

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

Einfluss von RhoA auf die Invasion von Mammakarzinomzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Schömel, Franziska

aus

Kassel

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

Ko-Betreuer: Prof. Dr. S. Johnsen

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

Ko-Referent:

Drittreferent:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss von RhoA auf die Invasion von Mammakarzinomzellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Kassel, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologische Aspekte des Mammakarzinoms	1
1.1.2 Histologie, Stadieneinteilung und Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms	1
1.1.3 Metastasierung des Mammakarzinoms	2
1.2 Metastasierung und die lokale Invasion als einer ihrer ersten Schritte	2
1.3 Migration – wie bewegen sich Zellen fort?	4
1.4 Was sind kleine GTPasen und welche Rolle spielt RhoA bei der Invasion?	4
1.5 Stressfasern und Fokale Adhäsionen	6
1.6 Fragestellung	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Material.....	8
2.2 Methoden.....	12
2.2.1 Zellkultur	12
2.2.2 Transiente Transfektion von siRNA (<i>small interfering ribonucleic acid</i>) mittels Lipofektion.....	13
2.2.3 RNA-Isolation	14
2.2.4 Messung der RNA-Konzentration	14
2.2.5 cDNA - (<i>complementary DNA</i> -) Synthese.....	15
2.2.6 real-time PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	15
2.2.7 Proteinisolation.....	16
2.2.8 Bradford-Assay	16
2.2.9 SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese).....	17
2.2.10 Western Blot.....	18
2.2.11 Proliferationsassay	19
2.2.12 Invasionsassay	19
2.2.13 Nachweis F-Aktin.....	20
2.2.14 Statistische Analysen	21
3 Ergebnisse.....	22
3.1 Nachweis des RhoA- <i>knockdowns</i>	22
3.1.1 Nachweis des RhoA- <i>knockdowns</i> bei MCF-7	22
3.1.2 Nachweis des RhoA- <i>knockdowns</i> bei T47D	22
3.2 Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf das Invasionsverhalten von MCF-7 und T47D in Kokultur.....	24
3.2.1 Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf das Invasionsverhalten von MCF-7 in Kokultur	24
3.2.2 Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf das Invasionsverhalten von T47D in Kokultur	25

3.3	Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf das Invasionsverhalten von MCF-7 in Monokultur	27
3.4	Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf das Proliferationsverhalten von MCF-7 und T47D	27
3.4.1	Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf das Proliferationsverhalten von MCF-7	28
3.4.2	Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf das Proliferationsverhalten von T47D	28
3.5	Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Bildung von F-Aktin	29
3.5.1	Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Bildung von F-Aktin bei MCF-7	29
3.5.2	Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Bildung von F-Aktin bei T47D	30
4	Diskussion	32
4.1	MCF-7	32
4.1.1	Invasionsassays und F-Aktin-Nachweis	32
4.1.2	Proliferationsassay	37
4.2	Tumorsuppressor oder Onkogen?	37
4.3	T47D	39
4.4	Ausblick	40
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nachweis der RhoA-Expression in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in [%] zur Kontrolle nach RhoA- <i>knockdown</i> durch transiente Transfektion von RhoA-siRNA.	23
Abbildung 2: Nachweis der RhoA-Expression in der Mammakarzinomzelllinie T47D in [%] zur Kontrolle nach RhoA- <i>knockdown</i> durch transiente Transfektion von RhoA-siRNA.	23
Abbildung 3: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 96-stündiger Kokultur mit MG-63.	25
Abbildung 4: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 96-stündiger Kokultur mit hFOB 1.19.	25
Abbildung 5: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie T47D nach 96-stündiger Kokultur mit MG-63.	26
Abbildung 6: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie T47D nach 96-stündiger Kokultur mit hFOB 1.17.	26
Abbildung 7: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 96-stündiger Monokultur.	27
Abbildung 8: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.	28
Abbildung 9: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie T47D.	28
Abbildung 10: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Bildung von F-Aktin in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.	30
Abbildung 11: Einfluss des RhoA- <i>knockdowns</i> auf die Bildung von F-Aktin in der Mammakarzinomzelllinie T47D.	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Geräte	8
Tabelle 2: verwendete Reaktionssysteme / Kits	10
Tabelle 3: verwendete Zelllinien.....	10
Tabelle 4: verwendete Medien	11
Tabelle 5: verwendete Software.....	11
Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für die real-time PCR.....	16
Tabelle 7: Zusammensetzung der Standardreihe für eine lineare Regression.....	17
Tabelle 8: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel	17
Tabelle 9: verwendete Primärantikörper für die Western-Blot-Analyse.....	19
Tabelle 10: verwendete Sekundärantikörper	19

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HER-2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
PBS/DPBS	<i>(Dulbecco's) phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RhoA	<i>ras homolog gene family member A</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologische Aspekte des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist der häufigste bei Frauen diagnostizierte Krebs weltweit, ebenso ist es für die meisten krebsbedingten Todesfälle bei Frauen verantwortlich. 2018 gab es global gesehen etwa 2 Mio. neudiagnostizierte Mammakarzinome. Fast eine von vier Krebsdiagnosen bei Frauen betrifft die Brust. 2018 kam es weltweit zu mehr als 600 000 Todesfällen als Folge eines Mammakarzinoms (Bray et al. 2018). In Deutschland traten 2016 etwa 69 000 Neuerkrankungen auf. Von acht Frauen erkrankt im Durchschnitt eine an einem bösartigen Tumor der Brust. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 64 Jahren. Fast ein Drittel der Patientinnen ist bei der Erstdiagnose jünger als 55 Jahre. Insgesamt ist die Zahl diagnostizierter Brustkrebsfälle in den letzten Jahren gestiegen. Die Todesrate hingegen ist in den vergangenen 20 Jahren deutlich gesunken. Diese gesunkene Mortalität ist auf ein verbessertes therapeutisches Vorgehen zurückzuführen (Robert-Koch Institut 2019) was die große Bedeutung der Forschung auf diesem Gebiet unterstreicht.

1.1.2 Histologie, Stadieneinteilung und Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms

Mammakarzinome werden eingeteilt in duktale und lobuläre Karzinome. Duktale Karzinome gehen vom Epithel der Drüsenläppchen aus und machen etwa 85-90 % der Mammakarzinome aus. Lobuläre Karzinome haben ihren Ursprung im Milchgangsepithel und einen Anteil von 10-15 %. Sobald die entarteten Zellen Gewebegrenzen bzw. die Basalmembran überschritten haben und in benachbartes Gewebe wachsen, spricht man von einem invasiven Karzinom und nicht mehr von einem *Carcinoma in situ* (Weyerstahl und Stauber 2013).

Um die Ausbreitung der Tumorerkrankung zu beschreiben, wurde das TNM-System etabliert, anhand dessen der Tumor nach Größe (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasierung (M) eingeteilt wird. Auf Basis der TNM-Einteilung kann das sog. *Staging* erfolgen, die Einteilung in einzelne UICC-Stadien (Union for international Cancer Control) (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Wichtig für das therapeutische Vorgehen ist neben der Bestimmung des histologischen Typs und Differenzierungsgrades und des *Stagings* auch der Hormonrezeptorstatus. In etwa 80 % der Fälle ist ein Mammakarzinom positiv für den Östrogenrezeptor (ER) und/oder Progesteronrezeptor (PR). Zudem wird auf das Vorhandensein des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2) hin untersucht, dessen Vorkommen mit einer höheren Neigung zu Rezidiven und Metastasierung assoziiert ist. Mammakarzinome, die weder HER-2 noch ER und PR exprimieren, werden als *triple negative* bezeichnet und haben die schlechteste Prognose (Müller 2014).

1.1.3 Metastasierung des Mammakarzinoms

Eine Metastasierung beim Mammakarzinom ist häufig und geschieht oft bereits in einem frühen Stadium. Bei Therapiebeginn sind die Metastasen nicht selten noch inapparent. Sie finden sich entweder lymphogen (beispielsweise in der ipsilateralen Axilla oder parasternal) oder hämatogen (Müller 2014). Bei Letzteren sind vor allem das Skelettsystem, Lunge und Pleura sowie die Leber betroffen, aber auch das Zentrale Nervensystem, die Bauch- oder andere gynäkologische Organe (Lee 1983). Fernmetastasen sind die Haupttodesursache im Zuge der Erkrankung, nicht der Primärtumor selbst (Weigelt et al. 2005). Bei 25-40 % der Patientinnen kommt es zur Metastasierung. Die mittlere Überlebenszeit ab dem Auftreten von Metastasen beträgt, abhängig von verschiedenen Faktoren (u. a. Tumorbiologie, *Staging*, Allgemeinzustand, Alter), zwei bis vier Jahre (Guarneri und Conte 2009). Bei der Bildung von Metastasen haben Tumorzellen, insbesondere auch Mammakarzinomzellen, eine hohe Affinität zu Knochengewebe. Ein Grund hierfür ist vermutlich, dass zirkulierende Tumorzellen durch die starke Vaskularisierung des Knochenmarks mit diesem in engen Kontakt treten. Da jedoch nicht jedes stark durchblutete Organ ein typischer Metastasierungsort ist, kann dies nicht der einzige Grund sein. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Umgebung des Knochens für Tumorzellen besonders anziehend ist und das Wachstum und ein aggressives Verhalten der Tumorzellen unterstützt (Mundy 2002).

1.2 Metastasierung und die lokale Invasion als einer ihrer ersten Schritte

Die entscheidende Todesursache einer Krebserkrankung sind Metastasen bzw. die Konsequenzen ihrer Behandlung (Steeg 2016). 90 % der Patienten mit einem soliden Tumor versterben an den Folgen der Metastasen (Gupta und Massague 2006). Als Metastase bezeichnet man die Entwicklung eines Zweittumors als Folge eines

Primärtumors an anderer Stelle des Körpers (Coghlin und Murray 2010). Wird eine Krebserkrankung zu einem Zeitpunkt entdeckt, bevor es zur Metastasierung gekommen ist, kann sie häufig erfolgreich behandelt werden (Chambers et al. 2002). Dies unterstreicht zum einen die Bedeutung der Vorbeugung und Früherkennung, zum anderen die Notwendigkeit, die Prozesse der Metastasierung zu verstehen und in diesem Bereich zu forschen.

Ogleich die große Bedeutung der Metastasierung bekannt ist und bereits viele beteiligte molekulare Vorgänge benannt werden können, ist noch eine Vielzahl an Abläufen innerhalb dieses biologischen Prozesses unverstanden. Dies liegt maßgeblich daran, dass die beteiligten Vorgänge im Körper sehr schwer zu beobachten sind. Die Entwicklung vom Primärtumor zur Metastase in einem entfernten Gewebe beinhaltet mehrere Schritte, die durchlaufen werden müssen. Voraussetzung ist der Verlust zellulärer Adhäsionen und die zunehmende Beweglichkeit der Krebszellen (Chambers et al. 2002). Durch Zerstörung der Basalmembran kommt es zur lokalen Invasion, einer Migration von Tumorzellen in benachbartes Gewebe bzw. in die extrazelluläre Matrix (EZM) der Umgebung. Es folgt die Intravasation, das Eindringen einzelner Tumorzellen oder kleinerer Zellverbände in das Gefäß- oder Lymphsystem. Innerhalb des Gefäßsystems müssen die Tumorzellen unter anderem Scherkräften und der Immunantwort des Organismus standhalten. Wurde das Zielorgan erreicht, kommt es zur Extravasation, dem Austritt aus dem Gefäßsystem. Schließlich müssen die Tumorzellen in der neuen Umgebung überleben und Mikrometastasen ausbilden, die unter Umständen für viele Jahre unbemerkt bleiben, bis sie zu Makrometastasen werden. Letzteres wird als Kolonisation bezeichnet (Gomez-Cuadrado et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Frage, welchen Einfluss RhoA auf die Invasivität von Mammakarzinomzellen hat. Im Invasionsassay wird der Prozess der Invasion bzw. der lokalen Invasion als einer der ersten Schritte des Metastasierungsprozesses simuliert, indem die Tumorzellen ihren Zellverband verlassen und in Richtung eines Stimulus migrieren.

Die lokale Invasion bedeutet *in vivo*, dass Tumorzellen die Basalmembran durchbrechen, um den Verband des Primärtumors zu verlassen und sich nach Durchtritt des mit dem Tumor assoziierten Stromas in das umgebende gesunde Gewebe zu begeben. Die geordnete Architektur des physiologischen Epithels dient normalerweise als Barriere, wird jedoch bei der lokalen Invasion erfolgreich durchbrochen (Valastyan und Weinberg 2011). Wichtige Voraussetzung für den Prozess der lokalen Invasion ist die Aktivierung von Signalwegen, die für die Dynamik des Zytoskeletts und den Abbau von Haftverbindungen zwischen den Zellen verantwortlich sind (Friedl und Alexander 2011). Damit einher geht die Fähigkeit der

Krebszellen zur Migration, um in benachbartes Gewebe eindringen zu können (Yamaguchi und Condeelis 2007). Die Zellen verlieren ihre hohe Differenzierung und erlangen die Fähigkeit, ihre ursprüngliche extrazelluläre Matrix bzw. den Primärtumor zu verlassen, ohne durch Apoptose daran gehindert zu werden, wie es bei gesundem Epithel der Fall ist (Guan 2015).

1.3 Migration – wie bewegen sich Zellen fort?

Krebszellen können in benachbartes Gewebe invadieren, da sie die Möglichkeit der Migration besitzen (Yamaguchi und Condeelis 2007). Zellmigration trägt entscheidend zu verschiedenen zellulären Mechanismen bei – neben den bereits genannten pathologischen spielen ebenso zahlreiche physiologische Vorgänge eine große Rolle (Wundheilung, Embryonalentwicklung, Entzündungsprozesse) (Mitchison und Cramer 1996). Bei der Fortbewegung der Zelle kommt es zu kurzfristigen Prozessen, bei denen das Aktinzytoskelett eine entscheidende Rolle spielt: Durch eine ständige Reorganisation bzw. einen ständigen Auf- und Abbau des Aktins wird die Membran der Zelle an der Zellvorderkante vorwärts getrieben, während sie sich an der Hinterkante zusammenzieht. Auf diese Weise schiebt sich die Zelle voran (Lauffenburger und Horwitz 1996). Im vorderen Bereich kommt es während dieser Vorwärtsbewegung ständig zur Ausbildung neuer Adhäsionen mit dem Substrat. Wenn diese durch die Vorwärtsbewegung auf Höhe der Hinterkante liegen, erfolgt durch Kontraktion des Zellkörpers die Ablösung der Zelle (Raftopoulou und Hall 2004).

Zellen migrieren einzeln oder in einem Verband aufeinander abgestimmt mit gleicher Geschwindigkeit (kollektive Migration). Die Mechanismen der Einzelmigration können während der kollektiven Migration auf jede einzelne Zelle übertragen werden (Mayor und Etienne-Manneville 2016). Rho-GTPasen nehmen bei der Regulation der biochemischen Prozesse, die Voraussetzung für die Migration sind, eine zentrale Rolle ein (Raftopoulou und Hall 2004).

1.4 Was sind kleine GTPasen und welche Rolle spielt RhoA bei der Invasion?

Bei RhoA (Ras homolog gene family member A), welches in dieser Arbeit im Mittelpunkt steht, handelt es sich um eine Rho-GTPase (GTP = Guanosintriphosphat). Rho-GTPasen gehören zur Superfamilie Ras, GTP-bindender Proteine mit einer atomaren Masse von 20-30 kDA. Die drei am besten charakterisierten unter ihnen sind Rho, Rac und Cdc42. Rho-

GTPasen stellen sog. molekulare Schalter dar, indem sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen (GDP = Guanosindiphosphat) Zustand wechseln. Im aktiven Zustand sind sie beteiligt an zahlreichen nachgeschalteten zellulären Prozessen, beispielsweise der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Zelladhäsion. Eine intrinsische GTPase-Aktivität sorgt für eine Rückkehr in den inaktiven Zustand und beendet die Signaltransduktion (Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997). Der Wechsel zwischen der aktiven und inaktiven Form wird gesteuert durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und GAPs (*GTPase-activating proteins*). Erstere fördern den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP und somit die Aktivierung, letztere verstärken die intrinsische Hydrolyse des gebundenen GTP und fördern auf diese Weise die Inaktivierung (Bos et al. 2007). Sogenannte Rho-spezifische *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDI) sorgen für eine Stabilisierung der GTPasen in ihrer inaktiven Form und verhindern somit z. B. eine deregulierte Aktivierung oder einen ungebremsten Abbau (Garcia-Mata et al. 2011).

RhoA gehört zu den am besten untersuchten kleinen GTPasen. Es ist insbesondere seit langem bekannt für sein Mitwirken an der Bildung von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen (Ridley und Hall 1992) und der Kontraktilität des Aktin-Myosin-Netzwerkes innerhalb der Zelle (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996). Lange Zeit ging man davon aus, RhoA wirke ausschließlich an der Hinterkante der Zelle. Es ist dort über die Bildung von Stressfasern an kontraktile Vorgängen, genauer gesagt am Rückzug der Hinterkante beim Vorwärtstreten, beteiligt. Es häufen sich jedoch Hinweise, dass RhoA ebenfalls an der Vorderkante sich fortbewegender Zellen bei Prozessen des Vorwärtstretens mitwirkt (K O'Connor und Chen 2013). Beispielsweise konnten O'Connor et al. zeigen, dass eine RhoA-Aktivierung an der Vorderkante zur Bildung von *membrane ruffles* und Membranlamellen führt und auf diese Weise am Vorwärtstreten der Zelle beteiligt ist (KL O'Connor et al. 2000). Kurokawa et. al., die mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer die räumliche und zeitliche Aktivität von RhoA in sich fortbewegenden Zellen untersuchten, konnten ebenfalls zeigen, dass es sowohl an der Hinter- als auch der Vorderkante aktiv ist und bei der Bildung von *membrane ruffles* mit RAC1 und Cdc42 zusammenwirkt (Kurokawa und Matsuda 2005).

Die Frage, wie RhoA einerseits die Kontraktion bzw. Stressfaserbildung und andererseits das Vorankommen der Zellen fördern kann, wirft viele Fragen auf und verdeutlicht die Vielseitigkeit RhoAs (O'Connor und Chen 2013).

1.5 Stressfasern und Fokale Adhäsionen

Fokale Adhäsionen sorgen durch eine Verankerung des Aktinzytoskeletts für eine dynamische Verbindung zwischen Epithelzellen und den Proteinen der extrazellulären Matrix (BurrIDGE et al. 1988). Kontraktile Bündel aus Aktinfilamenten, sog. Stressfasern, inserieren in der Basallamina (Chrzanowska-Wodnicka und BurrIDGE 1996). Fokale Adhäsionen sind zum einen wichtig für die feste Haftung der Zelle, zum anderen für das Vorwärtskommen der Zelle: Der koordinierte Auf- und Abbau des Aktinzytoskeletts in Kombination mit Bildung und Abbau Fokaler Adhäsionen stellt die Basis hierfür dar. Zum Aufbau Fokaler Adhäsionen gehört der zytoplasmatische Anteil, an dem die Aktinfilamente inserieren, eine transmembrane Domäne, deren Hauptbestandteil Proteine der Integrin-Familie sind, und die extrazelluläre Seite, an der die Verbindung zu den EZM-Proteinen stattfindet. An der zytoplasmatischen Seite kommt es zum einen zur Verbindung zwischen Integrinen und diversen Aktin-bindenden Proteinen wie Alpha-Aktinin, Vinculin, Talin und Paxillin. Zum anderen interagieren die Integrine hier mit verschiedenen Regulatorproteinen wie z. B. der Fokalen Adhäsionskinase (Pawlina und Ross 2016).

1.6 Fragestellung

Voraussetzung für die Bildung von Metastasen ist, dass die Zellen des Primärtumors einen invasiven Phänotyp entwickeln. Dies beinhaltet, dass sie ihren Ursprungsort verlassen, d. h. weniger adhäsiv werden und stattdessen migrieren. Da Fernmetastasen für einen Großteil der Todesfälle im Zusammenhang mit Krebserkrankungen verantwortlich sind, sind die Mechanismen, mit denen maligne entartete Zellen einen weniger adhären, invasiveren Phänotyp entwickeln, von großem Interesse. Ausschlaggebend für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Publikation von Aguilar-Rojas et. al aus dem Jahr 2012, in der sie ihre Untersuchungen zum Einfluss des *Gonadotropin-releasing hormone receptors* auf RhoA vorstellten. Sie konnten zeigen, dass die Aktivierung von GnRH-Rezeptoren durch einen GnRH-Agonisten in der hochinvasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 über die Aktivierung von RhoA die Invasivität der Zellen reduzierte. Unter anderem durch Fluometrie und konvokale Mikroskopie beurteilten Aguilar-Roja et al. die Aktinpolymerisation und die Substratbindung in An- sowie Abwesenheit des Agonisten. Es zeigte sich, dass RhoA über die Zunahme von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen zu einer Zunahme der Adhäsion der Zellen beiträgt (Aguilar-Rojas et al. 2012). Vor dem Hintergrund der Erkenntnis, dass eine gesteigerte RhoA-Aktivität hoch-invasive Mammakarzinomzellen weniger invasiv werden lässt, stellt sich die Frage, ob in wenig

invasiven Mammakarzinomzellen eine Herunterregulation der RhoA-Aktivität zu einer Zunahme der Invasionsneigung führt. Zur Beantwortung dieser Frage soll in den Zelllinien T47D und MCF-7 durch die Verwendung von siRNAs ein RhoA-*knockdown* herbeigeführt werden. Der Erfolg dieses als RNA-Interferenz bezeichneten *knockdowns* soll auf RNA-Ebene anhand von RT-qPCR (*real-time quantitative PCR*) und auf Proteinebene mit Western Blot überprüft werden. Um auszuschließen, dass sich die veränderte RhoA-Aktivität auf die Proliferation auswirkt, wird nach 48 h und nach 120 h ein Proliferations-Assay durchgeführt. Schließlich soll die Invasionsneigung der Mammakarzinomzellen nach RhoA-*knockdown* mit Hilfe einer Kokultur mit Osteoblasten- bzw. Osteosarkomzellen untersucht werden. Zudem wird mit Hilfe von Fluometrie ein quantitativer sowie konvokalmikroskopisch ein qualitativer F-Aktin-Nachweis durchgeführt, um zu untersuchen, welche Veränderungen sich auf Ebene des Zytoskeletts nach RhoA-*knockdown* ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Einmalartikel folgender Hersteller verwendet: Eppendorf (Hamburg, DE), Greiner (Kremsmünster, AT), LABSOLUTE (Renningen, DE), Sarstedt (Nümbrecht, DE) und Starlab (Hamburg, DE).

Tabelle 1: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Analysenwaage BP 161 P	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav KSG 112	KSG, Olching, DE
Biofuge pico	Heraeus, Hanau, DE
C-Digit Western Blot Scanner	Li-Cor, Lincoln, NE, USA
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX51	Olympus, Tokio, JPN
Flüssigstickstoffbehälter Arpege 140	Air Liquide, Paris, FRA
Immersionmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE
Inkubator	Sanyo, Osaka, JPN
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau, DE
Laborschüttler IKA MTS 4	IKA, Staufen, DE
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE
Magnetrührer	IKA, Staufen, DE
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, DE
Mini Protean Chamber	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Minizentrifuge MCF-2360	LMS, Tokyo, JPN
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, DE
Photometer	Eppendorf, Hamburg, DE

Gerät	Hersteller, Firmensitz
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage AZ1502	Sartorius, Göttingen, DE
qTower	Analytikjena, Jena, DE
Reax top Schüttel-und Mischgerät	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Rollenmischer	Karl Hecht, Sondheim v.d. Rhön, DE
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel, DE
Sicherheitswerkbank	Clean Air Techniek bv, Woerden, NLD
Synergy HT Microplate Reader	BIO-TEK, Winooski, VT, USA
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, DE
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, DE
Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Vakuumpumpe	Schuett biotec, Göttingen, DE
Vibrax	Serono, Genf, CHE

Tabelle 2: verwendete Reaktionssysteme / Kits

Reaktionssystem / Kit	Hersteller
RNeasy Mini Kit 74106	Qiagen, Venlo, NLD
QuantiNova Internal Control RNA and Assay	
QuantiNova Reverse Transcription Kit 205413	
QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit 208156	

Tabelle 3: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Histologie	Referenz	Bezugsquelle
hFOB 1.19	Knochen	osteoblastisch	Harris et al., 1995	AG von Prof. Dr. Steven Johnsen
MCF-7	metastatischer Pleuraerguss eines Adenokarzinoms der Brustdrüse	epithelial	Soule et al. 1973	ATCC-HTB-22
MG-63	Osteosarkom des Knochens	fibroblastisch	Billiau, et al., 1977	ATCC-CRL-1427
T47D	metastatischer Pleuraerguss eines duktalen Karzinoms der Brustdrüse	epithelial	Keydar et al. 1979	ATCC-HTB-133

Tabelle 4: verwendete Medien

Kulturmedium MCF-7, T47D	Kulturmedium MG-63	Kokultmedium	Kulturmedium hFOB 1.19
500 ml MEM-Medium (<i>Minimal Essential Medium</i>), mit Phenolrot (biowest, Riverside, MO, USA)	500 ml DMEM-Medium (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) mit Phenolrot, L-Glutamin (1 %) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	500 ml DMEM-Medium, ohne Phenolrot (Thermo Fisher Scientific)	500 ml DMEM/F12-Medium, ohne Phenolrot (Thermo Fisher Scientific)
50 ml FBS (<i>fetal bovine serum</i> ; Merck, Darmstadt, DE)		50 ml FBS <i>charcoal-stripped</i> (PAN-Biotech, Aidenbach, DE)	50 ml FBS
5 ml Penicillin - Streptomycin (Thermo Fisher Scientific)			
650 µl Insulin (50 IU) (Sanofi, Paris, FRA)		5 ml L-Glutamin	
500 µl Transferrin (Merck)			

Tabelle 5: verwendete Software

Software	Hersteller
AxioVision 3.1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
EndNote X8	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
Gen5 1.08	BIO-TEK, Winooski, VT, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Image Studio 4.0	Li-Cor, Lincoln, NE, USA
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
Powerpoint 2010	Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Das Arbeiten bzw. die Zellkultivierung fanden stets unter der Sicherheitswerkbank bei Verwendung von Einmalhandschuhen und nach Flächendesinfektion mit 70%igem Ethanol (Chemsolute, Rennigen, DE) statt. Bei den Gebrauchsmaterialien handelte es sich entweder um steriles Einmalmaterial oder Material, das sprühdesinfiziert oder abgeflammt wurde. Es wurde streng darauf geachtet, keine (Kreuz-)kontamination beider Zellreihen bzw. verwendeter Materialien oder der Flächen zu verursachen.

Alle Medien, Lösungen und Reagenzien wurden, falls notwendig, zwischen den Verwendungen entsprechend der jeweiligen Vorgaben (tief-)gekühlt. Wenn im Folgenden die Rede von Inkubieren ist, meint dies, falls nicht anders angegeben, eine wasserdampfgesättigte Umgebung mit 5 % CO₂ und 37 °C (34 °C bei hFOB1.19).

Alle Medien und das Trypsin wurden vor dem Zellkontakt im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.2.1.1 Lagerung und Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen in 10 ml des jeweiligen Kulturmediums (siehe Tab. 4) im Inkubator kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurde passagiert, dies fand etwa zweimal wöchentlich statt. Hierbei wurde der Überstand aus Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, PAN Biotech) gewaschen. Danach wurden die Zellen in 3 ml Trypsin (c.c pro GmbH, Oberdorla, DE) trypsiniert, mit 7 ml Kulturmedium resuspendiert und im gewünschten Verhältnis geteilt.

2.2.1.2 Einfrieren der Zellen

Nachdem die Zellen wie unter 2.2.1.2 angegeben trypsiniert worden waren, wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1300 rcf (*relative centrifugal force*) zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen (Nalgene, Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C in Kryokonservierungsboxen mit Isopropanol (Nalgene) langsam eingefroren und nachfolgend in flüssigen Stickstoff (-180 °C) umgelagert. Für das Einfriermedium wurden 75 % des jeweiligen Kulturmediums mit 20 % FCS und 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich/Merck) ergänzt.

2.2.1.3 Auftauen der Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, sofort tröpfchenweise in Kulturmedium überführt und inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums, um das restliche DMSO zu entfernen.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Um ein Experiment durchzuführen, wird eine jeweils definierte Zellzahl benötigt. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, einer Apparatur zur Bestimmung der Zellmenge in einer Suspension. Sie besteht aus einer Grund- und einer Deckplatte aus Glas, zwischen denen durch speziellen Schliff ersterer ein Raum definierten Volumens entsteht. Durch Zählen der Zellen innerhalb eines Zählrasters in diesem definierten Raum, kann auf die Gesamtmenge in der Lösung geschlossen werden. Das Prinzip, einen Raum bekannter Tiefe und mit Raster zu verwenden, geht auf A. Cramer zurück (1855), das noch heute verwendete Zählraster wurde von O. Neubauer publiziert (1924) (Museum Sybodo). Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm und die auszuzählende Fläche 4 mm². Mit folgender Formel wurde die Zellzahl in der Suspension bestimmt:

$$\text{Zellen je ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Verdünnung}} \times 10^4$$

Wird die errechnete Zellzahl pro ml durch die benötigte Zellzahl pro ml dividiert, ergibt sich ein Verdünnungsfaktor, durch den wiederum das für das Experiment benötigte Volumen geteilt wird. Hieraus lässt sich errechnen, welche Menge der Zellsuspension benötigt wird. Diese wird mit der entsprechenden Menge Medium ergänzt, sodass das benötigte Endvolumen der Zellsuspension mit der notwendigen Konzentration entsteht.

Nach Trypsinieren der Zellen wurde die Zellsuspension bei 1300 rcf 5 min zentrifugiert und das Pellet im jeweiligen Medium gelöst. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau (Merck) verdünnt und davon 10 µl mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der selektiv nur Zellen mit poröser Membran anfärbt, diese nicht vitalen Zellen können beim Zählen übersprungen werden.

2.2.2 Transiente Transfektion von siRNA (*small interfering ribonucleic acid*) mittels Lipofektion

Die transiente siRNA-Transfektion wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Girgert et al. 2012). Um zu analysieren, wie sich eine reduzierte RhoA-Expression auf das

Invasionsverhalten der Mammakarzinomzellen auswirkt, wurde durch eine transiente Transfektion eines Pools aus drei verschiedenen RhoA-spezifischen siRNAs (sc-44209, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) die RhoA-Expression reduziert. Als Kontrolle wurde eine nicht-spezifische Kontroll-siRNA (sc-37007, Santa Cruz Biotechnologies) verwendet, welche zu keiner Sequenz-spezifischen mRNA-Degradierung führt.

Die Zellen der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 bzw. T47D wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben passagiert, ausgezählt und schließlich 5×10^5 Zellen je 25 cm^2 -Zellkulturgefäß in 2 ml MEM (ohne Penicillin/Steptomycin) angesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 10 min in Opti-MEM I Transfektionsmedium (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. 4 μl der jeweiligen siRNA (10 μM) und des Transfektionsreagenz (sc-29528, Santa Cruz Biotechnologies) wurden jeweils in 100 μL Opti-MEM I Transfektionsmedium (Thermo Fisher Scientific) gelöst, zusammengefügt und für 45 min im Dunkeln bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Die Zellen wurden schließlich für 6 h mit dem Transfektionsgemisch und anschließend für weitere 18 h mit zusätzlich 1 ml MEM-Kulturmedium (ergänzt mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin) inkubiert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden Zellen mit einer Fluorescein-gekoppelten siRNA (sc-36869, Santa Cruz Biotechnologies) transient transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten fluoreszenzmikroskopisch überprüft

2.2.3 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) wie vom Hersteller angegeben verwendet. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h, 48 h und 120 h lysiert. Das Lysat wurde auf eine Siliziummembran-Säule gegeben, die selektiv RNA bindet. Durch mehrere Waschschrte mit unterschiedlichen Puffern wurde die RNA aufgereinigt und zum Schluss mit 30 μL Nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.2.4 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer gemessen, das die Absorption der Probe bei 260 nm misst. Anhand dieser Absorption wurde mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors die RNA-Konzentration berechnet. Bei einer Absorption von 1 und der Schichtdicke der Küvette von 1 cm gilt für RNA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Messung bei 260 nm erlaubt eine Aussage bezüglich der Quantität. Da jedoch viele andere organische Substanzen (Proteine, Kohlenhydrate usw.) in ähnlichen Bereichen wie RNA Licht absorbieren, kann eine Verunreinigung anhand dieses Wertes nicht ausgeschlossen werden. Durch eine Messung bei 230 nm (Absorption durch organische Substanzen) und 280 nm (Absorption durch Proteine

und Phenole) kann die Qualität der Probe besser beurteilt werden, indem diese Messwerte zu den Messwerten bei einer Absorption von 260 nm ins Verhältnis gesetzt werden (Held 2006).

2.2.5 cDNA - (*complementary DNA*-) Synthese

Für die Reverse Transkription wurde das QuantiNova Reverse Transcription Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. 2 µg der zuvor isolierten RNA (siehe 2.2.3) wurden in 13 µL Nuklease-freien Wassers für die cDNA-Synthese verdünnt. Eine interne Kontrolle (QNIC, Qiagen) wurde angewandt, um eine mögliche Inhibierung der reversen Transkription zu detektieren. Der RNA wurden 2 µL DNase Removal Mix (Qiagen) hinzugegeben und bei 45 °C für 2 min im Thermocycler inkubiert, um genomische DNA zu entfernen. Anschließend wurde den Proben 5 µL Mastermix hinzugefügt, der die Reverse Transkriptase und einen Mix aus Primern enthält, und für 3 min bei 25 °C (Anlagerung der Primer), 10 min bei 45 °C (Reverse Transkription) und 5 min bei 85 °C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase) inkubiert.

2.2.6 real-time PCR (*polymerase chain reaction*)

Für die real-time PCR wurde das Qiagen QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zuvor wie unter 2.2.5 angegeben umgeschriebene cDNA wurde mit Nuklease-freien Wasser und QuantiNova Yellow Template Diluting Buffer auf eine Konzentration von 0,0125 µg/µl verdünnt. Es wurden jeweils 16 µl des Mastermixes, welcher die mRNA-spezifischen Primer (siehe Tab. 6) für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), RhoA oder die interne Kontrolle enthält mit 4 µl cDNA versetzt, die 96-Well Platte verklebt und bei 1500 rcf für 3 min zentrifugiert. Schließlich folgte die PCR mit einem Zyklus bei 95 °C für 120 s (Polymerase-Aktivierung), 40 Zyklen bei 95 °C für 5 s und 58-62 °C für 10 s (Denaturierung, Primer-Anlagerung, Elongation) und die Schmelzkurvenanalyse bei 60-95 °C für 6 s. Bei Letzterer wird die Temperatur schrittweise erhöht, wodurch zum einen die spezifische Schmelztemperatur des PCR-Produktes detektiert wird und zum anderen unspezifische Nebenprodukte erkannt werden können, deren Schmelztemperatur sich von der gesuchten amplifizierten DNA unterscheidet.

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für die real-time PCR

Gen	Sequenz
RhoA	for 5': CAAGGACCAGTTCCCAGAGG rev 5': TGTCCCACAAAGCCAACTCT
GAPDH_2	for 5': GAAGGTCGGAGTCAACGGAT rev 5': TGGAATTTGCCATGGGTGGA

2.2.7 Proteinisolation

Aus den wie unter 2.2.2 beschrieben transient transfizierten Zellen wurden nach 24 h und 120 h die Proteine isoliert. Nach Absaugen des Mediums wurden 2 ml PBS-EDTA (0,2 % w/v) hinzugefügt. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von ihrer Unterlage abgelöst, die Zellsuspension aufgenommen und die Kulturflasche mit 3 ml PBS gespült, welches daraufhin ebenfalls aufgenommen wurde. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1300 rcf zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 30 µl Lysepuffer resuspendiert. Der Lysepuffer besteht aus Cellyse M (Sigma-Aldrich/Merck) ergänzt mit 0,01 % Protease Inhibitor 100 x (Sigma-Aldrich/Merck) und 0,01 % Phosphatase Inhibitor (Sigma-Aldrich/Merck).

2.2.8 Bradford-Assay

Die Messung der Proteinkonzentration erfolge nach dem von M. Bradford 1976 publizierten Prinzip (Bradford 1976). Die Proteine wurden wie unter 2.2.7 beschrieben isoliert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut und 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden 5 µl der Proteinlösung aus dem Überstand mit 45 µl ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) verdünnt. Der restliche Überstand wurde 1:2 mit Laemli-Puffer versetzt, der aus 5 ml Ampuwa + 5 ml *LDS Sample Buffer* (4x) (Thermo Fisher Scientific) + 1 ml *Sample Reducing Agent* (10x) (Thermo Fisher Scientific) besteht. Es wurden 10 µl jeder verdünnten Proteinprobe und der Standardreihe (siehe Tab. 7) in Doppelbestimmung aufgetragen. Pro 96-Well wurden 200 µl BioRAD-Lösung (4 ml Ampuwa + 1 ml *Protein Assay Dye Reagent Concentrate*; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) hinzugefügt und diese 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm mittels des BioTek Synergy HT ausgelesen. Die BioRad-Lösung enthält den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau, der mit Proteinen blaue Komplexe bildet, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm besitzen. Die absolute Absorption ist proportional zur

Konzentration der Proteinlösung. Im Vergleich zu den Standardlösungen mit bekannter Konzentration, mit Hilfe deren Anstiegs eine lineare Regression gebildet wurde, konnte somit die Konzentration der gemessenen Lösungen ermittelt werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Standardreihe für eine lineare Regression

Konz. (mg/ml) (Verdünnung)	BSA (<i>bovine serum albumin</i>)- Stammlösung (µl)	PBS (µl)
1 (1:10)	100	900
0,75 (1:13,33)	75	925
0,5 (1:20)	50	950
0,25 (1:40)	25	975
0,1 (1:100)	10	990

2.2.9 SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Mit Hilfe der SDS-Page werden Proteine innerhalb eines elektrischen Feldes ihrer Größe bzw. Kettenlänge nach aufgetrennt, nachdem sie durch Hitze denaturiert wurden. Diese Methode wurde 1970 von U. Laemmli publiziert (Laemmli 1970). Die Auftrennung erfolgt innerhalb eines Polyacrylamid-Gels nach Beladung mit SDS. Letzteres sorgt für eine gleichmäßig negative Ladung, sodass die Eigenladung der Proteine bei der Auftrennung vernachlässigt werden kann. Kürzere Proteinketten wandern im Gel weiter als längere. Die für die SDS-Page benötigte Apparatur (Kammer und Stromquelle) wurde nach Herstellerangaben aufgebaut. Sammel- sowie Trenngel wurden wie in Tab. 8 beschrieben gegossen.

Tabelle 8: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

Trenngel (Menge für 2 Gele) 7,5 %	Sammelgel (Menge für 2 Gele) 4,8 %
Acrylamid (30 %; Lonza, Rockland, ME) 2,3 ml	Acrylamid (30 %) 0,75 ml
TRIS (Trishydroxymethyl-aminomethan; pH 8,8) 2,8 ml	TRIS (pH 6,8) 1,9 ml
SDS (10 %; Sigma-Aldrich/Merck) 110 µl	SDS (10 %) 75 µl

Trenngel (Menge für 2 Gele) 7,5 %	Sammelgel (Menge für 2 Gele) 4,8 %
H ₂ O 5,7 ml	H ₂ O 5 ml
TEMED 20 µl (Tetramethylethylenediamine; Carl Roth, Karlsruhe, DE)	TEMED 22 µl
APS (10 %) 37 µl (Ammoniumpersulfat; Merck)	APS (10 %) 37 µl

Die Proteinproben wurden bei 95 °C unter Schütteln im Thermomixer für 5 min denaturiert, zentrifugiert, aufgetragen und die Gel-Elektrophorese mit Elektrophoresepuffer (100 ml 10x Elphopuffer + 400 ml ddH₂O + 5 ml SDS 10 %; 10x Elphopuffer = 15,1 g Tris + 72 g Glycin + 1000 ml ddH₂O) für 30 min mit 80 V, gefolgt von 45 min mit 100 V durchgeführt.

2.2.10 Western Blot

Die Methode des Western Blot wurde 1979 von W. Burnette entwickelt (Burnette 1981). Die während der SDS-Elektrophorese aufgetrennten Proteine werden durch einen senkrecht zum Gel ausgerichteten elektrischen Fluss auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran übertragen. Die PVDF-Membran (Merck) wurde 20 s in Methanol aktiviert, nachfolgend wurden im wet Blotverfahren bei 100 V für 60 min mit Transferpuffer (3,03 g Tris + 14,41 g Glycin + 100 ml Methanol 20 % + 1000 ml ddH₂O.) die Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zunächst 10 min in TBST-Puffer (*Tris-buffered saline with Tween20*; 100 ml 10x TBS + 10 ml Tween20 10 %; 10x TBS = 80 g NaCl + 2 g KCL + 30 g Trisbase + HCl bis pH 7,4 + 1000 ml ddH₂O) gewaschen, daraufhin wurden für 1 h unspezifische Bindungen mit TBST + 5 % Magermilchpulver blockiert. Danach wurde die Membran für 5 min in TBST gewaschen und über Nacht unter Schwenken bei 4 °C mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 9), verdünnt in TBST, inkubiert. Die Membran wurde dreifach für 10 min in TBST gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe Tab. 10), verdünnt in TBST, für 1 h bei RT erfolgte. Die Membran wurde dreifach für 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mittels Chemilumineszenz-Lösung (Westar Supernova, Cyanagen, Bologna, ITA) auf dem Li-Cor Digit Blot-Scanner mit dem Programm Image Studio® die Intensität der spezifischen Antikörperbindung an das Protein ermittelt. Die Intensität der detektierten Banden wurde mittels Image Studio® quantifiziert und in Verhältnis zu der Intensität des Referenzproteins (GAPDH) gesetzt. Für eine wiederholte Anwendung wurde die Membran für 1 min in *Stripping Buffer* (Interchim,

Montluçon, FRA) inkubiert, um die Antikörperbindung zu lösen.

Tabelle 9: verwendete Primärantikörper für die Western-Blot-Analyse

Primärantikörper	Herkunft	Hersteller
RhoA	Mouse	Cytoskeleton, Denver, CO, USA
GAPDH	Rabbit	Chemicon/Merck

Tabelle 10: verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Herkunft	Hersteller
NA931 (RhoA)	Sheep	Healthcare Life Sciences. Buckinghamshire, UK
NA 9340 (GAPDH)	Donkey	

2.2.11 Proliferationsassay

Um zu analysieren, ob eine veränderte RhoA-Expression Einfluss auf die Proliferation von Mammakarzinomzellen hat, wurden die Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben transient transfiziert. Anschließend wurden nach 48 h und 120 h die Zellen trypsiniert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.4 beschrieben gezählt. Die ermittelte Zellzahl nach transients Transfektion mit einer RhoA-spezifischen siRNA wurde gegen die Zellzahl nach transients Transfektion mit einer unspezifischen siRNA-Kontrolle normalisiert.

2.2.12 Invasionsassay

Um zu prüfen, ob eine verringerte RhoA-Expression das Invasionsverhalten der Tumorzellen verändert, wurden die Mammakarzinomzellen mit Osteoblasten- (hFOB 1.19) bzw. Osteosarkomzellen (MG-63) in einer modifizierten Boyden-Kammer kokultiviert. Dieses Prinzip wurde von v. Alten et al. beschrieben (2006). Die Mammakarzinomzellen wurden zunächst wie unter 2.2.2 beschrieben transient transfiziert. Die Inserts (oberes Well) wurden für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 30 µL eines Gemischs aus Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) beschichtet (Matrigel 1:2 verdünnt in phenolrot-freien DMEM). Es wurden 1 x 10⁴ Mammakarzinomzellen in den Inserts und 2,5 x 10⁴ Osteoblasten-/Osteosarkomzellen in den Wells angesät, jeweils in Kokulturmedium. Nach 24 h wurden die

Inserts mit den Mammakarzinomzellen in die Wells mit den Osteoblasten-/Osteosarkomzellen umgesetzt und für 96 h kokultiviert.

Die invadierten Mammakarzinomzellen wurden mittels Hämalanfärbung nach Brömer (1965) gefärbt. Hierfür wurden die Inserts für 5 min bei RT mit DPBS gewaschen, es folgte ein Spülen mit Aqua dest. und eine Fixierung der Mammakarzinomzellen im Insert für 10 min bei RT mit Methanol. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua dest. gespült und die fixierten Mammakarzinomzellen mit Hämalanlösung (Merck) für 5 min bei RT inkubiert. Das enthaltene Hämatoxylin ist positiv geladen und bindet daher an die negativ geladenen Nukleinsäuren, sodass die Zellkerne gefärbt wurden und die Zellen bei der späteren Auszählung gut zu erkennen waren. Die Inserts wurden mit Aqua dest., Leitungswasser und nochmalig Aqua dest. gespült und anschließend die obere Schicht des Inserts (nicht invadierte Mammakarzinomzellen) mit einem Celluron-Stieltupfer (Hartmann, Wiener Neudorf, AUT) entfernt. Die Inserts wurden ausgestanzt und mit Aquatex (Merck) eingedeckelt. Die invadierten Mammakarzinomzellen auf der unteren Seite des Inserts konnten daraufhin in vier zufällig gewählten Bereichen des Inserts ausgezählt und die Anzahl nach Behandlung mit RhoA-siRNA mit der Kontrolle verglichen werden.

2.2.13 Nachweis F-Aktin

Um zu prüfen, ob eine verringerte RhoA-Expression die Fähigkeit vermindert, durch eine Rho-Aktivierung (Zugabe FCS) Aktinfasern zu polymerisieren, wurde die Bildung von F-Aktin durch Fluometrie und Immunfluoreszenz analysiert. Die Deckgläschen (Thermo Fisher Scientific) für die Immunfluoreszenz wurden zunächst autoklaviert und mit 500 µl Poly-D-Lysin-Lösung (Merck) unter Schütteln (200/min) bei RT für 20 min beschichtet. Darauffolgend wurde sie dreimal mit 500 µl DPBS gewaschen. Es folgte eine Trocknung der Deckgläschen unter der Zellkulturbank für mindestens 2 h.

Die am Tag zuvor wie unter 2.2.2 transient transfizierten Mammakarzinomzellen wurden trypsiniert und in Kulturmedium resuspendiert. Pro Well für die Fluometrie / Deckgläschen für die Immunfluoreszenz wurden 2×10^4 Mammakarzinomzellen angesät. Es folgte ein Anwachsen der Zellen für 24 h im Inkubator und daraufhin ein Mediumwechsel in Kulturmedium ohne FCS für weitere 24 h.

Es folgt eine Zugabe von Kulturmedium für 5 min, wobei das hier enthaltene FCS (10 %) eine bis zu 6-fache Rho-Aktivierung und folglich Stressfaserbildung zur Folge hat. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, 500 µl 3,7%iges Formaldehyd (Merck) in jedes Well pipettiert (Fixierung) und 30 min bei RT inkubiert. Die fixierten Zellen wurden mit

Fluoreszenzfärbelösung, bestehend aus DPBS mit 2 % BSA (Carl Roth) und 0,25 % Triton X-100 (Merck), gewaschen und permeabilisiert.

Zum Anfärben des F-Aktins für die fluometrische Messung wurden die fixierten Zellen für 1 h mit 2 µg/ml Phalloidin-TRITC (Sigma Aldrich/Merck) inkubiert. Im Anschluss wurden alle Wells jeweils zweifach mit 500 µl Fluoreszenzlösung und 500 µl DPBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Wells mit 500 µl Methanol befüllt, um den Fluoreszenzfarbstoff zu extrahieren, und 1 h im Dunklen bei RT inkubiert. Es folgte die Messung der Fluoreszenzsignale bei einer Extinktion von 530 nm und einer Emission von 590 nm mit Hilfe des Synergy HT Microplate Readers und dem Programm Gen5® 1.08. Die Intensität der Fluoreszenz nach verminderter RhoA-Expression wurde mit der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Die Deckgläschen für den Nachweis der Immunfluoreszenz unter dem Mikroskop wurden nach der Fixierung durch Formaldehyd 1 h im Dunkeln bei RT mit Phalloidin-TRITC und DAPI (1µg/ml; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) in Fluoreszenzfärbelösung inkubiert. DAPI dient der Färbung der Zellkerne. Nach dem letzten Waschschrift der Färbung (2 x 500 µl Fluoreszenzlösung, 2 x 500 µl PBS) wurden die Deckgläschen für den mikroskopischen Fluoreszenznachweis in einem Tropfen Prolong Diamond Antifade (Thermo Fisher Scientific) auf einem Objektträger eingedeckelt. Für 24 h trockneten die Objektträger bei 4 °C. Mit dem Immersionsmikroskop wurden die Zellen fotografiert, um das F-Aktin qualitativ darzustellen.

2.2.14 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism® 7.0 für Windows genutzt. Hierbei wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt, wobei ein $p < 0,05$ als signifikant gewertet wurde. Jeder Versuch im Rahmen dieser Arbeit wurde unabhängig mindestens drei Mal mit unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des RhoA-*knockdowns*

siRNAs führen zu einem spezifischen *knockdown* des jeweiligen Gens durch Degradation der mRNA (*RNA-interference*) (Fire et al. 1998), in unserem Fall zu einem *knockdown* von RhoA. Um die Eigenschaften der bezüglich der RhoA-Expression veränderten Zellen untersuchen zu können, muss sichergestellt sein, dass RhoA tatsächlich ausreichend herunterreguliert worden ist. Daher wurde nach der Transfektion von RhoA-siRNA in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D zu den Zeitpunkten t_0 , t_{48} und t_{120} die Expression der RhoA-mRNA mit RT-qPCR quantifiziert und zu den Zeitpunkten t_{24} und t_{120} die Expression von RhoA auf Proteinebene mit Hilfe von Western Blot analysiert. Die siRNA wurde mit Hilfe von Lipofektion in die Zellen transfiziert (Felgner et al. 1987). Die Effizienz der Transfektion hängt von den jeweiligen Bedingungen ab; es können sich unbemerkt Probleme bei der Aufnahme der siRNA ergeben. Daher wurden parallel zur Transfektion der RhoA-siRNA Zellen mit einer Fluorescein-gekoppelten siRNA transient transfiziert und der Erfolg der Transfektion zu den Zeitpunkten t_0 , t_{48} und t_{120} fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

3.1.1 Nachweis des RhoA-*knockdowns* bei MCF-7

Bei MCF-7 zeigte sich zu allen drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) eine Reduktion der RhoA-mRNA in den mit RhoA-siRNA transient transfizierten Zellen (siehe Abb. 1 A). Zum Zeitpunkt t_0 nach Transfektion war diese Reduktion signifikant ($55,6 \pm 0,1275$ % SEM, $p = 0,0083$, $n = 5$), ebenfalls zum Zeitpunkt t_{120} ($90 \pm 0,02689$ % SEM, $p = 0,0137$, $n = 3$). Die Analyse der Proteinexpression mit Hilfe von Western Blot ergab bei MCF-7 sowohl zum Zeitpunkt t_{24} als auch zum Zeitpunkt t_{120} nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA eine reduzierte Expression von RhoA (Abb. 1 B). Zum Zeitpunkt t_{120} war diese signifikant ($36 \pm 10,58$ %, $p = 0,0003$, $n = 5$).

3.1.2 Nachweis des RhoA-*knockdowns* bei T47D

Bei T47D zeigte sich zu allen drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) eine Reduktion der RhoA-mRNA in den mit RhoA-siRNA transient transfizierten Zellen (siehe Abb. 2 A). Zum Zeitpunkt t_0 war diese Reduktion signifikant ($45,5 \pm 0,1097$ % SEM, $p = 0,0025$), ebenfalls zum Zeitpunkt t_{120} ($62 \pm 0,1255$ % SEM, $p = 0,0192$). Die Analyse der

Proteinexpression mit Hilfe von Western Blot ergab bei T47D sowohl zum Zeitpunkt t_{24} als auch zum Zeitpunkt t_{120} nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA eine reduzierte Expression von RhoA (Abb. 2 B). Zum Zeitpunkt t_{120} war diese signifikant ($62,2 \pm 15,63 \%$, $p = 0,042$, $n = 5$).

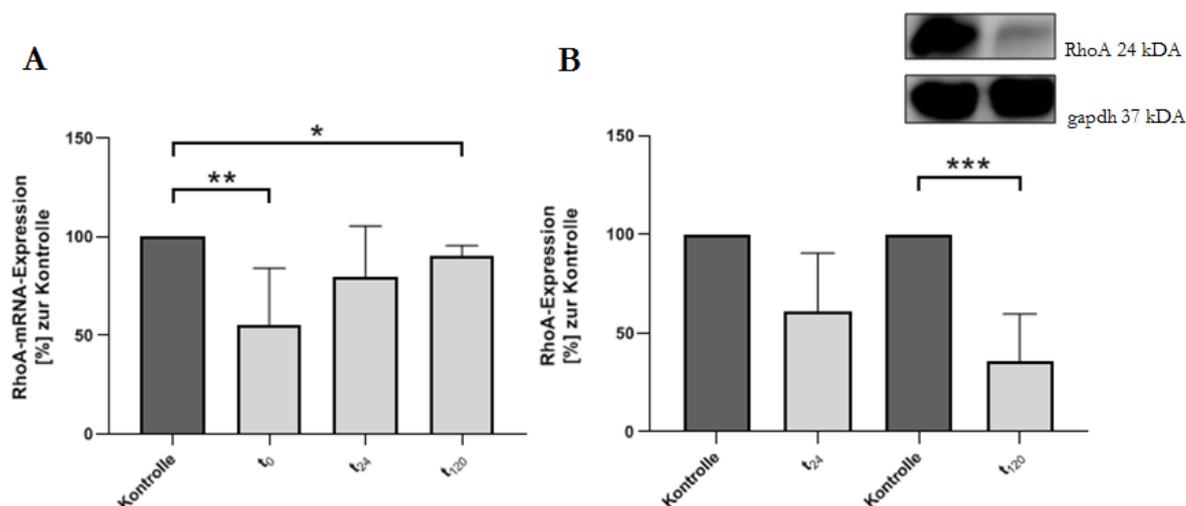


Abbildung 1: Nachweis der RhoA-Expression in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in [%] zur Kontrolle nach RhoA-knockdown durch transiente Transfektion von RhoA-siRNA. Anhand von RT-qPCR wurde die Expression der RhoA-mRNA zu den Zeitpunkten t_0 , t_{24} und t_{120} nach Transfektion analysiert (A). Mit Western Blot wurde die Menge von RhoA nach Transfektion zu den Zeitpunkten t_{24} und t_{120} bestimmt (B). Angegeben sind MW \pm SEM für $n = 3-5$. Die Signifikanz wurde mit t-Test (ungepaart) bestimmt. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,005$.

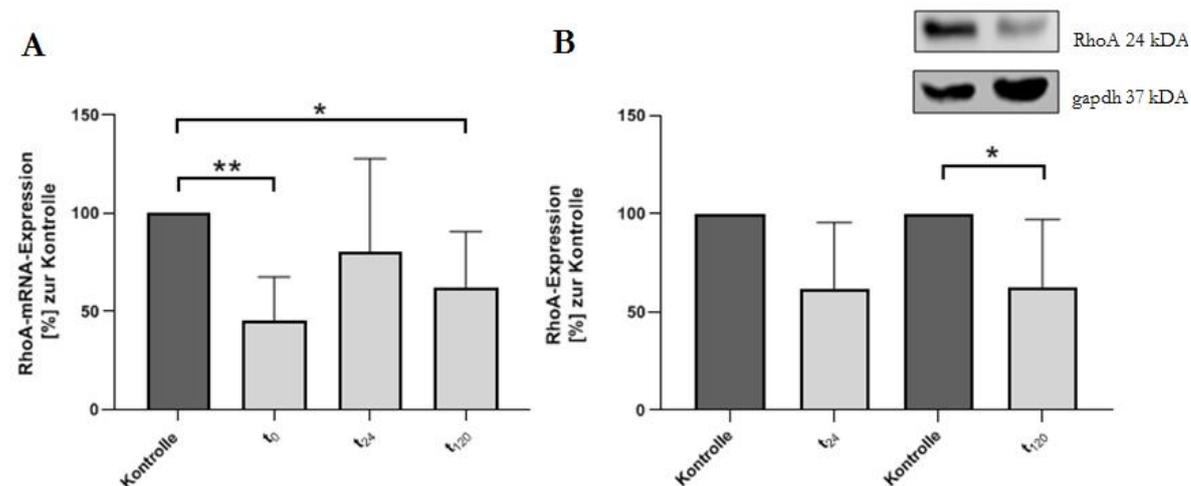


Abbildung 2: Nachweis der RhoA-Expression in der Mammakarzinomzelllinie T47D in [%] zur Kontrolle nach RhoA-knockdown durch transiente Transfektion von RhoA-siRNA. Anhand von RT-qPCR wurde die Expression der RhoA-mRNA zu den Zeitpunkten t_0 , t_{24} und t_{120} nach Transfektion analysiert (A). Mit Western Blot wurde die Menge von RhoA nach Transfektion zu den Zeitpunkten t_{24} und t_{120} bestimmt (B). Angegeben sind MW \pm SEM für $n = 3-5$. Die Signifikanz wurde mit t-Test (ungepaart) bestimmt. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

3.2 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf das Invasionsverhalten von MCF-7 und T47D in Kokultur

Vega et al. (2011) konnten zeigen, dass in der hochinvasiven Mammakarzinomzelllinie MDA-B-231 eine Reduktion der RhoA-Aktivität zu einer Zunahme invasiver Zellen führt. Aguilar-Rojas et al. (2012) wiesen zudem nach, dass eine Steigerung der RhoA-Aktivität bei MDA-MB-231 zu einer reduzierten Invasion führt. Andere jedoch weisen RhoA eine onkogene Rolle zu. Di Wu et al. (2009) beispielsweise sind der Meinung, dass die Aktivierung von RhoA in der Zelllinie MDA-MB-231 für deren hohe Invasivität verantwortlich ist. Auch Pillé et al. (2005) sehen RhoA als wichtigen Faktor bezüglich der Invasivität von MDA-MB-231, da bei ihrer Untersuchung nach RhoA-*knockdown* in dieser Zelllinie die Invasion durch Matrigel abnahm. Um zu klären, inwiefern sich die bisherigen Erkenntnisse auf wenig invasive Mammakarzinomzellen übertragen lassen, wurde das Invasionsverhalten in den beiden gering invasiven Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D nach RhoA-*knockdown* analysiert. Hierfür wurden sie getrennt durch eine künstliche Basalmembran aus Matrigel für 96 h im etablierten Kokultursystem mit Osteoblasten (hFOB 1.19) bzw. Osteosarkomzellen (MG-63) kultiviert. Von Alten et al. (2006) konnten eine gesteigerte Invasionsneigung von mit primären Osteoblasten (hOB) bzw. MG-63 kokultivierten Mammakarzinomzellen nachweisen. Da Mammakarzinomzellen primär in den Knochen metastasieren, eignen sich Zellen knöchernen Ursprungs sehr gut für ein *In-vitro*-Modell der Invasion.

3.2.1 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf das Invasionsverhalten von MCF-7 in Kokultur

Bei MCF-7 zeigte sich in der Kokultur mit MG-63 eine signifikante Zunahme der Anzahl invasiver Zellen durch die künstliche Basalmembran nach RhoA-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle ($123,1 \pm 11,01$ % SEM, $p = 0,0432$, $n = 18$) (siehe Abb. 3 A).

In der Kokultur von MCF-7 mit hFOB 1.19 zeigte sich keine signifikante Veränderung der Anzahl invasiver Zellen durch die künstliche Basalmembran nach RhoA-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 4 A).

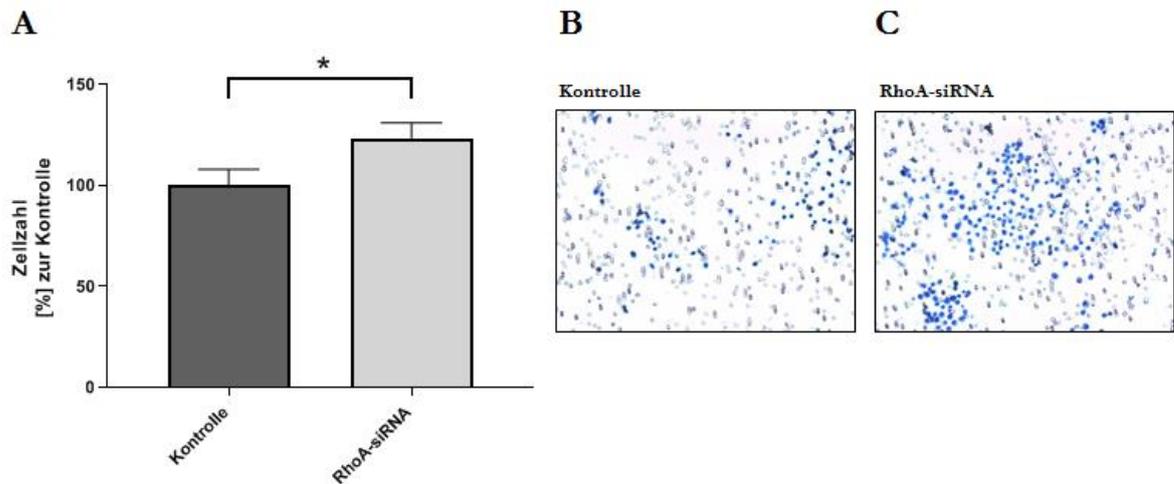


Abbildung 3: Einfluss des RhoA-Knockdowns auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 96-stündiger Kokultur mit MG-63. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden die Mammakarzinomzellen mit MG-63 getrennt durch eine künstliche Basalmembran aus Matrigel® kokultiviert. Dargestellt ist die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) (A). Angegeben ist MW \pm SEM für n = 18. Die Signifikanz wurde mit t-Test (ungepaart) bestimmt. (*) p < 0,05. Invasive Zellen nach Behandlung mit siRNA-Kontrolle (B) und nach RhoA-Knockdown (C). Vergrößerung 10-fach.

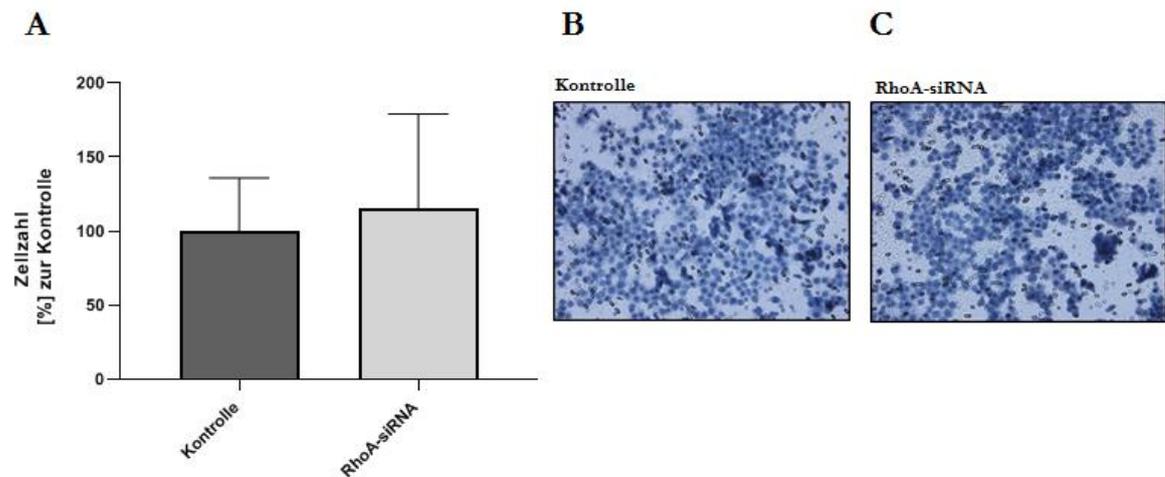


Abbildung 4: Einfluss des RhoA-Knockdowns auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 96-stündiger Kokultur mit hFOB 1.19. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden die Mammakarzinomzellen mit hFOB 1.19 getrennt durch eine künstliche Basalmembran aus Matrigel® kokultiviert. Dargestellt ist die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) (A). Angegeben ist MW \pm SEM für n = 24. Es wurde ein t-Test (ungepaart) durchgeführt. Invasive Zellen nach Behandlung mit siRNA-Kontrolle (B) und nach RhoA-Knockdown (C). Vergrößerung 10-fach.

3.2.2 Einfluss des RhoA-Knockdowns auf das Invasionsverhalten von T47D in Kokultur

Bei T47D zeigte sich in der Kokultur mit MG-63 kein signifikanter Effekt ($105,5 \pm 8,366$ % SEM, p = 0,5139, n = 24), jedoch ein Trend zur Zunahme der Invasion (siehe Abb. 5 A).

Auch in der Kokultur mit hFOB 1.19 zeigte sich bei T17D keine signifikante Veränderung der Anzahl invasiver Zellen durch die künstliche Basalmembran nach *RhoA-knockdown* im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 6 A).

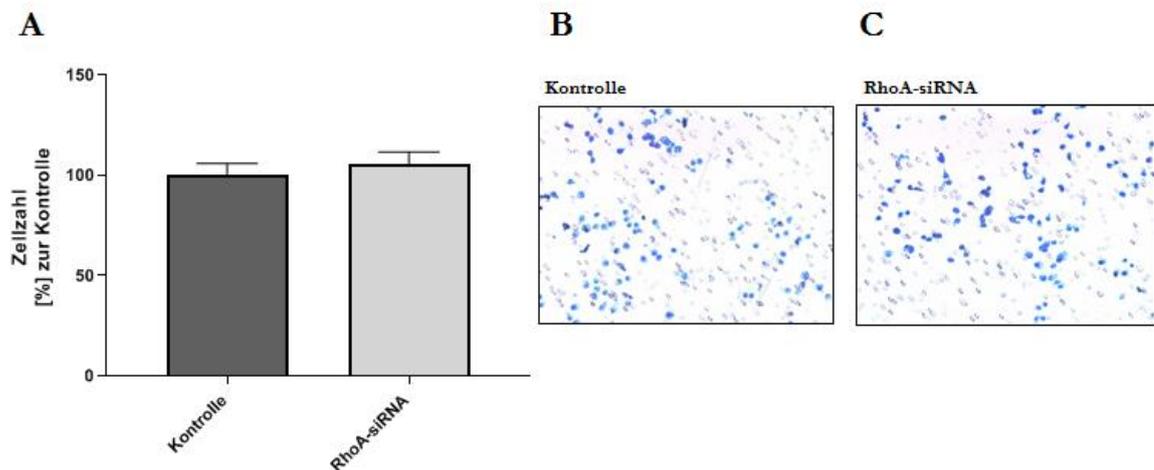


Abbildung 5: Einfluss des *RhoA-knockdowns* auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie T47D nach 96-stündiger Kokultur mit MG-63. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden die Mammakarzinomzellen mit MG-63 getrennt durch eine künstliche Basalmembran aus Matrigel® kokultiviert. Dargestellt ist die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) (A). Angegeben ist MW \pm SEM für n = 24. Es wurde ein t-Test (ungepaart) durchgeführt. Invasive Zellen nach Behandlung mit siRNA-Kontrolle (B) und nach *RhoA-knockdown* (C). Vergrößerung 10-fach.

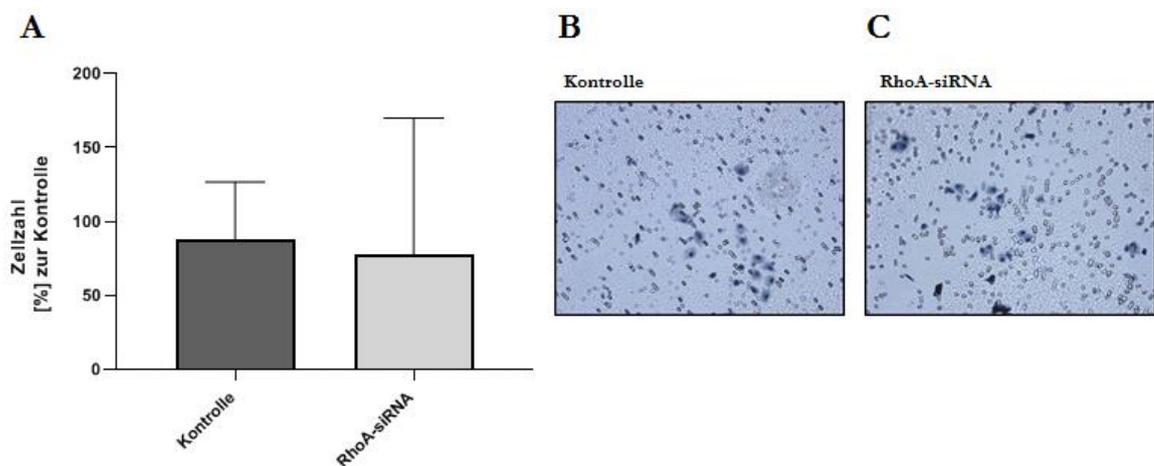


Abbildung 6: Einfluss des *RhoA-knockdowns* auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie T47D nach 96-stündiger Kokultur mit hFOB 1.17. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden die Mammakarzinomzellen mit hFOB 1.17 getrennt durch eine künstliche Basalmembran aus Matrigel® kokultiviert. Dargestellt ist die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) (A). Angegeben ist MW \pm SEM für n = 24. Es wurde ein t-Test (ungepaart) durchgeführt. Invasive Zellen nach Behandlung mit siRNA-Kontrolle (B) und nach *RhoA-knockdown* (C). Vergrößerung 10-fach.

3.3 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf das Invasionsverhalten von MCF-7 in Monokultur

Um auszuschließen, dass in der Kokultur mit MG-63 ein vom RhoA-*knockdown* unabhängiger zelllinienspezifischer Effekt aufgetreten ist, führten wir im Anschluss an die Versuche mit Kokultur ein Invasionsassay mit Monokultur durch. Zellen der Zelllinie MCF-7 wurden durch Matrigel von FCS als einzigen Stimulus getrennt für 96 h kultiviert.

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl invasiver Zellen durch die künstliche Basalmembran nach RhoA-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle ($176,7 \pm 27,17$ % SEM, $p = 0,0079$, $n = 18$) (siehe Abb. 7 A).

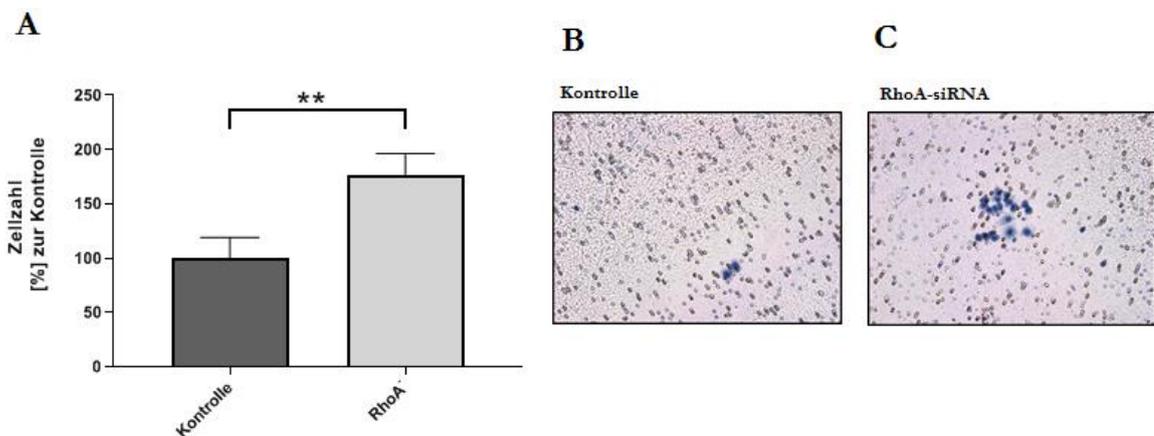


Abbildung 7: Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf die Invasion der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 96-stündiger Monokultur. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden die Mammakarzinomzellen von FCS getrennt durch eine künstliche Basalmembran aus Matrigel® monokultiviert. Dargestellt ist die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) (A). Angegeben ist MW \pm SEM für $n = 18$. Die Signifikanz wurde mit t-Test (ungepaart) bestimmt. (**) $p < 0,01$. Invasive Zellen nach Behandlung mit siRNA-Kontrolle (B) und nach RhoA-*knockdown* (C). Vergrößerung 10-fach.

3.4 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf das Proliferationsverhalten von MCF-7 und T47D

Die Invasionsassays allein erlauben keine sichere Aussage darüber, ob die Zunahme invasiver Zellen durch die künstliche Basalmembran tatsächlich auf eine Zunahme der Invasivität zurückzuführen ist. Eine Zunahme der Proliferation nach RhoA-*knockdown* könnte eine Zunahme der Invasion vortäuschen. Um auszuschließen, dass der *knockdown* von RhoA Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D hat, wurde 48 sowie 120 h nach transienter Transfektion der siRNA eine Proliferationsanalyse durchgeführt.

3.4.1 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf das Proliferationsverhalten von MCF-7

Bei MCF-7 zeigte sich sowohl nach 48 h als auch nach 120 h kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle (=100 %) (siehe Abb. 8).

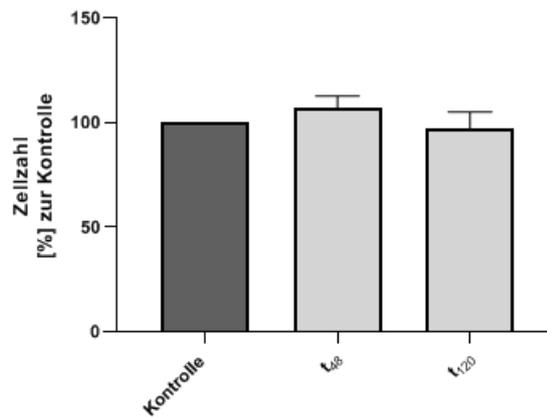


Abbildung 8: Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden die Zellen zu den Zeitpunkten t₄₈ und t₁₂₀ ausgezählt und mit der Kontrolle (= 100 %) verglichen. Angegeben sind MW ± SEM für n = 4. Es wurde ein t-Test (ungepaart) durchgeführt.

3.4.2 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf das Proliferationsverhalten von T47D

Auch bei T47D zeigte sich sowohl nach 48 h als auch nach 120 h kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle (=100 %) (siehe Abb. 9).

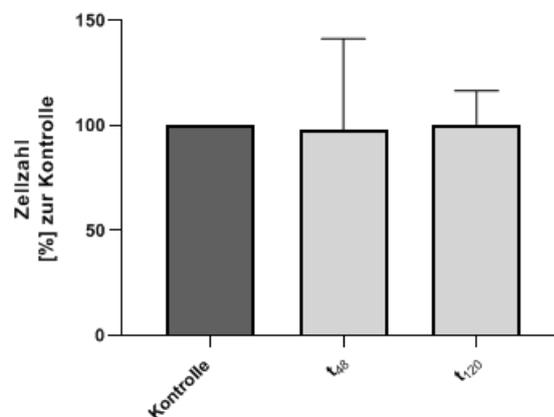


Abbildung 9: Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie T47D. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden die Zellen zu den Zeitpunkten t₄₈ und t₁₂₀ ausgezählt und mit der Kontrolle (= 100 %) verglichen. Angegeben sind MW ± SEM für n = 4. Es wurde ein t-Test (ungepaart) durchgeführt.

3.5 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf die Bildung von F-Aktin

Wir konnten zeigen, dass durch RhoA-*knockdown* in der wenig invasiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 die Invasionsneigung zunimmt. Obwohl bei T47D keine signifikante Zunahme der Invasion zu beobachten war, konnte auch hier ein entsprechender Trend erkannt werden. RhoA ist an der Bildung von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen und hierdurch an der Haftung der Zellen an ihrem Substrat beteiligt (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996; Ridley und Hall 1992). Aguilar-Rojas et al. zeigten, dass in der hochinvasiven Zelllinie MDA-MB-231 eine Zunahme der RhoA-Aktivität zu einer gesteigerten Bildung von Stressfasern und verstärkter Adhäsion führte. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob nach RhoA-*knockdown* die Zunahme der Invasion bei MCF-7 bzw. der entsprechende Trend bei T47D auf eine Abnahme Fokaler Adhäsionen bzw. des F-Aktins als Korrelat der Stressfaserbildung zurückzuführen ist. Um zu prüfen, ob eine verringerte RhoA-Expression die Fähigkeit vermindert, durch Polymerisierung von Aktin Stressfasern zu bilden, wurde in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D die Bildung von F-Aktin durch Fluometrie und Immunfluoreszenz analysiert.

3.5.1 Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf die Bildung von F-Aktin bei MCF-7

Die quantitative Bestimmung des F-Aktins mithilfe der Fluometrie zeigte bei MCF-7 eine signifikante Abnahme des F-Aktins in den mit RhoA-siRNA transient transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) ($49 \pm 19,71$ % SEM, $p = 0,0412$, $n = 4$) (siehe Abb. 10).

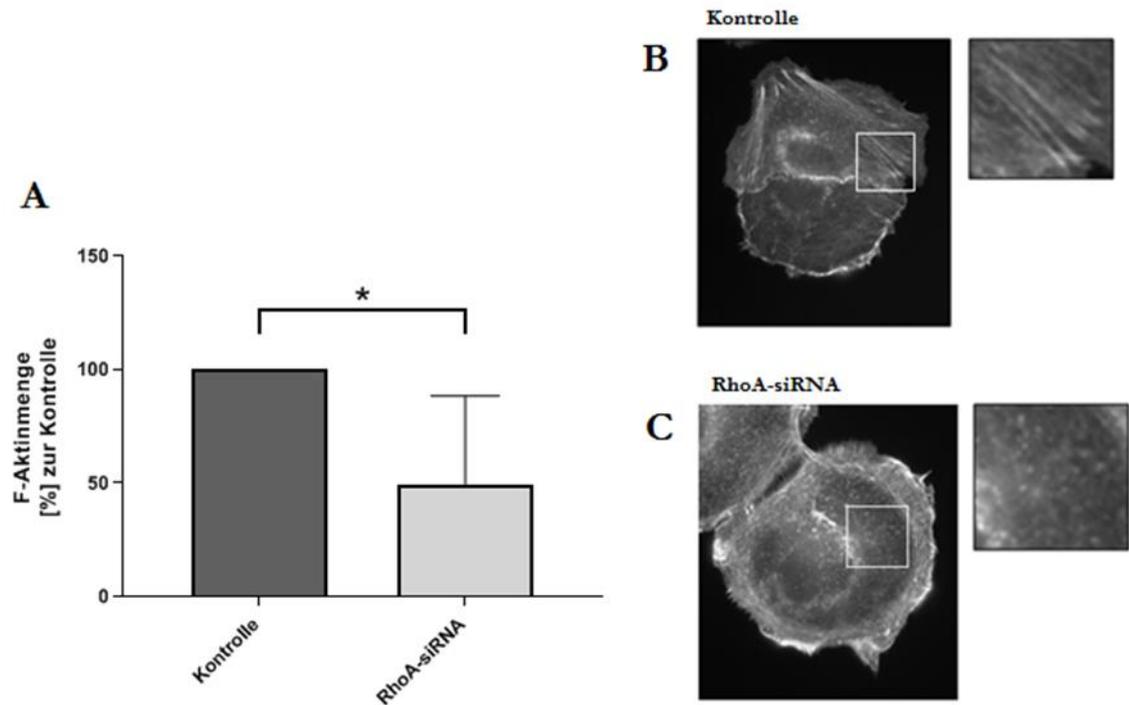


Abbildung 10: Einfluss des RhoA-knockdowns auf die Bildung von F-Aktin in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden in den Mammakarzinomzellen die Polymerisierung von F-Aktin provoziert und die Menge des gebildeten F-Aktins fluometrisch quantifiziert (A). Angegeben ist MW \pm SEM für n = 4. Die Signifikanz wurde mit t-Test (ungepaart) bestimmt. (*) p < 0,05. Immersionsmikroskopische Darstellung des F-Aktins nach Behandlung mit siRNA-Kontrolle (B) und nach RhoA-knockdown (C). Vergrößerung 100-fach.

3.5.2 Einfluss des RhoA-knockdowns auf die Bildung von F-Aktin bei T47D

Bei T47D ergab die quantitative Bestimmung des F-Aktins keine signifikante Veränderung zwischen den transient mit RhoA-siRNA transfizierten Zellen und der Kontrolle (siehe Abb. 11).

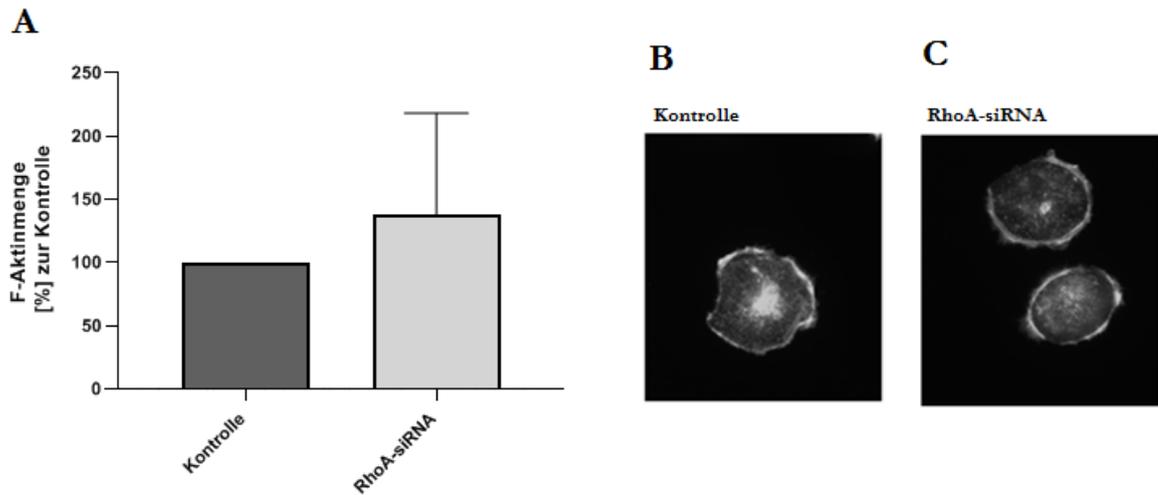


Abbildung 11: Einfluss des RhoA-knockdowns auf die Bildung von F-Aktin in der Mammakarzinomzelllinie T47D. Nach transienter Transfektion von RhoA-siRNA wurden in den Mammakarzinomzellen die Polymerisierung von F-Aktin provoziert und die Menge des gebildeten F-Aktins fluometrisch quantifiziert. Angegeben ist $MW \pm SEM$ für $n = 4$. Es wurde ein t -Test (ungepaart) durchgeführt. Immersionsmikroskopische Darstellung des F-Aktins nach Behandlung mit siRNA-Kontrolle (B) und nach RhoA-knockdown (C). Vergrößerung 100-fach.

4 Diskussion

Die lokale vom Primärtumor ausgehende Invasion ist einer der ersten Schritte der Metastasierungskaskade als Voraussetzung für Fernmetastasen (Gomez-Cuadrado et al. 2017). Metastasen sind die Haupttodesursache im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung. Circa 90 % der krebsbedingten Todesfälle gehen auf Metastasen zurück (Gupta und Massague 2006). Diese Zahl verdeutlicht die Notwendigkeit, die Entstehung bzw. den Prozess der Invasion und Metastasierung zu erforschen, um die Möglichkeiten therapeutischen Eingreifens zu erweitern.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist der Einfluss der GTPase RhoA auf das Invasionsverhalten der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D.

Hinsichtlich der Rolle von RhoA in Karzinomen gibt es viele gegensätzliche Stimmen, vor allem bezüglich der Frage, ob RhoA als Onkogen die Invasion und Metastasierung fördert oder als Tumorsuppressor wirkt. Um vor dem Hintergrund dieser Kontroverse zu untersuchen, wie sich RhoA auf die Invasivität von wenig invasiven Mammakarzinomzellen auswirkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein etabliertes *In-vitro*-Modell verwendet, mit dem die Zelllinien MCF-7 und T47D nach RhoA-*knockdown* mit Osteoblasten/Osteosarkomzellen für 96 h kokultiviert wurden (von Alten et al. 2006). Außerdem wurde mit Blick auf den Einfluss des RhoA-*knockdowns* auf das Zytoskelett eine quantitative und qualitative Analyse des F-Aktins mit Hilfe von Phalloidin durchgeführt und das Proliferationsverhalten analysiert.

4.1 MCF-7

4.1.1 Invasionsassays und F-Aktin-Nachweis

Es zeigte sich, dass bei MCF-7 die gerichtete Invasion durch die künstliche Basalmembran nach RhoA-*knockdown* in Kokultur mit MG-63 signifikant zunimmt.

Voraussetzung für die lokale Invasion als ersten Schritt in der Metastasierungskaskade ist der Verlust zellulärer Adhäsionen und die zunehmende Beweglichkeit der Krebszellen (Chambers et al. 2002). RhoA ist an der Bildung von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen und auf diese Weise an der Haftung der Zellen an ihrem Substrat beteiligt (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996; Ridley und Hall 1992).

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, was nach RhoA-*knockdown* auf der Ebene des Zytoskeletts passiert bzw., ob die von uns festgestellte Zunahme der Invasion bei MCF-7 auf

eine Abnahme Fokaler Adhäsionen bzw. des F-Aktins als Korrelat der Stressfaserbildung zurückzuführen ist, sodass ein motilerer Phänotyp entsteht.

Diese Vermutung konnten wir bestätigen, indem sich bei MCF-7 im F-Aktin-Nachweis nach *RhoA-knockdown* eine signifikant verringerte Menge an F-Aktin nachweisen ließ. Als Ursache der gesteigerten Invasivität der Zelllinie MCF-7 nach *RhoA-knockdown* vermuten wir, dass sich als Folge der reduzierten Adhäsionen und Stressfasern ein motilerer Phänotyp entwickelt.

Dies korrespondiert mit Erkenntnissen von Yu et al. (2015), die in der Zelllinie MCF-7 demonstrierten, dass eine reduzierte RhoA-Menge zu Veränderungen bzw. gestörter Verteilung des F-Aktin-Zytoskeletts führte und in diesem Zusammenhang eine Zunahme von Migration und Invasion auftrat.

Es sei zudem verwiesen auf Aguilar-Rojas et al. (2012), die in der hochinvasiven Zelllinie MDA-MB-231 zeigten, wie sich die Invasionsneigung durch eine gesteigerte Bildung von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen im Zusammenhang mit der Zunahme der RhoA-Aktivität reduzierte. Der Phänotyp dieser eigentlich aggressiven Zellen wurde signifikant weniger invasiv.

Rodrigues et al. (2014) untersuchten die Wirkung von RhoA in kolorektalen Karzinomen. Sie wiesen nach, dass ein *RhoA-knockdown* zu einer signifikanten Steigerung der Migration und Invasion durch Matrigel führte. Im *In-vivo*-Modell ergab sich im Rahmen ihrer Arbeit daraufhin eine gesteigerte Bildung von Lungenmetastasen.

Humphries et al. (2017) konnten zudem in der triple-negativen Brustkrebszelllinie SUM-159 beobachten, dass eine durch einen *knockout* von ARHGAP18, einem GTPase-aktivierenden Protein mit GAP-Aktivität für RhoA, hervorgerufene stark gesteigerte RhoA-Aktivität zu einer anhaltenden Bildung Fokaler Adhäsionen und kräftiger Stressfasern führte. Im Zuge dessen kam es zu reduzierter Migration und Metastasierung.

Schon einige Jahre zuvor hatten Maeda et al. (2011) ARHGAP18 unter anderen in den Zelllinien MDA-MB-231 und HeLa untersucht und konnten zeigen, dass nach *ARHGAP-knockdown* eine Zunahme der Menge der Aktinstressfasern und Fokalen Adhäsionen festzustellen war und in diesem Zusammenhang eine reduzierte Migration. Dies führten sie auf die gesteigerte RhoA-Aktivität nach *ARHGAP18-knockdown* zurück.

Andere hingegen sehen die Rolle RhoAs als onkogen bzw. förderlich für die Prozesse der Invasion von Tumorzellen.

Pillé et al. (2005) beispielsweise gehen davon aus, dass RhoA die Invasivität von Brustkrebszellen unterstützt. Sie zeigten in der Zelllinie MDA-MD-231 eine Abnahme der

Invasion durch Matrigel um 90 % nach RhoA-*knockdown* durch RhoA-siRNA. In derselben Publikation beschrieben sie jedoch, dass ein RhoA-*knockdown* derselben Art die Proliferation um fast 85 % inhibierte. Es kann hier nicht festgestellt werden, ob die reduzierte Invasion tatsächlich auf eine Abnahme der Invasivität zurückzuführen ist oder durch die deutliche Reduktion der Proliferation im Rahmen dieses Experiments vorgetäuscht wird.

Auch Di Wu et al. (2009) sind der Meinung, dass unter anderem die Aktivierung von RhoA in der Zelllinie MDA-MB-231 für deren hohe Invasivität verantwortlich ist. Sie arbeiteten mit dem *guanine nucleotide exchange factor* Myo-GEF und zeigten, dass er für die Aktivierung von RhoA und RhoC verantwortlich ist. Außerdem publizierten sie unter dem Titel „*MyoGEF regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC*“, durch einen *knockdown* von MyoGEF reduziere sich die Invasionsaktivität in Matrigel und die Polarisierung in der Zelllinie MDA-MB-231. Es ist jedoch anzumerken, dass ihre Ergebnisse keine genaue Differenzierung dahingehend zulassen, welche der beiden GTPasen tatsächlich durch ihren *knockdown* für die Veränderungen der Invasivität verantwortlich ist. Tatsächlich räumten sie in ihrer Diskussion ein, dass es noch einzugrenzen sei, ob beide – RhoA und RhoC – für die von MyoGEF vermittelten Veränderungen innerhalb der Zelle verantwortlich sind. Zudem schlossen sie nicht aus, dass RhoA und RhoC in Kombination mit MyoGEF in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien unterschiedliche Funktionen entfalten.

Timpson et al. (2011) untersuchten Pankreasgangkarzinome an lebenden Mäusen. Sie konnten bis zu einer Tiefe von 150 µm in Tumoren zeigen, dass es bei vorliegender TP53-Mutation zu erhöhter RhoA-Aktivität kam und dass es im dreidimensionalen Modell sowohl an der Hinter- als auch der Vorderkante der Tumorzellen Bereiche hoher RhoA-Aktivität gab. Diese erhöhte RhoA-Aktivität ließ sich in nicht-invasiven Zellen ohne Mutation nicht beobachten. Sie brachten diese Ergebnisse in Zusammenhang mit der erhöhten Invasionsneigung der Pankreasgangkarzinomzellen mit TP53-Mutation. Die Ergebnisse von Timpson et al. werfen die Frage auf, ob die gesteigerte Invasionsneigung tatsächlich Folge der höheren RhoA-Aktivität ist oder ob hier nur scheinbar eine Korrelation vorliegt. Sie betrachteten weder mögliche Veränderungen auf Ebene des Zytoskeletts, noch potentielle Veränderungen als Folge der p53-Mutation. So ist es zum Beispiel unklar, ob es in den p53-Mutanten zu einer gesteigerten Proliferation kommt.

Jacquement et al. (2013) wiesen nach, dass mit einer lokalen Steigerung der RhoA-Aktivität in invasiven Pseudopodien von Ovarialkarzinomzellen deren Ausweitung und somit die invasive Migration durch eine dreidimensionale Matrix einherging. Sie halten die gesteigerte RhoA-Aktivität für ursächlich. Sie konnten zeigen, dass die von ihnen registrierte RhoA-

Aktivitätssteigerung in 2D-Kultur mit einer Zunahme zahlreicher kurzer, dichter gerader F-Aktin-Spikes einhergehend bzw. im dreidimensionalen Invasionsassay mit langen, dicken aktinreichen Protrusionen. Im Zusammenhang mit dieser von Jacquement et al. beobachteten pro-invasiven Wirkung RhoAs, die sich auch auf Ebene des Zytoskeletts nachvollziehen lässt, soll auf die unten diskutierte Frage verwiesen werden, ob RhoA zwei Seiten besitzt, eine tumorsuppressive und eine onkogene (siehe unten).

Nachdem, wie oben beschrieben, bei MCF-7 die Zahl invasiver Zellen nach *RhoA-knockdown* in Kokultur mit MG-63 signifikant zunahm, konnten wir in Kokultur mit hFOB 1.19 keine signifikante Veränderung feststellen.

Obwohl beide Zelllinien knöchernen Ursprungs sind, unterscheiden sie sich deutlich.

Bei MG-63 handelt es sich um Zellen eines Osteosarkoms (Billiau et al. 1977). hFOB 1.19 wiederum sind fetale humane Osteoblasten. Durch die Transfektion eines für den Temperatur-sensitiven Mutanten des SV40 T-Antigens kodierenden Gens kommt es unter der permissiven Temperatur von ca. 33,5 °C zu einem Anstieg der Proliferation, wohingegen dieser Zustand durch Temperaturen im Bereich ab 38 °C aufwärts verlangsamt bzw. gestoppt werden kann. Bei den höheren Temperaturen differenzieren die Zellen und beginnen mit der Produktion einer mineralisierten Matrix. Sie stellen eine homogene, schnell proliferierende Zelllinie dar, anhand derer die verschiedenen Stadien der Osteoblastendifferenzierung untersucht werden können. Verschiedene Nachteile, die bei der Forschung von Primären Osteoblasten oder Osteosarkomzellen auftreten, treten bei hFOB nicht auf. Primäre Osteoblasten teilen sich z. B. sehr langsam und werden in Kultur schnell seneszent (Harris et al. 1995). Außerdem muss auf Grund der verschiedenen Spender immer von einer genetische Heterogenität ausgegangen werden bzw. ist das Stadium der Differenzierung nicht einheitlich (Subramaniam et al. 2002).

Bei humanen bzw. murinen Osteosarkomzellen besteht immer die Unsicherheit, wie ähnlich sie physiologischem, nicht entartetem Osteoblastengewebe sind und welche genetischen Abweichungen vorliegen (Harris et al. 1995). Obwohl sie homogener sind als primäre Osteoblasten, können sie aufgrund abnormalen Wachstums bzw. abnormaler Proliferation nicht gleichgestellt werden. Zudem weisen sie andere Reaktionen auf Hormone und Cytokine auf als Primärkulturen (Subramaniam et al. 2002).

Die hier dargestellten Charakteristika machen deutlich, dass Osteosarkomzellen und humane Osteoblasten nicht als gleichartig betrachtet werden dürfen. Mit Blick auf die unterschiedlichen Ergebnisse in den von uns sowohl mit Osteosarkomzellen als auch fetalen

humanen Osteoblasten durchgeführten Kokulturen, stellt sich vor allem die Frage, in wie fern sich das jeweilige von den Knochenzellen ausgehende Milieu unterscheidet und ob sich dies in Form eines unterschiedlich starken Stimulus auf die Mammakarzinomzellen auswirkt.

Subramaniam et al. (2002) verglichen mit Hilfe von multicolor FISH den Karyotyp von hFOB 1.19 mit dem von MG-63. Sie konnten darstellen, dass erstere minimale chromosomale Schäden besaßen, wohingegen letztere zahlreiche numerischen und komplexe strukturelle Abnormalitäten auf chromosomaler Ebene aufwiesen.

Billiau et al. (1977) zeigten, dass MG-63 im Vergleich zu diversen anderen malignen Tumoren, darunter auch Osteosarkomzellen anderen Ursprungs, große Mengen Interferons produzieren.

Pautke et al. (2004) verglichen verschiedene Osteosarkomzelllinien, z. B. MG-63, mit normalen humanen Osteoblasten unter anderem mit Hilfe von Immuncytochemie. Hierbei ergab sich, dass sich Osteosarkomzellen signifikant von Osteoblasten unterscheiden, wobei sich neben verschiedenartiger Morphologie und signifikant höherer Proliferationsraten die Unterschiede vor allem in der Zusammensetzung der produzierten EZM fanden. Der bemerkenswerteste Unterschied war hierbei neben den deutlich unterschiedlich verteilten einzelnen Kollagentypen der immuncytochemische Nachweis von MMP-9 in allen untersuchten Osteosarkomzelllinien, während diese, MMP-9, in normalen Osteoblasten nicht nachweisbar war. Zudem konnten Pautke et al. demonstrieren, dass in Zellkultur die untersuchten Osteosarkomzellen, einschließlich MG-63, keine von der Zelldichte abhängigen Veränderungen ihrer Morphologie vollzogen. Es fehlte beispielsweise an Kontaktinhibition, sodass das Zellwachstum anders als bei den Osteoblasten nicht einschichtig blieb.

Die hier zitierten Referenzen lassen erahnen, dass deutliche Unterschiede zwischen MG-63 und den humanen fetalen Osteoblasten hFOB 1.19 bestehen, vor allem das die ossären Zellen umgebende Milieu betreffend. Dies könnte einen Ansatz darstellen, um zu erklären, weshalb von MG-63 ein größerer Anreiz für die Mammakarzinomzellen ausgeht, in ihre Richtung zu migrieren.

Um das Invasionsverhalten der Mammakarzinomzellen nach *RhoA-knockdown* unabhängig vom Einfluss einer weiteren Zelllinie zu betrachten bzw. um auszuschließen, dass die in Kokultur mit MG-63 festgestellt Zunahme invasiver Zellen auf den alleinigen Einfluss von MG-63 zurückzuführen ist, führten wir ein Invasionsassay in Monokultur durch. Dieses ergab, dass auch bei der ausschließlich gegen FCS gerichteten Invasion durch Matrigel die Invasionsneigung von MCF-7 nach *knockdown* von RhoA zunahm und bestätigte unsere These, dass dieser die Invasivität erhöht.

4.1.2 Proliferationsassay

Die Invasionsassays allein lassen keine sichere Aussage darüber zu, ob die erhöhte Zahl an Zellen, die durch die künstliche Basalmembran migrieren, tatsächlich auf eine Zunahme der Invasion zurückzuführen ist. Eine gesteigerte Proliferation nach RhoA-*knockdown* könnte eine Zunahme der Invasion vortäuschen.

Auch bezüglich des Einflusses von RhoA auf die Proliferation von Zellen herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Dulong et al. (2014) konnten keinen Einfluss der Behandlung von MCF-7 mit RhoA-siRNA auf die Proliferation feststellen. Rodrigues et al. (2014) hingegen zeigten, dass die Proliferation in Kolonkarzinomzellen nach RhoA-*knockdown* zunimmt. Pillé et al. (2005) sehen RhoA als proliferationsfördernd; nach Behandlung mit RhoA-siRNA stellten sie eine Reduktion der Proliferation in MDA-MB-231 fest.

Um herauszufinden, welchen Einfluss der *knockdown* von RhoA im Rahmen unserer Experimente auf das Proliferationsverhalten der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 hat, wurde eine Proliferationsanalyse durchgeführt. Hierbei ergab sich, dass die Herunterregulation von RhoA keinen Einfluss auf die Proliferation von MCF-7 hat. Dies korrespondiert mit der Beobachtung von Dulong et al. in ebendieser Zelllinie. Folglich gehen wir davon aus, dass bei dem von uns untersuchten Effekt von RhoA auf die Invasion von MCF-7 kein Einfluss auf die Proliferation stattgefunden hat.

4.2 Tumorsuppressor oder Onkogen?

O'Connor und Chen (2013) beschäftigten sich in einer Publikation aus dem Jahr 2013 mit der wachsenden Erkenntnis, dass RhoA ein sehr vielseitiges Protein ist, über dessen Wirkung Uneinigkeit herrscht und dessen Funktion nicht auf Stressfaserbildung und Aktin-Myosin-Kontraktilität begrenzt ist: Lange ging man davon aus, dass sich die Funktion von RhoA auf die Hinterkante beschränkt, wo es deren Zusammenzug beim Vorschub der Zelle vermittelt und für die Migration nicht relevant ist. Unter anderem durch Techniken wie den *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) konnte jedoch gezeigt werden, dass RhoA ebenfalls an der Vorderkante migrierender Zellen aktiv ist und dort unter anderem bei der Bildung von Membranfortsätzen eine aktive Rolle bei der Vermittlung der Vorwärtsbewegung einnimmt, es folglich sowohl bei der Kontraktion als auch der Protrusion mitwirkt.

Bei der Literaturrecherche im Rahmen dieser Arbeit bestätigte sich, wie unter 4.1.1 bereits dargestellt, dass über die Rolle von RhoA in Karzinomen Uneinigkeit herrscht. Die einen betrachten es als tumorsuppressiv und die Invasion hemmend, die anderen als onkogen. Die

Einschätzung von O'Connor und Chen passt zu dieser Beobachtung. Sie gehen davon aus, dass es vom jeweiligen Signalweg abhängt, auf welche Art RhoA wirkt.

Es liegt nahe, einen Blick auf die nachgeschalteten Effektoren von RhoA zu werfen, insbesondere auf ROCK und mDia, die am genauesten untersucht sind (K O'Connor und Chen 2013).

ROCK ist ein entscheidender Mediator der RhoA-Funktion: Es verstärkt die Aktin-Myosin-Kontraktibilität, indem es die Myosinphosphatase durch Phosphorylierung inaktiviert bzw. indem es die Myosinleichtketten durch Phosphorylierung aktiviert (Narumiya et al. 2009). Es kommt auf diese Weise zur Bündelung von Aktinfasern bzw. zu Bildung von Stressfasern und Fokaler Adhäsionen (Burrige und Wennerberg 2004). Demgegenüber stehen Prozesse, an denen RhoA beteiligt ist, die in der Polymerisation von Aktin resultieren. Wichtige Effektoren sind hier beispielsweise mDia und Phosphatidylinositide 4P-5 Kinase (Narumiya et al. 2009). Wenn sich das Verhältnis von ROCK und mDia zu mDia verschiebt oder der Einfluss von ROCK reduziert wird, ergibt sich daraus eine Reduktion der Stressfaserdicke, und die Migration der Zellen wird gefördert (Burrige und Wennerberg 2004).

O'Connor und Chen (2013) vermuten, dass fortgeschrittene Karzinome einen Mechanismus erwerben, die durch RhoA und ROCK vermittelte Kontraktibilität zu mildern und stattdessen die Protrusion zu fördern. Sie stellen nach eigenen Untersuchungen die These auf, dass Rhotekin und S100A4 für den Wechsel von RhoA zwischen diesen zwei sehr unterschiedlichen Funktionen eine wichtige Rolle spielen: Sie konnten zeigen, dass S100A4 an der *Rho-binding-domaine* des Rho Effektor Rhotekin binden kann und diese daraufhin einen Komplex mit RhoA bilden, wodurch sich die RhoA-Funktion verändert. Statt zur Bildung von dicken kontraktile Stressfasern kommt es unter Einfluss von S100A4 zur Bildung von *membrane ruffles*. In Abwesenheit von S100A4 überwiegt der Einfluss von RhoA auf die Kontraktibilität bzw. Stressfaserbildung.

Im Einklang mit O'Connor und Chen konnten Gründker et al. (2016) in den Zelllinien MDA-MB-231 und mesenchymal transfizierten MCF-7-EMT zeigen, dass bei beiden sowohl die Expression von S100A4 als auch die Invasion signifikant höher war als in MCF-7 des Wildtypes. Diese gesteigerte Invasionsneigung konnte durch die Behandlung mit Antikörpern gegen S100A4 reduziert werden. Zudem analysierten Gründker et al. (2016), dass S100A4 in entartetem Brustgewebe deutlich höher exprimiert ist als in *in-situ*-Karzinomen. In physiologischem Gewebe oder benignen Brusttumoren konnten sie kein S100A4 nachweisen.

Wir schließen uns der Ansicht von O'Connor und Chen an, dass RhoA „dynamic functions in tumor cell migration and invasion“ besitzt (K O'Connor und Chen 2013) und unterstützen die These, dass RhoA nicht uneingeschränkt als Onkogen oder Tumorsuppressor bezeichnet werden kann, sondern vielmehr die Umstände unter bzw. die Zelllinien in denen es wirkt, beachtet werden müssen. Auch Rodrigues et al. (2014) stellen die These auf, dass RhoA gegensätzliche Effekte in verschiedenen Tumortypen besitze und dementsprechend in einigen Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom suppressiv wirke, während es in anderen zur Metastasenbildung beitrage.

Im Einklang mit der These, RhoA besitze einen zelllinienspezifischen Effekt, kamen wir im Rahmen unserer Experimente bei T47D zu anderen Ergebnissen als bei MCF-7.

4.3 T47D

Bei T47D ergab sich bei der gerichteten Invasion durch die künstliche Basalmembran nach RhoA-*knockdown* sowohl in Kokultur mit MG-63 als auch mit hFOB keine Zunahme invasiver Zellen. Zudem war insgesamt die Menge der durch die Membran invadierten Zellen geringer als bei MCF-7. Passend zu diesem Ergebnis zeigte sich auch bei der Untersuchung des F-Aktins bei T47D keine signifikante Veränderung. Die Proliferation blieb bei T47D genau wie bei MCF-7 vom RhoA-*knockdown* unbeeinflusst.

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass der Einfluss von RhoA auf die Mammakarzinomzelllinie T47D deutlich geringer ist als auf MCF-7.

Bei der Suche nach einer Erklärung für diese voneinander abweichenden Ergebnisse sollte der Unterschied zwischen beiden Zelllinien betrachtet werden.

MCF-7 und T47D sind zwei menschliche Brustkrebszelllinien, die beide zum Subtyp Luminal A gehören, d. h. Östrogenrezeptor-positiv, Progesteronrezeptor-positiv-negativ und HER2-negativ sind, einen niedrigen Ki67-Proliferationsindex besitzen und hormon- und häufig chemotherapiesensibel sind (Holliday und Speirs 2011). Beide sind bekannt dafür, viele Eigenschaften des physiologischen Epithels der Brustdrüse zu besitzen, und werden sehr häufig für *In-vitro*- sowie *In-vivo*-Experimente verwendet. Dabei gelten sie als sehr ähnlich (S Yu et al. 2017). Dennoch konnten Studien der letzten Jahre Unterschiede aufzeigen.

Aka und Lin (2012) beispielsweise identifizierten mindestens 164 Proteine, die in beiden Zelllinien unterschiedlich exprimiert werden, darunter unter anderem. Biomarker für

Brustkrebs und Proteine, die in die Regulation von Apoptosevorgängen, Proliferation und Kanzerogenese involviert sind. Aka und Lin weisen nachdrücklich darauf hin, dass die von ihnen identifizierten Proteine entsprechend in Mammakarzinomen unterschiedlich exprimiert sein könnten und dass dies in Studien mit diesen Zelllinien beachtet werden sollte.

Rondon-Lagos et al. (2014) führten zytogenetische Analysen verschiedener Brustkrebszelllinien durch und wiesen unter anderem in der Zelllinie MCF-7 spezifische strukturelle Alterationen nach, die sie von T47D unterscheidet. Beispielsweise zeigte sich eine häufige strukturelle und numerische Abweichung des Chromosom 7, vor allem eine Polysomie. Letztere wurde wiederum in der Vergangenheit bereits mit Lymphknotenmetastasen und schlechter Prognose von Mammakarzinomen assoziiert (Hirata et al. 1998). Randon-Lagos et al. (2014) empfehlen, die den Karyotyp betreffenden Unterschiede bei der experimentellen Verwendung der Zelllinien bzw. bei der Dateninterpretation zu beachten, da ihr Einfluss auf die Ergebnisse nicht auszuschließen sei. Zudem vermuten sie, es könne durch die strukturellen Veränderungen zu Deregulierungen bei der Genexpression kommen, beispielsweise mit der Folge aktivierter Onkogene oder der Bildung von Fusionsproteinen mit verstärkter Transkriptionsaktivität.

Auch S Yu et al. (2017) konnten Abweichungen der Eigenschaften beider Zelllinien aufzeigen: Sie re-analysierten große Mengen an MCF-7 und T47D betreffenden Daten, die im Rahmen von *next-generation sequencing* generiert worden waren, woraus sich Folgendes ergab: Beide Zelllinien unterscheiden sich in der Expression einer nicht unerheblichen Zahl von Genen vor allem unter Östrogenwirkung bzw. besitzen unterschiedliche molekulare Charakteristika, die sich insbesondere in einer größeren Sensitivität von T47D gegenüber Progesteron auswirken.

Die o. g. Beispiele machen deutlich, dass es entscheidende Unterschiede zwischen MCF-7 und T47D gibt, und liefern verschiedene Ansatzpunkte zur Erklärung der auch bei unseren Experimenten voneinander abweichenden Ergebnisse. Wir vermuten, dass die Invasionsneigung bei T47D von Natur aus so gering ist, dass selbst ein RhoA-*knockdown* nicht dazu führt, dass die Invasion nachweisbar zunimmt.

4.4 Ausblick

In zukünftigen Untersuchungen sollte ein Augenmerk auf die RhoA-Aktivität gelegt werden, beispielsweise indem man invasive Zellen mit einem RhoA-Aktivator behandelt, um zu überprüfen, ob ihre Invasivität der These entsprechend abnimmt. Dieser Frage könnte ebenfalls in *In-vivo*-Experimenten auf den Grund gegangen werden. Bezüglich der Kokulturen liegt eine Untersuchung des Sekretoms nahe, um Hinweise zu

finden, weshalb MCF-7 als gering invasive Mammakarzinomzelle in Anwesenheit einer Osteosarkomzelle invasiver wächst als kokultiviert mit humanen fetalen Osteoblasten.

5 Zusammenfassung

Eine gesteigerte Aktivität von RhoA lässt invasive Mammakarzinomzellen weniger invasiv werden. Vor diesem Hintergrund stellten wir uns die Frage, ob in weniger invasiven Mammakarzinomzellen eine Herunterregulation der RhoA-Aktivität zu einer Zunahme der Invasionsneigung führt. Unserer Hypothese nach müsste ein *knockdown* von RhoA zu einer stärkeren Invasion im Invasionsmodell führen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die RhoA-Aktivität in den Zelllinien T47D und MCF-7 durch die Verwendung von siRNA herunterreguliert. Der Erfolg des *knockdowns* wurde auf RNA-Ebene anhand von RT-qPCR und auf Proteinebene mit Western Blot überprüft. Um auszuschließen, dass sich die veränderte RhoA-Aktivität auf die Proliferation auswirkt, wurde nach 48 h und 120 h ein Proliferationsassay durchgeführt. Schließlich wurde die Invasionsneigung der Mammakarzinomzellen nach RhoA-*knockdown* mit Hilfe einer Kokultur mit humanen fetalen Osteoblasten- (hFOB 1.19) bzw. Osteosarkomzellen (MG-63) sowie einer Monokultur untersucht. Zudem wurden quantitative sowie qualitative F-Aktin-Nachweise durchgeführt, um zu untersuchen, welche Veränderungen sich auf Ebene des Zytoskeletts nach RhoA-*knockdown* ergeben. Der RhoA-*knockdown* ließ sich durch RT-qPCR und Western Blot in beiden Zelllinien nachweisen. Bei der Proliferation ergab sich weder bei MCF-7 noch bei T47D ein signifikanter Einfluss.

Bei MCF-7 zeigte sich in Kokultur mit MG-63 eine signifikante Zunahme der Invasion, ebenso in der ausschließlich gegen FCS gerichteten Monokultur. In der Kokultur mit hFOB 1.19 ergab sich keine signifikante Veränderung. Im F-Aktin-Nachweis zeigte sich eine Abnahme des F-Aktins nach RhoA-*knockdown*. Bei T47D folgte auf die Kokultur weder mit MG-63 noch mit hFOB 1.19 eine signifikante Veränderung der Invasion, ebenso wenig ergab sich ein signifikanter Einfluss auf Ebene des F-Aktins.

Anhand der Ergebnisse mit MCF-7 konnte wir unsere oben genannte Hypothese bestätigen: Nach RhoA-*knockdown* verstärkt sich die Invasionsneigung der Mammakarzinomzellen. Die Tatsache, dass sich dies in Kokultur mit hFOB 1.19 nicht bestätigen ließ, führen wir darauf zurück, dass von ihnen ein geringerer Stimulus ausgeht. Durch eine anschließend durchgeführte ausschließlich gegen FCS gerichtete Monokultur von MCF-7 konnten wir jedoch die Ergebnisse aus dem Invasionsassay mit MG-63 zelllinienunabhängig bestätigen.

Die Abnahme des F-Aktins zeigt, dass es auf Ebene des Zytoskletetts zu einer Abnahme Fokaler Adhäsionen und Stressfasern als Voraussetzung für die gesteigerte Migration im Rahmen der zunehmenden Invasion kommt.

Als Grund für die fehlenden Veränderungen bei T47D vermuten wir deren von Natur aus zu geringe Invasionsneigung. Selbst ein *RhoA-knockdown* führt nicht dazu, dass die Invasion nachweisbar zunimmt. Die fehlende Abnahme des F-Aktins unterstützt die These, dass sie ihren adhären Phänotyp behalten.

Ein Blick in die RhoA-betreffende Literatur macht deutlich, dass Uneinigkeit darüber herrscht, ob es sich bei RhoA um einen Tumorsupressor oder ein Onkogen handelt. Zum einen ist seit langem bekannt, dass es an der Hinterkante von Zellen wirkt und an der Adhäsion und Kontraktion beteiligt ist. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass es an Prozessen des Vorwärtkommens bzw. der Migration mitwirkt. Wir schließen uns der These an, dass es auf die jeweilige Zelllinie ankommt bzw. auf die beteiligten Effektoren.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass RhoA in der von uns untersuchten Zelllinie MCF-7 eine tumorsuppressive Rolle einnimmt; eigentlich gering invasive Mammakarzinomzellen werden durch Herunterregulation von RhoA invasiver.

6 Literaturverzeichnis

Aguilar-Rojas A, Huerta-Reyes M, Maya-Nunez G, Arechavaleta-Velasco F, Conn PM, Ulloa-Aguirre A, Valdes J (2012): Gonadotropin-releasing hormone receptor activates GTPase RhoA and inhibits cell invasion in the breast cancer cell line MDA-MB-231. *BMC Cancer* 12, 550

Aka JA, Lin SX (2012): Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7. *PLoS One* 7, e31532

Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, De Somer P (1977): Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* 12, 11-15

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007): GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394-424

Burnette WN (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203

Burrige K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C (1988): Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 4, 487-525

Burrige K, Wennerberg K (2004): Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572

Chen M, Bresnick AR, O'Connor KL (2013): Coupling S100A4 to Rhotekin alters Rho signaling output in breast cancer cells. *Oncogene* 32, 3754-3764

- Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K (1996): Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133, 1403-1415
- Coghlin C, Murray GI (2010): Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol* 222, 1-15
- Dulong C, Fang YJ, Gest C, Zhou MH, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG, Vannier JP, Lu H, Soria C, Cazin L et al. (2014): The small GTPase RhoA regulates the expression and function of the sodium channel Nav1.5 in breast cancer cells. *Int J Oncol* 44, 539-547
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811
- Friedl P, Alexander S (2011): Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147, 992-1009
- Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K (2011): The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 493-504
- Girgert R, Emons G, Grundker 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
- Gomez-Cuadrado L, Tracey N, Ma R, Qian B, Brunton VG (2017): Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech* 10, 1061-1074
- Grundker 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
- Guan X (2015): Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* 5, 402-418
- Guarneri V, Conte P (2009): Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist* 14, 645-656
- Gupta GP, Massague J (2006): Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695

Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC (1995): Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 10, 178-186

Held PG: Nucleic acid purity assessment using A260/A280 ratios. https://www.biotek.com/resources/docs/PowerWave200_Nucleic_Acid_Purity_Assessment.pdf; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA, 2006; abgerufen am 03.07.2020

Hirata K, Tagawa Y, Kashima K, Kidogawa H, Deguchi M, Tsuji T, Ayabe H (1998): Frequency of chromosome 7 gain in human breast cancer cells: correlation with the number of metastatic lymph nodes and prognosis. *Tohoku J Exp Med* 184, 85-97

Holliday DL, Speirs V (2011): Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 13, 215

Humphries B, Wang Z, Li Y, Jhan JR, Jiang Y, Yang C (2017): ARHGAP18 downregulation by miR-200b suppresses metastasis of triple-negative breast cancer by enhancing activation of RhoA. *Cancer Res* 77, 4051-4064

Jacquemet G, Green DM, Bridgewater RE, von Kriegsheim A, Humphries MJ, Norman JC, Caswell PT (2013): RCP-driven alpha5beta1 recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1-IQGAP1 complex. *J Cell Biol* 202, 917-935

Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ (1979): Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15, 659-670

Kurokawa K, Matsuda M (2005): Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol Biol Cell* 16, 4294-4303

Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996): Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369

Lee YT (1983): Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. *J Surg Oncol* 23, 175-180

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.1, 2018 AWMF Registernummer: 032-045OL; <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>; abgerufen am 04.07.2020

Maeda M, Hasegawa H, Hyodo T, Ito S, Asano E, Yuang H, Funasaka K, Shimokata K, Hasegawa Y, Hamaguchi M et al. (2011): ARHGAP18, a GTPase-activating protein for RhoA, controls cell shape, spreading, and motility. *Mol Biol Cell* 22, 3840-3852

Mayor R, Etienne-Manneville S (2016): The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 97-109

Mitchison TJ, Cramer LP (1996): Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379

Müller M (Hrsg.): Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis 2014/15. 7. Auflage; Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach/Rh. 2014

Mundy GR (2002): Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2, 584-593

Museum Sybodo - Medizinische Instrumente und Geräte der Krankenpflege; <https://www.kugener.com/de/laboratoires-d-analyses/67-artikel/2823-zaehlkammer-2-n-neubauer.html>; abgerufen am 04.07.2020

Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T (2009): Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 65-76

O'Connor K, Chen M (2013): Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* 4, 141-147

O'Connor KL, Nguyen BK, Mercurio AM (2000): RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the $\alpha\beta$ 4 integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol* 148, 253-258

Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, Milz S (2004): Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* 24, 3743-3748

Pawlina W, Ross MH: Histology: a text and atlas. 7. Auflage; Wolters Kluwer Health, Philadelphia 2016

Pille JY, Denoyelle C, Varet J, Bertrand JR, Soria J, Opolon P, Lu H, Pritchard LL, Vannier JP, Malvy C et al. (2005): Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther* 11, 267-274

Raftopoulou M, Hall A (2004): Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32

Ridley AJ, Hall A (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399

Robert Koch Institut (RKI), Zentrum für Krebsregisterdaten: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html;sessionid=A27DF5B5CECBE408EA5F61164A845CA2.1_cid363; abgerufen am 04.07.2020

Rodrigues P, Macaya I, Bazzocco S, Mazzolini R, Andretta E, Dopeso H, Mateo-Lozano S, Bilic J, Carton-Garcia F, Nieto R et al. (2014): RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer. *Nat Commun* 5, 5458

Rondon-Lagos M, Verdun Di Cantogno L, Marchio C, Rangel N, Payan-Gomez C, Gugliotta P, Botta C, Bussolati G, Ramirez-Clavijo SR, Pasini B et al. (2014): Differences and homologies of chromosomal alterations within and between breast cancer cell lines: a clustering analysis. *Mol Cytogenet* 7, 8

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416

Steeg PS (2016): Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer* 16, 201-218

Subramaniam M, Jalal SM, Rickard DJ, Harris SA, Bolander ME, Spelsberg TC (2002): Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *J Cell Biochem* 87, 9-15

Timpson P, McGhee EJ, Morton JP, von Kriegsheim A, Schwarz JP, Karim SA, Doyle B, Quinn JA, Carragher NO, Edward M et al. (2011): Spatial regulation of RhoA activity during pancreatic cancer cell invasion driven by mutant p53. *Cancer Res* 71, 747-757

Valastyan S, Weinberg RA (2011): Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275-292

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997): Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-2322

Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ (2011): RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol* 193, 655-665

von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G, Grundker C (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 100, 13-21

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005): Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591-602

Weyerstahl T, Stauber M (Hrsg.): *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2013

Wu D, Asiedu M, Wei Q (2009): Myosin-interacting guanine exchange factor (MyoGEF) regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC. *Oncogene* 28, 2219-2230

Yamaguchi H, Condeelis J (2007): Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 1773, 642-652

Yu L, Liu X, Cui K, Di Y, Xin L, Sun X, Zhang W, Yang X, Wei M, Yao Z et al. (2015): SND1 acts downstream of TGFbeta1 and upstream of Smurf1 to promote breast cancer metastasis. *Cancer Res* 75, 1275-1286

Yu S, Kim T, Yoo KH, Kang K (2017): The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 486, 752-758

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Carsten Gründker, Herrn Professor Günter Emmons, Herrn Doktor Martin Hellriegel und Frau Professor Julia Gallwas für die Möglichkeit bedanken im Labor für Molekulare Gynäkologie am Universitätsklinikum Göttingen die Arbeiten für meine Promotion durchzuführen. Für die vorbildliche, hoch motivierte und allzeit geduldige Betreuung danke ich Johanna Hellinger und ebenso Sonja Blume für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Ein weiterer Dank gilt Herrn Professor Steven Johnsen für seine konstruktiven Vorschläge sowie die Zweitbegutachtung meiner Arbeit. Für die freundliche Kooperation und Unterstützung bin ich darüber hinaus seiner Arbeitsgruppe zu Dank verpflichtet. Zudem möchte ich die „Deutsche Krebshilfe Dr. Mildred Scheel Stiftung“ danken erwähnen, ohne deren Fördermittel die Forschungsarbeiten zu dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.