman, C., Lee, A. W., Menon, U., Fasching, P. A., McAlpine, J. N., Doherty, J. A., Modugno, F., Schildkraut, J. M., Rossing, M. A., Huntsman, D. G., Wu, A. H., Berchuck, A., Pike, M. C., & Pharoah, P. D. P. (2015). Population Distribution of Lifetime Risk of Ovarian Cancer in the United States. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 24(4), 671–676. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-1128>

- Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L., & Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51–BRCA2 complex. *Nature*, *420*(6913), 287–293. <https://doi.org/10.1038/nature01230>
- Pettapiece-Phillips, R., Narod, S. A., & Kotsopoulos, J. (2015). The role of body size and physical activity on the risk of breast cancer in BRCA mutation carriers. *Cancer Causes & Control*, *26*(3), 333–344. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0521-0>
- Phipps, A. I., Chlebowski, R. T., Prentice, R., McTiernan, A., Stefanick, M. L., Wactawski-Wende, J., Kuller, L. H., Adams-Campbell, L. L., Lane, D., Vitolins, M., Kabat, G. C., Rohan, T. E., & Li, C. I. (2011). Body Size, Physical Activity, and Risk of Triple-Negative and Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *20*(3), 454–463. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0974>
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nature Reviews Cancer*, *12*(3), 159–169. <https://doi.org/10.1038/nrc3215>
- Poole, A. J., Li, Y., Kim, Y., Lin, S.-C. J., Lee, W.-H., & Lee, E. Y.-H. P. (2006). Prevention of Brca1-Mediated Mammary Tumorigenesis in Mice by a Progesterone Antagonist. *Science*, *314*(5804), 1467–1470. <https://doi.org/10.1126/science.1130471>
- Poppitt, S. D., Kilmartin, P., Butler, P., & Keogh, G. F. (2005). Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids in Health and Disease*, *4*(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-4-30>
- Poulsen, R. C., Wolber, F. M., Moughan, P. J., & Kruger, M. C. (2008). Long chain polyunsaturated fatty acids alter membrane-bound RANK-L expression and osteoprotegerin secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *85*(1–2), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2007.10.004>
- Rissanen, H., Knekt, P., Jarvinen, R., Salminen, I., & Hakulinen, T. (2003). Serum Fatty Acids and Breast Cancer Incidence. *Nutrition and Cancer*, *45*(2), 168–175. [https://doi.org/10.1207/S15327914NC4502\\_05](https://doi.org/10.1207/S15327914NC4502_05)
- Rosato, V., Bosetti, C., Talamini, R., Levi, F., Montella, M., Giacosa, A., Negri, E., & La Vecchia, C. (2011). Metabolic syndrome and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *Annals of Oncology*, *22*(12), 2687–2692. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr025>
- Rossouw, J. (2002). Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women’s Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *288*(3), 321–333. <https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321>
- Rubin, J., Murphy, T., Nanes, M. S., & Fan, X. (2000). Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *278*(6), C1126–C1132. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.6.C1126>

- Rumawas, M. E., Meigs, J. B., Dwyer, J. T., McKeown, N. M., & Jacques, P. F. (2009). Mediterranean-style dietary pattern, reduced risk of metabolic syndrome traits, and incidence in the Framingham Offspring Cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(6), 1608–1614. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27908>
- Sakai, M., Kakutani, S., Horikawa, C., Tokuda, H., Kawashima, H., Shibata, H., Okubo, H., & Sasaki, S. (2012). Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. *BMC Cancer*, *12*(1), 606. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-606>
- Salmena, L., & Narod, S. (2012). BRCA1 Haploinsufficiency: Consequences for Breast Cancer. *Women's Health*, *8*(2), 127–129. <https://doi.org/10.2217/WHE.12.2>
- Saunders, M. M., Taylor, A. F., Du, C., Zhou, Z., Pellegrini, V. D., & Donahue, H. J. (2006). Mechanical stimulation effects on functional end effectors in osteoblastic MG-63 cells. *Journal of Biomechanics*, *39*(8), 1419–1427. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.04.011>
- Schramek, D., Leibbrandt, A., Sigl, V., Kenner, L., Pospisilik, J. A., Lee, H. J., Hanada, R., Joshi, P. A., Aliprantis, A., Glimcher, L., Pasparakis, M., Khokha, R., Ormandy, C. J., Widschwendter, M., Schett, G., & Penninger, J. M. (2010). Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature*, *468*(7320), 98–102. <https://doi.org/10.1038/nature09387>
- Schramek, D., Sigl, V., & Penninger, J. M. (2011). RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *22*(5), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.02.007>
- Schultheiss, O. C., & Stanton, S. J. (2009). Assessment of salivary hormones. *Methods in Social Neuroscience*, 17–44.
- Schwingshackl, L., Schwedhelm, C., Galbete, C., & Hoffmann, G. (2017). Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, *9*(10), 1063. <https://doi.org/10.3390/nu9101063>
- Scott, J. P. R., Sale, C., Greeves, J. P., Casey, A., Dutton, J., & Fraser, W. D. (2011). The role of exercise intensity in the bone metabolic response to an acute bout of weight-bearing exercise. *Journal of Applied Physiology*, *110*(2), 423–432. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00764.2010>
- Scott, L. J., & Muir, V. J. (2011). Denosumab: in the prevention of skeletal-related events in patients with bone metastases from solid tumours. *Drugs*, *71*(8), 1059–1069. <https://doi.org/10.2165/11207370-000000000-00000>
- Seethaler, B., Basrai, M., Vetter, W., Lehnert, K., Engel, C., Siniatchkin, M., Halle, M., Kiechle, M., & Bischoff, S. C. (2020). Fatty acid profiles in erythrocyte membranes following the Mediterranean diet – data from a multicenter lifestyle intervention study in women with hereditary breast cancer (LIBRE). *Clinical Nutrition*, *39*(8), 2389–2398. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.10.033>

- Sellers, T. A. (2002). Interaction of Waist/Hip Ratio and Family History on the Risk of Hormone Receptor-defined Breast Cancer in a Prospective Study of Postmenopausal Women. *American Journal of Epidemiology*, *155*(3), 225–233. <https://doi.org/10.1093/aje/155.3.225>
- Shafir, A. L., Zhang, X., Poole, E. M., Hankinson, S. E., & Tworoger, S. S. (2014). The Association of Reproductive and Lifestyle Factors with a Score of Multiple Endogenous Hormones. *Hormones and Cancer*, *5*(5), 324–335. <https://doi.org/10.1007/s12672-014-0191-0>
- Shannon, J., King, I. B., Moshofsky, R., Lampe, J. W., Li Gao, D., Ray, R. M., & Thomas, D. B. (2007). Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(4), 1090–1097. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.4.1090>
- Shimamura, M., Nakagami, H., Osako, M. K., Kurinami, H., Koriyama, H., Zhengda, P., Tomioka, H., Tenma, A., Wakayama, K., & Morishita, R. (2014). OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(22), 8191–8196. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400544111>
- Sigl, V.; Schramek, D.; Penninger, J. (2012). RANK und RANKL-Vom Knochen zum Mammakarzinom. *Journal Für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen*, *19*(1), 27–32.
- Sigl, V., Owusu-Boaitey, K., Joshi, P. A., Kavirayani, A., Wirnsberger, G., Novatchkova, M., Kozieradzki, I., Schramek, D., Edokobi, N., Hersl, J., Sampson, A., Odai-Afotey, A., Lazaro, C., Gonzalez-Suarez, E., Pujana, M. A., CIMBA, F., Heyn, H., Vidal, E., Cruickshank, J., ... Penninger, J. M. (2016). RANKL/RANK control Brca1 mutation-driven mammary tumors. *Cell Research*, *26*(7), 761–774. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.69>
- Signori, C., El-Bayoumy, K., Russo, J., Thompson, H. J., Richie, J. P., Hartman, T. J., & Manni, A. (2011). Chemoprevention of Breast Cancer by Fish Oil in Preclinical Models: Trials and Tribulations: Figure 1. *Cancer Research*, *71*(19), 6091–6096. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0977>
- Simonet, W. ., Lacey, D. ., Dunstan, C. ., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H. ., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.-L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., ... Boyle, W. . (1997). Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, *89*(2), 309–319. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3)
- Smith, C. A., Farrah, T., & Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell*, *76*(6), 959–962. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90372-7)
- Stofkova, A. (2009). Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocrine Regulations*, *43*(4), 157–168. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19908934>

- Sun, Q., Ma, J., Campos, H., Hankinson, S. E., & Hu, F. B. (2007). Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *86*(1), 74–81. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.1.74>
- Sureda, A., Bibiloni, M., Julibert, A., Bouzas, C., Argelich, E., Llompart, I., Pons, A., & Tur, J. (2018). Adherence to the Mediterranean Diet and Inflammatory Markers. *Nutrients*, *10*(1), 62. <https://doi.org/10.3390/nu10010062>
- Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Nicholson, G. C., Moseley, J. M., John, T. M., & Suda, T. (1988). Induction of Calcitonin Receptors by  $1\alpha, 25$ - Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Osteoclast-Like Multinucleated Cells Formed from Mouse Bone Marrow Cells\*. *Endocrinology*, *123*(3), 1504–1510. <https://doi.org/10.1210/endo-123-3-1504>
- Tamtaji, O. R., Borzabadi, S., Ghayour-Mobarhan, M., Ferns, G., & Asemi, Z. (2019). The effects of fatty acids consumption on OPG/RANKL/RANK system in cardiovascular diseases: Current status and future perspectives for the impact of diet-gene interaction. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(3), 2774–2781. <https://doi.org/10.1002/jcb.27672>
- Teng, Y.-T. A., Nguyen, H., Gao, X., Kong, Y.-Y., Gorczynski, R. M., Singh, B., Ellen, R. P., & Penninger, J. M. (2000). Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *Journal of Clinical Investigation*, *106*(6), R59–R67. <https://doi.org/10.1172/JCI10763>
- Tercyak, K. P., Bronheim, S. M., Kahn, N., Robertson, H. A., Anthony, B. J., Mays, D., O’Neill, S. C., Peterson, S. K., Miesfeldt, S., Peshkin, B. N., & DeMarco, T. A. (2019). Cancer genetic health communication in families tested for hereditary breast/ovarian cancer risk: a qualitative investigation of impact on children’s genetic health literacy and psychosocial adjustment. *Translational Behavioral Medicine*, *9*(3), 493–503. <https://doi.org/10.1093/tbm/ibz012>
- Tiede, B., & Kang, Y. (2011). From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. *Cell Research*, *21*(2), 245–257. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.11>
- Tobeiha, M., Moghadasian, M. H., Amin, N., & Jafarnejad, S. (2020). RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *BioMed Research International*, *2020*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/6910312>
- Tsay, S.-L., Ko, W.-S., & Lin, K.-P. (2017). The Lifestyle Change Experiences of Cancer Survivors. *Journal of Nursing Research*, *25*(5), 328–335. <https://doi.org/10.1097/JNR.000000000000178>
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., & Higashio, K. (1997). Isolation of a Novel Cytokine from Human Fibroblasts That Specifically Inhibits Osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *234*(1), 137–142. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6603>
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, *5*(2),



99–114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18151955>

- Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(4), 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.03.006>
- Tutino, V., De Nunzio, V., Caruso, M., Bonfiglio, C., Franco, I., Mirizzi, A., De Leonardis, G., Cozzolongo, R., Giannuzzi, V., Giannelli, G., Notarnicola, M., & Osella, A. (2018). Aerobic Physical Activity and a Low Glycemic Diet Reduce the AA/EPA Ratio in Red Blood Cell Membranes of Patients with NAFLD. *Nutrients*, 10(9), 1299. <https://doi.org/10.3390/nu10091299>
- Venkitaraman, A. R. (2014). Cancer Suppression by the Chromosome Custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science*, 343(6178), 1470–1475. <https://doi.org/10.1126/science.1252230>
- Vik, A., Brodin, E. E., Mathiesen, E. B., Brox, J., Jørgensen, L., Njølstad, I., Brækkan, S. K., & Hansen, J.-B. (2015). Serum osteoprotegerin and future risk of cancer and cancer-related mortality in the general population: the Tromsø study. *European Journal of Epidemiology*, 30(3), 219–230. <https://doi.org/10.1007/s10654-014-9975-3>
- Wang, M., Yu, B., Westerlind, K., Strange, R., Khan, G., Patil, D., Boeneman, K., & Hilakivi-Clarke, L. (2009). Prepubertal physical activity up-regulates estrogen receptor  $\beta$ , BRCA1 and p53 mRNA expression in the rat mammary gland. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(1), 213–220. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0062-x>
- Werner, H., & Bruchim, I. (2012). IGF-1 and BRCA1 signalling pathways in familial cancer. *The Lancet Oncology*, 13(12), e537–e544. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70362-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70362-5)
- West, S. L., Scheid, J. L., & De Souza, M. J. (2009). The effect of exercise and estrogen on osteoprotegerin in premenopausal women. *Bone*, 44(1), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.09.008>
- Widschwendter, M., Burnell, M., Fraser, L., Rosenthal, A. N., Philpott, S., Reisel, D., Dubeau, L., Cline, M., Pan, Y., Yi, P.-C., Gareth Evans, D., Jacobs, I. J., Menon, U., Wood, C. E., & Dougall, W. C. (2015). Osteoprotegerin (OPG), The Endogenous Inhibitor of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL), is Dysregulated in BRCA Mutation Carriers. *EBioMedicine*, 2(10), 1331–1339. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.08.037>
- Widschwendter, M., Rosenthal, A. N., Philpott, S., Rizzuto, I., Fraser, L., Hayward, J., Intermaggio, M. P., Edlund, C. K., Ramus, S. J., Gayther, S. A., Dubeau, L., Fourkala, E. O., Zaikin, A., Menon, U., & Jacobs, I. J. (2013). The sex hormone system in carriers of BRCA1/2 mutations: a case-control study. *The Lancet Oncology*, 14(12), 1226–1232. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70448-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70448-0)
- Williams, N. I., Helmreich, D. L., Parfitt, D. B., Caston-Balderrama, A., & Cameron, J. L. (2001). Evidence for a Causal Role of Low Energy Availability in the Induction of Menstrual Cycle Disturbances during Strenuous Exercise Training. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(11), 5184–5193. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.11.8024>

- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H.-L., Steinman, R. M., & Choi, Y. (1997). TRANCE (Tumor Necrosis Factor [TNF]-related Activation-induced Cytokine), a New TNF Family Member Predominantly Expressed in T cells, Is a Dendritic Cell-specific Survival Factor. *Journal of Experimental Medicine*, *186*(12), 2075–2080. <https://doi.org/10.1084/jem.186.12.2075>
- Xia, H., Ma, S., Wang, S., & Sun, G. (2015). Meta-Analysis of Saturated Fatty Acid Intake and Breast Cancer Risk. *Medicine*, *94*(52), e2391. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002391>
- Yano, K., Tsuda, E., Washida, N., Kobayashi, F., Goto, M., Harada, A., Ikeda, K., Higashio, K., & Yamada, Y. (1999). Immunological Characterization of Circulating Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis Inhibitory Factor: Increased Serum Concentrations in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, *14*(4), 518–527. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.4.518>
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S. -i., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., & Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(7), 3597–3602. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3597>
- Yuan, Y., Chen, X., Zhang, L., Wu, J., Guo, J., Zou, D., Chen, B., Sun, Z., Shen, C., & Zou, J. (2016). The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *122*(2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.11.005>
- Zahid, H., Simpson, E. R., & Brown, K. A. (2016). Inflammation, dysregulated metabolism and aromatase in obesity and breast cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, *31*, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.11.003>
- Zallone, A. (2006). Direct and Indirect Estrogen Actions on Osteoblasts and Osteoclasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1068*(1), 173–179. <https://doi.org/10.1196/annals.1346.019>
- Zaman, T., Sun, P., Narod, S. A., Salmena, L., & Kotsopoulos, J. (2019). Plasma RANKL levels are not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Oncotarget*, *10*(25), 2475–2483. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26810>
- Zheng, J.-S., Hu, X.-J., Zhao, Y.-M., Yang, J., & Li, D. (2013). Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ*, *346*(jun27 5), f3706–f3706. <https://doi.org/10.1136/bmj.f3706>
- Zhou, Y., Wang, T., Zhai, S., Li, W., & Meng, Q. (2016). Linoleic acid and breast cancer risk: a meta-analysis. *Public Health Nutrition*, *19*(8), 1457–1463. <https://doi.org/10.1017/S136898001500289X>

Ziegler, R. G., Hoover, R. N., Pike, M. C., Hildesheim, A., Nomura, A. M. Y., West, D. W., Wu-Williams, A. H., Kolonel, L. N., Horn-Ross, P. L., Rosenthal, J. F., & Hyer, M. B. (1993). Migration Patterns and Breast Cancer Risk in Asian-American Women. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 85(22), 1819–1827. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.22.1819>

Ziegler, S., Niessner, A., Richter, B., Wirth, S., Billensteiner, E., Woloszczuk, W., Slany, J., & Geyer, G. (2005). Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand. *Metabolism*, 54(7), 935–938. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.02.009>

## 9. Anhang

### 9.1. Ergänzungstabelle 1

**Ergänzungstabelle 1 (Tabelle 4).** Zusammenhang zwischen Veränderung der sRANKL und OPG Serumkonzentrationen und Veränderungen in n-6, n-9 und n-9 Fettsäuren während der dreimonatigen Interventionsphase ( $\Delta$ VI-SE).

	sRANKL (IG: n=17, KG: n=19)			OPG (IG: n=14, CKG: n=12)		
	Spearman r	95% KI	p (q) Wert	Spearman r	95% KI	p (q) Wert
<b>RBCM PUFA</b>						
n-3 <sup>a</sup>	-0.1067	-0.4332-0.2445	0.5417 (0.8372)	0.5788	0.2354-0.7937	0.0019 <b>(0.0476)</b>
n-6 <sup>b</sup>	-0.0913	-0.4205-0.2591	0.6019 (0.8527)	-0.0735	-0.4577-0.3338	0.7212 (0.8750)
n-9 <sup>c</sup>	-0.1591	-0.4755-0.1938	0.3613 (0.6465)	-0.2007	-0.5541-0.2140	0.3256 (0.6343)
EPA 20:5 (n-3)	-0.0726	-0.4048-0.2766	0.6788 (0.8750)	0.5624	0.2123-0.7845	0.0028 <b>(0.0476)</b>
DPA 22:5 (n-3)	0.0087	-0.3346-0.35	0.9605 (0.9774)	0.4906	0.1156-0.7432	0.0109 (0.0741)
DHA 22:6 (n-3)	-0.1283	-0.4508-0.2239	0.4627 (0.7491)	0.4270	0.3545-0.7049	0.0296 (0.1258)
ARA 20:4 (n-6)	0.0092	-0.3341-0.3505	0.9580 (0.9774)	-0.2732	-0.6050-0.1396	0.177 (0.4629)
Ölsäure 18:1 (n-9)	-0.0832	-0.4137-0.2667	0.6347 (0.8632)	-0.2000	-0.5536-0.2146	0.3273 (0.6343)
<b>Plasma PUFA</b>						
n-3 <sup>d</sup>	-0.0293	-0.3112-0.3632	0.8651 (0.9774)	0.3074	-0.1028-0.6282	0.1267 (0.3916)
n-6 <sup>e</sup>	0.3449	0.0084-0.6113	<b>0.0396</b> (0.1496)	-0.5296	-0.7659- - 0.1672	<b>0.0054</b> (0.0612)
n-9 <sup>f</sup>	-0.21	-0.5113-0.1372	0.2189 (0.4962)	0.07282	-0.3344-0.4572	0.7237 (0.8750)
EPA20:5 (n-3)	0.0049	-0.3332-0.3418	0.9774 (0.9774)	0.06667	-0.3399-0.4523	0.7463 (0.8750)
DPA22:5 (n-3)	0.2108	-0.1364-0.5119	0.2171 (0.4962)	0.1631	-0.2508-0.5265	0.4260 (0.7242)
DHA22:6 (n-3)	-0.02	-0.3552-0.3196	0.9075 (0.9774)	0.3737	-0.02807- 0.6715	0.06 (0.2040)
ARA20:4 (n-6)	0.0963	-0.2493-0,4291	0.5765 (0.8522)	-0.1966	-0.5511-0.2180	0.3358 (0.6343)
Ölsäure 18:1 (n-9)	-0.3683	-0.6278-0.0352	<b>0.0271</b> (0.1258)	0.5070	0.1371-0.7528	<b>0.0082</b> (0.0695)

Korrelationsanalysen basierend auf dem Spearman rank Korrelationskoeffizienten (r) zwischen Veränderungen in OPG und sRANKL Serumkonzentrationen und Veränderungen in n-3, n-6 und n-9 ungesättigten Fettsäuren (PUFA) über die dreimonatige Lebensstilintervention ( $\Delta$ VI-SE). Die Messungen erfolgten in Erythrozytenmembranen (RBCM) und Plasma. Multiples Testen wurde adjustiert auf eine false discovery rate (FDR) von 5% basierend auf der Ergänzungstabelle 1 im Anhang. Die resultierenden q-Werte sind in Klammern angegeben. OPG, Osteoprotegerin;

PUFA, polyunsaturated fatty acids; sRANKL, soluble receptor of nuclear factor  $\kappa$ B ligand; V1, drei Monate nach Studienbeginn.

<sup>a</sup> Summe aus Eicosatriensäure (ETA, 20:3 n-3), Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 n-3), Docosapentaensäure (DPA, 22:5 n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 n-3).

<sup>b</sup> Summe aus Linolsäure (CLA, 18:2 n-6) und Arachidonsäure (ARA, 20:4 n-6).

<sup>c</sup> Summe aus Ölsäure (18:1 n-9), Gondoensäure (20:1 n-9) und Nervensäure (24:1 n-9)

<sup>d</sup> Summe aus Alpha-Linolensäure (18:3 n-3), EPA, DPA and DHA.

<sup>e</sup> Summe aus CLA, Gamma-Linolensäure (18:3 n-6), Eicosatriensäure (20:2 n-6), Dihomogammalinolensäure (20:3 n-6), ARA

<sup>f</sup> Summe aus Erucasäure (22:1 n-9), Eicosatriensäure (20:2 n-9), Mead'sche Säure (20:3 n-9)

## 9.2. Ein- und Ausschlusskriterien nach LIBRE-1 Studienprotokoll

### Einschlusskriterien der LIBRE-1 Studie (alle Kriterien müssen zutreffen):

- Frauen mit nachgewiesener pathogener Mutation in BRCA1 oder BRCA2
- Alter zwischen 18 und 69 Jahren
- informierte schriftliche Einwilligung

### Ausschlusskriterien der LIBRE-1 Studie (Das Vorliegen von mindestens einem der nachfolgend genannten Kriterien führt zum Ausschluss):

- Metastasierte Tumorerkrankung
- Lebenserwartung < 3 Jahre
- Klinisch limitierende Herz-Lungen-Erkrankung (instabile KHK, Herzinsuffizienz Stadium IV, COPD GOLD IV, maximaler Ruheblutdruck > 160/100 mmHg)
- Signifikante orthopädische Probleme, die ein Bewegungstraining nicht gestatten
- Schwerwiegende Erkrankungen, die eine Teilnahme an den Gruppeninterventionen nicht zulassen (z.B. psychiatrische Erkrankungen oder internistische Erkrankungen)
- Karnofsky-Index < 60%
- Frauen mit einer VO<sub>2</sub>peak > 150%
- Frauen mit einer Belastungsfähigkeit < 50 Watt
- Nahrungsmittelallergien, welche die Durchführung einer mediterranen Diät verbieten
- Veganer
- BMI < 15 kg/m<sup>2</sup>
- Schwangerschaft
- Unzureichende Kenntnisse der deutschen Sprache
- Mangelnde Kooperationsbereitschaft (Compliance)
- Aktuelle Teilnahme an anderen interventionellen klinischen Prüfungen

### 9.3. Materialien zur Durchführung der ELISA Tests

#### Materialliste

- Reinstwasser: Aqua B. Braun, Ecotainer®, 1000 ml, Art-Nr: 0082479E (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Präzisionspipetten mit variablen Volumina von 10-1000µl
  - 30-300 µl Mehrfach-Pipette: Eppendorf Research PhysioCare, Art-Nr: 1078837
  - 200 µl Pipette: Poetman 200p, Art-Nr: 0541406
  - 20 µl Pipette: Poetman 20p, Art-Nr: N51219M
  - Rainin Pipet Light, Art-Nr: J0301805A
  - Brand Macro Pipette, Art-Nr: 2V4573
  - 10 ml Pipette: Cellstar greiner bio-one
- Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch: Biozym 20l Surphob, 200 µl ZAP Premiere
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multipipette: Eppendorf Multipipette Plus

#### Laborgeräte

- Vortex Mixer: IKA MS1 Minishaker, IKA Vibrax-VXR Typ VX7
- Mikrotiterplattenphotometer: Thermo Fisher Science MultiScan FC (Version 1.00.96)

#### Inhalt des sRANKL ELISA Kits

LOT-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1016 - 181213	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 1016 - 181213	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 1016 - 181213	SOL	OPG-Lösung, gebrauchsfertig	5,5 ml
K 1016 / 1705-639	STD	Standard, Konzentrat	1 vial
K 1016 / 1705-640	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 vial
K 1016 / 1705-640	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 vial
K 1016 - 181213	CONJ	Konjugat, Streptavidin, peroxidase- markiert	1 vial

K 1016 - 181213	AB	Detektionsantikörper, biotinyliert	1 vial
K 1016 - 181213	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 1016 - 181213	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

Inhalt des OPG ELISA Kits

LOT-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1011 - 190227	PLATE	Polyklonaler Ziege-anti-OPG Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter	12 x 8 Tests
K 1011 - 190227	WASHBUF	Waschpuffer, 20-fach Konzentrat	1 x 50 ml
K 1011 - 190227	AB	Monoklonaler Maus-anti-OPG-Antikörper, biotinyliert	1 x 7 ml
K 1011 / RS 191	STD	Standards 1-6 (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 pmol/l), gebrauchsfertig	6 x 300 µl
K 1011 / RC 194	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 300 µl
K 1011 - 190227	ASYBUF	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 25 µl
K 1011 - 190227	CONJ	Konjugat, Streptavidin-HRP, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 1011 - 190227	SUB	Substrat (TMB Lösung), gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 1011 - 190227	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml



## **10. Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Marion Kiechle für die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit und die tolle Möglichkeit, dieses Projekt zu verwirklichen. Auch bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen, welches es mir ermöglichte, selbstständig und eigenverantwortlich zu arbeiten.

Besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Sabine Grill für die ausgezeichnete Betreuung während allen Phasen meiner Promotion und für ihre wunderbare und über alle Maße hinaus engagierte Unterstützung bedanken.

Mein großer Dank gilt Frau Alexandra Sturmheit, ohne die meine Laborarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Auch möchte ich allen weiteren Mitarbeitern der gynäkologischen Tumorgenetik danken, die dazu beigetragen haben, dass ich dieses Thema bearbeiten konnte, sowie allen Mitarbeitern der LIBRE-1 Studie in München, Kiel und Köln und allen Probanden, die durch ihre Teilnahme diese Studie erst ermöglicht haben.

Meiner Mutter und Manuel möchte ich für ihre Unterstützung und Ermutigung sowohl während des Studiums und der Promotion als auch darüber hinaus danken.

## 11. Veröffentlichungen

Neirich L, Yahiaoui-Doktor M, Lammert J, Basrai M, Seethaler B, Berling-Ernst A, Ramser J, Quante AS, Schmidt T, Niederberger U, Rhiem K, Schmutzler R, Engel C, Bischoff SC, Halle M, Kiechle M, Grill S. Physical activity and Mediterranean diet as potential modulators of osteoprotegerin and soluble RANKL in gBRCA1/2 mutation carriers: results of the lifestyle intervention pilot study LIBRE-1. *Breast Cancer Res Treat.* 2021 Sep 27. doi: 10.1007/s10549-021-06400-7. Epub ahead of print. PMID: 34570303.