

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. J. Gallwas)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**CYR61 und S100A4 als Targets für die
Therapie des triple-negativen
Mammakarzinoms sowie des
Tamoxifen-resistenten
Mammakarzinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Silke Hüchel, geb. Schiemann

aus
Hann. Münden

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker
Ko-Referent/in:
Drittreferent/in:
Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "CYR61 und S100A4 als Targets für die Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms sowie des Tamoxifen-resistenten Mammakarzinoms" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Hellinger JW, **Hüchel S**, Goetz L, Bauerschmitz G, Emons G, Gründker C (2019):
Inhibition of CYR61-S100A4 axis limits breast cancer invasion. *Front Oncol* **9**, 1074

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.2 Histopathologie des Mammakarzinoms	2
1.2.1 Hormonrezeptorstatus	2
1.3 Therapie des primären Mammakarzinoms.....	4
1.3.1 Adjuvante Therapien des primären Mammakarzinoms.....	4
1.3.2 Adjuvante Therapie des Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinoms.....	4
1.3.3 Adjuvante Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms.....	4
1.3.4 Therapie des metastasierten Mammakarzinoms	5
1.3.5 Therapie des metastasierten Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinoms.....	5
1.3.6 Therapie des metastasierten TNBC	5
1.4 Triple-negatives Mammakarzinom.....	5
1.5 Metastasierungsprozess	6
1.5.1 Metastasierung.....	6
1.5.2 Tumorangiogenese.....	6
1.5.3 Invasion und EMT.....	7
1.5.4 Metastasierung des primären Mammakarzinoms.....	7
1.5.5 Metastasierung des TNBC.....	8
1.6 Prometastatische Faktoren	8
1.6.1 CYR61.....	8
1.6.2 S100A4.....	9
1.7 Fragestellung.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Geräte.....	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.3 Chemikalien.....	13
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	13
2.1.5 Sammelgel und Trenngel.....	14
2.1.6 Kulturmedien und Medienzusätze.....	15
2.1.7 Biologisches Material.....	18
2.1.8 Matrigel™.....	18
2.1.9 Small interfering RNA (siRNA).....	18
2.1.10 Enzyme	18

2.1.11	Antikörper.....	19
2.1.12	Software.....	20
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Zellkultur.....	20
2.2.2	si-RNA-Transfektion.....	22
2.2.3	Proteinbestimmung.....	22
2.2.4	Westernblot.....	24
2.2.5	Kokultur.....	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Invasionsraten unbehandelter Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR, MCF-7 TMX, MDA-MB-231 und HCC1806	28
3.2	Proteinexpression von CYR61 und Invasion der Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 nach CYR61-Knock-down	31
3.2.1	Expression von CYR61 und Invasion nach CYR61-Knock-down in HCC1806-Zellen 31	
3.2.2	Expression von CYR61 und Invasion nach CYR61-Knock-down in MDA-MB-231-Zellen	33
3.3	Proteinexpression von S100A4 und Invasion der Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 nach S100A4-Knock-down.....	35
3.3.1	Expression von S100A4 und Invasion von HCC1806-Zellen nach S100A4-Knock-down.....	35
3.3.2	Expression von S100A4 und Invasion von MDA-MB-231-Zellen nach S100A4-Knock-down.....	37
3.4	Vergleiche der Invasionsraten der Zelllinien von MCF-7 WT versus MCF-7 TR sowie MCF-7 WT versus MCF-7 TMX.....	39
3.4.1	Vergleich der Invasionsraten der Zelllinien MCF-7 WT versus MCF-7 TR und MCF-7 WT versus MCF-7 TMX.....	39
3.4.2	Vergleich der Invasionsraten der Zelllinien MCF-7 TR versus MCF-7 TMX.....	41
3.5	Proteinexpression von CYR61 sowie S100A4 und Invasion der Zelllinie MCF-7 TR nach CYR61- und S100A4-Knock-down.....	41
3.5.1	Expression von CYR61 und Invasion nach CYR61-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen 42	
3.5.2	Expression von S100A4 und Invasion nach S100A4-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen	44
3.6	Vergleich der Invasionsraten von MCF-7-WT- versus MCF-7-TR-Zellen nach CYR61- und S100A4-Knock-down.....	46
3.6.1	Vergleich der Invasionsraten von MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen nach CYR61-Knock-down	46
3.6.2	Vergleich der Invasion von MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen nach S100A4-Knock-down.....	48
4	Diskussion	51
4.1	Überblick der Invasionsraten spezifischer Mammakarzinomzelllinien.....	51
4.2	Inhibierung von CYR61 in HCC1806- und MDA-MB-231-Zellen.....	52
4.3	Inhibierung von S100A4 in HCC1806- und MDA-MB-231-Zellen.....	53
4.4	Vergleiche der Inhibierung von CYR61 und S100A4.....	54

4.5	Invasionsraten der Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR und MCF-7 TMX.....	54
4.6	Inhibierung von CYR61 und S100A4 in MCF-7-TR-Zellen	55
4.7	Inhibierung von CYR61 und S100A4 in MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen.....	56
4.8	CYR61 und S100A4 im Vergleich.....	57
4.9	Fazit und Ausblick	57
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der verwendeten Kokultur.	26
Abbildung 2: Bestimmung der Invasionsrate bei MCF-7-WT-, MCF-7-TR-, MCF-7-TMX-, MDA-MB-231- und HCC1806-Zellen.....	29
Abbildung 3: Invasionsassays der Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR, MCF-7 TMX, MDA- MB-231, HCC1806.....	30
Abbildung 4: Bestimmung der Proteinexpression von CYR61 sowie der Invasionsrate nach CYR61-Knock-down in HCC1806-Zellen.....	32
Abbildung 5: Invasion kokultivierter Kontroll-HCC-1806-Mammakarzinomzellen versus HCC1806 nach CYR61-Knock-down (Hämalaunfärbung).....	33
Abbildung 6: Bestimmung der Proteinexpression von CYR61 sowie der Invasionsrate nach CYR61-Knock-down in MDA-MB-231-Zellen.	34
Abbildung 7: Invasion kokultivierter Kontroll-MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen versus MDA-MB-231 nach CYR61-Knock-down (Hämalaunfärbung).....	35
Abbildung 8: Bestimmung der Proteinexpression von S100A4 sowie der Invasionsrate nach S100A4-Knock-down in HCC1806-Zellen.....	36
Abbildung 9: Invasion kokultivierter Kontroll-HCC1806-Mammakarzinomzellen versus HCC1806-Zellen nach S100A4-Knock-down (Hämalaunfärbung).....	37
Abbildung 10: Bestimmung der Proteinexpression von S100A4 sowie der Invasionsrate nach S100A4-Knock-down in MDA-MB-231-Zellen.	38
Abbildung 11: Invasion kokultivierter Kontroll-MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen versus MDA-MB-231 nach S100A4-Knock-down (Hämalaunfärbung).	39
Abbildung 12: Vergleiche der Invasionsraten der unbehandelten Zelllinien MCF-7 WT versus MCF-7 TR und MCF-7 WT versus MCF-7 TMX.....	40
Abbildung 13: Vergleich der Invasionsraten der unbehandelten Zelllinien MCF-7 TR versus MCF-7 TMX.	41
Abbildung 14: Bestimmung der Proteinexpression von CYR61 sowie der Invasion nach CYR61-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen.....	43
Abbildung 15: Invasion kokultivierter Kontroll MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen versus MCF-7-TR-Zellen nach CYR61-Knock-down (Hämalaunfärbung).....	43
Abbildung 16: Bestimmung der Proteinexpression sowie der Invasionsrate nach S100A4- Knock-down in MCF-7-TR-Zellen.	45
Abbildung 17: Invasion kokultivierter Kontroll-MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen versus MCF-7-TR-Zellen nach S100A4-Knock-down (Hämalaunfärbung).....	45
Abbildung 18: Vergleich der Invasionsrate von MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen nach CYR61-Knock-down.....	47
Abbildung 19: Invasion kokultivierter Kontroll-MCF-7-WT-Mammakarzinomzellen versus MCF-7-WT-Zellen nach CYR61-Knock-down (Hämalaunfärbung).....	48
Abbildung 20: Vergleich der Invasionsraten von MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen nach S100A4-Knock-down.	49
Abbildung 21: Invasion kokultivierter Kontroll-MCF-7-WT-Mammakarzinomzellen versus MCF-7-WT-Zellen nach S100A4-Knock-down (Hämalaunfärbung).....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	12
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.....	13
Tabelle 3: Zusammensetzung des 5%igen Sammelgels.....	14
Tabelle 4: Zusammensetzung des 10%igen Trenngels.....	15
Tabelle 5: Kulturmedien und Medienzusätze	15
Tabelle 6: Einfriermedium	16
Tabelle 7: Medium mit Tamoxifen.....	16
Tabelle 8: Versuchsmedium Transfektion.....	17
Tabelle 9: Mammakarzinom- und Osteosarkomzellen	18
Tabelle 10: Small interfering RNA	18
Tabelle 11: Primärantikörper.....	19
Tabelle 12: Sekundärantikörper.....	19
Tabelle 13: Software.....	20
Tabelle 14: Herstellung der Proteinstandards.....	23
Tabelle 15: Hämalanfärbung	26

Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BET	Brusterhaltene Therapie
BL1	Basaler Subtyp (<i>basal-like-1</i>) (TNBC)
BL2	Basaler Subtyp (<i>basal-like-2</i>) (TNBC)
BRCA 1	<i>breast cancer 1</i>
BRCA 2	<i>breast cancer 2</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinases</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor (CCN2)</i>
CYR61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CCN1)</i>
DCIS	<i>ductal carcinoma in situ</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamin- N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Na-Salz
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER α	Östrogenrezeptor α (<i>estrogen-receptor-α</i>)
ER β	Östrogenrezeptor β (<i>estrogen-receptor-β</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GnRH	<i>gonadotropin releasing hormone</i>
GSK-3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1 α	Hypoxie-induzierender Faktor-1 α (<i>hypoxia-inducible factor 1 α</i>)
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
IM	Immunmodulatorischer Subtyp (TNBC)
LAR	Luminaler Androgenrezeptor-ähnlicher-Subtyp (<i>luminal androgen receptor</i>) (TNBC)
LCIS	<i>lobular carcinoma in situ</i>

M	Mesenchymaler Subtyp (TNBC)
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MMP1	Matrix-Metalloproteinase 1
MSL	<i>mesenchymal-stem-like</i> (TNBC)
Mts1	<i>metastasin 1</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed (CCN3)</i>
PI3k	Phosphoinositid-3-Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAR-1	Protease-aktivierender Rezeptor-1
p53	Tumorsuppressorgen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand</i>
PKC	Proteinkinase C
P/S	Penicillin/Streptomycin
RISC	<i>RNA-induced silence complex</i>
RKI	Robert Koch-Institut
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator (<i>selective estrogen receptor modulator</i>)
si-RNA	<i>small interfering RNA</i>
S100A4	<i>S100 calcium-binding protein A4</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	Tween-TBS-Puffer
TCF	T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor (<i>T-cell factor</i>)
TCF/LEF	T-Zell-Faktor/Leukozyt-Enhancer-Faktor (<i>T-cell factor/lymphoid enhancer factor</i>)
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TIMP-1	Metalloproteinase-Inhibitor-1
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom (triple-negative breast cancer)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VEGF *vascular endothelial growth factor*

WNT *wingless int-1*

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Brustkrebs ist der häufigste Tumor und die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen der Frauen weltweit (Jemal et al. 2011).

Auch in Deutschland ist Brustkrebs mit jährlich ca. 69.000 Neuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung der Frau (RKI 2017). Jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (Eisemann et al. 2013). Pro Jahr sterben ca. 17.670 Frauen deutschlandweit an Brustkrebs und rund 100 Mal mehr Frauen als Männer erkranken an einem Mammakarzinom (RKI 2017).

Nicht beeinflussbare Risikofaktoren wie die Lebenszeit-Östrogen-Exposition, frühe Menarche, ein hohes Alter bei der ersten Geburt, postmenopausale Adipositas (Sierra-Martinez et al. 2018), ein Karzinom der kontralateralen Brust und das steigende Alter der Frau tragen zu einer erhöhten Inzidenz des Brustkrebses bei (Böcker et al. 2012). Hierzu zählen auch hereditäre Risikofaktoren (Antoniou und Easton 2006): BRCA-1-(*breast cancer antigen 1*) und BRCA-2-(*breast cancer antigen 2*) Mutationen (Miki et al. 1994; Wooster et al. 1995) sowie eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 (Fountzilias et al. 2016) zeigen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung eines Mammakarzinoms. Beeinflussbare Risikofaktoren sind Lebensstil bezogen: Hohe Rate an Adipositas, Mangel an physischer Aktivität, sesshaftes Verhalten sowie regelmäßiger Alkoholkonsum. Es wird geschätzt, dass ein Drittel der Mammakarzinome auf vermeidbaren Risikofaktoren beruhen (Lammert et al. 2018). Ein Risikofaktor mit hereditärer Prädisposition hat insgesamt eine größere Auswirkung auf die Entstehung eines Mammakarzinoms (Lammert et al. 2018).

1.2 Histopathologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom lässt sich übergeordnet in zwei Entitäten gliedern. Zum einen existiert das *Carcinoma in situ*, zum anderen das invasive Mammakarzinom. Das *Carcinoma in situ* stellt eine neoplastische Proliferation maligner epithelialer Zellen dar und ist von einer intakten Basalmembran von gefäßtragendem Fett- und Bindegewebe abgegrenzt. Das *Carcinoma in situ* lässt sich in ein lobuläres *Carcinoma in situ* (LCIS) und ein duktales *Carcinoma in situ* (DCIS) unterscheiden. Das LCIS kommt bei 1% aller Mammakarzinome prämenopausal vor, wohingegen das DCIS mit einer Häufigkeit von 5-30% und postmenopausal auftritt. Es zeigte sich, dass sich die invasiven Mammakarzinome über präinvasive Stadien entwickeln und das *Carcinoma in situ* somit als Vorläuferläsion gilt.

Das invasive Mammakarzinom unterscheidet sich anlehnend an die Vorläuferläsionen in ein invasiv lobuläres Karzinom und ein invasiv duktales Karzinom. Es charakterisiert sich durch infiltratives Wachstum, welches Basalmembran überschreitend stattfindet und lymphogen sowie hämatogen metastasiert. Prognostisch zeigt das invasiv lobuläre Karzinom eine 10-Jahres-Überlebensrate von 35%, das invasiv duktales Karzinom von 30%. Die schlechte Prognose des invasiven Mammakarzinoms ist der frühen Metastasierung durch Basalmembran überschreitendes Wachstum geschuldet (Böcker et al. 2012).

1.2.1 Hormonrezeptorstatus

Neben der histopathologischen Einteilung des Mammakarzinoms, existiert die Einteilung nach Hormonrezeptorstatus. Das Mammakarzinom lässt sich hinsichtlich der Expression der Östrogen(ER)- und Progesteronrezeptoren sowie der Überexpression des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) einteilen. Östrogene werden in der Nebennierenrinde gebildet und gelten als Liganden für den ER. Vor allem 17β -Östradiol (E_2) ist essentiell wichtig für das physiologische Wachstum und die Differenzierung menschlicher Brust-Epithelzellen (Chen und Russo 2009). Durch eine hohe Östrogenexposition kann es zu Veränderungen im Genom des Brustgewebes kommen und in einer Änderung des Signalweges resultieren (Bolton und Thatcher 2008). Es folgt eine ungehemmte Proliferation und die Entstehung eines Karzinoms.

Der ER gehört zu der Familie der DNA-bindenden Liganden aktivierenden Transkriptionsfaktoren. Sie modulieren die Östrogenwirkung über die Expression von Zielgenen (Nilsson et al. 2004). Im Brustgewebe liegen physiologisch zwei Arten von Östrogenrezeptoren vor, die für das Wachstum und die Differenzierung der Mammazellen verantwortlich sind. Hier unterscheidet man zwischen Östrogenrezeptor α (ER α) und Östrogenrezeptor β (ER β) (Chen und Russo 2009). ER α spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Progression des Brustkrebses. Daher ist er der wichtigste Marker, der über die Therapieeinleitung mit Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator (SERM), entscheidet (Lindberg et al. 2011).

Nach Chen und Russo (2009) hängt das Östrogen abhängige Wachstum, das therapeutische Ansprechen sowie die Prognose von der ER α -Expression ab. ER α -positive Mammakarzinome können mittels Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) wie Tamoxifen behandelt werden. Allerdings können Brustkrebszellen eine Resistenz gegenüber Tamoxifen entwickeln. Sie werden als Tamoxifen-resistente Zelllinien bezeichnet. Da auf Tamoxifen als therapeutisches Konzept verzichtet werden muss, resultiert eine schlechtere Prognose. MCF-7-WT(Wildtyp)-Mammakarzinomzellen wurden erstmals im Jahre 1973 aus dem Pleuraerguss einer Frau extrahiert und sind ER α -positiv (Brooks et al. 1973). Sie können mit Tamoxifen erfolgreich behandelt werden. MCF-7-WT-Zellen können durch wiederholte Tamoxifen-Gaben resistent werden. Es resultieren die verwandten Mammakarzinomzelllinien MCF-7 TR (Tamoxifen-resistent). Durch die erworbene Resistenz wird eine erhöhte Aggressivität vermutet (Gründker et al. 2016).

Der ER β zeigt eine dem ER α entgegengesetzte Wirkung. Die Induktion des ER β reduziert das exponentielle Wachstum sowie die Proliferation (Ström et al. 2004). Der ER β geht mit einer erhöhten Adhäsion sowie Cluster-Bildung einher, indem er Laminin-bindende Integrine der extrazellulären Matrix positiv beeinflusst. Somit ist die erhöhte ER β -Expression auch mit einer verminderten Zellmigration assoziiert (Lindberg et al. 2010). Der ER β zeichnet sich auch als wichtiger Modulator der Brustkrebszellen-Invasion aus. Schlussfolgernd führt der Verlust der ER β -Expression zur Entstehung von Brustkrebs (Lazennec et al. 2001). Madhu Krishna et al. (2018) fanden, dass ER β ein negativer Regulator des Zellzyklus und folglich ein möglicher Tumorsuppressor in Brustkrebsgewebe sei.

75-80% der Mammakarzinome weisen einen positiven Nachweis von ER α und/oder Progesteronrezeptoren auf (Dawson et al. 2009; Föst et al. 2011). Das Steroidhormon Progesteron wird vom Corpus luteum des Ovars sezerniert, hat eine reproduktive Funktion und gilt als Ligand für Progesteronrezeptoren (Graham und Clarke 1997).

Progesteronrezeptoren sind nukleäre ligandenaktivierende Transkriptionsfaktoren (Mangelsdorf et al. 1995). Zusammen mit dem ER α stehen sie für ein proliferatives und karzinogenes Verhalten. In Brustkrebsgewebe kann Progesteron abhängig von der Expositionsdauer pro-proliferativ sowie antiproliferativ wirken (Kim et al. 2013). Die WHI-Studie erbrachte den Nachweis, dass Progesteron, unabhängig von Östrogen, ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Mammakarzinoms zeige (Rossouw et al. 2002).

HER2 wird auch im Brustgewebe exprimiert. Er gehört zur Familie der menschlichen epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFR) und stellt einen Tyrosinkinase-Rezeptor dar, der an Wachstumsprozessen beteiligt ist (Yarden 2001).

Kommt es zu einer Überexpression von HER2, folgt die vermehrte Zellproliferation über den RAS-MAPK-Signalweg und der programmierte Zelltod wird gehemmt. Die Überexpression des HER2 geht mit einer höheren Aggressivität und einem erniedrigten Gesamtüberleben mit Brustkrebs einher. Eine HER2-Überexpression (als HER2-positiv bezeichnet) zeigt sich in 20-30% der invasiven Mammakarzinome (Hudis 2007). Die Hälfte

der HER2-positiven Mammakarzinome exprimieren ER α oder Progesteronrezeptoren. Mammakarzinome zeigen durch die positiv vorhandenen intrazellulären Rezeptoren therapeutische Optionen (Dawson et al. 2009; Föst et al. 2011) im Gegensatz zu ER α - und Progesteronrezeptor-negativen Mammakarzinomen mit normaler HER2-Rezeptor-Expression.

1.3 Therapie des primären Mammakarzinoms

Laut der Leitlinie Mammakarzinom (2017), steht beim lokoregionären Mammakarzinom die vollständige operative Tumorentfernung im Fokus. Unter Berücksichtigung einer vollständigen Tumorentfernung, sollte die brusterhaltene Therapie (BET) der radikalen Mastektomie vorgezogen werden. Nach BET folgt immer eine Radiotherapie der gesamten Brust, um das Risiko von Rezidivtumoren zu senken. Beide Therapien zeigen keinen Unterschied in der Überlebensrate (Leitlinie Mammakarzinom 2017). Nach intraoperativer Kontrolle des Sentinel-Lymphknotens wird über die lymphogene Aussaat des Malignoms entschieden und Lymphknoten entnommen bzw. belassen (Melcher et al. 2012).

1.3.1 Adjuvante Therapien des primären Mammakarzinoms

Laut der Leitlinie Mammakarzinom (2017), gliedert sich die adjuvante Therapie des primären Mammakarzinoms je nach histologischem Typ in eine adjuvante Chemotherapie, eine endokrine Therapie sowie eine Antikörpertherapie. Zusätzlich kann die Strahlentherapie im adjuvanten oder neoadjuvanten Kontext als Therapiebaustein hinzugefügt werden. Adjuvante Chemotherapien beinhalten in der Regel ein Taxan sowie ein Anthrazyklin.

1.3.2 Adjuvante Therapie des Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinoms

Eine endokrine Therapie ist indiziert bei ER α - und/oder Progesteronrezeptor-positiven invasiven Tumoren. Prämenopausal erfolgt die Gabe von Tamoxifen als Östrogenrezeptormodulator oder eines zusätzlichen Aromatasehemmers (er hemmt das Enzym Aromatase und folglich die Östrogenproduktion) wie bei postmenopausaler Behandlung. Alternativ folgt die Suppression der Ovarialfunktion durch eine bilaterale Ovarektomie oder GnRH-Agonisten (Leitlinie Mammakarzinom 2017).

1.3.3 Adjuvante Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms

Beim sogenannten triple-negativen Mammakarzinom (TNBC) fehlen suffiziente Therapieoptionen, da weder ER α und PR vorhanden sind, noch HER2 überexprimiert wird. Das triple-negative Mammakarzinom wird derzeit mit einer Chemotherapie, insbesondere mit einem Taxan und einem Anthrazyklin behandelt (Leitlinie Mammakarzinom 2017).

1.3.4 Therapie des metastasierten Mammakarzinoms

Eine Therapieoption des rezidivierenden Mammakarzinoms ist die erneute Operation, eine eventuell medikamentös systemische Therapie sowie die Strahlentherapie. Das metastasierte Mammakarzinom wird nach palliativem Ansatz therapiert (Leitlinie Mammakarzinom 2017).

1.3.5 Therapie des metastasierten Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinoms

Metastasierte Mammakarzinome werden in der Regel bei positivem ER α und Progesteronrezeptor systemisch behandelt. Prämenopausal kommen GnRH-Analoga sowie die Ovariectomie kombiniert mit einer Tamoxifentherapie zum Einsatz. Postmenopausal steht eine Ovarialsuppression mit Aromatasehemmern im Vordergrund. In der systemischen Therapie findet sich auch der mTOR-Inhibitor Everolimus wieder. Zusätzlich wird eine Polychemotherapie verabreicht. Zur Erstlinientherapie gehört auch die Kombination aus Chemotherapie und dem Angiogenesehemmer Bevacizumab, welches das progressionsfreie Überleben verbessert. Die Erstlinientherapie des metastasierten HER2-positiven Mammakarzinoms beinhaltet eine duale Blockade mit Trastuzumab/Pertuzumab und einem Taxan (Leitlinie Mammakarzinom 2017).

1.3.6 Therapie des metastasierten TNBC

Laut der Leitlinie Mammakarzinom (2017), folgt bei TNBC eine Chemotherapie wie unter 1.3.3 beschrieben. Es zeigte sich allerdings bei TNBC mit BRCA1-Mutation ein besseres Ansprechen von Carboplatin als Docetaxel. Es gibt zusätzlich potenzielle Therapiekonzepte, die derzeit noch in Studien evaluiert werden und zukünftig eine Rolle in der Therapie des TNBC spielen könnten.

1.4 Triple-negatives Mammakarzinom

Es existiert eine heterogene Gruppe von Mammakarzinomen, die keinen Progesteronrezeptor, keinen ER α und keine Überexpression des HER2 aufweist und übergeordnet als triple-negatives Mammakarzinom (TNBC) bezeichnet wird. Der ER β dagegen wird exprimiert (Hinsche et al. 2015). 10-20% aller Mammakarzinome sind triple-negativ (Kurebayashi 2009). Man kann die heterogene Gruppe der TNBC auch genauer einteilen. Die Differenzierung der TNBC-Subtypen beinhaltet die basalen Subtypen (BL1 und BL2), einen immunomodulatorischen Subtyp (IM), einen mesenchymalen Subtyp (M), einen mesenchymalen Stammzell-ähnlichen Subtyp (MSL) sowie einen luminalen Androgenrezeptor-ähnlichen-Subtyp (LAR) (Lehmann et al. 2016). Durch das Fehlen der oben aufgeführten Rezeptoren, den dadurch bedingten Mangel an Therapieoptionen sowie die frühe Metastasierung resultiert eine schlechte Prognose (Lehmann et al. 2016). Die Chemotherapie bleibt die einzig mögliche therapeutische Option im adjuvanten und

metastasierten Setting des TNBC. Vergleichsweise ist das ER α - sowie Progesteronrezeptor-positive und HER2-überexprimierte Mammakarzinom durch endokrine bzw. Target-Therapie mit einer deutlich besseren Prognose vergesellschaftet (Gluz et al. 2009). Das TNBC ist histologisch schlecht differenziert, hochmaligne und aggressiv (Chen und Russo 2009). Deshalb werden neue therapeutische Optionen gegen die heterogene Gruppe des TNBC benötigt.

1.5 Metastasierungsprozess

1.5.1 Metastasierung

Metastasierung bezeichnet die Verschleppung von Zellen des Primärtumors an einen anderen Ort. Sie ist ein wichtiges Ereignis, weil ein Großteil der Krebsmortalität auf die Metastasen zurückgeht (Hunter 2004). Metastasen sind Zellen, die von malignen Primärtumoren abstammen und die Möglichkeit zur Migration und Absiedlung in andere Organe haben, um dort wiederum zu proliferieren. Diese Zellen sind am gefährlichsten (Coghlin und Murray 2010). Die Voraussetzung des Tumorwachstums sowie der Metastasierung hängt von der Fähigkeit des Tumors ab seine eigene Blutversorgung durch Angiogenese zu induzieren. Die Metastasierung beinhaltet die Schritte der Invasion in benachbarte Gewebe, Intravasation, Transport der Tumorzellen via Blutzirkulation, Extravasation und Wachstum in einem sekundären Organ (Mazzocca und Carloni 2009). Der Ort der Aussaat folgt dem Prinzip des Organotropismus. So hat jeder Primärtumor eine Organpräferenz, an welcher Lokalität sich eine Metastase bildet (Böcker et al. 2012).

1.5.2 Tumorangiogenese

Die Beschreibung der Tumorangiogenese, der Invasion und der Metastasierung erfolgt nach Böcker et al. (2012). Die Tumorangiogenese ist für die Metastasierung essentiell. Kommt es zur Proliferation eines Tumors und erreicht dieser eine Größe von mehr als 1-2 mm, bildet er eigene Gefäße aus, um sich mit Sauerstoff- und Nährstoffen versorgen zu können. Er kann jahrelang sehr klein bleiben und sich ausschließlich über Diffusion ernähren. Wächst er und folgt eine dadurch bedingte intratumorale Hypoxie, kommt es zur Aktivierung der Hypoxie-induzierenden Faktoren (HIF). Vor allem der Hypoxie-induzierende Faktor-1 α (HIF-1 α) aktiviert die Induktion des vaskulären epidermalen Wachstumsfaktors (VEGF) und induziert die Produktion neuer Blutgefäße, die aus den zuvor schon bestehenden Kapillaren aussprossen. Laut Wang et al. (2014), tragen die HIFs zusätzlich unter Hypoxie dazu bei, die Transkription von Genen zu aktivieren, welche an der vermehrten Ausknospung von Mikrovesikeln, unter anderem Exosomen, beteiligt sind. Die Mikrovesikel beinhalten Proteine, *messenger-RNA* (mRNA) und *micro-RNA* (microRNA), welche von anderen Zellen wiederum aufgenommen werden und einen Beitrag zur Beeinflussung der Mikroumgebung leisten können.

1.5.3 Invasion und EMT

Zwei Wege führen zur Invasion von Tumorzellen. Zum einen spielt laut Böcker et al. (2012) die Degradation von extrazellulärer Matrix (z.B. Basalmembran) eine Rolle bei der Invasion. Dieser Vorgang ist unter anderem auf durch Tumorzellen sezernierte Enzyme (Metalloproteinasen, Serinproteasen wie Plasmin und Plasminogenaktivatoren, Heparanasen, Proteoglykanasen, Cysteinproteasen wie Kathepsine) zurückzuführen, wobei die Matrix-Metalloproteinasen hierbei die größte Rolle spielen. Zum anderen müssen sich die Tumorzellen aus dem durch Cadherinen verursachten Zell-Zell-Kontakt herauslösen. Das passiert durch Allelverlust und/oder Mutation des E-Cadherin-Gens, welches weniger exprimiert wird und folglich die Zelladhäsion abnimmt. In diesem Zusammenhang ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durch den Verlust des E-Cadherins und der folglich Expression mesenchymaler Marker wie Vimentin gekennzeichnet (Scully et al. 2012). Dadurch kommt es zu einem zusätzlichen Verlust der Zellpolarität. Die Tumorzellen, die sich der EMT unterzogen haben, ändern ihr Aussehen in einen länglichen Phänotyp. Zusätzlich erleichtern Faktoren der Extrazellulären Matrix wie Matrix-degradierende Enzyme, z.B. MMP, durch ihre Produktion von Kanälen die Bewegung der mesenchymalen Tumorzellen (Friedl und Wolf 2008). Durch eine Änderung in den Aktinfilamenten und des zytoskelettalen Umbaus besteht für die Tumorzelle nun die Möglichkeit zur Migration (Iwatsuki et al. 2010). Die Migration stellt die aktive Bewegung (Lokomotion) der Tumorzellen dar, mit Invasion ins benachbarte Gewebe. Voraussetzung ist die Anheftung durch Matrixrezeptoren an Komponenten der Basalmembran und die Fortbewegung der Tumorzellen durch ihre Aktinfilamente in die durch Degradation eröffneten Geweberäume. Haben die Tumorzellen Anschluss an die Blutgefäße gewonnen, folgt die Intravasation. Die Zellen wandern mit dem Blutstrom und verlassen diesen durch Extravasation wieder, um an einen sekundären Ort zu gelangen. Tumorzellen, die sich im Rahmen der EMT durch Verlust von E-Cadherin temporär zu mesenchymalen Stammzellen entwickelt hatten, sind dazu in der Lage die E-Cadherin Expression sowie die damit verbundenen epithelialen Eigenschaften am sekundären Fokus wiederzugewinnen (Guarino et al. 2007).

1.5.4 Metastasierung des primären Mammakarzinoms

Die meisten Tode sind der Metastasierung des Mammakarzinoms geschuldet und nicht des Primärtumors (Weigelt et al. 2005). Zuvor galt die Metastasierung von Brustkrebs als spätes Stadium der Krankheit. Die Tatsache wurde durch Hüsemann et al. (2008) widerlegt. Er postulierte, dass die metastatische Verbreitung ein früher Schritt der Krebsprogression darstelle. Fast 6-10% der Patientinnen haben zum Zeitpunkt der Diagnose des Mammakarzinoms schon Metastasen. Die mediane Überlebenszeit bei metastasierter Erkrankung beträgt zwei bis vier Jahre (Chung und Carlson 2003).

Die häufigste Metastasierung des primären Mammakarzinoms findet in die Lunge (Minn et al. 2005), die Leber (Hoshino et al. 2015), den Knochen (Kang et al. 2003) und das Gehirn

(Bos et al. 2009) statt. Wie schon beschrieben, haben Primärtumoren die Tendenz zum Organotropismus. Eine Voraussetzung dafür ist die Bildung von Mediatoren, die für die Ausbreitung in die präferierte Lokalisation involviert sind. Auf der einen Seite bilden die Brustkrebszellen die Gegebenheiten der Mikroumgebung zur Erleichterung der Invasion, des Überlebens und des Wachstums aus, auf der anderen Seite beeinflusst die Tumorumgebung das invasive und metastatische Potential des Mammakarzinoms (Xie et al. 2017).

1.5.5 Metastasierung des TNBC

TNBC bilden schnell Fernmetastasen aus (Dawson et al. 2009). Das Risiko eines Rezidivs nach Erstdiagnose eines TNBC ist innerhalb der ersten fünf Jahre besonders hoch (Dent et al. 2009). Es tritt meist in Form viszeraler Metastasen auf. Das Rezidivrisiko eines ER α - und Progesteronrezeptor-positiven sowie HER2-überexprimierten Mammakarzinoms bleibt über die Zeit konstant (Dawson et al. 2009).

1.6 Prometastatische Faktoren

Sowohl das *S100 calcium-binding protein A4* (S100A4) als auch *cysteine-rich angiogenic inducer 61* (CYR61) sind hoch exprimiert in Gewebeproben der Brusthyperplasie, des *Carcinoma in situ* und des malignen Mammakarzinoms nachgewiesen worden (Ravasi et al. 2004).

CYR61 und S100A4 spielen wichtige Rollen in EMT, Invasion und Metastasierung, indem sie die Tumorzellmotilität fördern.

Die Zelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 sind TNBC-Zelllinien und exprimieren vermehrt die prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4. Der Knock-down dieser Faktoren führt zu einer signifikant verminderten Invasionsrate. Sie werden daher als potenzielle therapeutische Targets betrachtet (Nguyen et al. 2016).

Die ER α -positive Mammakarzinomzelllinie MCF-7 WT (WT = Wildtyp) zeigt kein invasives Verhalten und eine niedrige Expression der prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4. Nach mesenchymaler Transition zu MCF-7-EMT-Zellen kommt es zu einer Steigerung der Expression der prometastatischen Faktoren sowie einer deutlich gesteigerten Invasionsrate (Gründker et al. 2016).

1.6.1 CYR61

Cysteine-rich protein 61 (CYR61), auch CCN1 genannt, gehört zur CCN-Familie, die aus sechs Proteinen besteht. Sie werden von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und durch zellulären Stress wie Hypoxien induziert. Die Mitglieder der CCN-Familie haben keine spezifischen Rezeptoren. Sie kommunizieren via Integrinen und Proteoglykanen. Sie stimulieren Mitosen, Apoptosen, Produktion extrazellulärer Matrix und die Migration unterschiedlicher Zelltypen (Leask und Abraham 2006). CYR61 gehört aber auch zu den Heparin-bindenden Proteinen

und fördert so die Zelladhäsion sowie Neovaskularisation (Xie et al. 2001). Allerdings spielen die Proteine CCN1 bis CCN3 unterschiedliche, innerhalb ihrer Familie teils paradoxe, Rollen. Während CYR61 für die Aggressivität verantwortlich ist, verhalten sich CCN2 (CTGF) und CCN3 (Nov) wie Tumorsuppressoren.

Jiang et al. (2004) veröffentlichten, dass in Tumorgewebe signifikant höhere Level CYR61 nachweisbar sind verglichen mit normalem Gewebe. Zusätzlich sind diese hohen Level CYR61 mit einer schlechten Prognose, nodaler Involvierung und Metastasierung assoziiert (Jiang et al. 2004). Xie et al. (2001) fanden heraus, dass CYR61 vermehrt in aggressiven Mammakarzinomen exprimiert werde. Auch zeigten sie eine signifikante Assoziation zwischen der Expression von CYR61 und der Tumorgroße, dem Stadium, dem positiven Lymphknotenstatus, dem Alter und dem ER-Level. Es zeigt sich eine erhöhte Expression von CYR61 nach Östrogenexposition. Tamoxifen dagegen inhibiert den ER α , wodurch es zu einer verminderten Expression von CYR61 kommt und in der Folge zu weniger Migration. Durch den Einsatz von GnRH-Analoga wie Triptorelin, wird die Expression von CYR61 und S100A4 reduziert. Zusätzlich reduziert es die Invasionsrate (Gründker et al. 2016).

Auf molekularer Ebene sind laut Nguyen et al. (2006), Matrix-Metalloproteinasen-1 (MMP-1) für den migrationsfördernden Effekt des CYR61 verantwortlich. MMP-1 verhält sich wie ein Signalmolekül, indem es den Protease-aktivierenden Rezeptor-1 (PAR-1) spaltet. Es kommt zu Calcium-abhängigen Signalen, die die Zellmigration und -invasion verursachen (Boire et al. 2005).

Ein weiterer Mechanismus des CYR61 ist die Involvierung in den WNT-Signalweg. Überexprimiertes CYR61 fördert die Aktivierung von Integrin-verknüpfter Kinase (ILK), welches von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3k) vermittelt wird. Es inhibiert die Aktivität des Glykogensynthase-Kinase-3-beta(GSK-3 β)-Gens über Phosphorylierung und verursacht die Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. β -Catenin wird dadurch vermehrt in den Nucleus transloziert. Hier bindet es an die Transkriptionsfaktoren T-Zell-Faktor/Leukozyt-Enhancer-Faktor (TCF/LEF) und erhöht damit die Transkriptionsaktivität von Cyclin D1 und anderer Zielgene. Dieser Vorgang führt zu erhöhter Zellproliferation (Xie et al. 2004).

Auch hat CYR61 als wichtiger Mediator in der Proliferation und Metastasierung des Brustkrebses einen Einfluss auf die EMT. CYR61 kann ein attraktives Ziel gegen EMT für therapeutische Interventionen darstellen (Nguyen et al. 2016).

1.6.2 S100A4

Die S100-Proteine wurden erstmalig 1965 von Moore erwähnt (Moore 1965). Metastasin (Mts1) wird als Synonym für S100A4 verwendet. Es liegt als Gencluster auf Chromosom 1q21, 3f3 und 2q34 (Ravasi et al. 2004).

S100A4 ist ein Mitglied der S100-Calcium-bindenden Proteinfamilie, das in die Tumormetastasierung involviert ist (Garrett et al. 2006).

Laut Ambartsumian et al. (1996), führt die Überexpression von S100A4 im Brustepithel von Mäusen zu vermehrten Primärtumoren der Mammae sowie zu einem vermehrten Auftreten von Metastasen in der Lunge.

Die Hypothese der Verbindung zwischen S100A4 und der Metastasierung wird durch Knock-down-Experimente gestützt, indem die Expression von S100A4 inhibiert und folglich die metastatische Kapazität nachlässt (Takenaga et al. 1997). S100A4 ist in den intrazellulären Prozess mittels β -Catenin/TCF-Signalweg und in das extrazelluläre Geschehen, bei welchem die Kontrolle von Motilität und Invasivität der Zellen beeinflusst wird, involviert. Der WNT/ β -Catenin-Signalweg folgt einer Gain-of-Function-Mutation des β -Catenins, was zu einer Verstärkung der Genaktivität und der Expression des prometastatischen Faktors S100A4 führt. Auch wurde eine TCF-Bindestelle im S100A4-Gen-Promoter identifiziert, die essentiell für die Aktivierung der S100A4-Genexpression ist. S100A4 stellt ein direktes β -Catenin/TCF-Ziel dar und zeigt damit eine erhöhte Migration, Invasion und Metastasierung. Beispielsweise wurde bei Zelllinien mit Gain-of-Function-Mutationen des β -Catenins eine 60-fach höhere S100A4-Expression mit dadurch bedingter steigender Metastasierung identifiziert. S100A4 wirkt sich somit negativ auf die Prognose aus (Stein et al. 2006).

S100A4 trägt zusätzlich zu einer vermehrten Invasion bzw. Metastasierung bei, indem es mit Hilfe seines Calcium-bindenden Verhaltens mit F-Actin, Tropomyosin, Tubulin, der schweren Kette des Nicht-Muskel Myosins II und mit den zytoskelettalen Proteinen interagiert und die Zellmotilität beeinflussen kann (Zuo et al. 2018; Garrett et al. 2008). S100A4 beeinflusst auch das Tumorsuppressorprotein p53, indem es die Phosphorylierung der Proteinkinase C (PKC) inhibiert und so zu einer Entwicklung eines aggressiveren Phänotyps beiträgt (Grigorian et al. 2001). Die extrazelluläre Funktion des S100A4 beinhaltet die Stimulation der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-13 und wirkt somit prometastatisch (Schmidt-Hansen et al. 2004).

Zusammenfassend neigen Tumoren mit einer Überexpression von S100A4 zu einer erhöhten Metastasierungsrate und zeigen eine signifikant verminderte Gesamtüberlebensrate (Platt-Higgins et al. 2000). Durch die Herunterregulation des S100A4, kommt es zur Inhibierung der EMT und zur Abnahme der Migration sowie Invasion (Zuo et al. 2018).

1.7 Fragestellung

Vor allem triple-negative Mammakarzinome zeigen beschränkte Therapieoptionen.

S100A4 und CYR61 spielen eine wichtige Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), Invasion und aggressiver Metastasierung der TNBC durch Förderung der Tumorzellmotilität (Nguyen et al. 2016; Zuo et al. 2018). Triple-negative

Mammakarzinomzelllinien gelten als sehr aggressiv und bilden früh Metastasen (Dawson et al. 2009).

Kann daher mittels Knock-down der prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4 in triple-negativen Mammakarzinomen eine therapeutische Option bestehen?

Zusätzlich existieren Mammakarzinome, die einen intrazellulären ER α haben, sich jedoch durch eine erworbene Tamoxifenresistenz auszeichnen. Durch die erworbene Resistenz wird eine erhöhte Aggressivität vermutet, die mit einer erhöhten Invasions- und Metastasierungsrate durch EMT einhergeht.

Exprimieren auch diese Zelllinien vermehrt die prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4? Und reagieren die Zellen dann auch auf den Knock-down mit einer verminderten Invasionsrate?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller, Firmensitz
Analysenwaage BP 161P	Sartorius, Göttingen
arium [®] mini	Sartorius, Göttingen
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer, Breda
Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau
Brutschrank 3121 S/N 28439531	Forma Scientific, San Bruno, USA
Elektrophoresekammer DNA	OWL Separation Systems, Portsmouth, USA
Laborfuge 400R	Heraeus Holding, Hanau
Laborzentrifuge Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Taufkirchen
Magnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mini-Protean TM III Cell and Systems	Bio-Rad, München
pH-Meter CG22	Schott-Geräte, Mainz
Photometer (BioPhotometer 6131)	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Power Supply, Pac Basic [^] R	Bio-Rad, München
Power Supply, Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Schüttler Titramax 1000	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank LaminAir [®] LFM 24725	Heraeus Holding, Hanau
Synergy [^] TM HT-Multi-Detektions-Reader	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2 TM	Bender§Hobein, Zürich, CH
Waage Sartorius M-Power AZ1502	Sartorius, Göttingen
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die benötigten Verbrauchsmaterialien (Einmalartikel) stammen von den Firmen Biozym (Hessisch Oldenburg), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Merck (Darmstadt), Nunc (Langenselbold), Sarstedt (Nümbrecht) sowie Starlab (Ahrensburg).

2.1.3 Chemikalien

Die für die Versuche verwendeten Chemikalien entstammen, sofern nicht anders vermerkt, den Firmen Merck (Darmstadt), PAA (Cölbe), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) und entsprechen dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösungen	Zusätze und Hersteller
Ammoniumpersulfat	Appl.Chem, Darmstadt
Anodenpuffer	1,82 g Tris, 100 ml 20% Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O (doppelt destilliertes H ₂ O), pH 10,4
Anodenpuffer, konzentriert	18,2 g Tris, 100 ml 20 % Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O, pH 10,4
Antikörper-Stripping-Puffer	Interchim
Blockierungslösung	TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver
CellLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich, München
Hämalaun-Lösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
Kathodenpuffer	2,62 g 6-Amino-Hexansäure, 1,51 g Tris, 100 ml 20 % Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O, pH 9,4
Laemmli-Probenpuffer (2x)	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
Lysis-Puffer	10mM Tris/HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 2 % (v/v) Triton X-114™

Puffer / Lösungen	Zusätze und Hersteller
NuPAGE® LDS Sample Buffer (2x)	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ HPO ₄ , pH 7,4
SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
TBE (0,5x)	90 mM Tris, 90mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5
TBST	1xTBS + 0,1 % (v/v) Tween
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Elektrophoresepuffer (1x)	Elpho 5fach 100ml, Aqua bidest 400ml, Lösung C 5ml 2,5 mM Tris, 19,2mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
PBS-EDTA	EDTA Tetrasodium salt 200mg in DPBS 10ml, DPBS 90ml
Bio Rad Lösung	Ampuwa (steril) 5ml + BioRadlösung 1ml

2.1.5 Sammelgel und Trenngel

Tabelle 3: Zusammensetzung des 5%igen Sammelgels

Material	Einsatz
ddH ₂ O	3,1 ml
Prosieve 50 Gel Solution (Cambrex)	0,5 ml
1,0 mM Tris	1,3 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TMED	4 µl

Tabelle 4: Zusammensetzung des 10%igen Trenngels

Material	Einsatz (für zwei Gele)
ddH ₂ O	5,3 ml
Prosieve 50 Gel Solution (Cambrex)	2,0 ml
1,0 mM Tris	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TMED	4 µl

2.1.6 Kulturmedien und Medienzusätze

Tabelle 5: Kulturmedien und Medienzusätze

	MEM w/ Earle`s Salts w/ Stable Gutamine, Phenolrot	DMEM (1x), Phenolrot	DMEM (1x), ohne Phenolrot
Funktion	Nährmedium	Nährmedium	Versuchsmedium
Zelllinien	HCC1806 MDA-MB-231 MCF-7 WT MCF-7 TR MCF-7 TMX	MG-63	HCC1806 MDA-MB-231 MCF-7 WT MCF-7 TR MCF-7 TMX MG-63
Zusätze	10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) P/S 0,1 % Insulin 0,1 % (v/v) Transferrin	10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) P/S 1 % (v/v) L-Gln	10 % (v/v) CD-FCS 1 % (v/v) P/S 1 % (v/v) L-Gln

Die für die Zellkultivierung nötigen Medien und die Zusätze wurden von den Firmen biowest[®], gibco[®] ThermoFisher Scientific und Biochrom (Berlin) verwendet.

Für die Zelllinien HCC1806, MDA-MB-231, MCF-7 WT, MCF-7 TR und MCF-7 TMX wurde das Minimum Essential Medium (MEM-Earl) mit Phenolrot verwendet, während die Zelllinie MG-63 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert wurde. Die Durchführung der in-vitro-Experimente erfolgte mit DMEM ohne Phenolrot.

Tabelle 6: Einfriermedium

Funktion	Zelllinien	Zusätze
Konservierung von Zellen	HCC1806 MDA-MB-231 MCF-7 WT MCF-7 TR MCF-7 TMX MG63	MEM (Standardmedium) FCS 20% DMSO 5%

Tabelle 7: Medium mit Tamoxifen

Funktion	Zelllinie	Zusätze
Nährmedium / Tamoxifenresistenz	MCF-7 TR	4-Hydrotamoxifen 13,45µl 10 ⁻³ ad 10ml

Tabelle 8: Versuchsmedium Transfektion

	MEM w/ Earle`s Salts w/ Stable Gutamine, Phenolrot, ohne AB	MEM w/ Earle`s Salts w/ Stable Gutamine, Phenolrot, doppelt-konzentriertes AB	siRNA Transfektionsmedium
Zelllinien	HCC1806 MDA-MB-231 MCF-7 WT MCF-7 TR MCF-7 TMX	HCC1806 MDA-MB-231 MCF-7 WT MCF-7 TR MCF-7 TMX	HCC1806 MDA-MB-231 MCF-7 WT MCF-7 TR MCF-7 TMX
Zusätze	10 % (v/v) FCS 0,1 % Insulin 0,1 % (v/v) Transferrin	10 % (v/v) FCS 0,1 % Insulin 0,1 % (v/v) Transferrin 2 % (v/v) P/S	keine

Das für die Transfektion verwendete siRNA-Transfektionsmedium stammt von der Firma Santa Cruz Biotechnology.

2.1.7 Biologisches Material

Tabelle 9: Mammakarzinom- und Osteosarkomzellen

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Referenz
HCC1806			
MDA-MB-231	Pleuraerguss	Adenokarzinom	Brinkley et al. (1980)
MCF-7 WT	Pleuraerguss	Adenokarzinom	Soule et al. (1973)
MCF-7 TR	Pleuraerguss	Adenokarzinom	Soule et al. (1973)
MCF-7 TMX	Pleuraerguss	Adenokarzinom	Soule et al. (1973)
MG-63	Primärtumor	Osteoblasten-ähnliches Osteosarkom	Biliau et al. (1977)

2.1.8 Matrigel™

Das für die Kokultur benötigte Matrigel™ Basalmembranmatrix ist eine gelöste Basalmembranvorbereitung von der Firma BD Biosciences, welche aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom extrahiert wurde.

2.1.9 Small interfering RNA (siRNA)

Tabelle 10: Small interfering RNA

(CCN1) CYR61 siRNA (h): sc-39331
(S100A4) Mts1 siRNA (h): sc-106781

Das Transfektionsreagenz zur Verwendung des effizienten Einbringens der siRNA in Zelllinien stammt von Santa Cruz Biotechnology.

2.1.10 Enzyme

Das verwendete Trypsin/EDTA stammt von der Firma PAA Laboratories in Cölbe.

2.1.11 Antikörper

Tabelle 11: Primärantikörper

Primärantikörper	Firma	Beschreibung	Konzentration
Anti-GAPDH	Cell Signaling	Monoclonal Rabbit	(0,1mg/ml) 1:2000
Anti-S100A4	Sigma HPA 007973	Polyclonal	(0,1mg/ml) 1:500
Anti-CCN1 (CYR61)	Sigma HPA 029853	Polyclonal	(0,1mg/ml) 1:250

Tabelle 12: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma	Konzentration
Anti-Rabbit IgG	GE-Healthcare NA 9340V	(0,1mg/ml) 1:20000

2.1.12 Software

Tabelle 13: Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
Axio Vision 3.1	Carl Zeiss Vision GmbH, Oberkochen
GraphPad Prism® (Version 5.00)	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Microsoft® Office 2007	Microsoft Corporation, Unterschleißheim
Microsoft® Excel	Microsoft Corporation, Washington, USA
Image Studio Digits Version 4.0	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA
Zotero Literaturverwaltungsprogramm	Zotero
Gen5™ 1.08 Microplate Data Analysis Software	BioTek Instruments, Winooski, VT

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung und Passagierung von Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem CO²-Anteil von 5% kultiviert. Das Nährmedium der Zellen setzte sich aus 500 ml rotem Minimum Essential Medium (MEM), 50 ml fetalem Kälberserum (FCS) > 10%, 5 ml Penicillin/Streptomycin > 1% und 650 µl Insulin sowie 500 µl Transferrin (Tabelle 5) zusammen, welches vor Vereinigung unter einer Sterilbank im Wasserbad bei 37°C erwärmt wurde. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit den Bodenflächen von 75 cm² bzw. 175 cm² kultiviert und passagiert. Die Angaben der im Folgenden beschriebenen Volumina erfolgte für die Zellkulturflaschen mit den Bodenflächen von 75 cm².

Die Mammakarzinomzelllinien HCC1806, MDA-MB-231 und MCF-7 WT sowie die Tamoxifen-resistenten MCF-7-Sublinien MCF-7 TR und MCF-7 TMX wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mittels Pipette in die mit 10 ml des Standardmediums befüllte Zellkulturflasche überführt (Tabelle 9). Um eine homogene Verteilung des Mediums zu erwirken, wurde die Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt und im Brutschrank kultiviert. Das Wachstum, die Metabolisierung der Inhaltsstoffe des

Standardmediums und das Entstehen von Stoffwechselprodukten zog den regelmäßigen Wechsel des Mediums nach sich. Der Wechsel des Standardmediums erfolgte durch Aspiration des alten Mediums und Ergänzung durch 10 ml des neuen Mediums. Bei einer Konfluenz der Tumorzellen von etwa 70% bis 80%, wurden die Zellen subkultiviert, welches der Reduktion der Zellzahl in der Zellkulturflasche diente und einem möglichen Detachment vorbeugte.

Die Passagierung erfolgte mit Hilfe des proteolytischen Enzyms Trypsin. Hierzu wurde Trypsin/EDTA sowie Standardmedium im Wasserbad bei 37°C erwärmt, sodass Trypsin sein Aktivitätsoptimum erreichte. Das alte Medium wurde mittels Pasteur-Pipette aspiriert, der Zellrasen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und wieder abgesaugt. 3 ml des Trypsins wurden auf den Tumorzellrasen pipettiert und bei 37°C inkubiert bis sich unter optischer Kontrolle die adhärennten Zellen von ihrer Wachstumsfläche ablösten. Es wurden 7 ml des Standardmediums der Zellkulturflasche zugefügt und alles mit Hilfe einer Pipette gemischt. 1 ml des Gemisches verblieb in der Zellkulturflasche, 9 ml des Standardmediums wurden hinzugefügt, sodass eine Subkultur einer 1:10-Verdünnung entstand.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen humaner Mammakarzinomzellen

Im Folgenden wird die Kryokonservierung der Mammakarzinomzellen beschrieben. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mittels des Enzyms Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in D-PBS) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in ein Falcon pipettiert und fünf Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand des Falcons wurde mit der Pipette aspiriert, während das Zellpellet mit einer Suspension aus 3,75 ml Standardmedium, 1 ml FCS (20%) und 0,25 ml DMSO (5%) gelöst, jeweils 1 ml der Zellsuspension in Kryogefäße abgefüllt und schließlich bei -80°C eingefroren wurde (Tabelle 6).

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Das 5 ml Reaktionsgefäß wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur und 1300 rpm zentrifugiert, sodass sich am Boden des Falcons ein Zellpellet bildete. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde eine 1:1 Mischung aus 10 µl Resuspension und 10 µl Trypanblau-Färbung in einem Reaktionsgefäß gemischt. Hiervon wurden erneut 10 µl der Zellsuspension auf die Neubauer-Kammer pipettiert, welche sich durch die Kapillarkräfte unter das Deckglas saugte. Um auf die Gesamtzellzahl im Kulturgefäß zu kommen, wurden vier große Eckquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahlen bestimmt. Hierzu wurde das Volumen, in dem das Pellet gelöst wurde, mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Die Trypanblau-Färbung ließ tote (blau angefärbtes Zytoplasma) von vitalen Zellen unterscheiden.

Schließlich wurde die Zellsuspension mit reinem Medium je nach gewünschter Endkonzentration verdünnt.

2.2.1.4 Tamoxifen-Behandlung

Die Zelllinie MCF-7 TR wurde in unserem Labor mittels Tamoxifen-Langzeitbehandlung etabliert. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz wurde die Zelllinie einmal wöchentlich mit 13,45 µl einer Tamoxifen-Lösung TAM (10^{-3} µl) behandelt (Tabelle 7).

2.2.2 si-RNA-Transfektion

Der si-RNA-Transfektionsversuch wird beschrieben nach Girgert et al. (2012). Hierbei geht es um die temporäre zelluläre Suppression von S100A4 und CYR61 durch si-RNA.

Die entsprechende Zelllinie wurde auf 5×10^5 Zellen/ml verdünnt und jeweils 2 ml auf vier Zellkulturflaschen à 25 cm³ pipettiert. Anschließend konnten die Zellen 24 Stunden anwachsen, sodass sie bis zu 80% konfluieren. Zudem wurden sowohl S100A4 si-RNA als auch CYR61 si-RNA von Santa Cruz mit 330 µl RNAase freiem Wasser vermischt, sodass eine Konzentration von 10 µM entstand.

2 ml eines Mediums ohne antibiotische Zusätze wurden pro Zellkulturflasche, anstatt des Standardmediums, hinzugefügt. Anschließend kultivierte die Zellkulturflasche im Wärmeschrank. Im nächsten Schritt wurden 16 µl der jeweiligen si-RNA in 400 µl Transfektionsmedium (Santa Cruz Biotechnology) pipettiert. Gleichzeitig wurden 16 µl des Transfektionsreagenzes selbiger Firma in 400 µl Transfektionsmedium pipettiert. Beides wurde in Reaktionsgefäßen vermischt und 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Zehn Minuten vor Transfektion wurde das alte Medium der vier Flaschen abgesaugt, wiederum 2 ml des Transfektionsmediums auf den Zellrasen pipettiert und erneut inkubiert. Pro Transfektion erfolgte die Vermischung von 800 µl Transfektionsmedium mit 200 µl si-RNA/Transfektionsreagenz. Jeweils 1 ml wurde auf die jeweilige Zelllinie in der 25 cm³ Zellkulturflasche gegeben und weitere sechs Stunden im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte die Addition von 1 ml eines doppelkonzentrierten Mediums jeweils in eine Zellkulturflasche (Girgert et al. 2012), welche erneut im Brutschrank kultiviert wurde (Tabelle 8). Der Versuch wurde letztendlich nach 24 h, 48 h und 96 h abgestoppt und die RNA der Proteine entsprechend isoliert. Die Kontrolle blieb unbehandelt.

2.2.3 Proteinbestimmung

2.2.3.1 Proteinisolation

Die Proteinisolation fand an Tag 1, Tag 2 oder Tag 4 statt. Die Proteine der Kontrolle wurden bei einer Konfluenz von 80% isoliert.

Das Medium der Zellkulturflaschen wurde vorsichtig aspiriert, die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen und jeweils mit 2 ml PBS-EDTA (Tabelle 2) für fünf Minuten benetzt, sodass sich die Zellen vom Untergrund lösen konnten.

Anschließend wurden die Zellen mit einem Cell-Scraper vom Untergrund geschabt. 3 ml DPBS wurde hinzugegeben, die Zellen aspiriert, in ein Falcon pipettiert und fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert, das übriggebliebene Zellpellet mit 30 µl des Zelllysispuffers (Tabelle 2) vermischt und in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die so isolierten Proteine konnten im -80°C kalten Tiefkühlschrank konserviert oder zur Proteinbestimmung weiterverwertet werden. Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.2.3.2 Herstellung des Proteinstandards (BSA)

Zunächst wird die Stammlösung angesetzt $c = 10 \text{ mg/ml}$. Hierzu werden 30 mg des Bovine Serum Albumin Standard (BSA) abgewogen und in 3 ml PBS gelöst. Nun werden die Verdünnungen wie die Tabelle zeigt hergestellt.

Tabelle 14: Herstellung der Proteinstandards

Verdünnung	Stammlösung in µl	PBS in µl
1:10	100	900
1:13,3	75	922,5
1:20	50	950
1:40	25	975
1:100	10	990

Die Standards können bei -80°C im Tiefkühlschrank konserviert werden.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentrationen bestimmen zu können, wurden die zuvor im Tiefkühlschrank konservierten Proteinproben und Standards auf Eis aufgetaut und zwei Minuten abzentrifugiert, sodass sich ein Zelldebris am Boden des Eppendorfgefäßes absetzte. 40 µl des Überstandes wurden aspiriert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von den Proben wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung bestehend aus Proteinlösung und Aqua bidest hergestellt. Um die Proben bei -80°C wegfrieren zu können, wurden sie zuvor jeweils mit Laemmli-Puffer (Tabelle 2) vermischt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine 96-Well-Platte benutzt. Um genauere Messwerte durch Bestimmung des Mittelwerts zu erhalten, wurden jeweils 10 µl jeder Probe doppelt aufgetragen. Zusätzlich kamen pro Well 200 µl Bio-Rad-Lösung (steriles Ampuwa 5 ml + BioRadlösung 1 ml) hinzu. Die 96-Well-Platte wurde dann fünf Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler

Titramax 1000 inkubiert. Abschließend erfolgte die Proteinmessung mit der Gen-5™-Microplate-Data-Analysis-Software.

2.2.4 Westernblot

Das Verfahren des Westernblots wird im Folgenden nach Towbin et al. (1979) beschrieben. Hierbei macht man sich die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) zunutze, bei der Proteine wegen ihrer Molekülmasse aufgetrennt und somit quantifiziert werden können. Zu Beginn wurden die Proteine mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt, wofür vorbereitend die Proteinkonzentration und der Laemmli-Puffer (Tabelle 2) hergestellt wurde. Die bei -80°C tiefgekühlten Proteine wurden im Thermomixer bei 95°C für fünf Minuten erwärmt, zwei Minuten auf Eis gelegt und weitere zwei Minuten bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert.

Nach Laemmli (1970) besteht das Gel der diskontinuierlichen SDS-Page aus einem Sammelgel (Stacking) mit 5% Polyacrylamid (Tabelle 3) und einem Trenngel (Resolving) mit 10% Polyacrylamid (Tabelle 4).

Die Proteine wurden in der zuvor bestimmten Proteinkonzentration in die Slots der Gelplatten pipettiert. Im ersten Slot wurde ein Größenstandard peqGOLD Protein-Marker V verwendet. Die Gelplatte wurde in ein Elektrophoreseapparat Mini-PROTEAN® III Electrophoresis Cell Apparatur von Bio-Rad eingesetzt und Elektrophoresepuffer (Elpho fünffach 100 ml, Aqua bidest 400 ml, Lösung C 5 ml) in die Kammern gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 80 Volt für 30 Minuten und 100 Volt für 60 Minuten. Anschließend wurden die Gelplatten vorsichtig zwischen den stabilisierenden Glasplatten herausgelöst. Um die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran blotten zu können, wurde ein Kunststoffgitter, zwei Schwämme sowie je drei Filterpapiere zu jeder Seite verwendet. Das Gel und die Nitrocellulosemembran fanden mittig nebeneinander Platz. Das Blotten erfolgte in einem Blotttank, welcher mit Transferpuffer (Tabelle 2) und einem Kühlakku befüllt und für 60 Minuten bei 100 Volt angeschlossen wurde. Es folgte die Isolierung der Nitrocellulosemembran, die im Anschluss für zehn Minuten in Tween-TBS-Puffer (TBST) (Tabelle 2) gewaschen wurde. Die Proteinbindungsstellen wurden nun mit Trockenmilchpulver für weitere 60 Minuten geblockt, dann in TBST geschwenkt und anschließend mit der vorverdünnten Antikörpermischung Anti-S100A4 (1:250) sowie Anti-CCN-1 (CYR61) (1:1000) (Tabelle 11) getränkt und über Nacht im Kühlschrank bei 7°C bis 8°C belassen. Nach 24 h wurde die Nitrocellulosemembran mit TBST abgespritzt, drei Mal 15 Minuten in TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper Anti-Rabbit IgG (Tabelle 12) in einer Verdünnung von 1:20.000 auf die Membran gegeben wurde. Nach weiteren 60 Minuten auf dem Schüttler, wurde die Membran erneut mit TBST abgespritzt, weitere drei

Mal für 15 Minuten in TBST gewaschen sowie letztmalig fünf Minuten in *tris-buffered saline* (TBS) belassen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit dem WB Detection Set in einer 1:1 Konzentration behandelt, bevor sie mittels Software Programm Image Studio Digits Version 4.0 detektiert sowie quantifiziert wurde. Die Proteinbande für S100A4 liegt bei 12,5 Da, die für CYR61 bei 37 Da.

2.2.4.1 Stripping

Nach der Detektion und Visualisierung der Proteinbanden auf der Membran, erfolgte ein zusätzlicher Abgleich mittels Anti-GAPDH-Antikörper (Tabelle 11). Hierzu wurde die Membran zwei Minuten in einem Antikörper-Stripping-Puffer (Tabelle 2) belassen, der die an die Proteine gebundenen Antikörper löste. Danach wurde die Membran in Aqua bidest geschwenkt. Die Membran konnte dann ein weiteres Mal mit neuem Primärantikörper verwendet werden.

2.2.5 Kokultur

Die verwendete Methodik der Kokultur wird im Folgenden nach von Alten et al. (2006) beschrieben. Die Millicell Inserts (poly-carbonate 8 lm pore diameter, Millipore, Billerica, MA, USA), die Pipettenspitzen sowie das Matrigel wurden auf Eis gelegt und eine 1:1 Mischung von Matrigel und Mix für Matrigel angelegt. Jedes einzelne Insert wurde unter Vermeidung von Luftblasenbildung mit 30 µl der Mischung benetzt und gleichmäßig durch Schwenken verteilt, sodass eine homogene Benetzung erfolgte. Diese Tätigkeit fand stets unter einer Sterilbank statt. Die benetzten Inserts wurden in 24-Well-Platten überführt und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO² im Wärmeschrank inkubiert. In dieser Zeit wurden die jeweiligen Mammakarzinomzellen sowie MG63-Osteoblasten-ähnlichen-Zellen zunächst mit PBS (Tabelle 2) gewaschen, um sie dann mit Hilfe des Enzyms Trypsin vom Untergrund der Zellkulturflasche zu lösen. Die gelösten Zellen wurden in ein Falcon pipettiert und fünf Minuten bei rcf 13.000 min⁻¹ zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Grund des Reaktionsgefäßes absetzte. Sie wurden, wie unter 2.2.1 beschrieben, gezählt und 33.333 Zellen/ml der Zelllinie MG63 pro Well sowie 10.000 Mammakarzinomzellen/ml pro Well pipettiert. Die Zellen wuchsen nun 24 Stunden im Brutschrank an. Anschließend wurden die mit Mammakarzinomzellen befüllten Inserts, in die mit MG63-Osteoblasten-ähnlichen-Zellen befüllten Wells überführt. Somit befanden sich in der oberen Kammer die Mammakarzinomzellen, in der unteren Kammer MG63-Osteoblasten-ähnliche-Zellen. Die zuvor mit der si-RNA CYR61 behandelten Zellen wurden für 48 h, die mit der si-RNA S100A4 behandelten Zellen wurden 96 h inkubiert. Die Fixierung der invadierten Zellen erfolgte schrittweise.

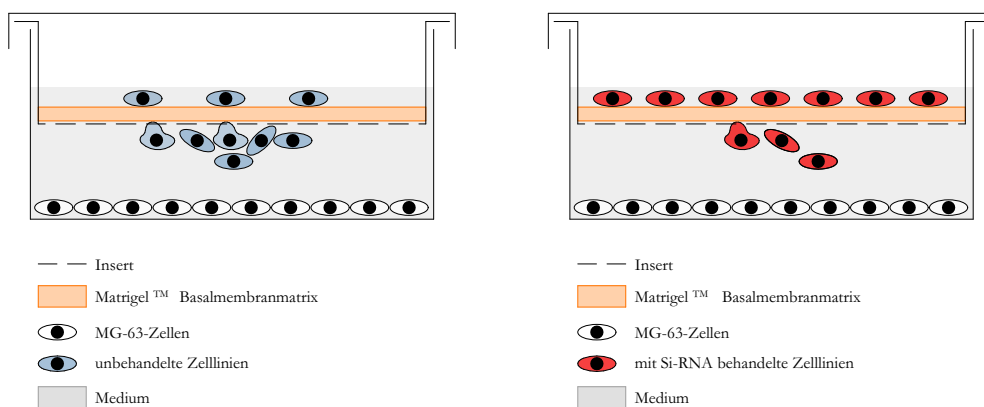


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verwendeten Kokultur (basierend auf Hinsche (2015)).

Die blau dargestellten und unbehandelten Mammakarzinomzellen werden auf mit Matrigel beschichteten Inserts ausgesät (A). Die rot dargestellten Zellen sind zuvor mit siRNA behandelt worden (B). In den Wells befinden sich MG63-Osteoblasten-ähnliche-Zellen sowie Medium.

2.2.5.1 Hämaunfärbung (Kokultur)

Die Hämaunfärbung wurde in 24-Well-Platten durchgeführt. Hämaun ist basisch und färbt somit alle Zellstrukturen wie die in den Zellkernen enthaltene DNA, die sauer (basophil) sind an, sodass die invadierten Zellen quantifiziert werden können. Von den folgenden Lösungen wurde jeweils 1 ml pro Well benötigt. Das Insert wurde mit der Pinzette der Reihenfolge nach in den unterschiedlichen Lösungen gewaschen.

Tabelle 15: Hämaunfärbung

Reagenz	Funktion	Dauer
1. PBS	Waschen	5 Minuten
2. Aqua dest.	Spülen	—
3. Methanol, 100%	Fixieren	10-15 Minuten
4. Aqua dest.	Spülen	—

Reagenz	Funktion	Dauer
5. Hämalaun	Färben	5-10 Minuten
6. Aqua dest.	Spülen	—
7. Leitungswasser	Bläuen	—
8. Aqua dest.	Spülen	—

Nach Fixierung wird das Insert mit Hilfe eines Watteträgers vorsichtig abgewischt, auf einem Objektträger ausgestanzt und mit Aquatext (Eindeckmittel) und einem Deckgläschen versehen. Schließlich können die invadierten Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Invasionsraten unbehandelter Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR, MCF-7 TMX, MDA-MB-231 und HCC1806

Mittels Invasionsassay können die unterschiedlichen Invasionsraten differenziert werden. Es wurden die ER α -positiven Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR und MCF-7 TMX sowie die triple-negativen Mammakarzinom(TNBC)-Zelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 mit Osteoblasten-ähnlichen MG63-Zellen kokultiviert. Es wurden ausschließlich unbehandelte Zellen verwendet, die als Kontrolle bezeichnet wurden.

Die Invasionszeit der ER α -positiven Zelllinien MCF-7 WT und den Tamoxifen-resistenten MCF-7 TR sowie MCF-7 TMX beträgt $t = 96$ h. Die triple-negativen Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 zeigen nach $t = 48$ h eine erhöhte Invasionsrate (Abbildung 2).

Die Tamoxifen-resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7 TR und MCF-7 TMX zeigen eine signifikant höhere Invasionsrate (%) als die Tamoxifen-sensiblen MCF-7-WT-Zellen (MCF-7 TR, $P < 0,0002$, SEM $\pm 43,72$ n = 42) (MCF-7 TMX, $P < 0,0032$, (SEM $\pm 74,96$ n = 18). Auch die triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 invadieren signifikant mehr als MCF-7-WT-Zellen (MDA-MB-231, $P < 0,0002$, SEM $\pm 167,0$ n = 42) (HCC1806, $P < 0,0002$, SEM $\pm 180,6$ n = 42). Insgesamt zeigen die zuletzt genannten Zelllinien eine schon nach $t = 48$ h erhöhte Invasionsrate, während sowohl MCF-7-WT- als auch MCF-7-TR- sowie MCF-7-TMX-Zellen nach $t = 96$ h eine vergleichsweise niedrigere Invasionsrate zeigen (Abbildung 2).

Abbildung 3 zeigt fluoreszenzmikroskopisch sowie mittels Hämalaunfärbung eine erhöhte Dichte invadierter Zellen der TNBC HCC1806 (E) sowie MDA-MB-231 (D). MCF-7 TR (B) und MCF-7 TMX (C) zeigen weniger invadierende Zellen im Vergleich zu TNBC. MCF-7-WT-Zellen (A) invadieren am geringsten.

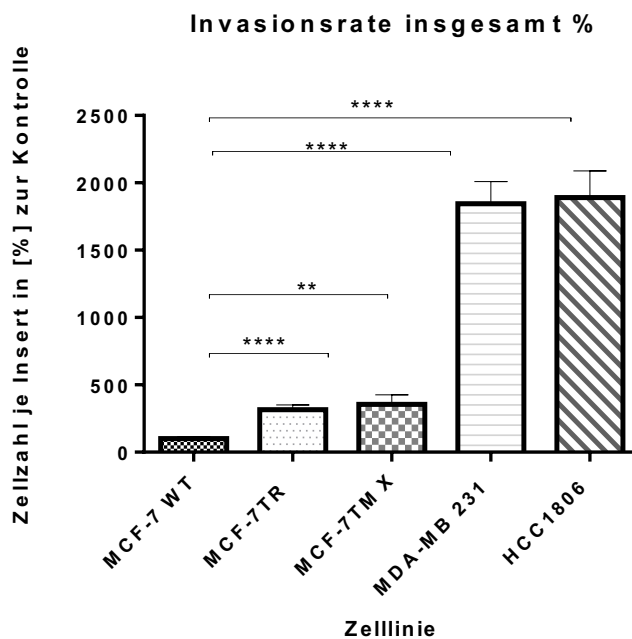


Abbildung 2: Bestimmung der Invasionsrate (%) bei MCF-7-WT-, MCF-7-TR-, MCF-7-TMX-, MDA-MB-231- und HCC1806-Zellen.

Die Invasion der einzelnen Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR, MCF-7 TMX, MDA-MB-231 und HCC1806 wurde mittels Invasionsassay und Kokultivierung mit Osteoblasten-ähnlichen MG63-Zellen gewährleistet. Die Invasionsrate (%) der MCF-7-WT- und MCF-7-TR- sowie MCF-7-TMX-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert, während MDA-MB-231- und HCC1806-Zellen nach $t = 48$ h detektiert wurde. Alle Zellen blieben unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. MCF-7 TR, $P < 0,0002$, (mean \pm SEM 43,72 $n = 42$). MCF-7 TMX, $P < 0,0032$, (mean \pm SEM 74,96 $n = 18$). MDA-MB-231, $P < 0,0002$, (mean \pm SEM 167,0 $n = 42$). HCC 1806, $P < 0,0002$, (mean \pm SEM 180,6 $n = 42$).

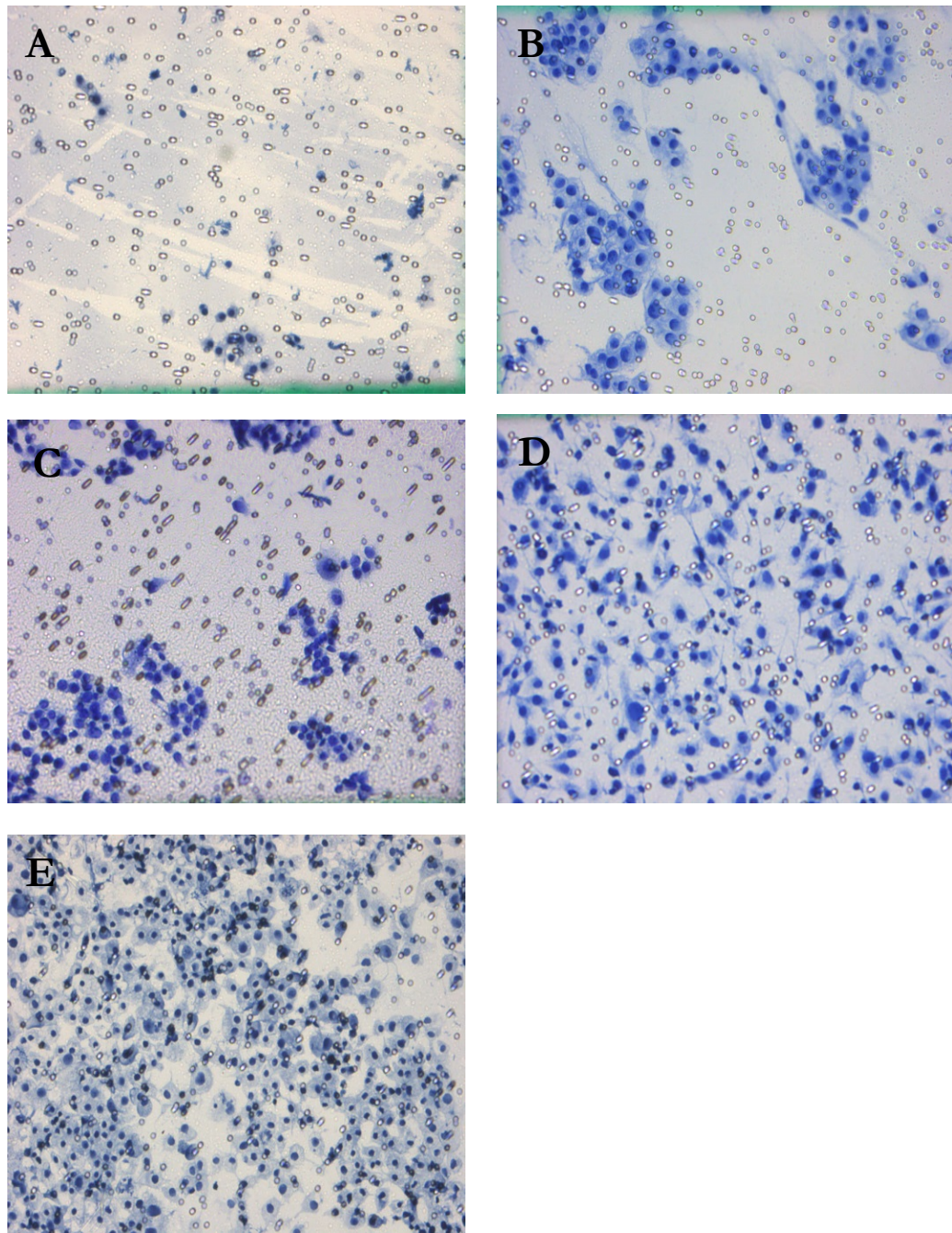


Abbildung 3: Invasionsassays der Zelllinien MCF-7 WT (A), MCF-7 TR (B), MCF-7 TMX (C), MDA-MB-231 (D), HCC1806 (E).

Die Zelllinien MCF-7-WT (A), MCF-7 TR (B) und MCF-7 TMX (C) wurden für $t = 96$ h und die Zellen MDA-MB-231 (D) und HCC1806 (E) für $t = 48$ h mit den Osteblasten-ähnlichen MG-63-Zellen kokultiviert.

3.2 Proteinexpression von CYR61 und Invasion der Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 nach CYR61-Knock-down

Die Bestimmung der Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Versuch, die Invasionsrate (%) mit Hilfe des Kokultur-Versuchs, bestimmt.

Die Proteinexpression (%) wird jeweils für die TNBC HCC1806 und MDA-MB-231 dargestellt. Hierbei zeigt sich die Proteinexpression einer unbehandelten Kontrolle und die Expression nach siRNA-Behandlung (siRNA-CYR61) nach $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h.

In den Invasionsassays wird die Invasionsrate (%) der Kontrolle und nach CYR61-Knock-down bestimmt. Die Kokultur der Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 wurde nach $t = 48$ h abgestoppt.

3.2.1 Expression von CYR61 und Invasion nach CYR61-Knock-down in HCC1806-Zellen

Mittels Westernblot wurde die Proteinexpression (%) der HCC1806-Zellen nach CYR61-Knock-down bestimmt. Nach CYR61-Herunterregulation zeigt sich eine signifikante Minderung der Proteinexpression nach $t = 24$ h ($P < 0,032$, $SEM \pm 74,97 \pm 8,830$ $n = 5$) sowie nach $t = 48$ h ($P < 0,0003$, $SEM \pm 49,79 \pm 7,539$ $n = 5$) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4 A).

Im Kokultur-Versuch resultiert eine signifikante Minderung der Invasionsrate (%) von HCC1806-Zellen nach CYR61-Knock-down im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,0002$, $SEM \pm 7,680$ $n = 18$) (Abbildung 4 B und Abbildung 5).

Zusammenfassend stellt sich eine Minderung der Proteinexpression (%) nach $t = 24$ h und $t = 48$ h (A), sowie eine nach $t = 48$ h verminderte Invasionsrate (%) (B) nach CYR-61-Herunterregulation, dar.

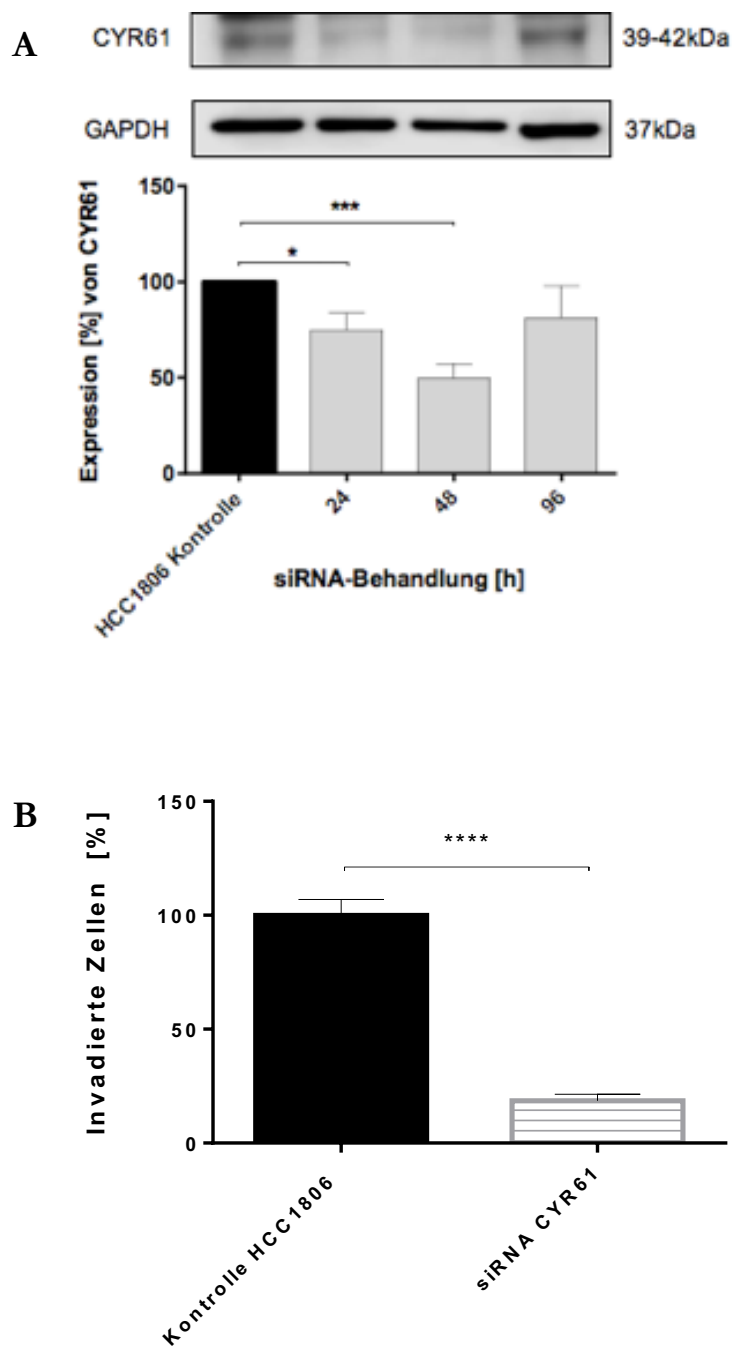


Abbildung 4: Bestimmung der Proteinexpression (%) von CYR61 (A) sowie der Invasionsrate (%) (B) nach CYR61-Knock-down in HCC1806-Zellen.

Die Expression von CYR61 wurde nach $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h in HCC1806-Mammakarzinomzellen mittels Westernblot detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. 24 h; $P < 0,032$; (mean \pm SEM $74,97 \pm 8,830$ n = 5), 48 h; $P < 0,0003$; (mean \pm SEM $49,79 \pm 7,539$ n = 5); 96 h; $P < 0,3982$; (mean \pm SEM $81,34 \pm 16,77$ n = 5). Die Invasion nach CYR61-Knock-down, der mit Osteosarkomzellen kokultivierten HCC1806-Zellen, wurde nach $t = 48$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA CYR61, $P < 0,0002$; (mean \pm SEM $7,680$ n = 18).

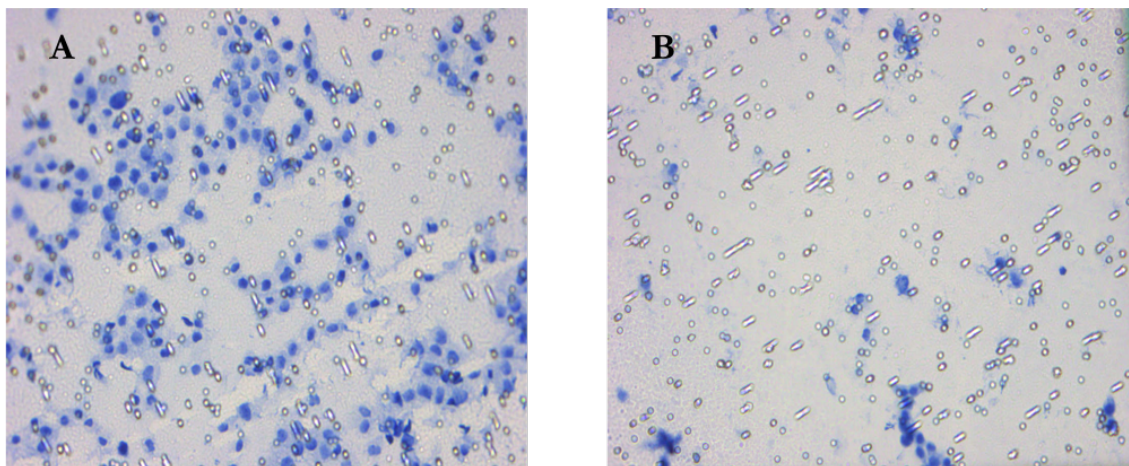


Abbildung 5: Invasion kokultivierter Kontroll-HCC-1806-Mammakarzinomzellen (A) versus HCC1806 nach CYR61-Knock-down (B) (Hämalaunfärbung).

Die HCC1806-Mammakarzinomzellen wurden sowohl in der Kontrolle als auch nach CYR61-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen für $t = 48$ h kokultiviert.

3.2.2 Expression von CYR61 und Invasion nach CYR61-Knock-down in MDA-MB-231-Zellen

Im Westernblot (A) zeigt sich nach CYR61-Knock-down bei MDA-MB-231-Zellen nach $t = 24$ h (24 h; $P < 0,002$; $SEM \pm 32,15 \pm 11,32$ $n = 4$) und $t = 48$ h (48 h; $P < 0,0351$; $SEM \pm 44,46 \pm 18,72$ $n = 4$) eine signifikante Minderung der Proteinexpression (Abbildung 6 A).

Im Invasionsassay (B) stellt sich eine signifikant verminderte Invasionsrate (%) der MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen nach durch siRNA verursachtem CYR61-Knock-down im Vergleich zur Kontrolle dar ($P < 0,0002$; $SEM \pm 107,5$ $n = 18$) (Abbildung 6 B und Abbildung 7).

Summa summarum kommt es nach CYR61-Herunterregulation zu einer erniedrigten CYR61-Proteinexpression (%) und folglich einer niedrigeren Invasionsrate (%) des CYR61 nach oben genannten Zeitpunkten.

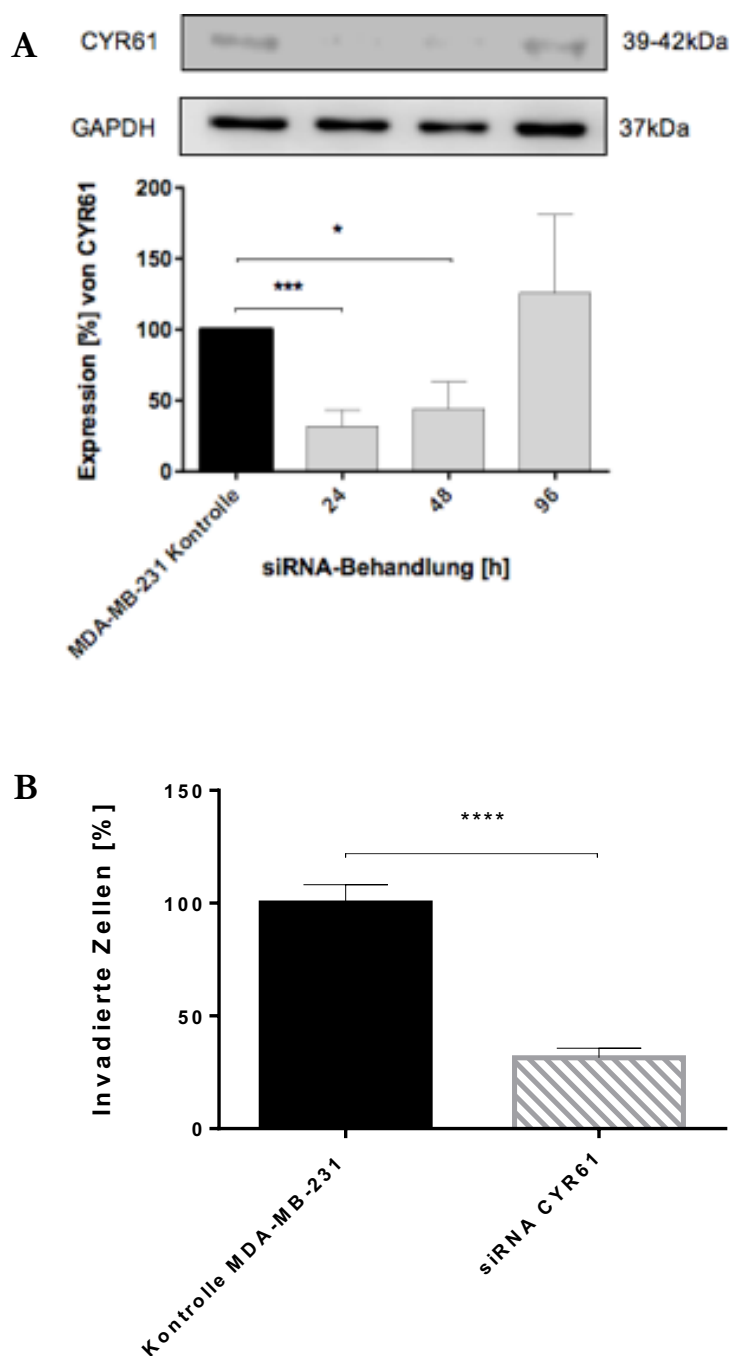


Abbildung 6: Bestimmung der Proteinexpression (%) von CYR61 (A) sowie der Invasionsrate (%) (B) nach CYR61-Knock-down in MDA-MB-231-Zellen.

Die Expression von CYR61 wurde nach $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h in MDA-MB-231 mittels Westernblot detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. 24 h; $P < 0,002$; (mean \pm SEM $32,15 \pm 11,32$ n = 4), 48 h; $P < 0,0351$; (mean \pm SEM $44,46 \pm 18,72$ n = 4), 96 h; $P < 0,7574$; (mean \pm SEM $125,8 \pm 55,30$ n = 4) Die Invasion nach CYR61-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MDA-MB-231-Zellen wurde nach $t = 48$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA CYR61, $P < 0,0002$; (mean \pm SEM $107,5$ n = 18).

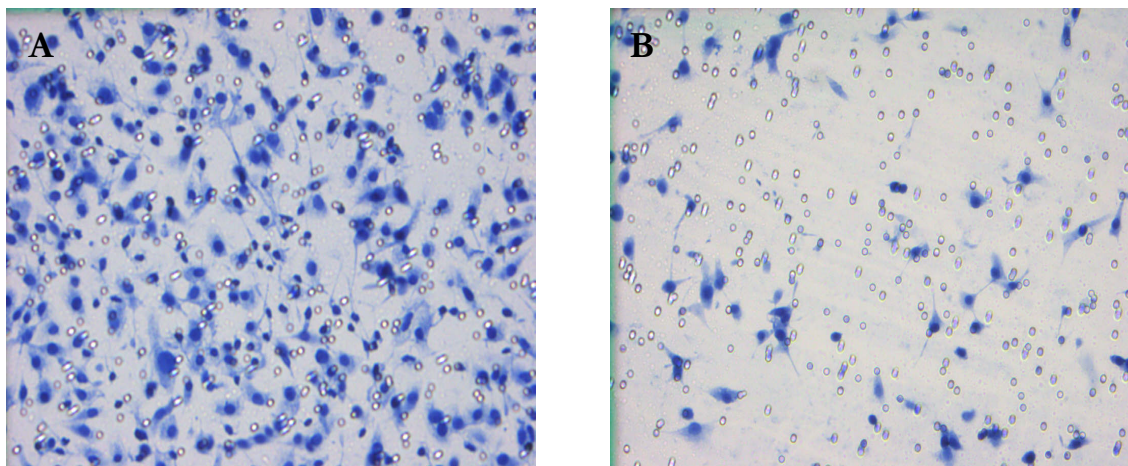


Abbildung 7: Invasion kokultivierter Kontroll-MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen (A) versus MDA-MB-231 nach CYR61-Knock-down (B) (Hämalaunfärbung).

Die MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen wurden, sowohl in der Kontrolle als auch nach CYR61-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen für $t = 48$ h kokultiviert.

3.3 Proteinexpression von S100A4 und Invasion der Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 nach S100A4-Knock-down

Mit Hilfe des Westernblots wurde die Proteinexpression (%) von S100A4 durch S100A4-Knock-down in den TNBC HCC1806 und MDA-MB-231 zu den Zeitpunkten $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h detektiert. Auch im Invasionsassay kommt es durch die Kokultivierung beider TNBC-Zelllinien mit den Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen nach S100A4-Downregulation zur Bestimmung der Invasionsrate (%) nach $t = 48$ h.

3.3.1 Expression von S100A4 und Invasion von HCC1806-Zellen nach S100A4-Knock-down

Im Westernblot kommt es zu einer Herunterregulation des Proteins S100A4 nach S100A4-Knock-down in HCC1806-Zellen (A). Die Proteinexpression (%) ist demnach im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert zu den Zeitpunkten $t = 24$ h (24 h; $P < 0,0858$; SEM $\pm 53,16$ 19,66 $n = 3$), $t = 48$ h (48 h; $P < 0,0079$; SEM $\pm 39,76$ $\pm 11,79$ $n = 3$) und $t = 96$ h (96 h; $P < 0,0643$; SEM $\pm 35,77$ $\pm 23,82$ $n = 3$) (Abbildung 8 A).

Die Invasionsrate (%) der TNBC HCC1806 nach S100A4-Downregulation (B) nimmt signifikant im Vergleich zur Kontrolle ab (siRNA S100A4, $P < 0,0002$; SEM $\pm 9,014$ $n = 36$) (Abbildung 8 B und Abbildung 9).

Schließlich zeigt sich eine signifikant geminderte Proteinexpression (%) von S100A4 nach $t = 24$ h, $t = 48$ h sowie $t = 96$ h. Zum Zeitpunkt der S100A4-Herunterregulation, stellt sich zudem eine verminderte Invasionsrate (%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dar.

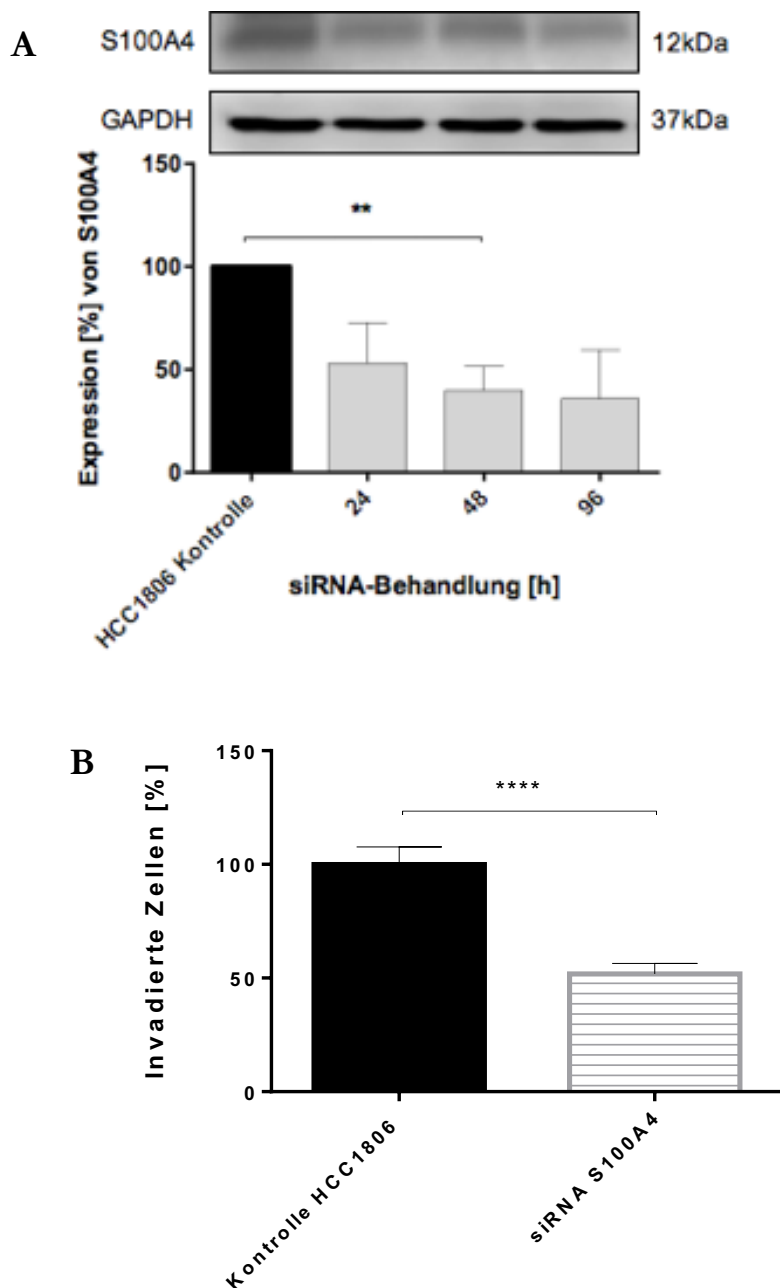


Abbildung 8: Bestimmung der Proteinexpression (%) von S100A4 sowie der Invasionsrate (%) (B) nach S100A4-Knock-down in HCC1806-Zellen.

Die Expression von S100A4 wurde nach $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h in HCC1806-Mammakarzinomzellen mittels Westernblot detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test (Abbildung A). 24 h; $P < 0,0858$; (mean \pm SEM $53,16 \pm 19,66$ $n = 3$), 48 h; $P < 0,0079$; (mean \pm SEM $39,76 \pm 11,79$ $n = 3$); 96 h; $P < 0,0643$; (mean \pm SEM $35,77 \pm 23,82$ $n = 3$). Die Invasion nach S100A4-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten HCC1806-Zellen wurde nach $t = 48$ h detektiert. Die Kontrolle blieb

unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA S100A4, $P < 0,0002$; (mean \pm SEM 9,014 n=36) (Abbildung B).

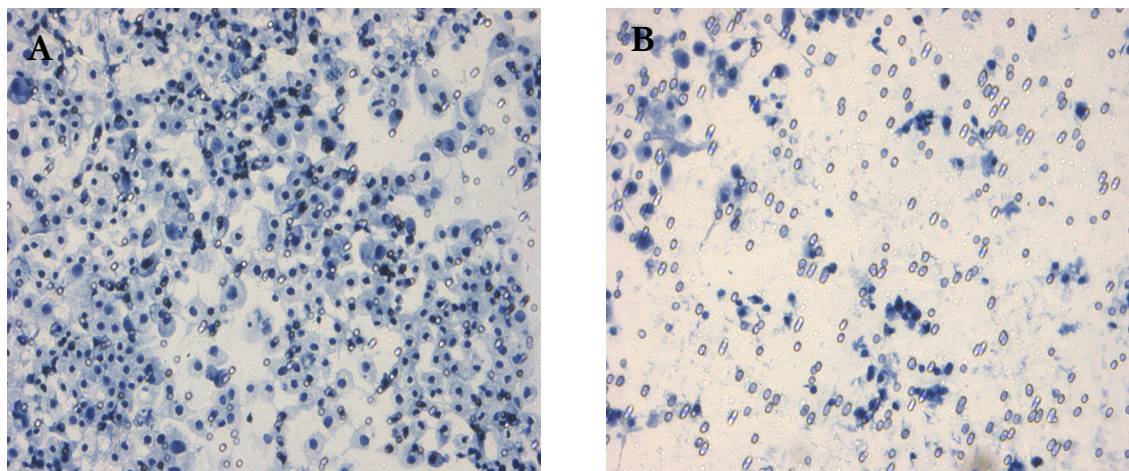


Abbildung 9: Invasion kokultivierter Kontroll-HCC1806-Mammakarzinomzellen (A) versus HCC1806-Zellen nach S100A4-Knock-down (B) (Hämalaunfärbung).

Die HCC1806-Mammakarzinomzellen wurden sowohl in der Kontrolle als auch nach S100A4-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen für $t = 48$ h kokultiviert.

3.3.2 Expression von S100A4 und Invasion von MDA-MB-231-Zellen nach S100A4-Knock-down

Die S100A4-Proteinexpression (%) im Westernblot (A) ist signifikant vermindert in den TNBC MDA-MB-231 nach $t = 24$ h (24 h; $P < 0,0004$; SEM $\pm 50,26 \pm 6,697$ n = 4) und $t = 48$ h (48 h; $P < 0,0004$; SEM $\pm 52,38 \pm 6,331$ n = 4) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10 A). Nachdem die verminderte Proteinexpression (%) des Proteins S100A4, nach durch siRNA erfolgter Herunterregulation von S100A4, nachgewiesen wurde, schließt sich das Invasionsassay (B) an. Hier sieht man eine signifikante Minderung der Invasionsrate (%) der MDA-MB-231-Zellen nach S100A4-Herunterregulation (siRNA S100A4, $P < 0,0008$; SEM $\pm 9,986$ n = 24) (Abbildung 10 B und Abbildung 11).

Zusammengefasst ergibt sich für die Zelllinie MDA-MB-231 eine verminderte S100A4-Proteinexpression (%) nach S100A4-Knock-down und nach dessen Herunterregulation eine zusätzlich verminderte Invasionsrate.

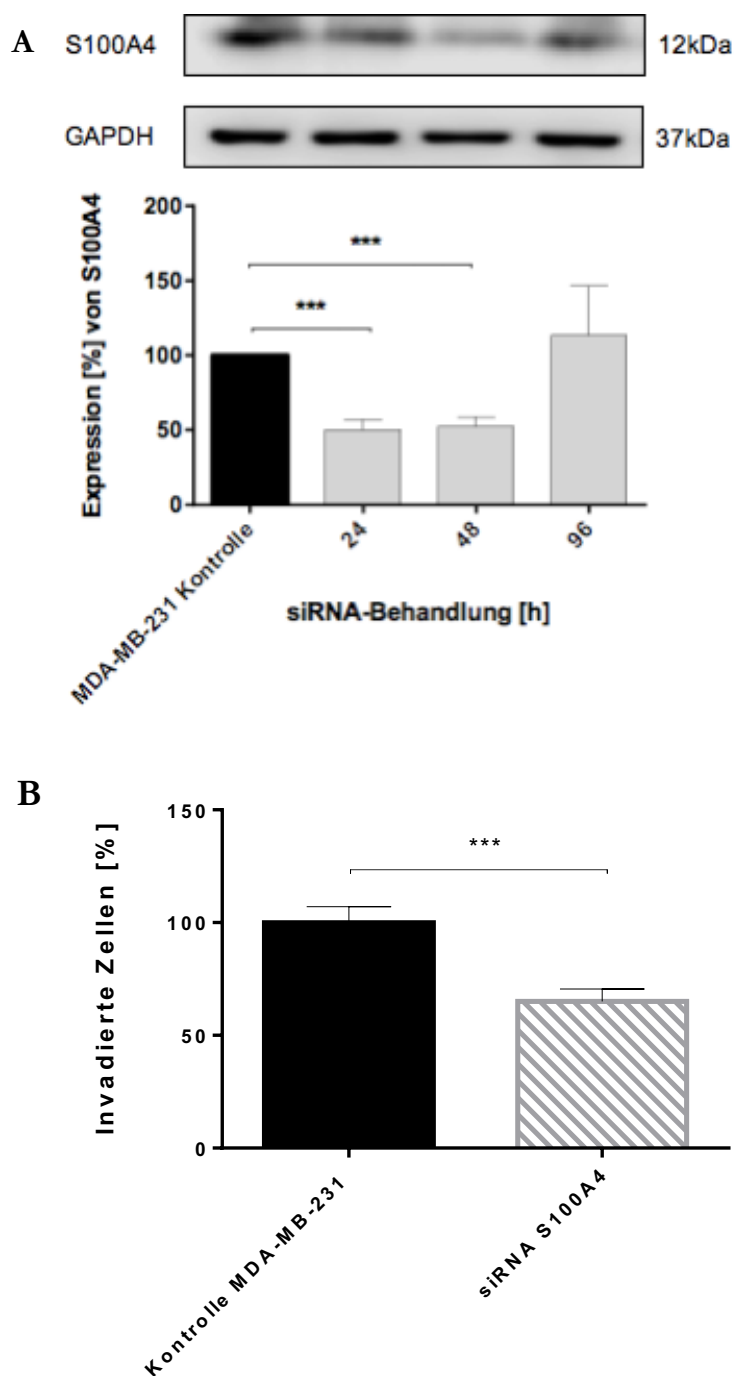


Abbildung 10: Bestimmung der Proteinexpression (%) von S100A4 (A) sowie der Invasionsrate (%) nach S100A4-Knock-down (B) in MDA-MB-231-Zellen.

Die Expression von S100A4 wurde nach $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h in MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen mittels Westernblot detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. 24 h; $P < 0,0004$; (mean \pm SEM $50,26 \pm 6,697$ $n = 4$), 48 h; $P < 0,0004$; (mean \pm SEM $52,38 \pm 6,331$ $n = 4$); 96 h; $P < 0,7996$; (mean \pm SEM $113,4 \pm 33,17$ $n = 4$) (Abbildung A). Die Invasion nach S100A4-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MDA-MB-231-Zellen wurde nach $t = 48$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA S100A4, $P < 0,0008$; (mean \pm SEM $9,986$ $n = 24$) (Abbildung B).

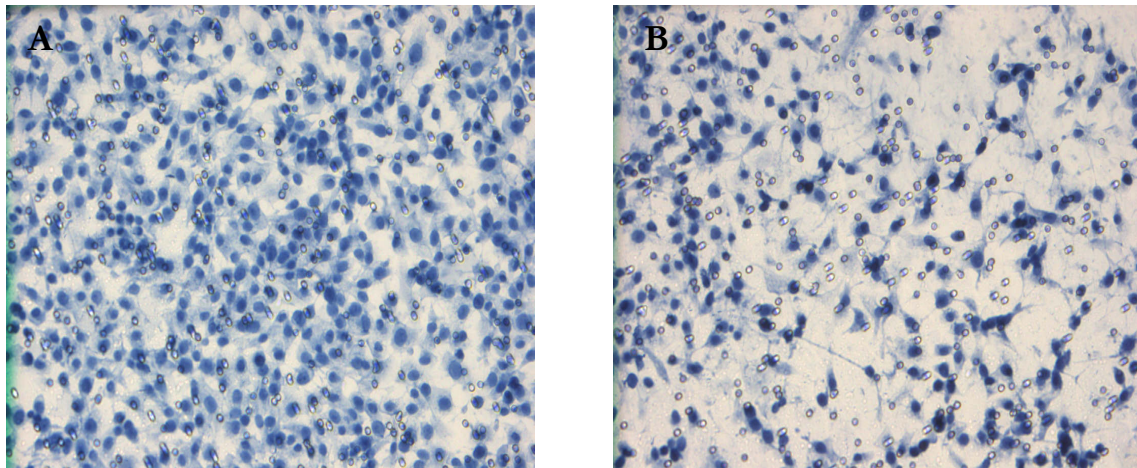


Abbildung 11: Invasion kokultivierter Kontroll-MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen (A) versus MDA-MB-231 nach S100A4-Knock-down (B) (Hämalaunfärbung).

Die MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen wurden sowohl in der Kontrolle als auch nach S100A4-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen für $t = 48$ h kokultiviert.

3.4 Vergleiche der Invasionsraten der Zelllinien von MCF-7 WT versus MCF-7 TR sowie MCF-7 WT versus MCF-7 TMX

Im Folgenden werden die Invasionsraten der Zelllinien MCF-7 WT und MCF-7 TR (A) sowie MCF-7 WT und MCF-7 TMX (B) miteinander verglichen (Abbildung 12). Alle Zelllinien sind in diesem Fall unbehandelt. Die Zellen invadieren im Invasionsassay mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen über einen Zeitraum von $t = 96$ h.

3.4.1 Vergleich der Invasionsraten der Zelllinien MCF-7 WT versus MCF-7 TR und MCF-7 WT versus MCF-7 TMX

Im Kokultur-Versuch zeigt sich bei den MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen eine signifikant höhere Invasionsrate (%) im Vergleich zu den MCF-7-WT-Zellen (Kontrolle MCF-7 TR, $P < 0,0003$; SEM $\pm 68,44$ $n = 42$) (Abbildung 12 A).

Auch bei den MCF-7-TMX-Mammakarzinomzellen zeigt sich eine signifikant höhere Invasionsrate (%) vergleichsweise zu den MCF-7-WT-Zellen (Kontrolle MCF-7 TMX, $P < 0,0004$; SEM $\pm 118,9$ $n = 18$) (Abbildung 12 B).

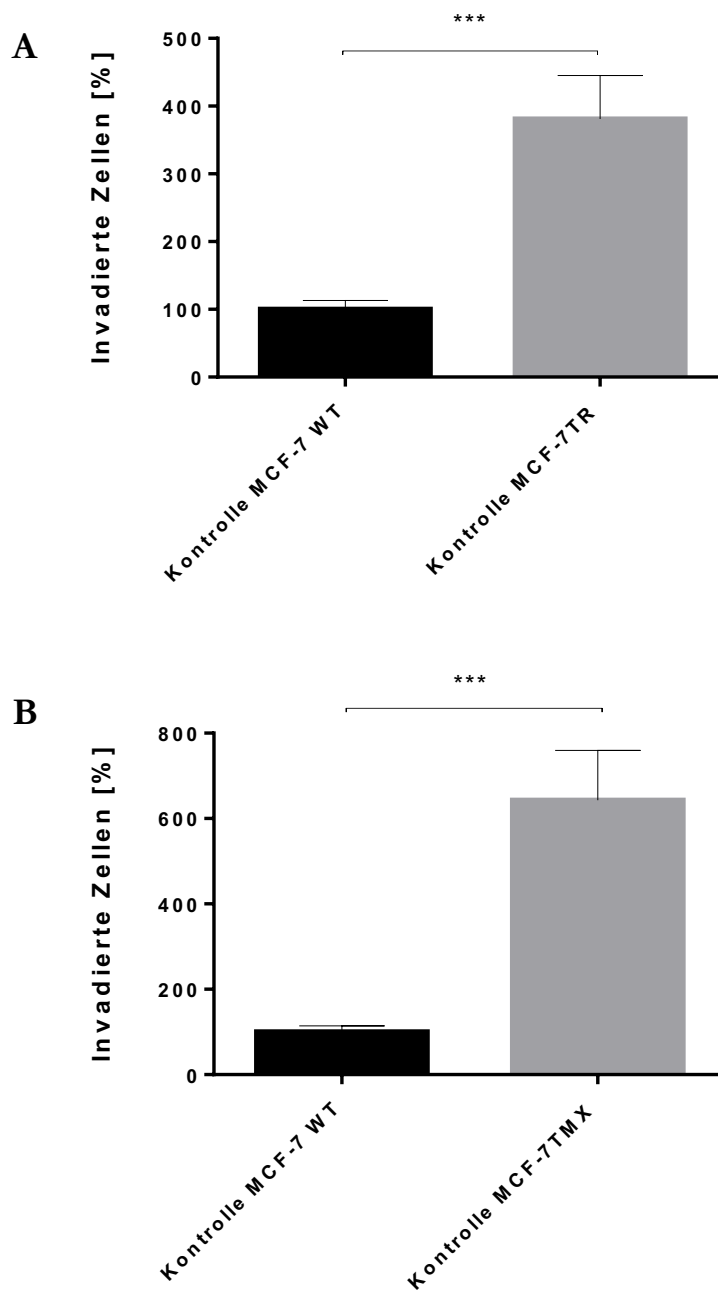


Abbildung 12: Vergleiche der Invasionsraten (%) der unbehandelten Zelllinien MCF-7 WT versus MCF-7 TR (A) und MCF-7 WT versus MCF-7 TMX (B).

Der Vergleich der Invasionsraten der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Beide Zelllinien blieben unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. Kontrolle MCF-7 TR, $P < 0,0003$; (mean \pm SEM 68,44 $n = 42$) (siehe Abbildung A). Der Vergleich der Invasion der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-WT- und MCF-7-TMX-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Beide Zelllinien blieben unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. Kontrolle MCF-7 TMX, $P < 0,0004$; (mean \pm SEM 118,9 $n = 18$) (siehe Abbildung B).

3.4.2 Vergleich der Invasionsraten der Zelllinien MCF-7 TR versus MCF-7 TMX

Verglichen wird außerdem die Invasionsrate (%) der Zelllinie MCF-7 TR versus MCF-7 TMX. Hierbei invadieren MCF-7-TR-Zellen nicht signifikant weniger als die MCF-7 TMX (Kontrolle MCF-7 TR, $P < 0,0824$; $SEM \pm 46,67$ $n = 18$) (siehe Abbildung 13). Die Invasionsrate (%) wurde mittels Invasionsassay und der Kokultivierung mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen nach $t = 96$ h bestimmt.

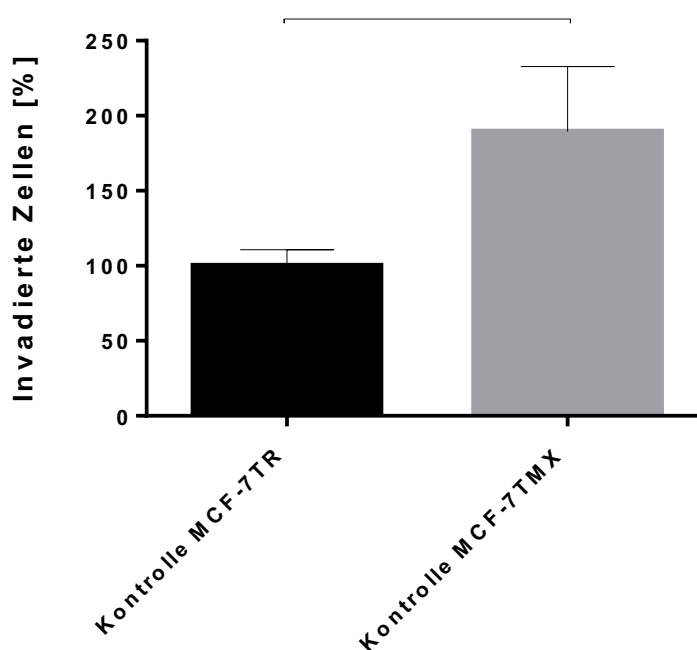


Abbildung 13: Vergleich der Invasionsraten (%) der unbehandelten Zelllinien MCF-7 TR versus MCF-7 TMX.

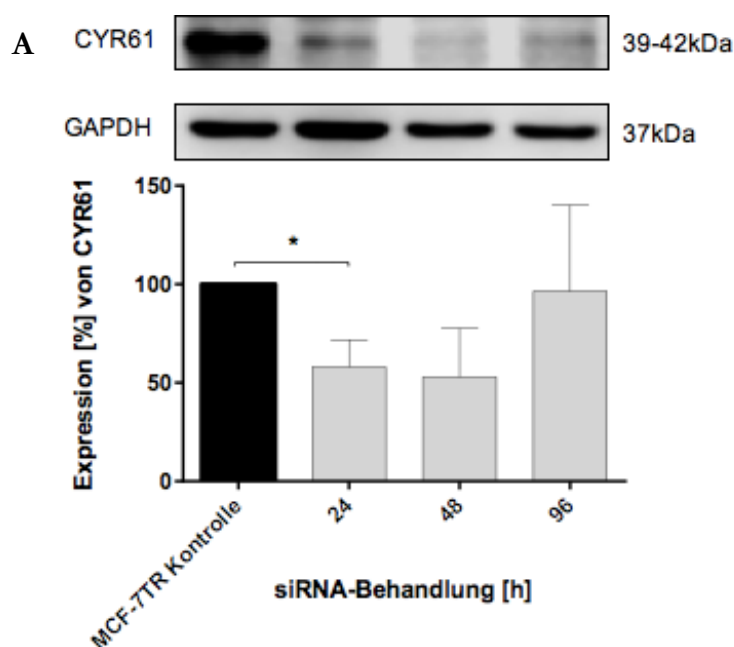
Der Vergleich der Invasionsraten (%) der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-TR- und MCF-7-TMX-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Beide Zelllinien blieben unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. Kontrolle MCF-7 TR, $P < 0,0824$; (mean \pm SEM 46,67 $n = 18$).

3.5 Proteinexpression von CYR61 sowie S100A4 und Invasion der Zelllinie MCF-7 TR nach CYR61- und S100A4-Knock-down

Mit Hilfe des Westernblot-Versuchs wird die Proteinexpression (%) von CYR61 und S100A4 in MCF-7-TR-Zellen detektiert. Zuvor erfolgt der Knock-down beider Proteine durch entsprechende siRNA. Die Proteinexpression (%) wurde zu den Zeitpunkten $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h bestimmt. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Im Versuch des Invasionsassay erfolgte zu Beginn die Herunterregulation der Proteine CYR61 und S100A4. Die MCF-7-TR-Zellen wurden dann mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen kokultiviert, anschließend wurde die Invasionsrate (%) nach $t = 96$ h bestimmt.

3.5.1 Expression von CYR61 und Invasion nach CYR61-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen

Die im Westernblot ermittelte Proteinexpression (%) von CYR61 (A) nach CYR61-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen ist signifikant erniedrigt nach $t = 24$ h (24 h; $P < 0,0212$; SEM $\pm 58,05 \pm 13,71$ $n = 6$) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14 A). Die durch das Invasionsassay bestimmte Invasionsrate (%) der MCF-7-TR-Zellen nach CYR61-Herunterregulation zeigt eine signifikante Minderung bezüglich der invadierten Zellen nach $t = 96$ h (siRNA CYR61, $P < 0,0002$; SEM $\pm 13,01$ $n = 18$) (Abbildung 14 B und Abbildung 15). Auch bei den MCF-7-TR-Zellen kann durch den Einsatz von CYR61-siRNA ein Knock-down erzielt werden, der sich durch die herabgesetzte Proteinexpression (%) im Westernblot detektieren lässt und eine verminderte Invasionsrate (%) zur Folge hat.



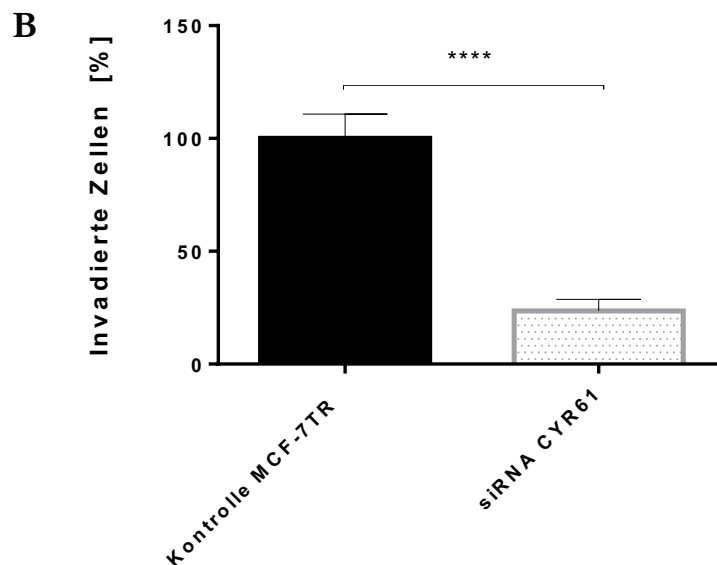


Abbildung 14: Bestimmung der Proteinexpression (%) von CYR61 (A) sowie der Invasion (%) nach CYR61-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen.

Die Expression von CYR61 wurde nach 24 h, 48 h und 96 h in MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen mittels Westernblot detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test (Abbildung A). 24 h; $P < 0,0212$; (mean \pm SEM $58,05 \pm 13,71$ n = 6), 48 h; $P < 0,0964$; (mean \pm SEM $52,94 \pm 24,75$ n = 6); 96 h; $P < 1,0364$; (mean \pm SEM $96,42 \pm 43,83$ n = 6). Die Invasion nach CYR61-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-TR-Zellen wurde nach 96 h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test (Abbildung B). siRNA CYR61, $P < 0,0002$; (mean \pm SEM $13,01$ n = 18).

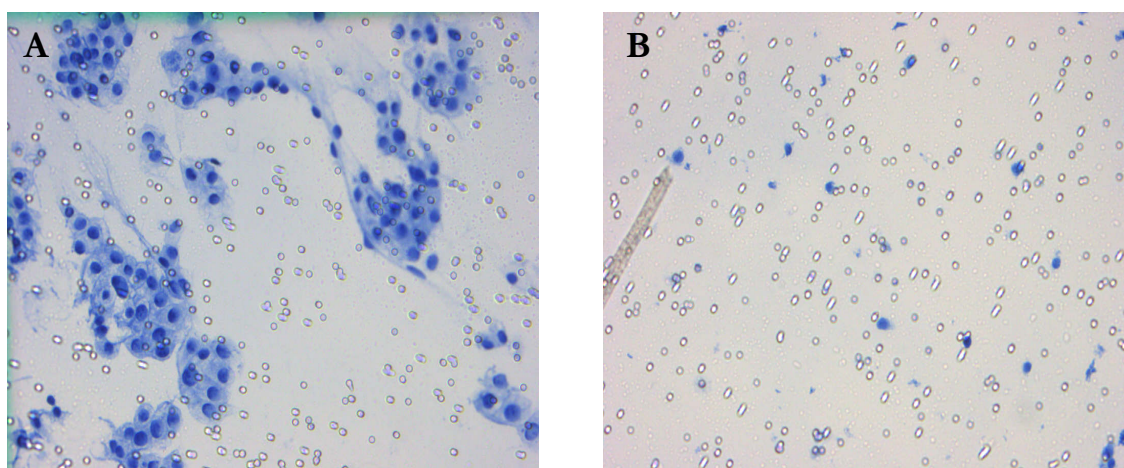
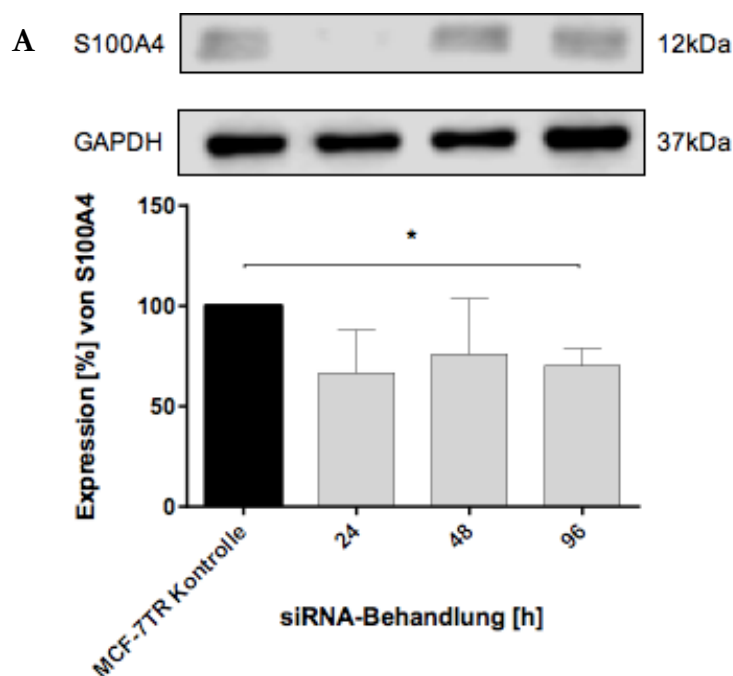


Abbildung 15: Invasion kokultivierter Kontroll MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen (A) versus MCF-7-TR-Zellen nach CYR61-Knock-down (B) (H&E-Färbung).

Die MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen wurden sowohl in der Kontrolle als auch nach CYR61-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG63-Zellen für 96 h kokultiviert.

3.5.2 Expression von S100A4 und Invasion nach S100A4-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen

Die Proteinexpression (%) von S100A4 nach S100A4-Knock-down in MCF-7TR-Mammakarzinomzellen (A) vermindert sich signifikant zum Zeitpunkt t=96 h (96 h; $P < 0,0236$; SEM $\pm 70,25 \pm 8,618$ n = 4) (Abbildung 16 A). Auch im Invasionsassay (B) vermindert sich signifikant die Invasionsrate (%) der MCF-7-TR-Zellen nach t = 96 h infolge der S100A4-Herunterregulation (siRNA S100A4, $P < 0,0106$; SEM $\pm 18,29$ n = 24) (Abbildung 16 B und Abbildung 17). Schließlich kann durch die Herunterregulierung des Proteins S100A4 in MCF-7-TR-Zellen erst einmal eine verminderte Proteinexpression (%) detektiert werden. Darüber hinaus kommt es auch zu einer verminderten Invasionsrate der MCF-7-TR-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach S100A4-Herunterregulation.



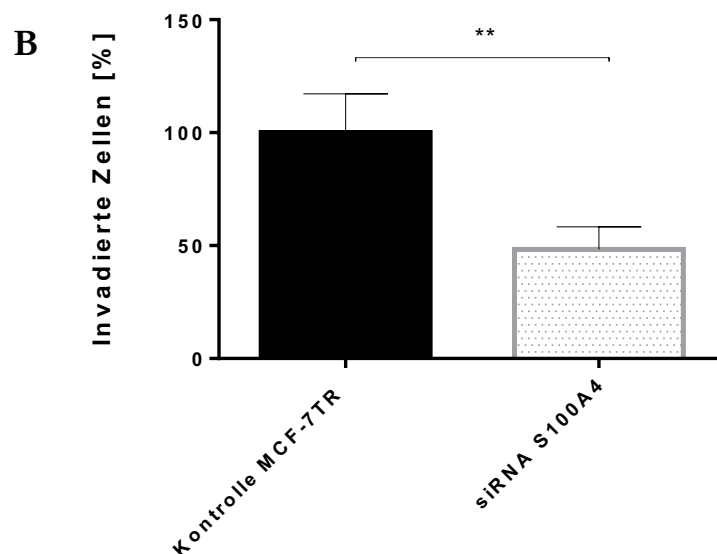


Abbildung 16: Bestimmung der Proteinexpression (%) (A) sowie der Invasionsrate (%) (B) nach S100A4-Knock-down in MCF-7-TR-Zellen.

Die Expression von S100A4 wurde nach $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 96$ h in MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen mittels Westernblot detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. 24 h; $P < 0,2692$; (mean \pm SEM $66,73 \pm 21,30$ $n = 4$), 48 h; $P < 0,5202$; (mean \pm SEM $76,07 \pm 27,66$ $n = 4$); 96 h; $P < 0,0236$; (mean \pm SEM $70,25 \pm 8,618$ $n = 4$). Die Invasion nach S100A4-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-TR-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA S100A4, $P < 0,0106$; (mean \pm SEM $18,29$ $n = 24$).

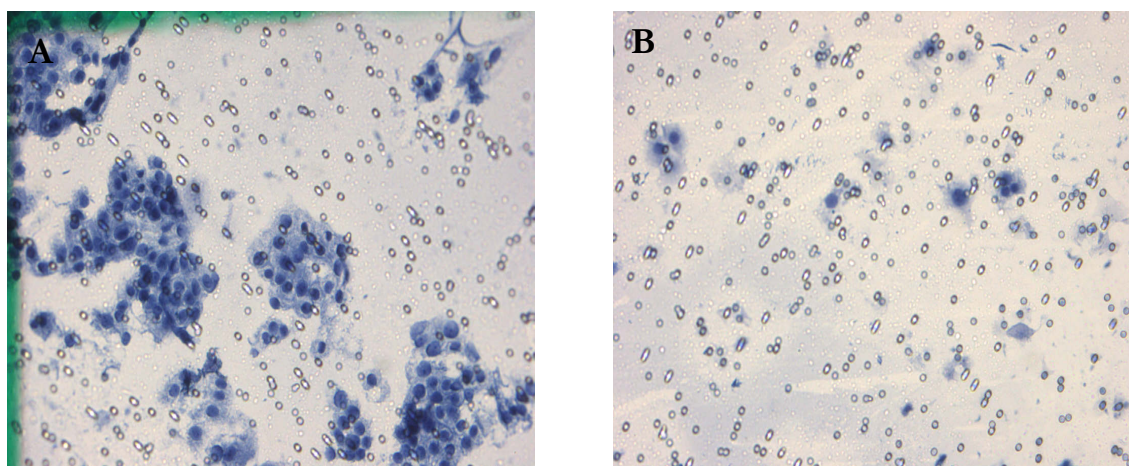


Abbildung 17: Invasion kokultivierter Kontroll-MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen (A) versus MCF-7-TR-Zellen nach S100A4-Knock-down (B) (Hämalaunfärbung).

Die MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen wurden sowohl in der Kontrolle als auch nach S100A4-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen für $t = 96$ h kokultiviert.

3.6 Vergleich der Invasionsraten von MCF-7-WT- versus MCF-7-TR-Zellen nach CYR61- und S100A4-Knock-down

Mit Hilfe des Invasionsassays werden die Invasionsraten (%) der Zelllinien MCF-7 WT und MCF-7 TR nach CYR61- und S100A4-Downregulation bestimmt und miteinander verglichen. Der Versuch wird mittels Kokultur mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen vollzogen und nach $t = 96$ h beendet. Die Kontrollen beider Zelllinien blieben unbehandelt.

3.6.1 Vergleich der Invasionsraten von MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen nach CYR61-Knock-down

Bei den MCF-7-WT-Zellen zeigt sich im Invasionsassay eine signifikant verminderte Invasionsrate (%) nach CYR61-Knock-down im Vergleich zur Kontrolle (siRNA CYR61, $P < 0,0393$; SEM $\pm 19,9$ $n = 18$) (Abbildung 18 A). In der Kontrolle kann man somit fluoreszenzmikroskopisch mittels Hämalanfärbung eine deutlich höhere Zelldichte beobachten (C), im Vergleich zu den mit siRNA behandelten Zellen (D) (Abbildung 19).

Im Vergleich zum Invasionsassay der MCF-7-WT-Zellen (A), wird auch bei den MCF-7-TR-Zellen (B) nach Herunterregulierung des Proteins CYR61 eine signifikante Minderung der Invasionsrate (%) ersichtlich (siRNA CYR61, $P < 0,0002$; SEM $\pm 13,01$ $n = 18$) (Abbildung 18 B).

Zusammenfassend zeigt sich nach Herunterregulation des prometastatischen Proteins CYR61 bei den MCF-7-WT- und den MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen eine erniedrigte Invasionsrate (%) nach $t = 96$ h. Vergleicht man beide Zelllinien miteinander, kann man die Aussage treffen, dass MCF-7-TR-Zellen eine höhere Signifikanz in der Minderung der Invasion nach CYR61-Herunterregulation haben. Im allgemeinen Vergleich (Abbildung 2), zeigt sich bei den MCF-7-WT-Zellen eine insgesamt niedrigere Invasionsrate (%) im Vergleich zu den MCF-7-TR-Zellen.

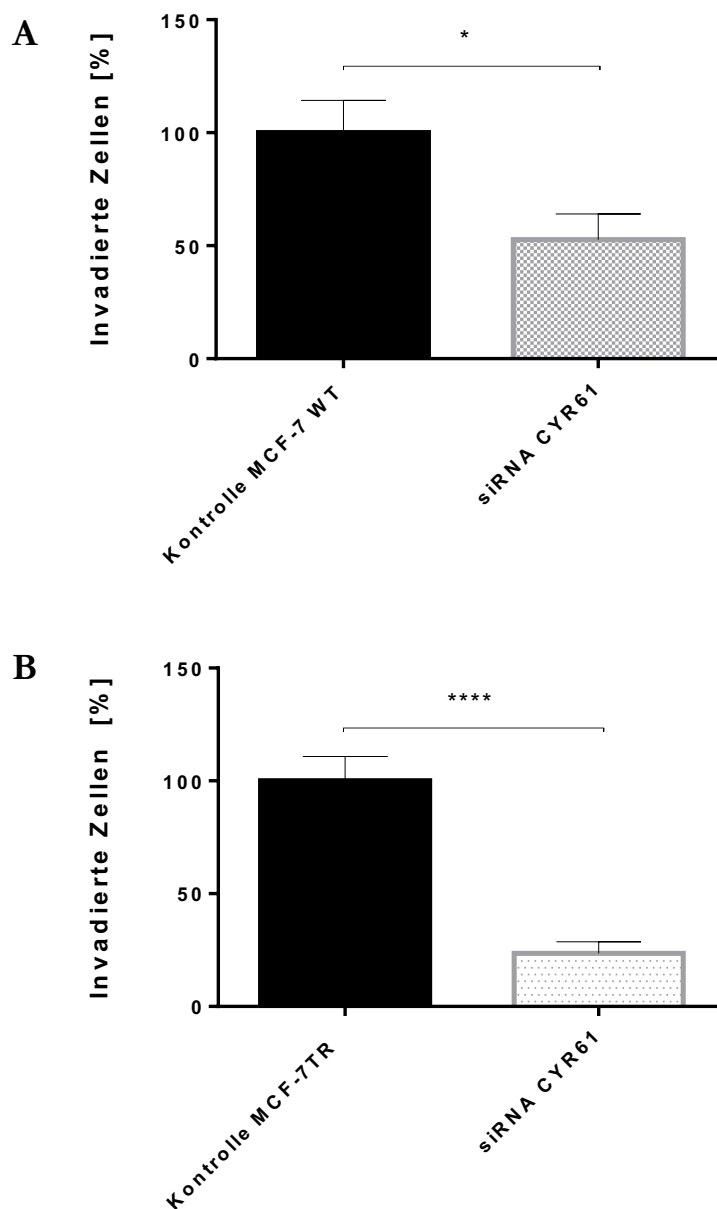


Abbildung 18: Vergleich der Invasionsrate (%) von MCF-7-WT- (A) und MCF-7-TR-Zellen (B) nach CYR61-Knock-down.

Die Invasion nach CYR61-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-WT-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA CYR61, $P < 0,0393$; (mean \pm SEM 19,9 $n = 18$) (Abbildung A). Die Invasion nach CYR61-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-TR-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test (Abbildung B). siRNA CYR61, $P < 0,0002$; (mean \pm SEM 13,01 $n = 18$).

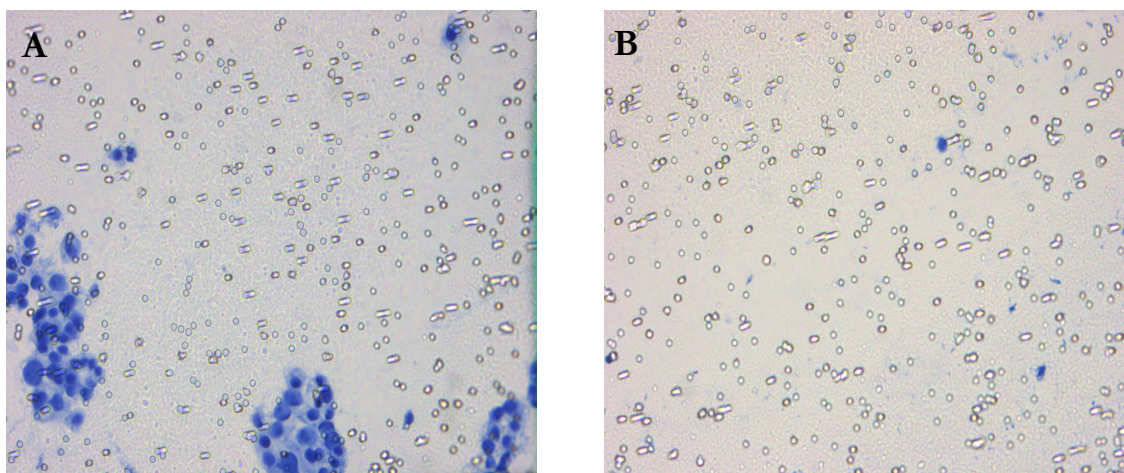


Abbildung 19: Invasion kokultivierter Kontroll-MCF-7-WT-Mammakarzinomzellen (A) versus MCF-7-WT-Zellen nach CYR61-Knock-down (B) (Hämalaunfärbung).

Die MCF-7-WT-Mammakarzinomzellen wurden sowohl in der Kontrolle als auch nach CYR61-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen für $t = 96$ h kokultiviert.

3.6.2 Vergleich der Invasion von MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen nach S100A4-Knock-down

Die Invasionsrate (%) nach S100A4-Knock-down im Invasionsassay bei der MCF-7-WT-Zelllinie (A), zeigt im Vergleich zu ihrer Kontrolle, eine nicht signifikante Minderung (siRNA S100A4, $P < 0,7195$; SEM $\pm 33,18$ $n = 24$) (Abbildung 20 A). Im Kokultur-Versuch kann man fluoreszenzmikroskopisch eine geringe Minderung der invadierten MCF-7-WT-Zellen (D) im Vergleich zu den Kontrollzellen (C) beobachten (Abbildung 21).

Vergleichsweise zu MCF-7-WT-Zellen, ist die Invasionsrate (%) der MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen nach S100A4-Herunterregulation (B) im Vergleich zu ihrer Kontrolle signifikant vermindert (siRNA S100A4, $P < 0,00106$; SEM $\pm 18,29$ $n = 24$) (Abbildung 20 B).

Summa summarum kommt es durch S100A4-Downregulation sowohl bei den MCF-7-WT- als auch bei den MCF-7-TR-Zellen zu einer Minderung der Invasionsrate (%) nach $t = 96$ h, bei der nur die MCF-7-TR-Zellen eine Signifikanz zeigen. Insgesamt zeigen unbehandelte MCF-7-WT-Zellen insgesamt eine niedrigere Invasion als die Tamoxifen-resistenten Zellen.

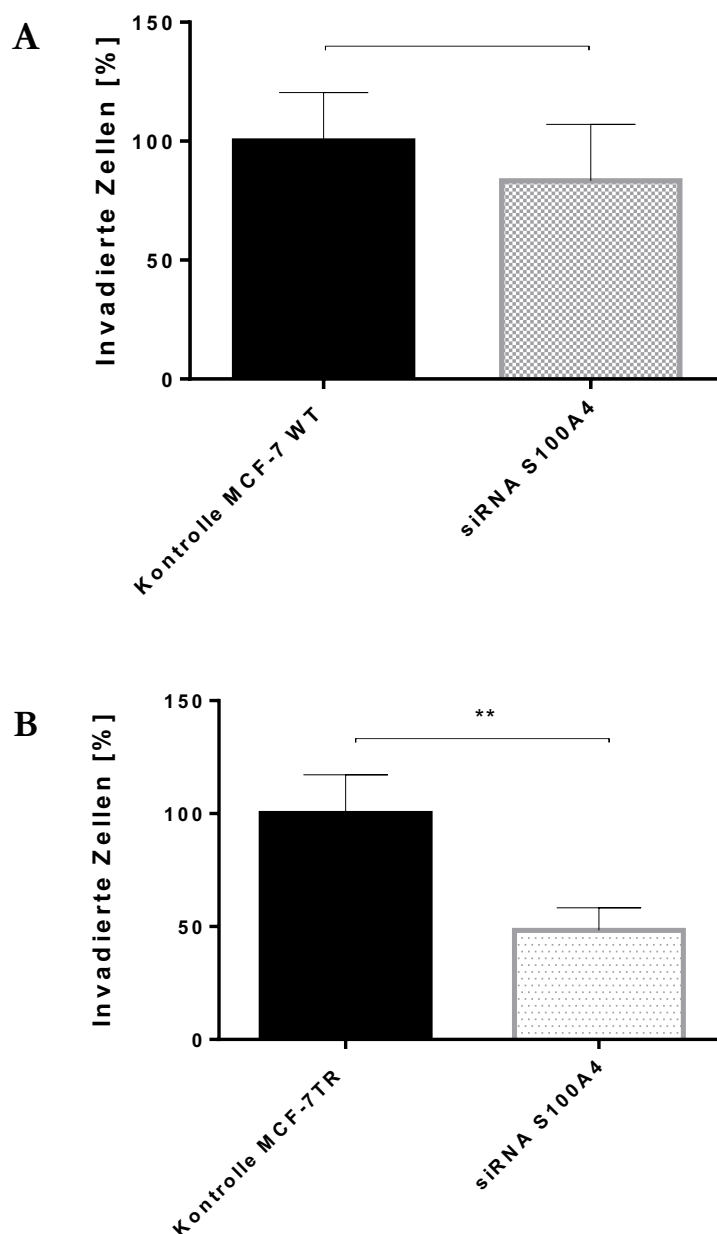


Abbildung 20: Vergleich der Invasionsraten (%) von MCF-7-WT- (A) und MCF-7-TR-Zellen (B) nach S100A4-Knock-down.

Die Invasion nach S100A4-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-WT-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA S100A4, $P < 0,7195$; (mean \pm SEM 33,18 $n = 24$). Die Invasion nach S100A4-Knock-down der mit Osteosarkomzellen kokultivierten MCF-7-TR-Zellen wurde nach $t = 96$ h detektiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Analyse erfolgte mittels unpaired t test. siRNA S100A4, $P < 0,0106$; (mean \pm SEM 18,29 $n = 24$).

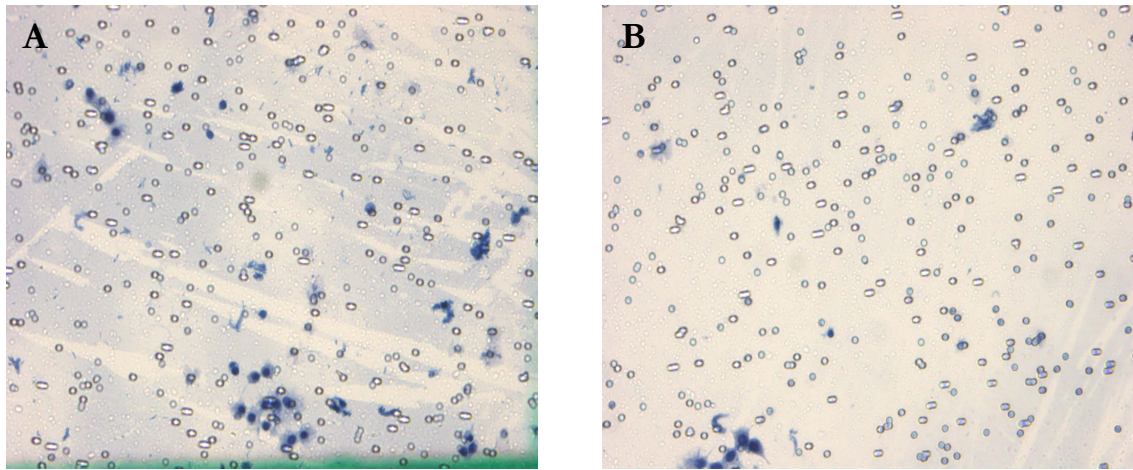


Abbildung 21: Invasion kokultivierter Kontroll-MCF-7-WT-Mammakarzinomzellen (A) versus MCF-7-WT-Zellen nach S100A4-Knock-down (B) (Hämalaunfärbung).

Die MCF-7-WT-Mammakarzinomzellen wurden sowohl in der Kontrolle als auch nach S100A4-Knock-down mit Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen für $t = 96$ h kokultiviert.

4 Diskussion

Die Zielsetzung der Arbeit bestand maßgeblich darin, die Wirkung des Knock-down der prometastatischen Faktoren S100A4 und CYR61 auf die Invasivität triple-negativer sowie Tamoxifen-resistenter Mammakarzinomzellen zu untersuchen. Beide Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), Invasion und Metastasierung, indem sie die Motilität der Krebszellen fördern (Gründker et al. 2016).

4.1 Überblick der Invasionsraten spezifischer Mammakarzinomzelllinien

Die Invasionsassay-Methodik mit verschiedenen Mammakarzinomzelllinien wurde in unserem Labor etabliert. Es wurde sich das Prinzip der modifizierten Boyden-Chamber zu Nutze gemacht, bei welchem die entsprechende Zelllinie durch eine Polycarbonat-Membran mit Osteoblasten-ähnlichen Zellen kokultiviert wurde, um den Prozess der Invasion nachzuahmen und die EMT zu analysieren (von Alten et al. 2006). Die Invasionsrate des Invasionsassays lässt auf die durch Chemotaxis gegründete Metastasierung von Krebszellen schließen (Justus et al. 2014).

Die Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR, MCF-7 TMX, MDA-MB-231 und HCC1806 wurden verwendet. MDA-MB-231 und HCC1806 gelten als triple-negative Mammakarzinomzelllinien. Bei ihnen besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Metastasierung, deshalb werden sie als aggressiv eingestuft (Volk-Draper et al. 2012).

Der Verlust der ER α und Progesteronrezeptoren, das Fehlen des überexprimierten HER2 sowie eine erhöhte Expression der prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4 in den TNBC-Zelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 sind für eine begrenzte Therapiemöglichkeit, eine vermehrte Invasion sowie eine erhöhte Aggressivität verantwortlich (Gründker et al. 2016; Qiu et al. 2016). Das zeigen die Versuche, in denen die triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 *in vitro* eine signifikant höhere Invasionsrate zeigen als die ER α -positive Zelllinie MCF-7 WT. Aber auch gegenüber der Tamoxifen-resistenten Zelllinien MCF-7 TR und MCF-7 TMX zeigt sich bei TNBC-Zelllinien eine prozentual höhere Invasionsrate. Grund dafür ist der höhere Level des CYR61-Gens in der hochinvasiven Zelllinie MDA-MB-231 als in der weniger invasiven Zelllinie MCF-7 WT (Jiang et al. 2004).

Im direkten Vergleich zeigen HCC1806 und MDA-MB-231 die höchste Invasionsrate. MCF-7 WT zeigt im Vergleich zu Tamoxifen-resistenten Zelllinien MCF-7 TR und MCF-7 TMX die geringste Invasionsrate. Aus diesem Modell lässt sich schließen, dass Tamoxifen-resistente Zelllinien (MCF-7 TR und MCF-7 TMX) aggressiver sind als MCF-7 WT, indem sie eine höhere Expression der prometastatischen Faktoren und dadurch eine erhöhte Tendenz zur Metastasierung zeigen.

Man beachte, dass die Invasionsraten nicht direkt miteinander vergleichbar sind, da der Invasionsassay-Versuch der TNBC-Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 bereits nach zwei Tagen beendet wurde. Dagegen wurde der Invasionsassay-Versuch der ER α -positiven Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR und MCF-7 TMX erst nach 96 h beendet. Die TNBC-Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 zeigen schon nach 48 h eine höhere Invasionsrate als die verwendeten ER α -positiven Zelllinien. Deshalb ist davon auszugehen, dass der Unterschied in der Invasionsrate noch größer wäre, hätte man das Invasionsassay der TNBC-Zelllinien erst nach 96 h beendet.

4.2 Inhibierung von CYR61 in HCC1806- und MDA-MB-231-Zellen

Wie schon unter 4.1 erwähnt, zeigt sich bei den TNBC-Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 eine Überexpression des prometastatischen Proteins CYR61 in der Kontrolle.

Bei beiden TNBC-Zelllinien kommt es nach 24 h und 48 h nach Knock-down von CYR61 zu einer signifikant verminderten CYR61-Expression als Zeichen der Herunterregulation des Proteins. Nach 48 h resultiert gleichermaßen eine signifikant verminderte Invasionsrate (%) der Zellen HCC1806 und MDA-MB-231 im Vergleich zur Kontrolle.

Vergleicht man die Zelllinien untereinander ist ersichtlich, dass HCC1806-Zellen nach Herunterregulation von CYR61 minimal weniger invadieren als MDA-MB-231-Zellen. Das könnte bedeuten, dass HCC1806-Zellen mehr CYR61 exprimieren und eine minimal höhere Invasion zeigen. *In vivo* ist dementsprechend die Gefahr einer vermehrten Metastasierung höher als bei MDA-MB-231-Zellen.

Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass CYR61 für die Metastasierung der TNBC-Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 verantwortlich ist, von welcher die schlechte Prognose dieser Mammakarzinomzellen abhängt. Denn auch Jiang et al. (2004) haben Mammakarzinome eine im Vergleich zum normalen Brustgewebe stattfindende Überexpression des prometastatischen Gens *CYR61*, einer somit erhöhten Wahrscheinlichkeit der Metastasierung, Involvierung der Lymphknoten und einer entsprechend schlechten Prognose zugeschrieben. Nguyen et al. (2006) sahen einen molekularen Zusammenhang, bei dem die Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1) den G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierenden Rezeptor (PAR1) spalten und somit aktivieren können. Hieraus resultiert eine erhöhte Invasion und Tumorigenese der Mammakarzinomzellen. Das Gen-Silencing supprimiert die MMP1-Induktion in stromalen Fibroblasten, was eine verminderte Migration zur Folge hat (Nguyen et al. 2006).

Die Herunterregulation des Gens *CYR61* stellt ein potentes therapeutisches Ziel für Patienten dar, deren Mammakarzinom eine hohe Expression des Gens zeigt (Lin et al. 2012). Schlussfolgernd führt es zu einer verminderten Metastasierung des Karzinoms und einer Verbesserung der Prognose.

4.3 Inhibierung von S100A4 in HCC1806- und MDA-MB-231-Zellen

Wie schon unter 4.1 erwähnt zählt neben dem *CYR61*-Gen auch das Gen *S100A4* als prometastatischer Faktor, indem es in die Kontrolle der Tumormetastasierung involviert ist (Grigorian et al. 1996). In Anlehnung an 4.2 zeigen die TNBC-Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 eine erhöhte Expression des Gens *S100A4*. Nach Einsatz der S100A4-si-RNA kommt es bei HCC1806 nach 48 h sowie bei MDA-MB-231 nach 24 h und 48 h zu einem signifikanten S100A4-Knock-down und dadurch bedingter verminderter S100A4-Proteinexpression. Somit wurde auch nach 48 h das Invasionsassay beider Zelllinien abgestoppt und zeigt eine signifikant verminderte Invasionsrate (%) im Vergleich zur Kontrolle. Auffällig ist, dass HCC1806-Zellen nach S100A4-Knock-down noch weniger invadierende Zellen aufweisen als MDA-MB-231-Zellen. Daraus ergibt sich die Annahme, dass HCC1806- auch *in vivo* mehr metastasieren als MDA-MB-231-Zellen und letztlich aggressiver sind. Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass HCC1806- und MDA-MB-231-Zellen eine hohe Expression des Gens *S100A4* haben und das ein wichtiger Grund für die Metastasierung dieser TNBC-Zelllinien ist. Auch Gründker et al. (2016) zeigten schon zuvor, dass die Invasion der Brustkrebszellen mit einer S100A4-Überexpression stark ansteigt im Vergleich zur Kontrolle.

Denn das S100A4-Protein stimuliert die metastatische Ausbreitung der Tumorzellen, folglich ist eine erhöhte Expression von S100A4 mit einer schlechten Prognose in vielen Krebsarten assoziiert (Grum-Schwensen et al. 2005).

Die *In-vitro*-Invasion bzw. die *In-vivo*-Metastasierung der S100A4-exprimierenden Brustkrebszellen entsteht durch verschiedene Prozesse, die in intrazellulär und extrazellulär separiert werden können. Einerseits, weil intrazelluläres S100A4 in die Motilität der Krebszellen involviert ist, indem es mit den schweren Ketten des Nicht-Muskel Myosins des Zytoskeletts interagiert (Elliott et al. 2012). Dies impliziert, dass der metastatische Effekt des Proteins S100A4 auf die zytoskelettale Funktion, welche die Zellbewegung reguliert, zurückzuführen ist (Jenkinson et al. 2004). Xu et al. (2016) postulierten, dass S100A4 die EMT durch Regulation der MMP2 fördert, und die Tumormetastasierung dadurch positiv beeinflusst. Aber nicht nur MMP2, sondern auch MMP13 werden durch S100A4 stimuliert, überexprimiert und wirken letztendlich prometastatisch (Garrett et al. 2006). Somit fördert S100A4 die Metastasierung durch den Umbau der extrazellulären Matrix und erleichtert die Angiogenese und die Tumordinvasion (Garrett et al. 2006). Auch trägt S100A4 zur Zellproliferation bei, indem es an das Tumorsuppressorgen p53 bindet und es dadurch inhibiert (Garrett et al. 2006).

Aus dem therapeutischen Blickwinkel betrachtet, lässt sich durch den Einsatz der S100A4-si-RNA eine Herunterregulation dieses Proteins erzielen, sodass es zu einer signifikant verminderten Expression und Invasion kommt. Das Protein S100A4 ist zu einem therapeutischen Ziel geworden gegen Tumorprogression und Angiogenese (Hernández et al. 2013).

4.4 Vergleiche der Inhibierung von CYR61 und S100A4

Vergleicht man die Minderung der Proteinexpression und die Invasionsrate der Zelllinie HCC1806 nach Herunterregulation von CYR61 und S100A4 miteinander, fällt ein deutlicher Rückgang der Invasionsrate (%) nach CYR61-Herunterregulation auf. Daraus erschließt sich, dass in HCC1806-Zellen der angiogenetische Faktor CYR61 die größere Rolle bezüglich der Invasion bzw. Metastasierung spielt als S100A4, weil er durch seine Hemmung eine deutlich verminderte Invasionsrate (%) zeigt.

Aber auch bei unbehandelten Mammakarzinomzellen zeigt sich eine minimal höhere Invasionsrate (%) von HCC1806 als MDA-MB-231. Nach CYR61-Knock-down invadieren prozentual weniger HCC1806- als MDA-MB-231-Zellen. Deshalb könnte CYR61 hier maßgeblich die Metastasierung beeinflussen haben. Demnach sind die HCC1806-Zellen eine allgemein aggressivere Zelllinie als MDA-MB-231.

Auch bei der TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 ist die Rate der invadierenden Zellen (%) nach CYR61-Herunterregulation deutlich geringer als nach S100A4-Herunterregulation im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Somit erscheint der prometastatische Effekt nach CYR61-Knock-down deutlich geringer als nach S100A4-Knock-down. Zusammenfassend scheint CYR61 einen größeren Effekt auf die Metastasierung zu haben als S100A4.

Allgemein dienen S100A4 und CYR61 als suffizientes therapeutisches Ziel, indem sie die Metastasierung der TNBC supprimieren können.

4.5 Invasionsraten der Zelllinien MCF-7 WT, MCF-7 TR und MCF-7 TMX

Bezüglich ihres Invasionsverhaltens wurden MCF-7 WT mit Tamoxifen-resistenten Zelllinien MCF-7 TR und MCF-7 TMX verglichen. Während MCF-7 WT Progesteronrezeptor- und ER α -positiv sind und eine Überexpression des HER2 haben, sind die Zelllinien MCF-7 TR und MCF-7 TMX Tamoxifen-resistent. Es erfolgt der direkte Vergleich beider Tamoxifen-resistenter Zelllinien.

MCF-7-TR- und MCF-7-TMX-Mammakarzinomzellen zeigen eine signifikant höhere Invasionsrate im Vergleich zu MCF-7 WT. Da die CYR61- und S100A4-Expression mit der Invasionsrate korreliert, lässt sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit zeigen, dass für MCF-7-WT-Zellen ein geringes Invasionsverhalten resultiert. Denn MCF-7-WT-Zellen exprimieren nur wenig CYR61 und S100A4. Dies zeigten auch Gründker et al. (2016) mit der Aussage, dass MCF-7-WT-Zellen kein invasives Verhalten zeigen, aufgrund von erniedrigter S100A4- und CYR61-Expression. Erst nach epithelial-mesenchymaler Transition der MCF-7-WT-Zellen zu MCF-7-EMT-Zellen kam es zu einer Erhöhung der Expression von S100A4 und CYR61 und dementsprechend zu einer vermehrten Invasion und Migration.

Letztendlich findet eine geringere Metastasierung des Mammakarzinoms mit MCF-7-WT-Zellen statt. Dieser Typ des Mammakarzinoms ist somit weniger aggressiv als die der untersuchten Tamoxifen-resistenten Sublinien.

MCF-7 TR ist eine ER α -positive Zelllinie, die eine Tamoxifenresistenz aufweist. Tamoxifen ist ein Agens, welches *Multi Drug Resistance* aufheben und den Effekt des Chemotherapeutikums Paclitaxel verbessern kann (Nathan et al. 2000). Besteht allerdings eine Resistenz gegen Tamoxifen, entfällt zum einen die Rolle des Östrogenrezeptormodulators und ein wichtiges therapeutisches Target entfällt, zum anderen wird es den Effekt des Paclitaxels nicht verbessern können. Das Resultat ist eine höhere Aggressivität und eine schlechte Prognose verglichen mit MCF-7WT-Zellen, welches sich in der signifikant höheren Invasionsrate (%) widerspiegelt. Auch die MCF-7-TMX-Mammakarzinomzellen haben eine im Vergleich zu MCF-7 WT signifikant höhere Invasionsrate (%). Hieraus lässt sich auf eine hohe Metastasierungsrate sowie eine schlechte Prognose schließen.

Vergleicht man die Tamoxifen-resistenten Zelllinien untereinander, zeigt sich eine prozentual höhere Invasionsrate (%) der MCF-7 TMX im Vergleich zu MCF-7 TR ohne Signifikanz. Daraus ergibt sich eine höhere Expression der prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4 sowie ein *in vivo* aggressiveres Verhalten als MCF-7-TR-Zellen. Da sich nach Abschluss der Versuche die Zelllinie MCF-7 TMX als mit Mykoplasmen kontaminiert herausstellte, fanden dahingehend keine weiteren Versuche in diesem Rahmen statt. Es ist anzunehmen, dass die MCF-7-TMX- genauso wie MCF-7-TR-Zelllinie eine erhöhte S100A4- und CYR61-Proteinexpression und folglich eine bewiesene hohe Invasionsrate (%) zeigen. Hier bietet der Einsatz von S100A4- und CYR61-si-RNA Potenzial für weitere Forschung.

Schließlich zeigen die verwendeten Tamoxifen-resistenten Zelllinien eine signifikant höhere Invasion gegenüber den MCF-7-WT-Zellen. Somit lässt sich interpretieren, dass die epithelial-mesenchymale Transition in Tamoxifen-resistenten Zelllinien wie MCF-7 TR und MCF-7 TMX eine Rolle spielt im Gegensatz zu MCF-7-WT-Zellen. Denn vermehrte CYR61- sowie S100A4-Expressionen gehen mit einer erhöhten Invasion, Migration und letztendlich Metastasierung einher und verschlechtern zudem die Prognose (Nguyen et al. 2016; Zuo et al. 2018).

4.6 Inhibierung von CYR61 und S100A4 in MCF-7-TR-Zellen

Nach durch CYR61-si-RNA erzielten Knock-down desselbigen Proteins kommt es nach zwei Tagen bei der Tamoxifen-resistenten Zelllinie MCF-7 TR zu einer signifikant verminderten Proteinexpression des CYR61. Wohingegen auch nach 96 h eine signifikante Verminderung in der Invasionsrate (%) resultiert. Zwar erscheint im Westernblot nach 96 h keine signifikante Verminderung der invadierenden Zellen mehr, allerdings erklärt sich dies additiv über den Zeitraum betrachtet als signifikant verminderte Invasion der MCF-7-TR-

Zellen nach CYR61-Herunterregulation. CYR61 zeigt sich mit seinem prometastatischen Potenzial auch in der Tamoxifen-resistenten Zelllinie MCF-7 TR erhöht. Das spiegelt sich in der signifikant erhöhten Invasionsrate (%) wider.

Auch die S100A4-si-RNA und die dadurch bedingte Herunterregulation des Proteins führt nach 96 h zu einer signifikanten Minderung der S100A4-Proteinexpression und erzielt so eine signifikant verminderte Invasion der MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen.

Zusammenfassend überexprimiert die Tamoxifen-resistente Zelllinie MCF-7 TR CYR61 und S100A4. Beide Proteine beeinflussen maßgeblich die epithelial-mesenchymale Transition (Gründker et al. 2016). Somit fördern sie die Invasion und Migration und werden deshalb als prometastatische Faktoren bezeichnet. Mit diesem Hintergrund dienen die Gene *S100A4* und *CYR61* als therapeutisches Ziel in der Verminderung der Metastasierung und der Verbesserung der Prognose, auch bei Tamoxifen-resistenten MCF-7-TR-Zellen. Die Invasionsrate (%) nach CYR61-Knock-down ist signifikant niedriger in MCF-7-TR-Zellen als nach S100A4-Knock-down.

4.7 Inhibierung von CYR61 und S100A4 in MCF-7-WT- und MCF-7-TR-Zellen

Der Vergleich zwischen MCF-7-WT-Zellen und den Tamoxifen-resistenten MCF-7-TR-Mammakarzinomzellen nach CYR61-Knock-down zeigt, dass es bei beiden Zelllinien zu einer signifikant verminderten Invasion im Vergleich zur Kontrolle kommt. Jedoch ist die Invasionsrate (%) der MCF-7-TR-Zellen nach CYR61-Herunterregulation zweifach geringer als die der MCF-7-WT-Zellen und die Abnahme der Invasion somit signifikanter.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass die Zelllinie MCF-7 TR eine höhere Expression des Proteins CYR61 aufweist und demnach eine höhere Metastasierungswahrscheinlichkeit besteht. Die Tamoxifen-resistente Zelllinie MCF-7 TR ist aggressiver als MCF-7 WT.

Beim S100A4-Knock-down durch S100A4-si-RNA bei den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 WT und MCF-7 TR wird eine verminderte Invasionsrate (%) ersichtlich. MCF-7-WT-Zellen invadieren nach S100A4-Herunterregulation weniger im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Jedoch zeigen MCF-7-TR-Zellen demgegenüber eine signifikante Verminderung der Invasionsrate (%). Somit lässt sich interpretieren, dass der prometastatische Faktor S100A4 in MCF-7-WT-Zellen weniger exprimiert wird als in MCF-7-TR-Zellen. Die Tamoxifen-resistente Zelllinie MCF-7 TR ist im direkten Vergleich aggressiver und zeigt ein erhöhtes Metastasierungspotenzial als die MCF-7-WT-Zellen.

Aufbauend auf Gründker et al. (2016), wo MCF-7-WT-Zellen als wenig invadierend und erst nach EMT als invasionssteigernd sowie aggressiv bezeichnet wurden, lässt sich bei der Tamoxifen-resistenten Zelllinie MCF-7 TR eine hohe Tendenz zur Invasion nachweisen. Dies liegt begründet in den hohen Leveln an CYR61 und S100A4, die die epithelial-mesenchymale Transition stark beeinflussen.

Nach Gründker et al. (2016) erscheint eine hohe CYR61-Expression, aber eine niedrige S100A4-Expression, mit einer hohen ER α -Expression assoziiert zu sein. Auch wurde dokumentiert, dass die CYR61-Expression von Östrogen induziert werde (Xie et al. 2001). Die Ergebnisse gehen mit dieser Aussage konform, denn nach Einsatz der CYR61-si-RNA kommt es zu einer signifikanten Minderung der Invasion (%) nach CYR61-Knock-down. Allerdings zeigt der Gebrauch der S100A4-si-RNA keinerlei Signifikanz bezüglich der entsprechenden Invasionsrate (%). Deshalb ist davon auszugehen, dass in MCF-7-WT-Zellen CYR61 die größere Rolle spielt. Auch in der Tamoxifen-resistenten Zelllinie MCF-7 TR zeigt sich dieser Effekt dezent. Die Invasionsrate nach CYR61-Knock-down ist stärker reduziert im Vergleich zum S100A4-Knock-down.

4.8 CYR61 und S100A4 im Vergleich

Summa summarum ist CYR61 bei allen verwendeten Zelllinien der dominante prometastatische Faktor. Denn nach dessen Herunterregulation kommt es in allen Fällen zu einem größeren reduzierenden Effekt bezüglich der Invasionsraten (%). Auch S100A4 beeinflusst in allen Fällen die Invasion. Im Vergleich ist jedoch CYR61 maßgeblicher für die Invasion verantwortlich und zeigt die größere Relevanz in Bezug auf die Invasion.

4.9 Fazit und Ausblick

Sowohl die TNBC-Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 sowie die ER α -positiven, aber gegenüber Tamoxifen-resistenten Zelllinien MCF-7 TR und MCF-7 TMX, zeigen eine hohe Expression der prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4. Der prometastatische Effekt zeigte sich an deren erhöhter Invasionsrate, welches auch die *in-vivo*-Metastasierung widerspiegeln sollte. Nach Herunterregulation entsprechender prometastatischer Proteine, zeigte sich eine signifikant verminderte Invasion aller genannter Zelllinien. Folglich sind diese Zelllinien aggressiver in ihrem Invasions- und Metastasierungsverhalten und vergesellschaftet mit einer schlechteren Prognose.

MCF-7-WT-Zellen, die keine Resistenz aufweisen, zeigen eine sehr geringe CYR61- und S100A4-Expression und invadieren minimalst.

Es ist davon auszugehen, dass eine Resistenz gegen Tamoxifen die Zellen auf molekularer Ebene so verändert, dass sie vermehrt mesenchymale Eigenschaften aufweisen.

Zukünftig könnten die prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4 bezüglich einer gezielten Krebstherapie in Frage kommen und so zur Hemmung der Metastasierung beitragen. Folglich könnte eine bessere Prognose der Brustkrebspatienten/-innen mit TNBC sowie Tamoxifen-resistenter Mammakarzinome resultieren.

5 Zusammenfassung

Triple-negative Mammakarzinome (TNBC) bieten durch das Fehlen von ER α und Progesteronrezeptoren sowie einer nicht vorhandenen Überexpression von HER2 nur wenige therapeutische Optionen. Doch auch beim ER α -positiven Mammakarzinom können durch die erworbene Resistenz gegenüber Tamoxifen die Möglichkeiten einer Therapie limitiert sein. Nicht nur diese verminderten therapeutischen Möglichkeiten, sondern auch die erhöhte Expression prometastatischer Faktoren wie CYR61 und S100A4 in diesen Karzinomen sind für deren gesteigerte Aggressivität hinsichtlich erhöhter Invasions-, Migrations- und Metastasierungsraten verantwortlich. In unserer Arbeitsgruppe wurden unter anderem die TNBC-Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 untersucht. Beide Zelllinien zeigten eine hohe Expression von CYR61 und S100A4. Gleichzeitig wiesen sie gegenüber ER α -positiven Zelllinien deutlich höhere Invasionsraten auf. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von siRNA gegen CYR61 sowie S100A4, beide Faktoren herunterreguliert wurden, ersichtlich durch deren verminderte Proteinexpression. Gleichzeitig wurde auch die Invasionsrate der Zelllinien reduziert. Dadurch sollte auch eine geringere Metastasierung zu erwarten sein.

ER α -positive MCF-7-WT-Mammakarzinomzellen besitzen nur eine äußerst schwach ausgeprägte Invasionsrate. Durch eine erworbene Resistenz gegenüber Tamoxifen verstärkte sich das Invasionsverhalten der beiden Zelllinien MCF-7 TR und MCF-7 TMX deutlich und die Proteinexpression von CYR61 und S100A4 zeigte erhöhte Werte. Auch war die Invasionsrate zusätzlich signifikant erhöht. Durch den Knock-down beider prometastatischer Faktoren kam es auch hier zu einer signifikanten Minderung derer Expression, gefolgt von einer reduzierten Invasionsrate. Die CYR61-si-RNA erzielte bezüglich der Tamoxifen-resistenten Zellen einen größeren Effekt auf die Invasionsrate im direkten Vergleich zu S100A4. Aber auch bei den TNBC-Zelllinien zeigte der CYR61-Knock-down den größeren Effekt. Insgesamt scheinen die prometastatischen Faktoren CYR61 und S100A4 in den TNBC-Zelllinien und in den Tamoxifen-resistenten ER α -positiven Zellen eine wichtige Rolle bei der erhöhten Invasivität zu spielen. Die betroffenen Mammakarzinomzellen zeigen ein aggressiveres Verhalten mit erhöhtem Invasions-, Migrations- und Metastasierungsverhalten. Durch Herunterregulation der prometastatischen Faktoren kommt es zu einer verminderten Invasionsrate.

In Anbetracht der wenig vorhandenen therapeutischen Optionen beim TNBC sowie beim Tamoxifen-resistenten Mammakarzinom, könnte eine Therapiemaßnahme, welche CYR61 und S100A4 reduziert, in Zukunft die Therapierbarkeit dieser Karzinome verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Ambartsumian NS, Grigorian MS, Larsen IF, Karlström O, Sidenius N, Rygaard J, Georgiev G, Lukanidin E (1996): Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene* 13, 1621–1630
- Antoniou AC, Easton DF (2006): Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25, 5898–5905
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A (2005): PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120, 303–313
- Bolton JL, Thatcher GRJ (2008): Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 21, 93–101
- Bos PD, Zhang XHF, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J (2009): Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459, 1005–1009
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD (1973): Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248, 6251–6253
- Böcker W, Denk H, Heitz PHU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.): Pathologie. 5. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2012
- Chen JQ, Russo J (2009): ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta* 1796, 162–175
- Chung CT, Carlson RW (2003): Goals and objectives in the management of metastatic breast cancer. *Oncologist* 8, 514–520
- Coghlin C, Murray GI (2010): Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol* 222, 1–15
- Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C (2009): Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer* 45, 27–40
- Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA (2009): Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 115, 423–428
- Eisemann N, Waldmann A, Katalinic A (2013): Epidemiology of breast cancer - current figures and trends. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 73, 130–135
- Elliott PR, Irvine AF, Jung HS, Tozawa K, Pastok MW, Picone R, Badyal SK, Basran J, Rudland PS, Barraclough R et al. (2012): Asymmetric mode of Ca²⁺-S100A4 interaction with nonmuscle myosin IIA generates nanomolar affinity required for filament remodeling. *Structure* 20, 654–666
- Föst C, Duwe F, Hellriegel M, Schweyer S, Emons G, Gründker C (2011): Targeted chemotherapy for triple-negative breast cancers via LHRH receptor. *Oncol Rep* 25, 1481–1487

- Fountzilas G, Giannoulatou E, Alexopoulou Z, Zagouri F, Timotheadou E, Papadopoulou K, Lakis S, Bobos M, Poullos C, Sotiropoulou M et al. (2016): TP53 mutations and protein immunopositivity may predict for poor outcome but also for trastuzumab benefit in patients with early breast cancer treated in the adjuvant setting. *Oncotarget* 7, 32731–32753
- Friedl P, Wolf K (2008): Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 68, 7247–7249
- Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR (2006): S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 281, 677–680
- Garrett SC, Hodgson L, Rybin A, Touthkine A, Hahn KM, Lawrence DS, Bresnick AR (2008): A biosensor of S100A4 metastasis factor activation: inhibitor screening and cellular activation dynamics. *Biochemistry* 47, 986–996
- Girgert R, Emons G, Gründker C (2012): Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat* 134, 199–205
- Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N (2009): Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol* 20, 1913–1927
- Graham JD, Clarke CL (1997): Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18, 502–519
- Grigorian M, Ambartsumian N, Lykkesfeldt AE, Bastholm L, Elling F, Georgiev G, Lukanidin E (1996): Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells. *Int J Cancer* 67, 831–841
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E (2001): Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 276, 22699–22708
- Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N (2005): Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res* 65, 3772–3780
- Gründker C, Bauerschmitz G, Schubert A, Emons G (2016): Invasion and increased expression of S100A4 and CYR61 in mesenchymal transformed breast cancer cells is downregulated by GnRH. *Int J Oncol* 48, 2713–2721
- Guarino M, Rubino B, Ballabio G (2007): The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39, 305–318
- Hernández JL, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, Masa M, Mitjans F, Martinez JM, Coma S et al. (2013): Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody. *PLoS ONE* 8, e72480
- Hinsche O, Girgert R, Emons G, Gründker C (2015): Estrogen receptor β selective agonists reduce invasiveness of triple-negative breast cancer cells. *Int J Oncol* 46, 878–884

- Hinsche O: Einfluss von ER β -Agonisten auf Wachstum und Invasion von triple-negativen Mammakarzinomzellen. Med. Diss. Göttingen 2015
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S et al. (2015): Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335
- Hudis CA (2007): Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357, 39–51
- Hunter KW (2004): Host genetics and tumour metastasis. *Br J Cancer* 90, 752–755
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA (2008): Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58–68
- Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M (2010): Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 101, 293–299
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69–90
- Jenkinson SR, Barraclough R, West CR, Rudland PS (2004): S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis. *Br J Cancer* 90, 253–262
- Jiang WG, Watkins G, Fodstad O, Douglas-Jones A, Mokbel K, Mansel RE (2004): Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 11, 781–791
- Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV (2014): In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp* 88, 51046
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J (2003): A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3, 537–549
- Kim JJ, Kurita T, Bulun SE (2013): Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev* 34, 130–162
- Kurebayashi J (2009): Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast Cancer* 16, 275–280
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2017): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Kurzversion 4.0; AWMF Registernummer: 032-0450L. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>; (abgerufen am: 02.08.2018)
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685

- Lammert J, Grill S, Kiechle M (2018): Modifiable lifestyle factors: Opportunities for (hereditary) breast cancer prevention - a narrative review. *Breast Care (Basel)* 13, 109–114
- Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F (2001): ER β inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142, 4120–4130
- Leask A, Abraham DJ (2006): All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci* 119, 4803–4810
- Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA (2016): Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS ONE* 11, e0157368
- Lin J, Huo R, Wang L, Zhou Z, Sun Y, Shen B, Wang R, Li N (2012): A novel anti-Cyr61 antibody inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 61, 677–687
- Lindberg K, Ström A, Lock JG, Gustafsson JA, Haldosén LA, Helguero LA (2010): Expression of estrogen receptor beta increases integrin alpha1 and integrin beta1 levels and enhances adhesion of breast cancer cells. *J Cell Physiol* 222, 156–167
- Lindberg K, Helguero LA, Omoto Y, Gustafsson JÅ, Haldosén LA (2011): Estrogen receptor β represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN: implications for tamoxifen sensitivity. *Breast Cancer Res* 13, R43
- Madhu Krishna B, Chaudhary S, Mishra DR, Naik SK, Suklabaidya S, Adhya AK, Mishra SK (2018): Estrogen receptor α dependent regulation of estrogen related receptor β and its role in cell cycle in breast cancer. *BMC Cancer* 18
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839
- Mazzocca A, Carloni V (2009): The metastatic process: methodological advances and pharmacological challenges. *Curr Med Chem* 16, 1704–1717
- Melcher C, Scholz C, Jäger B, Hagenbeck C, Rack B, Janni W (2012): Breast cancer: state of the art and new findings. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 72, 215–224
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66–71
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J (2005): Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518–524
- Moore BW (1965): A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19, 739–744

- Nathan FE, Berd D, Sato T, Mastrangelo MJ (2000): Paclitaxel and tamoxifen: an active regimen for patients with metastatic melanoma. *Cancer* 88, 79–87
- Nguyen LTT, Song YW, Cho SK (2016): Baicalein inhibits epithelial to mesenchymal transition via downregulation of Cyr61 and LOXL-2 in MDA-MB231 breast cancer cells. *Mol Cells* 39, 909–914
- Nguyen N, Kuliopulos A, Graham RA, Covic L (2006): Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. *Cancer Res* 66, 2658–2665
- Nilsson M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA (2004): Nuclear receptors in disease: the oestrogen receptors. *Essays Biochem* 40, 157–167
- Platt-Higgins AM, Renshaw CA, West CR, Winstanley JH, De Silva Rudland S, Barraclough R, Rudland PS (2000): Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9ka) with other prognostic markers in human breast cancer. *Int J Cancer* 89, 198–208
- Qiu J, Xue X, Hu C, Xu H, Kou D, Li R, Li M (2016): Comparison of clinicopathological features and prognosis in triple-negative and non-triple negative breast cancer. *J Cancer* 7, 167–173
- Ravasi T, Hsu K, Goyette J, Schroder K, Yang Z, Rahimi F, Miranda LP, Alewood PF, Hume DA, Geczy C (2004): Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics* 84, 10–22
- ZfKD (Zentrum für Krebsregisterdaten), GEKID (Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, e.V.): Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch-Institut, Berlin 2017
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene 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* 288, 321–333
- Schmidt-Hansen B, Ornås D, Grigorian M, Klingelhöfer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N (2004): Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 23, 5487–5495
- Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y (2012): Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 9, 311–320
- Sierra-Martinez M, Hernández-Cadena L, García-Sánchez JR, Acosta-Altamirano G, Palacios-Reyes C, Alonso-Themann PG, García-Ortiz L, Quintas-Granados LI, Reyes-Hernández OD (2018): Predictive polymorphisms for breast cancer in postmenopausal Mexican women. *J Cancer Res Ther* 14, 640–646
- Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W et al. (2006): The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 131, 1486–1500

- Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA (2004): Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1566–1571
- Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S (1997): Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene* 14, 331–337
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350–4354
- Volk-Draper LD, Rajput S, Hall KL, Wilber A, Ran S (2012): Novel model for basaloid triple-negative breast cancer: behavior in vivo and response to therapy. *Neoplasia* 14, 926–942
- von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G, Gründker C (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 100, 13–21
- Wang T, Gilkes DM, Takano N, Xiang L, Luo W, Bishop CJ, Chaturvedi P, Green JJ, Semenza GL (2014): Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, E3234–3242
- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005): Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591–602
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G (1995): Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789–792
- Xie D, Miller CW, O'Kelly J, Nakachi K, Sakashita A, Said JW, Gornbein J, Koeffler HP (2001): Breast cancer. Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *J Biol Chem* 276, 14187–14194
- Xie D, Yin D, Tong X, O'Kelly J, Mori A, Miller C, Black K, Gui D, Said JW, Koeffler HP (2004): Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways. *Cancer Res* 64, 1987–1996
- Xie HY, Shao ZM, Li DQ (2017): Tumor microenvironment: driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis. *Chin J Cancer* 36, 36
- Xu H, Li M, Zhou Y, Wang F, Li X, Wang L, Fan Q (2016): S100A4 participates in epithelial-mesenchymal transition in breast cancer via targeting MMP2. *Tumour Biol* 37, 2925–2932
- Yarden Y (2001): The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* 37, 3–8
- Zuo Z, Zhang P, Lin F, Shang W, Bi R, Lu F, Wu J, Jiang L (2018): Interplay between Trx-1 and S100P promotes colorectal cancer cell epithelial-mesenchymal transition by up-regulating S100A4 through AKT activation. *J Cell Mol Med* 22, 2430–244

Danksagung

Einen besonderen herzlichen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker aussprechen, der mich jederzeit mit großem Engagement, neuen Ideen, konstruktiver Kritik und Flexibilität unterstützte.

Herrn Prof. Dr. med. G. Emons danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung und seinem Labor die experimentellen Arbeiten durchführen zu können.

Allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Gynäkologie, insbesondere Sonja Blume und Dr. Johanna W. Hellinger, danke ich für die schöne und lehrreiche Zeit, für die entgegenkommende Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 27.08.1985 bin ich, Silke Hüchel, geborene Schiemann, in Hann. Münden (Göttingen) geboren worden. In den Jahren 1992 bis 1996 ging ich in die Grundschule Gimte in Hann. Münden, anschließend für zwei Jahre in die Orientierungsstufe II Auefeld Gimte. Ab 1998 besuchte ich das Grotefeld-Gymnasium in Hann. Münden und erlangte dort im Jahre 2005 das Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife. Nach dem Abitur begann ich von 2005 bis 2008 eine Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin an der Elisabeth von Thüringen Akademie für Gesundheitsberufe. Danach arbeitete ich als Gesundheits- und Krankenpflegerin am Universitätsklinikum Marburg und Gießen, Standort Marburg, auf den Intensivstationen für Anästhesie und Intensivtherapie sowie Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie. 2012 begann ich an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mein Studium der Humanmedizin und absolvierte 2014 den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Für den klinischen Studienabschnitt wechselte ich an die Georg-August-Universität nach Göttingen. Hier begann ich 2015 mit meiner Dissertation in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe. 2018 legte ich den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung vor Beginn des Praktischen Jahres ab. Im Anschluss absolvierte ich ab Oktober 2017 mein Praktisches Jahr im Fach Innere Medizin, mein Wahltertial im Fach Diagnostische und Interventionelle Radiologie sowie das dritte Tertial (Chirurgie) in der Universitätsmedizin Göttingen. Den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich am 05.12.2018 erfolgreich in Göttingen ab. Mein ärztlicher beruflicher Werdegang begann am 01.04.2019 am Universitätsklinikum Marburg und Gießen, Standort Marburg, in der Diagnostischen und Interventionellen Radiologie.