

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ludwig Kiesel -

Thema:

**Rolle des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1
bei der Strahlenresistenz des Mammakarzinoms**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentinum
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Rottke, Theresa Viktoria
aus Münster, Deutschland

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Götte

2. Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2018

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ludwig Kiesel -

Referent: Prof. Dr. Martin Götte

Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig

ZUSAMMENFASSUNG

Rolle des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1 bei der Strahlenresistenz des Mammakarzinoms

Rottke, Theresa Viktoria

Weltweit ist das Mammakarzinom die häufigste Krebsart bei Frauen. Besonders das sogenannte triple-negative Mammakarzinom lässt sich mit herkömmlichen Therapieansätzen schwer behandeln. Es fehlen tumorspezifische Biomarker, um neben der Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie, weiter zielgerichtete Therapieoptionen nutzen zu können.

Syndecan-1 ist ein Heparansulfat-Proteoglykan, welches vor allem auf epithelialen Zelloberflächen zu finden ist. Beim Mammakarzinom ist es dysreguliert und eine erhöhte Expression ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose. In einer Studie konnte eine erhöhte Radioresistenz von triple-negativen Brustkrebszellen bei siRNA-vermittelter Herabregulation von Syndecan-1 festgestellt werden.

Dieses Phänomen wurde in dieser Arbeit genauer charakterisiert. Hierzu wurden funktionelle Untersuchungen und Analysen der Expression bestimmter Zielgene an bestrahlten und Syndecan-1 defizitären triple-negativen und auch Rezeptor-positiven Brustkrebszellen durchgeführt. Besonders bei der triple-negativen Brustkrebszelllinie wurde der fehlende Einfluss des Syndecan-1 bemerkbar, in Form von verzögerter DNA-Reparatur, arretiertem Zellzyklus und Veränderungen in der Genexpression von Endothelin 1, Exonuclease 1, Cyclin dependent Kinase 6 (CDK6) und cAMP response element binding protein 1 (CREB1). CDK6 könnte für die erhöhte Strahlenresistenz Sdc-1-defizitärer Zellen verantwortlich sein, da es den Zellzyklus in der G1 Phase arretiert, in welcher die Zelle resistenter gegen genotoxische Einflüsse ist. Möglicherweise interagiert Syndecan-1 mit dem G-Protein des CREB1 Signalweges und beeinflusst so die Genexpression der Gene mit CREB1 Promotor-Bindungsstelle. Die oben genannten Gene besitzen eine solche CRE-Bindungsstelle, somit könnte CREB1 die Verbindung zwischen den Ergebnissen bilden. Diese Zusammenhänge eröffnen neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung des Mammakarzinoms bzw. bei der Verbesserung der Effizienz der Strahlentherapie.

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2018

1 Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Rolle des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1

bei der Strahlenresistenz des Mammakarzinoms

in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,

unter der Anleitung von Prof. Dr. Martin Götte

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 10.10.2018

Datum



Name/ Unterschrift

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	3
1 Erklärung.....	4
Inhaltsverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Maßeinheiten.....	12
2 Einleitung.....	13
2.1 Das Mammakarzinom.....	13
2.1.1 Definition.....	13
2.1.2 Epidemiologie.....	13
2.1.3 Diagnose.....	14
2.1.4 Klinische Symptome	14
2.1.5 Bewertung/Charakterisierung.....	14
2.1.6 Therapie.....	15
2.2 Syndecan-1	16
2.2.1 Definition.....	16
2.2.2 Aufbau und Funktionen.....	16
2.3 Zellkulturmodelle	19
2.3.1 MDA-MB-468.....	19
2.3.2 MCF-7	19
2.4 Fragestellung.....	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Zellkultur.....	21
3.1.1 Ablösen und Zählen der Zellen.....	21
3.2 Transfektion mit siRNA.....	23

3.2.1	siRNA Details	24
3.3	Quantitative Real-Time-PCR.....	25
3.3.1	RNA-Isolierung.....	25
3.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	25
3.3.3	Umschreiben der RNA in cDNA.....	26
3.3.4	Quantitative Real-Time-PCR Protokoll 1.....	26
3.3.5	Gradienten-PCR.....	28
3.3.6	Primer.....	29
3.3.7	Quantitative Real-Time-PCR – Protokoll 2.....	35
3.4	Gelelektrophorese.....	37
3.5	γ H2AX-Test.....	39
3.6	Zellzyklus-Analyse mittels DAPI-Färbung.....	42
3.7	BrdU-Assay.....	43
3.8	Statistik.....	46
3.9	Materialliste.....	47
4	Ergebnisse.....	55
4.1	Überprüfung des Syndecan-1-Knockdowns mittels qPCR.....	55
4.2	Einfluss von Syndecan-1 auf Signalprozesse.....	57
4.2.1	qPCR Endothelin-1	57
4.3	Einfluss von Syndecan-1 auf die Zellproliferation bei Bestrahlung.....	60
4.3.1	Funktionelles Assay: BrdU	60
4.3.2	qPCR	61
4.3.2.1	Cyclin A1	61
4.3.2.2	Cyclin B1	62
4.3.2.3	Cyclin-dependent Kinase 6.....	63
4.4	Reparaturprozesse nach Bestrahlung.....	65
4.4.1	γ H2AX-Assay.....	65

4.4.2	qPCRs	66
4.4.2.1	EXO1	66
4.4.2.2	CREB1.....	68
4.4.2.3	PMS1.....	70
4.5	Einfluss des Syndecan-1 Knockdowns auf den Zellzyklus.....	72
4.5.1	Zellzyklus-Analyse.....	72
4.5.2	qPCR Zellzyklus-Gene.....	74
5	Diskussion	75
5.1	Endothelin 1 Signalweg.....	75
5.2	Zellzyklus und DNA-Reparatur	78
5.2.1	CDK6.....	78
5.2.2	CREB1	79
5.2.3	EXO1	81
5.2.4	PMS1.....	82
5.3	Zusammenfassung.....	83
5.4	Limitierungen der Studie	85
5.5	Ausblick	87
6	Literaturverzeichnis.....	88
7	Abbildungsverzeichnis.....	99
8	Tabellenverzeichnis	101
10	Lebenslauf	103
11	Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

18S	18 Svedberg units
A	Adenin
BCT	breast-conserving therapy
BP/bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCNA1	Cyclin A1
CCNB1	Cyclin B1
CDK6	Cyclin-dependent Kinase 6
cDNA	complementary DNA
Cl	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	treshold cycle
CT	Computertomographie
CREB1	cAMP response element-binding protein 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dCyt	Desoxycytosin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
ET1	Endothelin 1
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
EXO1	Exonuclease 1
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence acticated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum

FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G	Guanin
γ	Gamma
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GeneBank®	National Institutes of Health (NIH) Gendatenbank
Ggf.	gegebenenfalls
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HER2	human epidermal growth factor Rezeptor 2
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IC-NST	invasives Karzinom, kein spezieller Typ
IHC	Immunhistochemie
ISH	in situ Hybridisierung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Stichprobenmenge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Opti-MEM	Opti-minimal essential medium
PBS	phosphate buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	pondus/potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PMS1	postmeiotic segregation increased 1
PR	Progesteronrezeptor
PubMed	Public Medicine (medizinische Datenbank)
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
®	registrierte Warenmarke
RefSeq	NCBI Reference Sequence Database (Gendatenbank)
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Kultivierungsmedium
RT	reverse transkription
siRNA	small interfering RNA
T	Thymin

Taq	Thermus aquaticus
TBP	Tributylphosphine
TE	Tris-EDTA
TNM	tumor, nodes and metastases
™	Trademark
u.a.	unter anderem
UDG	Uracil DNA-Glykosilase
UKM	Universitätsklinikum Münster
UTP	Uridintriphosphat
v. a.	vor allem
Vol.	Volumen
WBRT	whole breast radiation therapy
Wnt	Signalprotein des Wnt-Signalwegs zusammengesetzt aus Wingless und Int-1
z. B.	zum Beispiel

Maßeinheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
Gy	Gray
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
mGy	MilliGray
mol/l	Mol pro Liter
N	Normalität
nm	Nanometer
rpm	rounds per minute
sek	Sekunde(n)
U/min	Umdrehungen pro Minute
xg	mal Erdbeschleunigung

2 Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Definition

„Das Mammakarzinom ist ein bösartiger, vom Epithel der Drüsentubuli oder der Milchgänge ausgehender Tumor.“ (1)

2.1.2 Epidemiologie

Brustkrebs ist der weltweit am häufigsten diagnostizierte maligne Tumor bei Frauen, mit mehr als 1,6 Millionen Fällen pro Jahr, sowie weltweit die häufigste krebsinduzierte Todesursache bei Frauen (2).

Die Inzidenz ist am höchsten in Nordamerika, Australien/Neuseeland, in West- und Nordeuropa und am niedrigsten in Asien und Subsahara-Afrika (2).

In Deutschland wurden 2012 69.550 Neuerkrankungen an Brustkrebs bei Frauen registriert. Damit ist es mit Abstand die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Etwa eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen liegt bei 64 Jahren. (3) Eine Einteilung nach histologischen und molekular definierten Subtypen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Molekulare Subtypen von Brustkrebs (4): + positiv, - negativ, +/- überwiegend positiv, -/+ überwiegend negativ, ER Östrogenrezeptor, HER2 human epidermal growth factor Rezeptor 2, IC-NST Invasives Karzinom, kein spezieller Typ, IHC Immunhistochemie, ISH in situ Hybridisierung,

Intrinsische Subtypen nach Genexpressionsprofilanalyse	Histologische Typen	Histologische Grade	ER Status durch IHC	HER2 Status durch IHC/ISH	Ki67 durch IHC
Luminal A	IC-NST, klassisch lobulär, tubulär, kribriform, muzinös, neuroendokrin	1-2	ER+	HER2-	niedrig
Luminal B	IC-NST, mikropapillär	2-3	ER+/-	HER2-/+	hoch
HER2	IC-NST, apokrin, pleomorph, lobulär	2-3	ER+/-	HER2+	hoch
Basal-like	IC-NST, medullär, metaplastisch, adenoid-zystisch, sekretorisch	3	ER-	HER2-	hoch

2.1.3 Diagnose

Nach klinischer Untersuchung und bildgebenden Verfahren (insbesondere Mammographie) wird die Diagnose durch eine histologische Untersuchung gesichert (5). Der Diagnose folgt ein Tumorstaging mit gegebenenfalls weitreichenden Untersuchungen, wie Inspektion, Palpation, Mammographien, Rezeptorstatus, Ultraschall, MRT, CT, Röntgen und PET (Positronen-Emissions-Tomographie) (5). Für das Staging wird die TNM (tumor, nodes and metastases) Klassifikation verwendet (5).

2.1.4 Klinische Symptome

Symptome können ein abnormales Mammogramm oder ein palpabler Knoten sein. Bei fortgeschrittenen Tumoren können Hauteffloreszenzen auftreten (bekannt als peau d'orange) oder axilläre Adenopathien. Weniger als 5 % der Patienten zeigen Symptome eines metastasierenden Mammakarzinoms. (6)

2.1.5 Bewertung/Charakterisierung

Wird Brustkrebs diagnostiziert, muss auch der Hormonrezeptorstatus ermittelt werden. Dazu testet man nach Östrogen- (ER), Progesteron- (PR) Rezeptor-Expression und Überexpression vom human epidermal growth factor 2 (HER2) Rezeptor. Dieser Status ist wichtig für die Prognostik und Therapie. Der Rezeptorstatus wird immunhistochemisch bestimmt (6).

ER und PR sind prognostische Faktoren für invasive Brustkrebsarten.

HER2 wird entweder mithilfe einer Membranfärbung (IHC 3+) oder Genamplifikation durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) quantifiziert.

Anhand ihres Rezeptorstatus, lässt sich Brustkrebs in mehrere Subtypen unterteilen (7,8) (Tabelle 1). In einer Studie wurden 61.309 Fälle von Brustkrebs zwischen 1999 und 2004, hinsichtlich der Rezeptorsubtypen untersucht (7):

Hormonrezeptorpositive (ER und/oder PR) Subtypen bilden die Mehrheit der Fälle (80 %).

Eine HER2-Überexpression findet sich in 23 % der Fälle, davon waren 67 % hormonrezeptorpositiv und 32 % hormonrezeptornegativ.

ER, PR und HER2 negative (triple negativ) Subtypen machen nur 13 % der Fälle aus.

Offenbar spielt die Herkunft der Frauen eine Rolle. So hatten Afroamerikanerinnen mehr triple-negative Karzinome. (7)

2.1.6 Therapie

Die Therapie richtet sich nach der Charakterisierung des Tumors.

Hormonrezeptor-positive Tumoren können mit einer adjuvanten endokrinen Therapie behandelt werden. ER- und/oder PR- positive Patienten sind Kandidaten für eine endokrine Therapie (9). Auch eine HER2 Überexpression lässt eine zielgerichtete Therapie zu und wird oft mit einer adjuvanten Chemotherapie ergänzt (10).

Je nach Charakterisierung und TNM-Klassifikation werden operative Therapie, neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie, endokrine Therapie, Bestrahlung, sowie eine Kombination hieraus erwogen (5).

Brustkrebs im Anfangsstadium (I, IIA, IIB (T2N1)) wird zunächst operativ behandelt und ggf. durch Radiotherapie ergänzt. Gerade bei der Brust-konservierenden Therapie (BCT= breast-conserving therapy) wird die operative Entfernung des Tumors mit Lymphektomie durch moderat-dosierte WBRT (whole breast radiation therapy) ergänzt, um eventuell verbliebenes Tumorgewebe unschädlich zu machen (5). Auch bei erhöhter Rezidivgefahr, etwa bei befallenen Lymphknoten, wird im Anschluss an die Operation bestrahlt (5).

Die Vorteile der WBRT sind die Reduzierung des Risikos für lokale Rezidive und Tod durch Brustkrebs (5). Das 10-Jahres Risiko für Rezidive wird von 35 auf 19 % gesenkt (11). Das 15-jahres Risiko an Brustkrebs zu versterben reduziert sich von 25 auf etwa 21 % (11).

Bei fortgeschrittenem metastasiertem Brustkrebs wird kaum eine Heilung erreicht, die Therapie verlängert meist lediglich das Überleben, verbessert die Lebensqualität und bekämpft Symptome. Endokrine Therapie und Chemotherapie stehen hier im Vordergrund, wobei auch kurative Behandlungen diskutiert werden (12).

2.2 Syndecan-1

2.2.1 Definition

Syndecane bilden eine kleine Familie von Zelloberflächen-Heparansulfat Proteoglykanen (13). Die erste Erwähnung fand Syndecan-1 1989, als es seinen Namen Syndecan erhielt, abgeleitet von dem griechischen Wort „Syndein“ für „verbinden“ (14). Seine Existenz war allerdings schon früher bekannt, so wurde es z.B. von Rapraeger und Bernfield (15) beschrieben.

2.2.2 Aufbau und Funktionen

Syndecan-1 wird vor allem an der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen exprimiert (16) und bindet an Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Kollagen I, III und IV (17), an Fibronectin (18) und Thrombospondin (19) und ist assoziiert mit dem Aktin-Zytoskelett (16). Daraus leitet sich die Funktion als eine Art Anker ab, der die Morphologie von Epithelien stabilisiert, indem er die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Zytoskelett verbindet.

Zur Familie der Syndecane gehören noch Syndecan-2, -3 und -4 (20).

Syndecane sind Typ I Transmembranproteine, sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne mit Heparansulfatketten, einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 1). Die zytoplasmatische Domäne ist bei allen Syndecanen und auch zwischen verschiedenen Spezies gleich aufgebaut (16). Sie enthält verschiedene Bindungsstellen für am Zytoskelettaufbau und an Signaltransduktionsvorgängen beteiligte Liganden am C-Terminus (21).

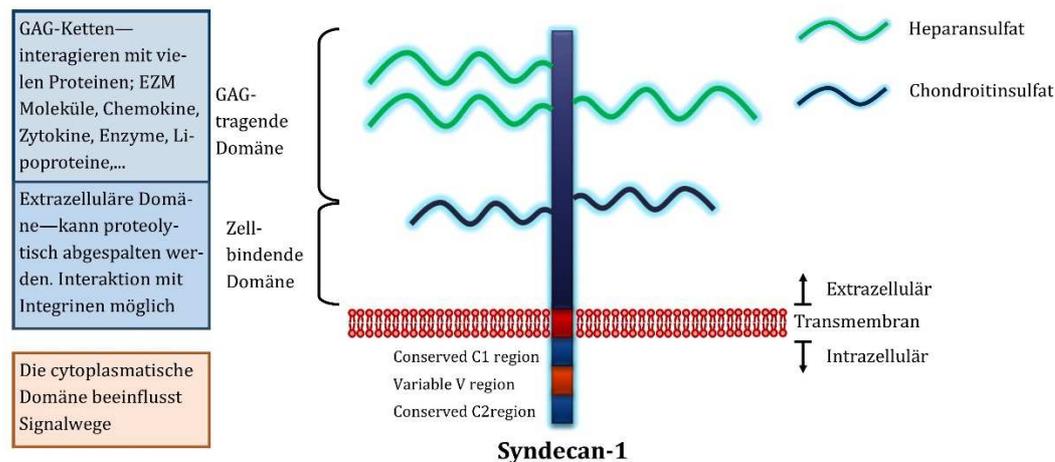


Abb. 1: Syndecan-1 Aufbau und Funktion (modifiziert nach Couchman et al. (13)); Syndecan-1 besteht aus einem Transmembranprotein mit intrazellulärer, transmembraner und extrazellulärer Domäne. Die extrazelluläre Domäne trägt Heparansulfat- und Chondroitinsulfatketten. Diese können mit vielen Molekülen interagieren (Proteine, EZM Moleküle, Chemokine, Zytokine, ...). Zudem kann diese Domäne abgespalten werden. Die intrazelluläre Domäne beeinflusst Signalwege.

Syndecane werden in unterschiedlichen Zellen und Lokalisation zu unterschiedlichen Zeiten und in unterschiedlicher Zahl exprimiert (22). In adultem Gewebe wird Syndecan-1 vor allem von einfachen und mehrschichtigen Epithelzellen, sowie von Plasmazellen exprimiert. Es kommt aber auch auf niedrigerem Expressionsniveau in einigen anderen Zelltypen vor, und seine Expression kann dort auch induziert werden (21).

Syndecane binden und regulieren viele Heparansulfat- und Heparin-bindende Moleküle. Über den genauen Stellenwert von Syndecanen und deren Relevanz wird angesichts der hohen Zahl an potentiellen Liganden diskutiert (20). Syndecane können die biologische Aktivität ihrer Liganden beeinflussen, indem sie ihre Stabilität, Konformation, Oligomerisierung oder Kompartimentierung verändern (23). Außerdem können Liganden direkt am Kernprotein binden (24–30), so scheinen alle Domänen für die biologische Funktion wichtig zu sein (20).

Auf der Zelloberfläche fungieren Syndecane vor allem als Corezeptoren und erleichtern die Interaktion ihrer Liganden und deren Signalrezeptoren (21,23). Syndecane kommen auch in löslicher Form vor, da ihre extrazelluläre Domäne proteolytisch abgespalten werden kann (Shedding) (21,31,32). Die löslichen Syndecane können als autokrine oder parakrine Effektoren auftreten. Syndecan-Shedding wird in vitro von einigen inflammatorischen Faktoren induziert, sowie in vivo unter verschiedenen pathologischen Bedingungen (20).

Obwohl Syndecan-1 Knockout-Mäuse überraschenderweise keinen entwicklungsbiologischen Phänotyp aufweisen, wird in verschiedenen Tiermodellen von Erkrankungen eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen veränderte Reaktion beobachtet. So zeigten sich neben einer veränderten Entzündung und Wundheilung in Syndecan-1 und Syndecan-4-defizienten Mäusen (33–38) auch eine Resistenz von Syndecan-1 Knockout-Mäusen gegenüber Wnt-induziertem Mammakarzinom (39–41). Aufgrund des Fehlens eines Entwicklungsphänotyps nimmt man an, dass der Verlust eines Syndecans funktionell durch andere Syndecane oder HSPGs (Heparansulfat-Proteoglykane) kompensiert werden kann (20).

Syndecan-1 partizipiert an vielen Zellvorgängen (Abbildung 2) und spielt eine Rolle bei Entzündungsprozessen (20,42,43), Wundheilungsprozessen (43), Regulation von Zelladhäsion und -motilität (44), Infektionserkrankungen (20), beeinflusst Wachstumsfaktoren (45) und spielt auch eine Rolle in der Tumorbilogie (13,20,46–48).

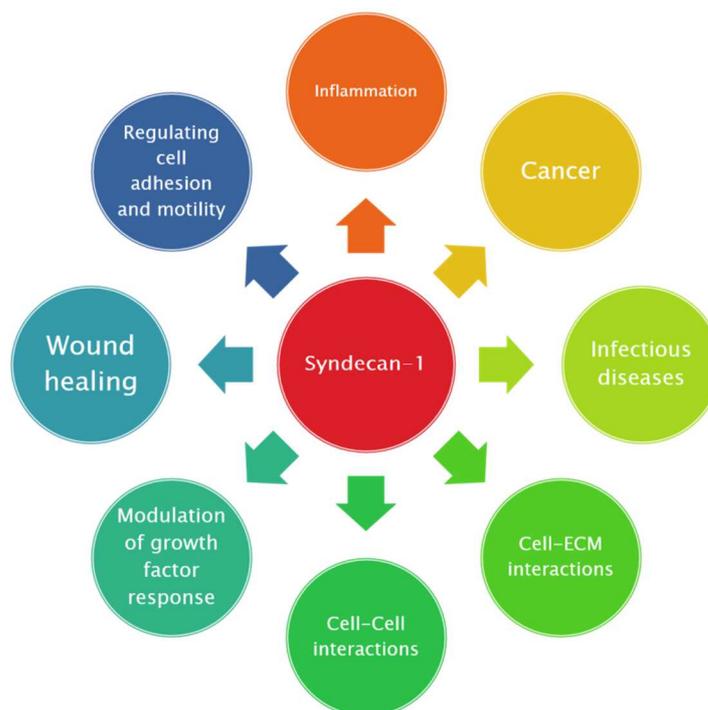


Abb. 2: Einflüsse und Funktionen von Syndecan-1 (13,20); Syndecan-1 beeinflusst Entzündungsprozesse und Wundheilungsprozesse, spielt eine Rolle bei Krebs, Zell-Zell und Zell-EZM-Interaktionen, moduliert die Reaktion auf Wachstumsfaktoren und beeinflusst die Regulation von Zelladhäsion und -motilität.

2.3 Zellkulturmodelle

2.3.1 MDA-MB-468

MDA-MB-468 ist eine triple-negative Brustkrebszelllinie vom Basal-A-Typ. Das bedeutet, sie ist Estrogen-Rezeptor, Progesteron-Rezeptor und human epidermal growth factor-Rezeptor 2 negativ (49). Patienten mit einem solchen triple-negativen Tumor vom basalen Typ haben eine sehr schlechte Prognose und es gibt keine zielgerichtete Therapie (50). Die Linie stammt von einer 51-jährigen dunkelhäutigen Patientin. Die Zellen wurden aus ihrem Pleuraerguss entnommen. Histologisch handelt es sich um ein Adenokarzinom (49).

2.3.2 MCF-7

MCF-7 ist eine Estrogen-Rezeptor und Progesteron-Rezeptor positive Brustkrebszelllinie vom luminalen Typ. Sie wurde aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen hellhäutigen Patientin gewonnen und stellt histologisch ein invasives duktales Karzinom (bzw. seit 2012 nach WHO Klassifikation „invasives Karzinom, kein spezieller Typ“ (4)) dar (49). Dieser Tumortyp kommt am häufigsten unter den invasiven Mammakarzinomen vor und weist keine ausreichenden Charakteristika auf, um einem speziellen Typ zugeordnet werden zu können (4).

2.4 Fragestellung

Bei dieser Arbeit sollte der Einfluss von Syndecan-1 auf die Strahlenresistenz beim Mammakarzinom genauer beleuchtet werden. Es wurde bereits eine erhöhte Strahlenresistenz bestimmter Syndecan-1-defizitären Brustkrebszellen festgestellt (44). Außerdem konnte eine erhöhte Zellmotilität unter Syndecan-1 Knockdown nachgewiesen werden (51). Dies sollte der Anknüpfungspunkt dieser Arbeit sein, denn die Mechanismen und beteiligten Signalwege sind noch fast gänzlich unerforscht. Insbesondere sollten Zielgene aus einer zuvor durchgeführten Transkriptom-weiten Expressionsanalyse untersucht werden und durch funktionelle Assays zur Proliferation, DNA-Reparaturprozessen und Zellzyklus ergänzt werden, mit dem Ziel Signalwege zu identifizieren, die als Angriffspunkte für Medikamente dienen könnten um eine gezielte Modulation der Strahlensensibilität von Brustkrebszellen zu ermöglichen. Folgende Fragen sollten dazu beantwortet werden:

Wie nimmt Syndecan-1 Einfluss auf die Vorgänge, die in der bestrahlten Zelle ablaufen und wie kommt die erhöhte Strahlenresistenz dabei zustande?

Welche Signalwege spielen dabei eine Rolle und könnten Angriffspunkt medikamentöser Therapie werden?

Wie wirkt sich Syndecan-1 auf die Zellproliferation nach Bestrahlung aus?

Welchen Einfluss hat es auf Reparaturprozesse nach Bestrahlung?

Wie verändert sich dabei der Zellzyklus?

Und wie nimmt Syndecan-1 Einfluss auf Signalvorgänge, die nach Bestrahlung ablaufen?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Es wurden zwei Brustkrebszelllinien für die Versuche verwendet: MDA-MB-468 und MCF-7. Die Kultivierung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Die MDA-MB-468 -Zellen wurden mit dem Nährmedium DMEM (+ 10 % FCS, + 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)) in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C, 7,5 % CO₂-Sättigung und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei starker Konfluenz (70-90 %) wurden die Zellen entweder für die Versuche verwendet oder gesplittet. Hierzu wurde das vorhandene Medium abpipettiert und die Zellen wurden zweimal mit 5-6 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 ml Accutase® für 6 Minuten inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und durch leichtes Klopfen auf den Rand der Zellkulturflasche unterstützt. Dann wurde, je nach Konfluenz, 2,5-5 ml Medium aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Mit dem Gemisch wurde die Wandung mehrmals gespült, um möglichst alle Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Die Zellsuspension wurde vollständig aufgenommen und bis auf 1 ml verworfen. Der Rest wurde zurück in die Flasche pipettiert und mit 13 ml Medium ergänzt. Somit wurde eine Passage im Sinne einer 1:4 – 1:6,5 -Verdünnung erzielt.

Die MCF-7-Zellen wurden zunächst mit dem Nährmedium RPMI (+ 10 % FCS, + 1 % P/S), in Zellkulturflaschen im Inkubator, bei 37 °C, & 5 % CO₂-Sättigung und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Zellen für optimales Wachstum weitere 10 % FCS benötigen. Daraufhin wurde das Medium angepasst (RPMI + 20 % FCS, + 1 % P/S).

Die Passage der Zellen erfolgte analog.

Fortwährend wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf Anomalien, Morphologie und Konfluenz untersucht.

3.1.1 Ablösen und Zählen der Zellen

Zunächst wurde die Konfluenz des Zellrasens unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Bei ausreichender Zelldichte wurde dann zunächst das vorhandene Medium verworfen und die Zellen anschließend mit 6-7 ml kaltem PBS gewaschen (bei MDA-MB-468 musste dieser Vorgang wiederholt werden, um ein vollständiges Ablösen zu gewährleisten). Dann folgte die Inkubation mit 2,5 ml Accutase® für 6 Minuten im Inkubator. Nach mehrmaliger mechanischer Erschütterung und visueller Kontrolle der Ablösung unterm Lichtmikroskop wurde die

Zellsuspension mit 4 ml frischem Medium resuspendiert und die Wandung mehrfach gespült. Der gesamte Inhalt wurde dann in ein Falcon Tube pipettiert und für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert.

Die leere Zellkulturflasche wurde mit 13 ml frischem Medium bestückt. In der Zwischenzeit wurde die Neubauer Zellkammer präpariert. Die Deckglasplatte wurde mithilfe von Adhäsion an der Trägerplatte fixiert.

Das zentrifugierte Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und gut durchmischt. 10 µl der Zellsuspension wurde zu 40 µl Farbstoff (Trypanblau-Lösung) gegeben. Etwa 0,9 µl der gefärbten Zellsuspension wurden dann zwischen Träger- und Deckplatte einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unterm Lichtmikroskop konnten anschließend die Zellen in 4 Quadraten (und jeweils auf 2 Außenlinien) gezählt werden. Mit dem Mittelwert aus den 4 Zählblöcken wurde dann die Zellzahl/ml bestimmt.

Zum Aussähen der Zellen in 6-Well-Platten wurden 300.000 - 350.000 Zellen pro Well benötigt. Die Menge an Zellsuspension wurde entsprechend berechnet und zu 2 ml Medium in jedes Well pipettiert. Die befüllte Platte wurde dann noch in Achten geschwenkt, um einen gleichmäßigen Bewuchs zu erreichen.

3.2 Transfektion mit siRNA

24 h nach Aussähen der Zellen kann mit der Transfektion begonnen werden.

Durch die Transfektion mit siRNA wird ein wirksamer Knockdown des Zielgens erreicht. siRNA (short interfering RNA) ist kurze, doppelsträngige RNA.

Diese RNA ist komplementär zur Sequenz der mRNA des auszuschaltenden Gens. Die doppelsträngige RNA ist Substrat von DICER, einer Ribonuclease. Diese spaltet die RNA in Bruchstücke von ca. 20 Nucleotiden, der siRNA. Die siRNA reagiert mit einem Multienzymkomplex, dem RISC (RNA-induced silencing complex). Es entsteht einzelsträngige siRNA, die mit den komplementären Sequenzen auf der Ziel-mRNA reagiert. Dies aktiviert Agonaut, eine RNase, die die mRNA abbaut (52).

Die Transfektion ist stabil über ca. 2-4 Tage, abhängig von Zelllinie und anderen Konditionen. DharmaFECT™ ist ein spezieller Lipidkomplex zum Einschleusen der siRNA in die Zielzelle (Abbildung 3) (53,54).

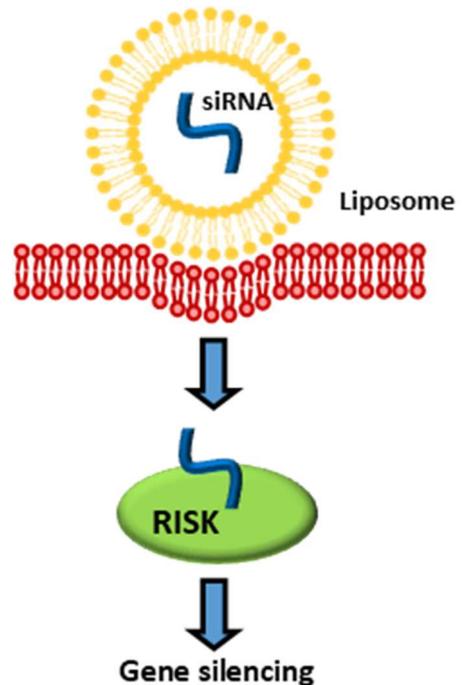


Abb. 3: Einschleusen der siRNA in die Zelle mithilfe eines Liposoms (modifiziert nach Yang et al. (55)) : Mithilfe eines Liposoms (alternativ: Lipidkomplex) wird die siRNA in die Zelle geschleust. Dort reagiert sie mit einem Multienzymkomplex (RISC). Es entsteht einzelsträngige siRNA, die mit den komplementären Sequenzen der Ziel-mRNA reagiert und so deren Abbau einleitet.

Zur praktischen Durchführung der Transfektion wird zunächst ausgerechnet, wieviel Reagenzien benötigt werden. Pro Probe werden 2 µl siRNA in 78 µl Opti-MEM®, sowie 2 µl DharmaFECT™ in 78 µl Opti-MEM® benötigt. Es wurden eine negative Kontroll-siRNA und eine Syndecan-1-siRNA verwendet.

Das DharmaFECT™ wurde zunächst mit dem Opti-MEM® vermischt. Es inkubierte 5 Minuten bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurde die siRNA in Opti-MEM® gelöst.

Die siRNA-Lösung wurde dann mit der entsprechenden Menge DharmaFECT™-Opti-MEM®-Lösung vermischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Inzwischen wurde ein Mediumwechsel bei den 6-Well-Platten durchgeführt. Pro Well werden 840 µl vorgewärmtes Opti-MEM® benötigt. Sorgfältige Beschriftung versteht sich von selbst. Nach der Inkubationszeit wurden vorsichtig 160 µl der Transfektions-Lösung über die gesamte Fläche des

Wells tropfenweise verteilt. 24 h nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und das Transfektionsmedium wurde gegen das übliche Nährmedium für die entsprechende Zelllinie ausgetauscht. Da die Zellen meist bestrahlt werden mussten, wurde nur 1,5 ml Medium hinzugefügt, damit beim Transport nicht versehentlich Medium in ein benachbartes Well gelangte.

Die Bestrahlung erfolgte in der Abteilung für Strahlentherapie des UKM. Je nach Versuch wurden die Zellen mit 2-4 Gy bestrahlt.

3.2.1 siRNA Details

Für die Versuche wurde die Syndecan-1 siRNA mit der Assay-ID S12634 [Thermo Fisher] verwendet. Die siRNA liegt an der Grenze der Exons 3 und 4 bei Basenpaar 544 des Syndecan-1-Gens (RefSeq Nr. NM_001006946.1) Weitere Details sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Syndecan-1 siRNA Details für siRNA S12634 (56)

Gensymbol: SDC1					
Sequenz		Translatiertes Protein	Zielexon(s)	siRNA Lokalisation	Image Clone ID
RefSeq	NM_001006946.1	NP_001006947.1	3, 4	544	
	NM_002997.4	NP_002988.3	2, 3	452	
	XM_005262620.4	XP_005262677.1	2, 3	295	
	XM_005262621.3	XP_005262678.3	2, 3	175	
	XM_005262622.2	XP_005262679.1	2, 3	114	
GeneBank mRNA	AJ551176.1		2, 3	401	
	AK222739.1		2, 3	383	
	AK299385.1		2, 3	353	
	AK307313.1		2, 3	273	
	AK313974.1		2, 3	380	
	BC008765.2		2, 3	396	3347793
	BM910157.1			454	
	J05392.1		2, 3	358	
	X60306.1		2, 3	153	

3.3 Quantitative Real-Time-PCR

3.3.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte 24 h nach Bestrahlung mit dem innuPREP RNA mini Kit [analytikjena]. Das vorhandene Medium wurde abpipettiert, 400 µl Lysis Puffer wurden zugegeben und 4 Minuten inkubiert. Mit einer umgedrehten Pipettenspitze wurden die Zellen zusätzlich manuell vom Boden gelöst. Das Zelllysate wurde in den ersten Filter (Bezeichnung D - blau) überführt. Der Filter wurde zuvor in einem Auffangröhrchen platziert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000 U/m für 2 Minuten. Bei diesem Schritt wird selektiv die DNA entfernt. Der Filter wurde verworfen, zum Filtrat wurden 400 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde dann in den Filter R (pink) pipettiert, der ebenfalls in einem Auffangröhrchen ruht. Hiermit soll eine selektive Bindung der RNA erreicht werden. Es folgt eine Zentrifugation bei 12.000 U/m für 2 Minuten. Nun wird das Filtrat verworfen und der Filter in ein neues Auffangröhrchen gesetzt. Die nächsten Schritte dienen der Aufreinigung der RNA. 500µl HS Lösung wird zugeführt. Es wurde für eine Minute bei 12.000 U/m zentrifugiert. Erneut wurde das Filtrat verworfen und der Filter in ein neues Röhrchen platziert. Nun wurden 750 µl LS Lösung zugefügt und wieder eine Minute bei 12.000 U/m zentrifugiert.

Es folgte eine trockene Zentrifugation (nur ein neues Auffangröhrchen) für 3 Minuten bei 12.000 U/m. Zuletzt wurde der Filter in ein verschließbares Röhrchen gegeben und 30-80 µl RNase freies Wasser wurden zwecks Elution hinzugefügt (Wassermenge je nach Zelldichte; meist 50 µl). Nach einer Minute erfolgte eine letzte Zentrifugation für 2 Minuten bei 8.000 U/m. Ab jetzt wurde die empfindliche RNA gekühlt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren.

3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mithilfe eines Photometers bestimmt. Das RNA-Programm wurde am Gerät ausgewählt und die Verdünnung eingetragen. In die Messküvette wurde zunächst als Blanc 60 µl Nuklease-freies Wasser pipettiert und gemessen. Im Anschluss wurden 3 µl der Probe mit 57 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und quantifiziert. Die Messung wurde aufgezeichnet.

Anschließend wurde 10 µl Probenlösung mit einer Konzentration von 1 µg/µl hergestellt und kurz zentrifugiert.

3.3.3 Umschreiben der RNA in cDNA

Zunächst wurde der Mastermix entsprechend 10 µl je Probe hergestellt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Mastermix Zusammensetzung

Reagenz	Menge in µl je Probe	Menge für 9 Proben
10x RT Buffer	2	18
25x dNTP Mix (100mM)	0,8	7,2
10x RT Random Primers	2,0	18
Reverse Transkriptase	1,0	9
Nuclease-free H ₂ O	4,2	37,8
Summe	10	90

10 µl Mastermix wurde dann zu den 10 µl Probe (1 µg/µl) gegeben, vermischt und anzentrifugiert. Das Gemisch wird dann im vorgeheizten PCR Cycler verarbeitet. Das Programm „Highcap“ läuft in folgenden Schritten ab (Tabelle 4):

Tabelle 4: Cycler-Protokoll zur cDNA-Herstellung

	Temperatur in °C	Zeit in min
Schritt 1	25	10
Schritt 2	37	120
Schritt 3	85	5
Schritt 4	4	∞

Nach Abschluss des Programms wurden noch 80 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.3.4 Quantitative Real-Time-PCR Protokoll 1

Bei diesem Protokoll wurden TaqMan™ Sonden verwendet. Dieses Assay nutzt die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase zur Detektion der Sequenz-spezifischen Amplifikation aus. Lee et al. entwickelten die fluorogene TaqMan™ Sonde (57). Diese besteht aus einem Oligonukleotid, welches am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) ausgestattet ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und zusätzlich durch einen Phosphatrest blockiert wird. Bei Anregung der intakten Sonde mit 488 nm Wellenlänge unterdrückt der Quencher durch Fluoreszenz-

Energietransfer die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes. Während der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase auf die Sonde und verdrängt sie. Die AmpliTaq DNA Polymerase hydrolysiert die Sonde. Die Verbindung zwischen Reporter und Quencher wird unterbrochen und die Fluoreszenz wird nicht länger unterdrückt. Je mehr PCR-Produkt akkumuliert wird, entsprechend steigt auch die Fluoreszenz mit jedem Zyklus an. Das Signal ist hoch sequenzspezifisch, da nicht 100%ig passende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird. Die Veränderungen der Fluoreszenz können nun nach jedem Zyklus erfasst werden (58).

Verwendetes Gerät: Applied Biosystems, 7300 Real Time PCR System

Zunächst wurden Mastermixe hergestellt, für die entsprechenden TaqMan-Sonden und den Standard 18S mit einer Extraprobenmenge für Pipettierverlust (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Pipettierschema Mastermix für q-RT-PCR

Anzahl Proben	Sonde (µl)	Mastermix (µl)	H ₂ O (µl)
1	0,625	6,25	3,125
5	3,125	31,25	15,625
9	5,625	56,25	28,125

In eine 96-er Platte wurden dann 2,5 µl Probe zu 10 µl Mastermix pipettiert. Die Platte wird sorgfältig zugeklebt und bis ca. 500 U/m anzentrifugiert. Die PCR wird mit der 7300 System Software [Applied Biosystems] gestartet.

3.3.5 Gradienten-PCR

Die neu erstellten Primer mussten vor ihrer Verwendung hinsichtlich der optimalen Annealing-Temperatur getestet werden. Mit dem Programm *Oligo* wurde zunächst die rechnerisch optimale Annealing Temperatur für jeden Primer ermittelt. Ein Bereich um diesen Wert wurde für die Gradienten-PCR ausgewählt.

Beispiel: Bei 55 °C als errechnetem Wert, wurde ein Bereich zwischen 53 °C und 59 °C gewählt. Es werden 8 Ansätze derselben Probe verwendet, außerdem eine Negativ-Kontrolle mit Nuklease-freiem Wasser.

Der Mastermix wird, wie in Tabelle 6 beschrieben, hergestellt.

Tabelle 6: Mastermix für Gradienten-PCR

Reagenz	Volumen/Probe in µl	Volumen bei 10 Proben in µl
Puffer	2,5	25
dNTP	0,5	5
UDG	0,5	5
Primer forward	1	10
Primer reverse	1	10
Taq-Polymerase	0,1	1
Taq-Antikörper	0,1	1
Nuklease-freies Wasser	16,8	168
Summe	22,5	225

8 Ansätze mit je 22,5 µl Mastermix und 2,5 µl Probe, sowie eine Negativkontrolle wurden hergestellt.

Anschließend wurde eine Gradienten-PCR mit den unterschiedlichen Annealing- Temperaturen gestartet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Schritte der Gradienten-PCR

	Temperatur in °C	Dauer in min	Wiederholungen
Schritt 1	37	15	1
Schritt 2	95	10	1
Schritt 3	95	0,5	} 40
	Gradient	0,5	
	72	0,5	
Schritt 4	72	4	1

3.3.6 Primer

Ausgangspunkt für die Primersuche war eine Liste mit eventuell relevanten Primern, aus einer unpublizierten Transkriptom-weiten Expressionsanalyse, die zuvor in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Götte in Kooperation mit Prof. Dr. George Yip (National University of Singapore) durchgeführt wurde. In dieser Analyse wurden mittels Affymetrix-Genarrays (Human Genome U133 plus 2.0 Array) drei biologische Replikate von MDA-MB-231 Zellen, die einer Behandlung +/- Sdc-1 siRNA und +/- 4 Gy Bestrahlung unterzogen worden waren, analog zur Publikation von Ibrahim SA et al. (59) auf Transkriptomebene untersucht. Hierbei wurden signifikante Unterschiede in der differentiellen Expression der mRNAs Cyclin A1, Cyclin B1, CDK6, CREB1, ET1, PMS1 und EXO1 festgestellt (Prof. Dr. M. Götte, persönliche Mitteilung), welche in dieser Dissertation an weiteren Replikaten zweier Zelllinien mittels qPCR unabhängig untersucht wurden.

In einem ersten Ansatz wurde zunächst in PubMed nach Publikationen, die Primersequenzen für diese Primer enthielten, gesucht. Gefundene Sequenzen wurden dann in PubMed Blast, im humanen Genom gesucht, um die Korrektheit der publizierten Sequenz zu verifizieren.

Da jedoch meist kein Treffer erzielt werden konnte, sind die folgenden Primer von Dr. Jürgen Weidner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Greve designt worden. Anhand der Sequenz wurde dann mit dem Programm „Oligo“ die optimale Annealing Temperatur für jeden Primer errechnet. Die Primer wurden dann bei der Firma eurogentec bestellt, in 1 ml TE resuspendiert, photometrisch quantifiziert und im Anschluss auf eine Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Informationen zu den Primern sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Dann wurde für jedes Primerpaar eine Gradienten-PCR durchgeführt, der Temperaturbereich wurde dabei um die errechneten Annealing-Temperaturen gelegt. Die Fragmente wurden dann

mittels Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht (Abb. 4-9). Anhand der Banden konnte die Länge des Fragments ermittelt werden, und somit festgestellt werden, ob das richtige Fragment vervielfältigt wurde. Gleichzeitig konnte die optimalste Annealing Temperatur, bei der intensivsten Bande, festgelegt werden. Bei Vorhandensein von Primerdimeren, erscheint eine Bande im Bereich von etwa 20 Basenpaaren. Beim Auftreten dieses Phänomens ist eine andere Temperatur zu bevorzugen. Für nahezu alle Primer ergab sich für den gesamten getesteten Temperaturbereich nur 1 Produkt.

Tabelle 8: Primerdetails; rev= reverse, for= forward

Primer Abkürzung	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	GC- Gehalt	Größe des Fragments (in BP)	Lokalis- ation	Errech- nete Anneal- ing Temp.	Getestete r Temp.- Bereich	Anneal- ing Temp.
CCNA1 for	Cyclin A1	GAGGTCCCGATGCTTGTCAGA	12/ 21	318	408- 726	61 °C	55- 63 °C	60 °C
CCNA1 rev		CCGGTGTCTACTTCATACACA	10/ 21			57 °C		
CCNB1 for	Cyclin B1	TTTGCACTTCCTTCGGAGAG	10/ 20	241	1159- 1400	55 °C	53- 59 °C	56 °C
CCNB1 rev		GGTGCTGCATAACTGGAAGA	10/ 20			55 °C		
CDK6 for	Cyclin- dependent Kinase 6	GCTGACCAGCAGTACGAATG	11/ 20	239	542- 781	57 °C	53- 59 °C	56 °C
CDK6 rev		TGTTTCGTGACACTGTGCACA	10/ 20			55 °C		
EXO1 for	Exonucleas e 1	CAGTCACTGAGTGGAGTTGAGA	11/ 22	168	474- 642	60 °C	56- 64 °C	63 °C
EXO1 rev		TCTCACATGGATGGGTTCTGAA	10/ 22			60 °C		
CREB1 for	cAMP response element- binding protein	CCACAAGTCCAAACAGTTCAGA	10/ 22	204	492- 696	60 °C	56- 64 °C	57 °C
CREB1 rev		GTGCTGAAGTCTCCTCTTCAGA	11/ 22			60 °C		
PMS1 for	postmeiotic segregation increased 1	AAACAATTGCCTGCGGCAACA	10/ 21		24-	60 °C	56- 64 °C	61 °C
PMS1 rev		AGCTCATGAGGAGATCTTGGA	10/ 21			60 °C		
PMS1neu for	postmeiotic segregation increased 1	ACAGATGTTTCCGCAGCTGACA	11/ 22			61 °C	58- 65 °C	
PMS1neu rev		TCTGAGAGTTCTCCATGATACA	10/ 23			61 °C		

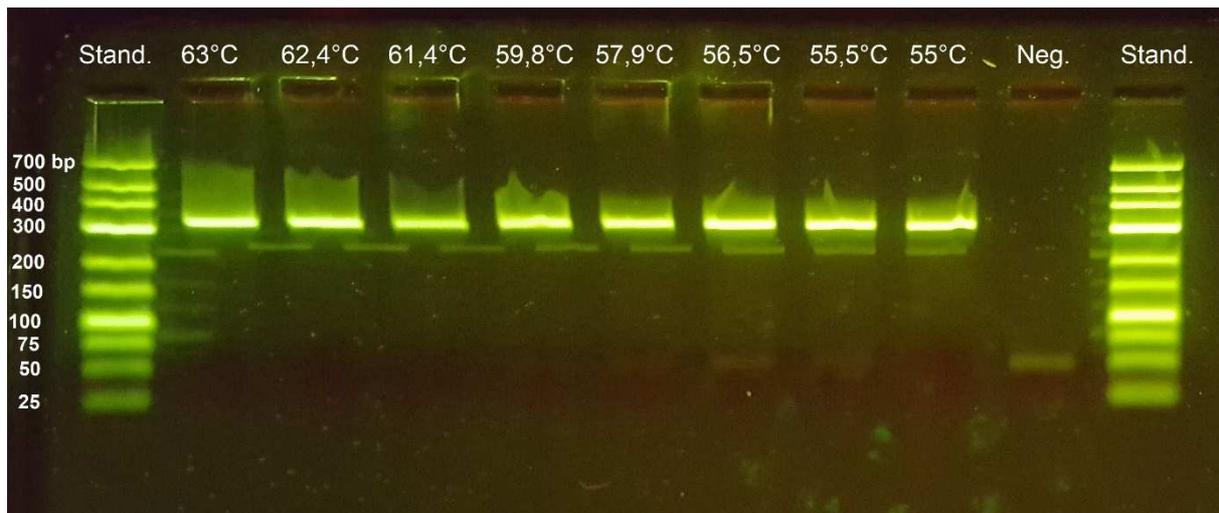


Abb. 4: Gelelektrophorese CCNA1; Neg.= Negativprobe mit nuklease-freiem Wasser, Stand. = Standard GeneRuler Low Range DNA der Firma Thermo Scientific; Banden unterhalb der Hauptbande stellen Reflektionen als Artefakt des Imaging-Systems dar.

In der oberen Zeile sind die Standards und Proben mit unterschiedlichen Temperaturen aufgetragen. Beim Standard wurde die entsprechende Länge in Basenpaaren zugeordnet. Bei den Proben erkennt man nun die unterschiedlich stark leuchtenden Banden im Bereich von etwa 300 Basenpaaren (Fragmentlänge: 318 bp).

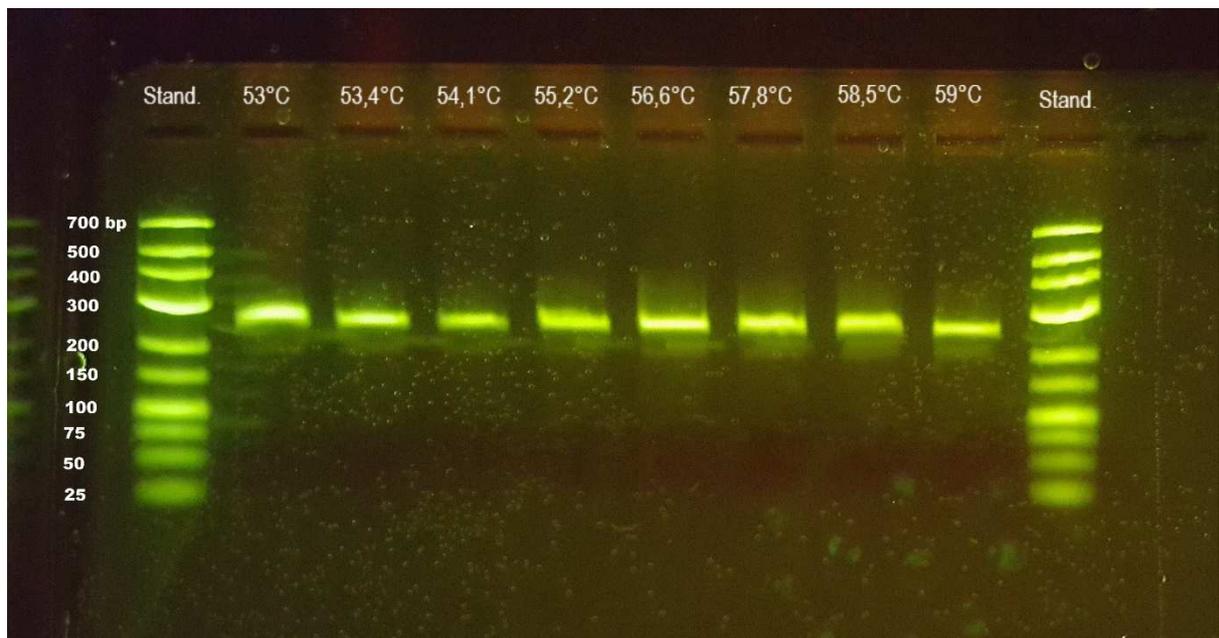


Abb. 5: Gelelektrophorese CCNB1

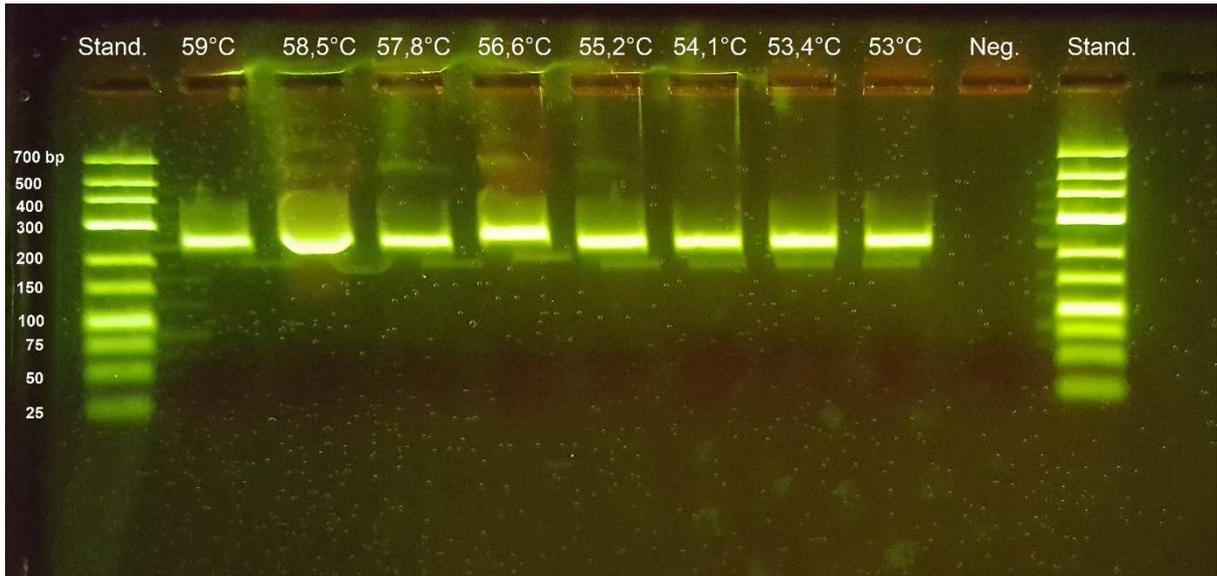


Abb. 6: Gelelektrophorese CDK6

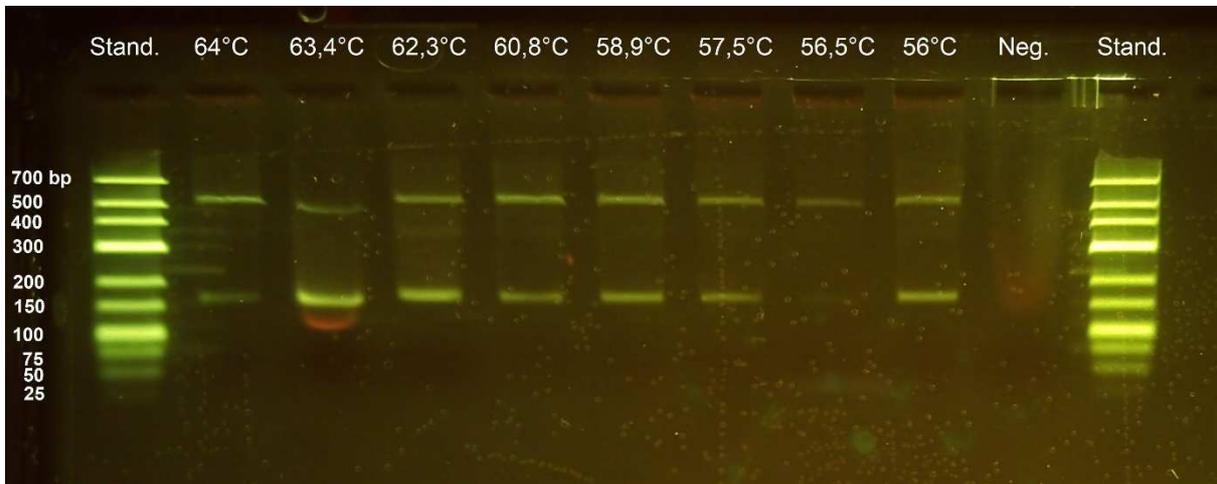


Abb. 7: Gelelektrophorese EXO1 und PMS1

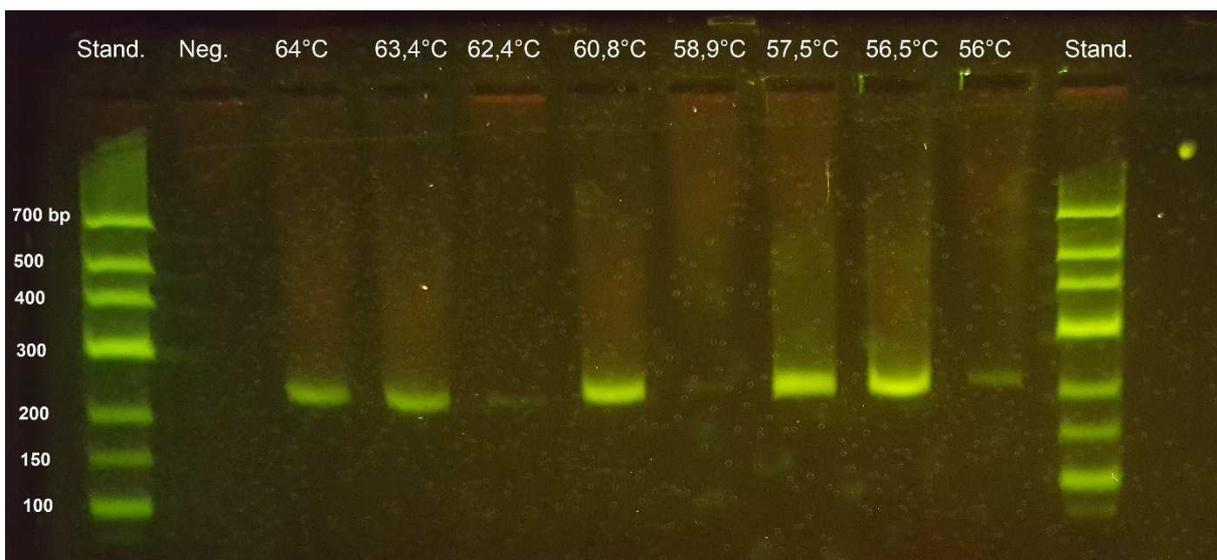


Abb. 8: Gelelektrophorese CREB1

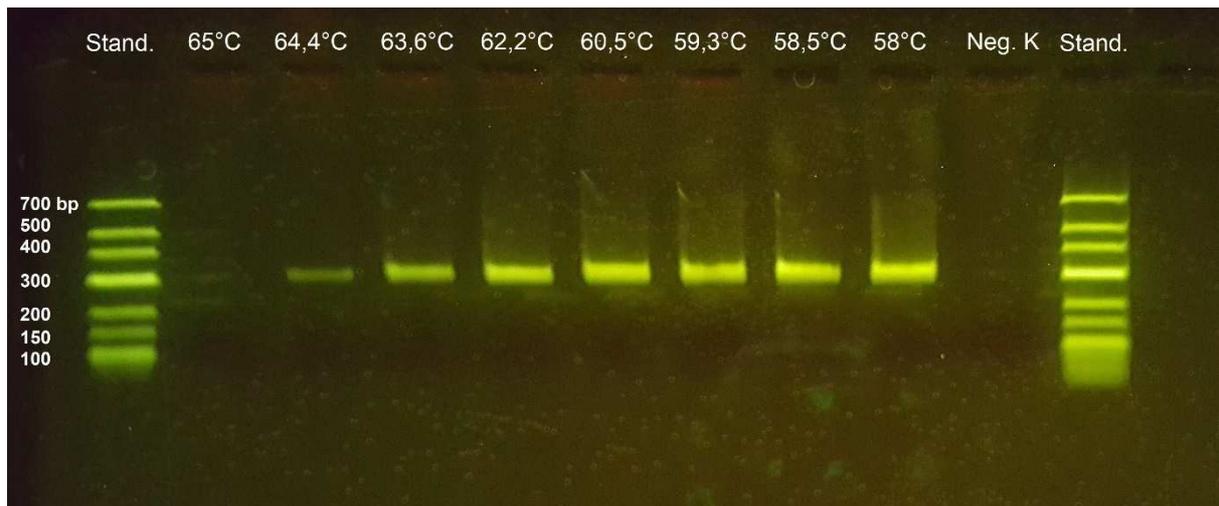


Abb. 9: Gelelektrophorese PMS1neu

3.3.7 Quantitative Real-Time-PCR – Protokoll 2

Bei den neu designten Primern wurde mit einem interkalierenden fluoreszierenden Farbstoff gearbeitet, SYTO 9® [ThermoScientific]. Es handelt sich dabei um einen grün-fluoreszierenden Farbstoff mit hoher Affinität zu DNA, mit maximaler Fluoreszenzanregung bei 483 nm und maximaler Fluoreszenzemission bei 503 nm. Dieser Farbstoff lagert sich in die Windungen der helikalen Struktur doppelsträngiger DNA an (60).

Mit der Akkumulation der Ziel-DNA-Stränge, steigt auch die Intensität der Fluoreszenz. Die Primer sind unmarkiert und genspezifisch. Der Farbstoff reagiert bei der PCR nicht nur mit der Zielsequenz, sondern mit jeder Form doppelsträngiger DNA, unter ungünstigen Bedingungen auch mit Primer-Dimeren oder PCR-Beiprodukten. Diese Methode hat also eine geringere Spezifität und eine hohe Sensitivität. Die Spezifität des PCR-Produkts wird mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft. Dazu wird das PCR-Produkt durch kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen. In der Schmelzpunktanalyse stellt der Peak das Zielgen dar. Primerdimere oder PCR-Beiprodukte würden als zusätzliche Peaks erkennbar (61).

Als Standard wurde humanes HPRT verwendet. 2 Mastermixe mit folgender Zusammensetzung wurden hergestellt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Mastermixe für qPCR Protokoll 2

In µl	Primer-Mastermix		Standard-Mastermix	
	Für 1 Probe	Für 15 Proben	Für 1 Probe	Für 15 Proben
Nuklease-freies H ₂ O	16,3	244,5	15,3	229,5
10x PCR Puffer + SYTO 9	2,5	37,5	2,5	37,5
MgCl ₂ , 2.0 mM (25 mM)	0,5	7,5	0,5	7,5
dNTP's + 50 % UTP	0,5	7,5	0,5	7,5
UDG (1U/µl)	0,5	7,5	0,5	7,5
Primer for	1,0	15	-	-
Primer rev	1,0	15	-	-
HPRT	-	-	3,0	45
Super Taq-Polymerase	0,1	1,5	0,1	1,5
Taq Antikörper	0,1	1,5	0,1	1,5
Summe	22,5	337,5	22,5	337,5

Dabei wurden zunächst die Taq-Polymerase und ihr Antikörper zusammen pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Beschriftung der Proberöhrchen.

Je zwei Negativkontrollen für jeden Mastermix wurden hergestellt, mit 22,5 µl Mastermix und 2,5µl Nuklease-freiem Wasser.

Bei den Proben wurden bei einem Durchlauf 4 Proben, mit je 3 technischen Replikaten, quantifiziert (22,5 µl Mastermix + 2,5 µl Probe).

Bei dem PCR Gerät wurde dann das in Tabelle 10 dargestellte Programm gestartet, mit der jeweils für das Primerpaar passenden optimalen Annealing Temperatur.

Tabelle 10: PCR-Protokoll 2

	Temperatur in °C	Dauer in min	Wiederholungen
Schritt 1 (Hold)	37	15	1
Schritt 2 (Hold 2)	95	5	1
Schritt 3 (Cycling)	95	30 sec.	} 40
	Annealing Temp.	40 sec.	
	72	30 sec.	
Schritt 4 (Hold 3)	72	6	1
Schritt 5 (Melt)	Anstieg von 50-95 °C in Schritten von 1 °C	90 sec. 50 °C 5 sec jeder Schritt	1

Weitere Einstellungen:

- Volumen 25 µl
- Fluoreszenz Green

Das Gerät war ein Rotor-Gene Q von Qiagen, mit zugehöriger Software, Rotor-Gene Q Series Software.

3.4 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 3%ige Metaphorgele verwendet, mit einer Auftrennung von 25-800 Basenpaaren. Das Elektrophorese-Gerät wurde von Dr. Weidner aus der Klinik für Strahlentherapie entwickelt und nach seinen Plänen hergestellt. Es enthält 2 Lichtfilter, sowie eine Gelkammer mit platinieren Spannungsdrähten.

Unterhalb der Gelkammer ist ein Filter, durchlässig für Licht mit der Wellenlänge 480 nm, dieses Licht regt die Fluoreszenz des Farbstoffes GelGreen an. Durch den oberen Filter, gelangt nur Licht mit der Wellenlänge 520 nm, dies entspricht der angeregten Fluoreszenz. Somit lässt sich die Wanderung der Fragmente im Gel live nachvollziehen und kontrollieren.

Das vorgegossene Gel wurde in die dafür vorgesehene Kammer eingesetzt. Das Gel wurde dann mit dem TBE Puffer (1x Tris-Borat-EDTA) vollständig bedeckt.

Dann folgte die Vorbereitung der Proben. 2 Standards wurden folgendermaßen zusammen pipettiert:

- 4 µl Standard (GeneRuler Low Range DNA – Thermo Scientific)
- 4 µl TE
- 4 µl Farbstoff (GelGreen 1:200)
- 3 µl Stockmix (blauer Farbstoff mit hochdosierter Zuckerlösung)

Der Stockmix beschwert dabei die Proben, damit sie sich leichter in die Kammern pipettieren lassen.

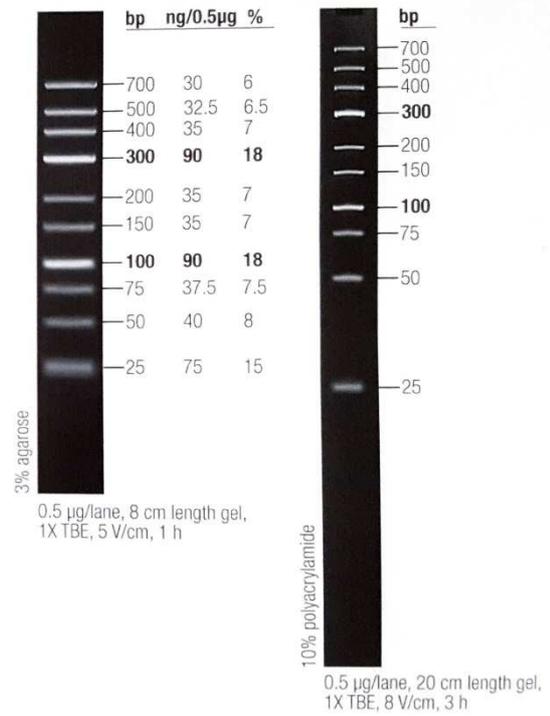
Die Proben und die Negativkontrolle wurden folgendermaßen präpariert:

- 6 µl Probe
- 4 µl Farbstoff (GelGreen 1:200)
- 2-3 µl Stockmix

Schließlich wurden die Gemische in die Gelkammern pipettiert, außen jeweils ein Standard (Abbildung 10), und die Elektrophorese wurde gestartet. Nach ca. 45 Minuten konnte man das Ergebnis mithilfe eines Smartphones abfotografieren.

Rechts: Abb. 10: Standard GeneRuler Low Range DNA Skala

GeneRuler Low Range DNA Ladder



3.5 γ H2AX-Test

Zur Bestimmung der Doppelstrangbruch-Reparatur-Kapazität wird die strahleninduzierte Phosphorylierung des Histons H2AX untersucht.

Zunächst werden DNA-Doppelstrangbrüche durch ionisierende Bestrahlung induziert. Die Zelle reagiert mit der Aktivierung einer Reihe von komplexen und gut organisierten Signal- und Effektorwegen, bekannt als DNA damage response (DDR), mit dem Ziel die ursprüngliche Form der DNA wiederherzustellen. Die gefährlichsten Läsionen sind DNA Doppelstrangbrüche, da sie schwer zu reparieren sind und die Zelle häufig in die Apoptose zwingen. Außerdem kann es zur Verbindung nicht-zusammengehörender Enden kommen, sowie chromosomale Umordnung, was wiederum mit Zelltransformation und Tumorgenese assoziiert ist. In einer sehr frühen Reaktion der Zellen kommt es zur Phosphorylierung des Histons H2AX zu γ H2AX. γ H2AX wiederum kann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die Anzahl der γ H2AX-Foci ist dabei ein Maß für die Zahl der vorhandenen Doppelstrangbrüche. Der Test hat eine hohe Sensitivität, und zeigt bereits Unterschiede bei sehr geringen Strahlendosen von etwa 1 mGy (62).

Folgende Reagenzien wurden bei dem Test verwendet und mussten einen Tag vor Beginn des Versuchs angesetzt werden (Haltbarkeit ca. 2 Wochen bei 4 °C):

0,25 % Triton

0,25 ml Triton wurden in 100 ml PBS (unsteril) unter Rühren und bei 50 °C gelöst.

5 % FCS

2ml FCS wurden in 38 ml PBS gelöst.

TBP (0,2 % Triton, 1 % BSA in PBS)

0,1 ml Triton wurden mit 0,5g BSA in 50 ml PBS gelöst.

FACS-Puffer (10 % FCS in PBS)

5 ml FCS wurden in 45 ml PBS gelöst.

Versuchsvorbereitung:

Zunächst wurden die Zellen ausgesät. Dabei wurden 3 Wells pro Messzeitpunkt mit je 330.000 Zellen verwendet (Abbildung 11).

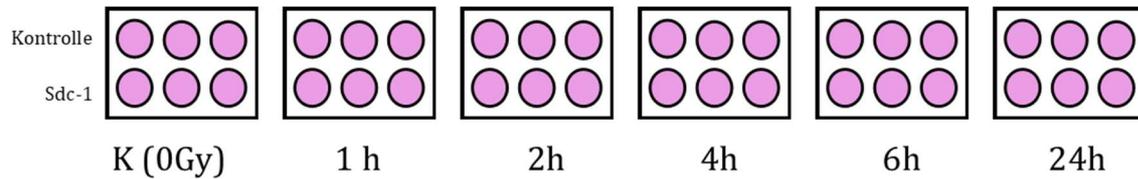


Abb. 11: Versuchsaufbau Zellen für γ H2AX-Experiment

Für die Zelllinie MDA-MB-468 wurde dabei das Nährmedium DMEM (+10 % FCS, + 1 % P/S) ausgewählt. Nach 24 Stunden erfolgte dann die Transfektion mit siRNA. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Bestrahlung von 5 Platten mit 2 Gy.

Die Fixierung erfolgte dann zu den Messzeitpunkten, nach 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung.

Fixierung:

Zunächst wurde das Medium abpipettiert, es folgte einmaliges Waschen mit 1 ml PBS. Nun wurde 1 ml Accutase® pro Well aufgetragen und inkubiert für 6 Minuten bei 37 °C, 7,5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit.

Die abgelösten Zellen aus drei identisch behandelten Zellen, wurden in ein Falcon Tube abpipettiert und mit 3 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert.

Anschließend wurden die Zellen bei 900 rpm (152 xg) für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml PBS gelöst und dann erneut zentrifugiert. Dann ließ man das Pellet gut abtropfen und addierte 300 μ l PBS, suspendierte die Zellen darin und gab schließlich noch tropfenweise 700 μ l eiskaltes 100%iges Ethanol hinzu. Die so fixierten Zellen wurden bei -20 °C eingefroren (Haltbarkeit ca. 14 Tage).

Färbung:

Die fixierten Zellen wurden kurz aufgetaut und dann für 5 Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand musste vorsichtig abgegossen werden. Dann wurden je 1ml 0,25%iges Triton in PBS zugegeben und kurz gevortext. Das Gemisch inkubiert für 30 Minuten auf Eis.

Es folgte eine Zentrifugation bei 300 xg für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgegossen, 500 μ l 5%iges FCS in PBS zu jedem Ansatz pipettiert und kurz gevortext. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei Raumtemperatur.

Nach einer erneuten Zentrifugation (300 xg, 5 min) wurde der Überstand abgegossen und gut abgetropft. Die Zellen wurden in 120 µl des 1:500 verdünnten Antikörpers in TBP für 120 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurden 500 µl TBP addiert und das Gemisch wurde erneut zentrifugiert (300xg, 5 min) und gut abgetropft.

Die folgenden Schritte erfolgten alle im Dunkeln:

Das Pellet wurde in 120 µl des 1:500 verdünnten sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG) in TBP resuspendiert und inkubiert 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, mit regelmäßiger manueller Durchmischung.

Nach der Inkubationszeit wurden 500 µl TBP hinzugefügt und es folgte eine erneute Zentrifugation (300 xg, 5 min). Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 1.000 µl FACS Puffer resuspendiert und die DNA wurde mit 40 µl PJ gegengefärbt. Das Gemisch ließ man 10 Minuten auf Eis und im Dunkeln ruhen.

Schließlich erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (CyFlow Space, Sysmex/Partec, Münster). Dazu wurden die Zellen mit einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt, die Emission wurde im roten Kanal (FL3, 675 nm) und im grünen Kanal (FL1, 527 nm) gemessen. Die Ergebnisse wurden als Punkthistogramm (Dotplot) mit der Auftragung FL3 gegen FL1 dargestellt und durch das Setzen von Auswertefenstern (Gates) analysiert. Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit der geräteeigenen Software (FloMax, Quantum Analysis, Münster).

3.6 Zellzyklus-Analyse mittels DAPI-Färbung

Es wurden vier Wells von zwei 6-Well-Platten mit je 330.000 Zellen besiedelt. Zwei Messzeitpunkte wurden ausgewählt: 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung.

24 Stunden nach Säen der Zellen erfolgte die Transfektion und nach weiteren 24 Stunden die Bestrahlung einer Platte mit 2 Gy.

Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen dann abgelöst (einmal mit 1 ml PBS gewaschen und dann 5 min mit 1 ml Accutase® inkubiert).

Die Zellen wurden mit 1 ml vorgewärmtem Medium in ein Falcon Tube aufgenommen und 5 min bei 900 rpm (152 xg) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert.

In ein Messröhrchen wurden nun 900 µl DAPI und 100 µl Zellprobe pipettiert und 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Gemessen wurde dann mit dem Durchflusszytometer. Die so gefärbten Zellen wurden mit einer UV-LED bei einer Wellenlänge von 375 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität bei 455 nm im FL4-Kanal gemessen.

DAPI interkaliert dabei quantitativ die DNA, die Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Phase des Zellzyklus erfolgt anhand ihres DNA-Gehaltes. Hierzu wurde die Software des Durchflusszytometers FloMax verwendet.

3.7 BrdU-Assay

Die Methode geht zurück auf Gratzner et al., die einen monoklonalen Antikörper für 5-Bromodesoxyuridin entwickelten. Hierdurch konnten proliferierende Zellen markiert werden, um sie anschließend durchflusszytometrisch zu quantifizieren (63).

BrdU wird in neu synthetisierte DNA als ein Ersatz für Thymidin eingebaut und markiert damit proliferierende Zellen und deren Tochterzellen, bevor es nach vielen Zellteilungen schließlich immer mehr verdünnt wird. Durch einen spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörper wird BrdU markiert und kann dann quantifiziert werden (64).

Folgende Reagenzien wurden für den Versuch hergestellt:

BrdU-Stammlösung:

Die Stammlösung wurde meist einen Tag vor der Fixierung hergestellt. 0,023 g BrdU wurden mit 0,02 g dCyt in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und mindestens 10 Minuten gerührt. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert, und in einem lichtgeschützten Gefäß bei 4 °C gelagert.

90 µl der Stammlösung wurden dann noch mit 36 ml Medium vermischt und lichtgeschützt bereitgestellt.

Pepsin-HCl

0,008 g Pepsin wurden in 40 ml 2N HCl gelöst. (Haltbarkeit etwa 2 Wochen bei 4 °C)

Propidiumiodid

PI (0,005 g in 100 ml Tris, pH=7,5) wurde im Verhältnis 1:10 in PBS gelöst. Pro Probe wurden 1,5 ml benötigt (+ 4,5 ml für Pipettierverlust). Bei 8 Proben also 1.500 µl PJ in 13.500 µl PBS. Das Gemisch wurde immer unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Versuchsvorbereitung:

Es wurden 300.000 Zellen pro Well ausgesät. Pro Messzeitpunkt wurden 2 Platten mit je 4 Wells mit Zellen bestückt (Abbildung 12).

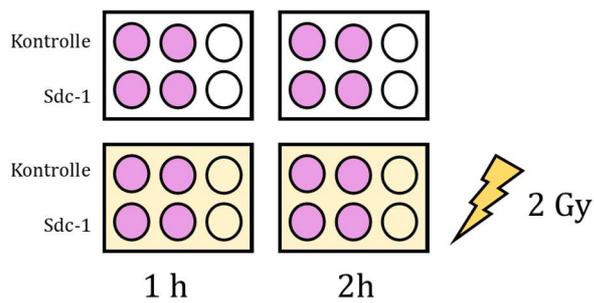


Abb. 12: Versuchsaufbau für das BrdU-Experiment

Die Transfektion erfolgte nach 24 Stunden, nach weiteren 24 Stunden wurden 2 Platten mit 2 Gy bestrahlt.

Fixierung:

Unmittelbar nach der Bestrahlung (ca. 30 min) wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und dann wurden 2 ml des BrdU-Mediums zugegeben.

Nach einer bzw. zwei Stunden Inkubation mit der Stammlösung wurde das Medium entfernt, einmal mit 1 ml PBS gewaschen und 1 ml Accutase® pro Well für 5-6 Minuten inkubiert (37 °C, 7,5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit).

Die abgelösten Zellen wurden in ein Falcon Tube aufgenommen und bei 900 rpm (152 xg) für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (900 rpm/ 152 xg, 5 min). Der Überstand wurde gut abgetropft und die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert. Dann wurden noch 700 µl eiskaltes 100%iges Ethanol hinzugefügt und die Zellen wurden so fixiert bei -20 °C eingefroren.

Färbung:

Die fixierte Zellsuspension wurde für 10 min bei 150 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert (150xg, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurden 2 ml Pepsin-HCl gegeben.

Der Ansatz inkubierte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, unter gelegentlichem Schütteln. Dieser Schritt diente der kombinierten Säuredenaturierung und Proteolyse.

Die Suspension wurde anschließend mit 5 ml PBS verdünnt und für 10 Minuten bei 150 xg zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 5 ml PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert, danach gut abgetropft und getrocknet.

Dann wurden die Zellen in 100µl PBS/BSA (0,1%ig) aufgenommen. 5 µl Anti-BrdU-FITC [Roche] wurden zu jedem Ansatz gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (unter gelegentlicher Durchmischung).

Dann wurden erneut 5 ml PBS hinzugefügt, zentrifugiert und abgetropft.

Die Zellen wurden dann in 1-2 ml PI aufgenommen und nach 30 Inkubation auf Eis im Dunkeln im Durchflusszytometer gemessen. Dazu wurden die Zellen mit einem 488 nm Argonlaser angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde sowohl in FL1 bei 527 nm gemessen als auch in FL3 bei 675 nm. Die Datenakquise und Auswertung erfolgte mit der FloMax-Software mittels eines Dotplots (FL3 gegen FL1).

3.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel 2016 und RStudio verwendet. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der zweiseitige Studentsche t-Test Typ 3 verwendet, sowie ggf. eine multiple lineare Regression durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ (*) festgelegt. Dabei wird $p \leq 0,01$ (**) als sehr signifikant, und $p \leq 0,001$ (***) als hochsignifikant bezeichnet. Diagramme stellen die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Die Ergebnisse der PCR Untersuchungen wurden mithilfe von Referenzgenen und der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode normiert.

Der CP oder auch Ct (Crossing Point) Wert entspricht der Zahl der PCR Zyklen, die für das Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus benötigt werden. Bei diesem Modell wird von einer 100%igen Effizienz der PCR ausgegangen, das bedeutet, dass sich die DNA Produktmenge mit jedem Zyklus verdoppelt.

Die Expression des Zielgens wird auf ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen (sog. housekeeping gene) bezogen. Dadurch wird die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgte über die sog. $\Delta\Delta Ct$ Methode. Im ersten Schritt wird für jede untersuchte Probe der CT Wert des Referenzgens vom Ct Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert.

$$\Delta Ct = \text{Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

Dann wird vom ΔCt Wert der ΔCt Wert einer Kontrolle abgezogen, man erhält den sog. $\Delta\Delta Ct$ Wert.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$$

Aus der arithmetischen Formel $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ergibt sich der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe.

$$\text{Ratio} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

(65)

3.9 Materialliste

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Materialien sind nach Methoden geordnet in den Tabellen 11 bis 22 aufgeführt.

Tabelle 11: Geräte und allgemeine Materialien:

Material	Hersteller, Hauptsitz
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Inkubator Heracell™ 150i CO ₂	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator Sanyo-19AIC CO ₂	Panasonic Biomedical Sales Europe B.V.
Lichtmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
PCR-Reaktor (rela time PCR) 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler TGradient, TPersonal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zentrifuge Zellkultur Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Accu-jet® Pro pipette controler	Brand, Wertheim
Pipette Costar® Striptte® (5, 10, 15 ml)	Corning, New York, USA
Pipette Eppendorf Research® (2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® plus (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipette (0.2-2 µl)	Gilson, Middleton, USA
Vortex-2 Genie	Bender & Hobein GmbH, Bruchsal
Linearbeschleuniger TrueBeam	Varian Medical Systems, Palo Alto, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Tabelle 12: Zellkultur

Material	Hersteller, Hauptsitz
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with Glucose 4500 mg/L	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS (10x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Falcon Tube	Corning®, NY, USA
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Mediumflasche Tissue Culture Flask (25, 75, 125cm ²)	Sarstedt, New York, USA
Penicillin-Streptomycin (10000 units penicillin + 10 mg/ml streptomycin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tissue Culture Flask (25, 75, 175 cm ²)	Sarstedt, New York, USA
Tissue culture plate (6-Well)	Sarstedt, New York, USA
Trypanblue-solution (0.4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Accutase® solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Neubauer Zellkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG., Lauda-Königshofen, Deutschland
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 13: siRNA Transfektion

Material	Hersteller, Hauptsitz
Dharmacon™ DharmaFECT™1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
siRNA Sdc-1 (Assay ID: s12634)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Opti-MEM®	Gibco, New York, USA

Tabelle 14: RNA Isolierung, Umschreiben in cDNA

Material	Hersteller, Hauptsitz
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Personal PCR-Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
InnuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, California, USA

Tabelle 15: PCR Protokoll 1

Material	Hersteller, Hauptsitz
7300 Real-Time PCR	Applied Biosystems, California, USA
96-well Multiply® PCR plate	Sarstedt, New York, USA
Takyon™ Rox Probe MasterMix dTTP	Eurogentec, Lüttich, Belgien

Tabelle 16: TaqMan-Sonden

Material	Katalognummer	Hersteller, Hauptsitz
18S	hs9999901_s1	Applied Biosystems, California, USA
SDC1	hs00174579_m1	Applied Biosystems, California, USA
ET1 (EDN1)	hs00174961_m1	Applied Biosystems, California, USA

Tabelle 17: PCR Protokoll 2, Gradienten-PCR

Material	Bestellnummer	Hersteller, Hauptsitz
Uracil-DNA-Glycolylase (UDG)	111005	Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Rheinland-Pfalz
Taq-Antikörper	639251 Antibody TAQSTART 500RXN	TAKARA Clontech, Mountain View, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Taq Polymerase	TP05a Licensed SUPER TAQ, 500 units	HT Biotechnology LTD, Cambridge, United Kingdom
Nuclease Free Water	AM 9937	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
dNTP's (Set of 4 dNTP's x 100 mM)	110011	Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Rheinland-Pfalz
dUTP (100 mM)	109001	Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Rheinland-Pfalz
HPRT (HS_HPRT_1_5G)	QT00059066	Qiagen, Hilden, Deutschland
MgCl ₂ , 2.0 mM (25 mM PCR-tested)	103006	Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Rheinland-Pfalz
PCR Puffer (10X SuperTaq PCR Buffer)	611031	HT Biotechnology LTD, Cambridge, United Kingdom
PCR Gerät Rotor-Gene Q		Qiagen, Hilden, Deutschland
MyCycler™ Thermal Cycler		Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Vortex Schüttler VF2		IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland

Tabelle 18: Primer

Primer Abkürzung	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Hersteller, Hauptsitz
CCNA1 for	Cyclin A1	GAGGTCCCAGTGGCTTGTGAGA	Eurogentec, Lüttich, Belgien
CCNA1 rev		CCGGTGTCTACTTCATACACA	
CCNB1 for	Cyclin B1	TTTGCACTTCCTTCGGAGAG	
CCNB1 rev		GGTGCTGCATAACTGGAAGA	
CDK6 for	Cyclin-dependent	GCTGACCAGCAGTACGAATG	
CDK6 rev	Kinase 6	TGTTTCGTGACACTGTGCACA	
EXO1 for	Exonuclease 1	CAGTCACTGAGTGGAGTTGAGA	
EXO1 rev		TCTCACATGGATGGGTTCTGAA	
CREB1 for	cAMP response element-binding protein 1	CCACAAGTCCAAACAGTTCAGA	
CREB1 rev		GTGCTGAAGTCTCCTCTTCAGA	
PMS1 for	postmeiotic	AAACAATTGCCTGCGCAACA	
PMS1 rev	segregation increased 1	AGCTCATGAGGAGATCTTGGA	
PMS1neu for	postmeiotic	ACAGATGTTCCGCAGCTGACA	
PMS1neu rev	segregation increased 1	TCTGAGAGTTCTCCCATGATACA	

Tabelle 19: Gelelektrophorese

Material	Bestellnummer	Hersteller, Hauptsitz
Elektrophoresegerät		Prototyp; Entwurf von Dr. Weidner hergestellt in den Fein- und Elektromechanischen Forschungswerkstätten der Medizinischen Fakultät, Münster
Metaphor Gel: Agarose Tiny HT	M3047, 0100	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain	41005	Biotium, Fremont, USA
Stockmix (Laborherstellung): 60 % Saccharose 0,1 % SDS 0,05 % Bromphenolblau 20 mM EDTA; pH 8,0		Merck KGaA, Darmstadt Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Serva, Heidelberg Merck KGaA, Darmstadt

Standard GeneRuler Low Range	SM1193	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TE Puffer (pH 7,4) (1X)	A0386, 0500	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tabelle 20: γ H2AX-Assay

Material	Bestellnummer	Hersteller, Hauptsitz
Triton		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS (Laborherstellung): 8,0 g NaCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl ad 1 l H ₂ O, anschließend autoklavieren		Merck KGaA, Darmstadt
Heizplatte, Magnetrührer, IKAMAG® RCT		IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
FCS		Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
BSA		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Accutase®		Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Inkubator HERAccl		Heraeus, Hanau, Deutschland
Cellstar Centrifuge Tubes 15 ml		Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zentrifuge Centrifuge 5810 R		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Sigma 3-16KL		Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Ethanol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

γ H2AX Antikörper Klon: JBW301	1-978-715-4321	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
γ H2AX Sekundärer Antikörper Alexa 488	A11029	Invitrogen, Carlsbad, USA
PI (Propidiumiodid)		Serva, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer CyFlow space		Sysmex PARTEC GmbH, Kobe, Japan (Ehemals Partec GmbH, Münster)
Sterilbank LaminAir® LB-48-C		Heraeus, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop		Olympus, Tokio, Japan

Tabelle 21: Zellzyklus-Analyse

Material	Hersteller, Hauptsitz
DAPI	Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Deutschland
Durchflusszytometer CyFlow space	Sysmex PARTEC GmbH, Kobe, Japan (Ehemals Partec GmbH, Münster)
Cellstar Centrifuge Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 22: BrdU-Assay

Material	Bestellnummer	Hersteller, Hauptsitz
Cellstar Centrifuge Tubes 15 ml		Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
BrdU 5'Bromo2'deoxyuridine	15240	Serva, Heidelberg, Deutschland
dCyt 2'Deoxyctidine hydrochloride	D8006 - 1G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sterilfilter		Merck Millipore, Burlington, USA

Pepsin		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HCl 2N		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PI		Serva, Heidelberg, Deutschland
Inkubator HERAcell		Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sigma 3-16KL		Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810 R		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ethanol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Anti-BrdU-FITC (Anti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein formalin grade) 50 µg	11 202 693 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung des Syndecan-1-Knockdowns mittels qPCR

Der Syndecan-1 Knockdown wurde mittels qPCR überprüft. Die Zellen wurden mit Syndecan-1 siRNA transfiziert, mit 4 Gy bestrahlt und anschließend wurde der Gehalt an Syndecan-1 mRNA mithilfe einer TaqMan-Sonde für Syndecan-1 quantifiziert. Die Reduktion von Syndecan-1 war für beide Zelllinien signifikant in einem t-Test (Abb. 13) und hoch- bzw. sehr signifikant in der multiplen linearen Regression (Tabelle 23 und 24).

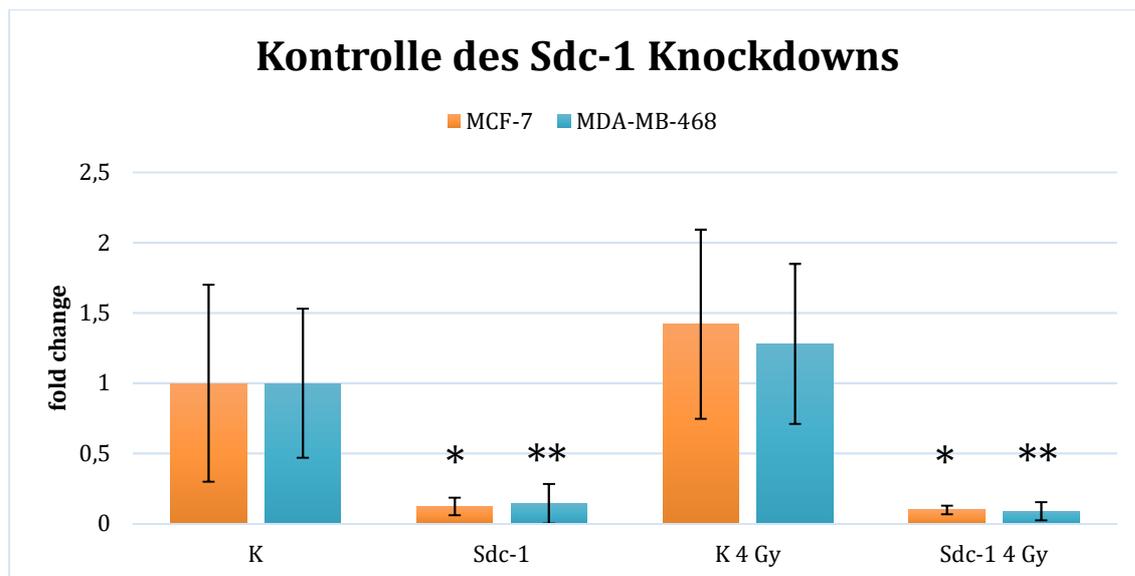


Abbildung 13: Ergebnisse der qPCRs mit TaqMan-Sonde für Syndecan-1, Zelllinien MDA-MB 468 und MCF-7, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung, K=fold change Kontrolle, Sdc-1= fold change Sdc-1-transfizierte Zellen

Tabelle 23: Multiple lineare Regression auf Fold Change – Sdc-1, MDA-MB 468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs Sdc-1, Zelllinie: MDA-MB 468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,1558	0,5046	
Syndecan-1	-0,9816	0,0004	***
Interaktion	-0,2088	0,5269	
Achsenabschnitt	1,1239	$9,89 \times 10^{-7}$	***
R ²	0,6941	Anzahl Observationen	24

Tabelle 24: Multiple lineare Regression auf Fold Change – Sdc-1, MCF-7

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs Sdc-1, Zelllinie: MCF-7			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,0321	0,9272	
Syndecan-1	-1,2642	0,0032	**
Interaktion	-0,0572	0,9084	
Achsenabschnitt	1,3877	9,95 x 10 ⁻⁵	***
R ²	0,7014	Anzahl Observationen	16

4.2 Einfluss von Syndecan-1 auf Signalprozesse

4.2.1 qPCR Endothelin-1

Der Einfluss des Syndecan-1 siRNA Knockdowns auf den Endothelin 1 Signalweg wurde mithilfe von qPCRs getestet. Dabei wurde eine TaqMan-Sonde verwendet. Das Ergebnis ist eine hochsignifikante Reduktion der Endothelin 1-Expression bei Sdc-1 Knockdown (Abbildung 14). Bei Bestrahlung mit 4 Gy ist das Ergebnis im direkten Vergleich mit der (unbestrahlten) Kontrolle nicht signifikant, eine genauere statistische Analyse ergab jedoch eine sehr signifikante Reduktion von Endothelin 1 durch den Knockdown.

Die multiple lineare Regression erlaubt eine simultane Analyse aller Daten hinsichtlich der verschiedenen Einflussfaktoren. Der Einfluss der einzelnen Faktoren wird dabei separat herausgerechnet. Somit kann der Einfluss des Knockdowns, der Bestrahlung und der Interaktion beider Einflüsse (Interaktion: Bestrahlung + Knockdown) betrachtet werden. Es wurden insgesamt 32 Messungen erhoben – je 2 Wells ohne Behandlung (Kontrollgruppe), 2 mit Syndecan-1 Knockdown, 2 mit Bestrahlung und 2 mit Syndecan-1 Knockdown und Bestrahlung kombiniert und dies an 4 unterschiedlichen Tagen. Im Regressionsmodell wird der Einfluss dieser Behandlungen auf den Fold Change mit Hilfe von Dummy-Variablen gemessen. Das Regressionsmodell kann mit folgender Gleichung zusammengefasst werden:

$$\begin{aligned} \text{Fold Change}_i = & \alpha + \beta_{\text{Bestrahlung}} \times I_i^{\text{Bestrahlung}} + \beta_{\text{Sdc-1}} \times I_i^{\text{Sdc-1}} \\ & + \beta_{\text{Interaktion}} \times I_i^{\text{Bestrahlung}} \times I_i^{\text{Sdc-1}} + \epsilon_i \end{aligned}$$

Die zu erklärende Variable ist der Fold Change. α ist der Achsenabschnitt der Regression und gibt den Mittelwert des Fold Change der Kontrollgruppe, also der unbehandelten Observationen an. $I_i^{\text{Bestrahlung}}$ ist eine Dummy-Variable, die für bestrahlte Observationen den Wert 1 annimmt und sonst 0 ist. $I_i^{\text{Sdc-1}}$ ist 1 für Observationen mit Syndecan-1 Knockdown und sonst 0. $\beta_{\text{Bestrahlung}}$ misst somit den Einfluss von Bestrahlung auf den Fold Change, $\beta_{\text{Sdc-1}}$ den Einfluss von Syndecan-1 Knockdown auf den Fold Change und $\beta_{\text{Interaktion}}$ gibt den zusätzlichen Effekt an, wenn Syndecan-1 Knockdown und Bestrahlung bei demselben Well angewendet wurden. i indiziert die einzelnen Observationen. ϵ_i bezeichnet den Fehlerterm, also die Abweichung der Observation i vom Modell.

In der unten aufgeführten Tabelle 25 können die geschätzten Koeffizienten des oben ausgeführten Modells abgelesen werden. Syndecan-1 Knockdown weist einen zum 1 %-Niveau signifikant negativen Einfluss von -0,5553 auf. Es wird auch deutlich, dass die Bestrahlung keinen

signifikanten Einfluss hat. Ebenso gibt es keinen signifikanten Interaktionseffekt. Der Fold Change Mittelwert der Kontrollgruppe (also der Achsenabschnitt) beläuft sich auf 0,9362. Das Modell erklärt 38 % der Variation im Fold Change.

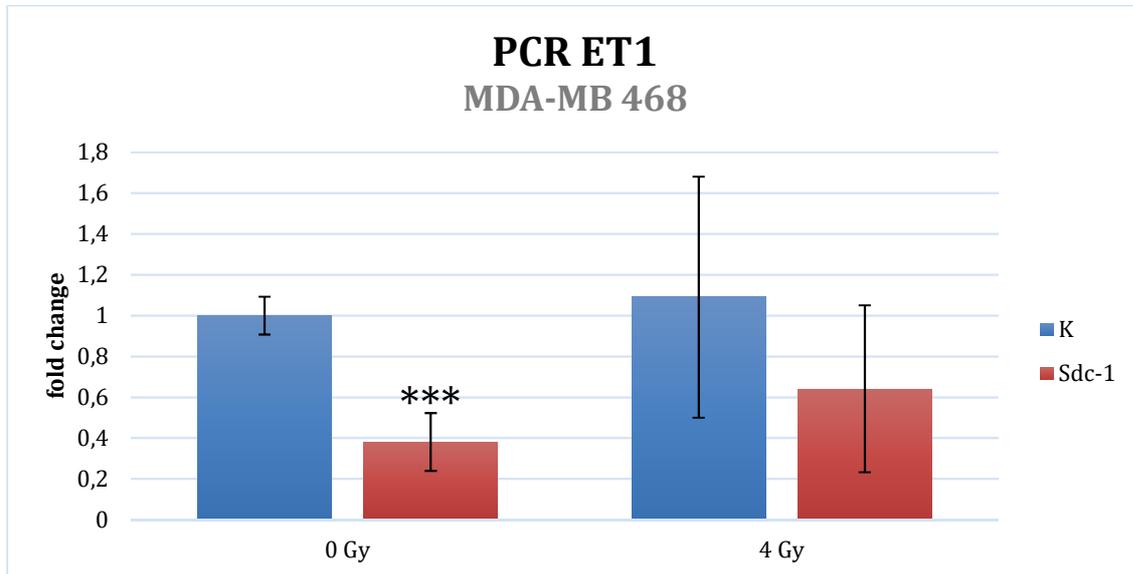


Abbildung 14: Ergebnisse der qPCRs mit TaqMan-Sonde für Endothelin 1, Zelllinie MDA-MB 468, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 25: Multiple lineare Regression auf Fold Change – ET1, MDA-MB 468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs ET1, Zelllinie: MDA-MB 468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,1547	0,43273	
Syndecan-1	-0,5553	0,00809	**
Interaktion	0,1058	0,69832	
Achsenabschnitt	0,9362	$4,43 \times 10^{-7}$	***
R ²	0,3825	Anzahl Observationen	32

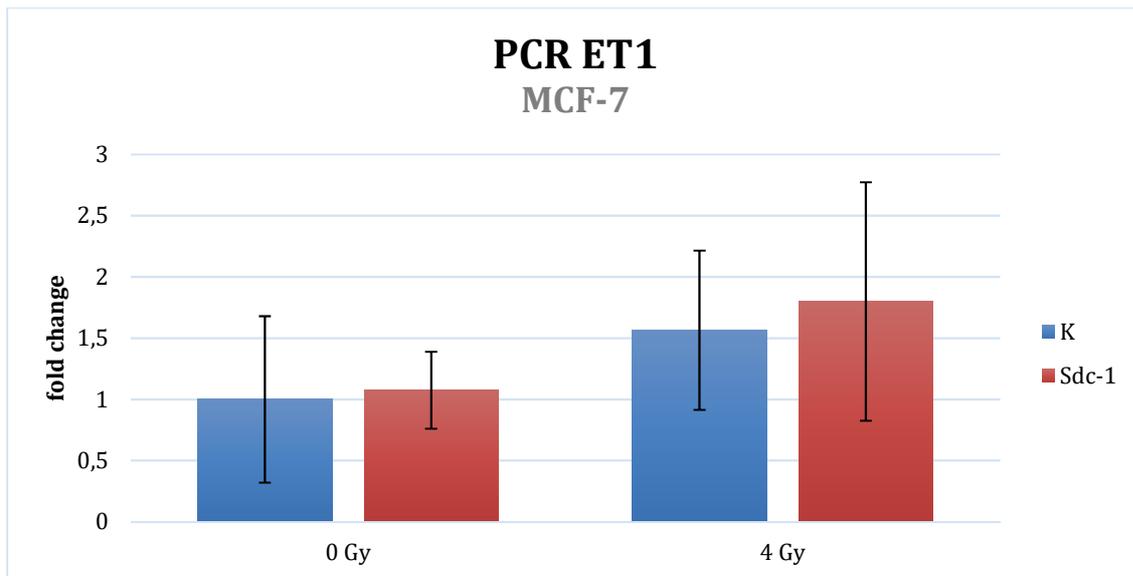


Abbildung 15: Ergebnisse der qPCRs mit TaqMan-Sonde für Endothelin 1, Zelllinie MCF-7, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 26: Multiple lineare Regression auf Fold Change – ET1, MCF-7

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs ET1, Zelllinie: MCF-7			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,1913	0,639	
Syndecan-1	-0,2985	0,466	
Interaktion	0,5334	0,358	
Achsenabschnitt	1,3740	$9,88 \times 10^{-5}$	***
R^2	0,149	Anzahl Observationen	24

Bei den MCF-7 Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Die Werte streuten stark um den Mittelwert (Abbildung 15, Tabelle 26).

4.3 Einfluss von Syndecan-1 auf die Zellproliferation bei Bestrahlung

Um Veränderungen bei der Zellproliferation zu erforschen wurde als funktionelles Assay das BrdU-Experiment gewählt. Zusätzlich wurden qPCRs mit Primern durchgeführt. Hierbei wurden Primer verwendet, die Genprodukte detektieren sollten, die in Zusammenhang mit der Zellproliferation stehen.

4.3.1 Funktionelles Assay: BrdU

Bei dem BrdU-Experiment wurden die Zellen ausgesät, nach 24h mit siRNA transfiziert, nach weiteren 24h mit 2 Gy bestrahlt und anschließend mit dem BrdU-Medium inkubiert. Nach 1 und 2 Stunden wurden die Zellen fixiert und anschließend gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

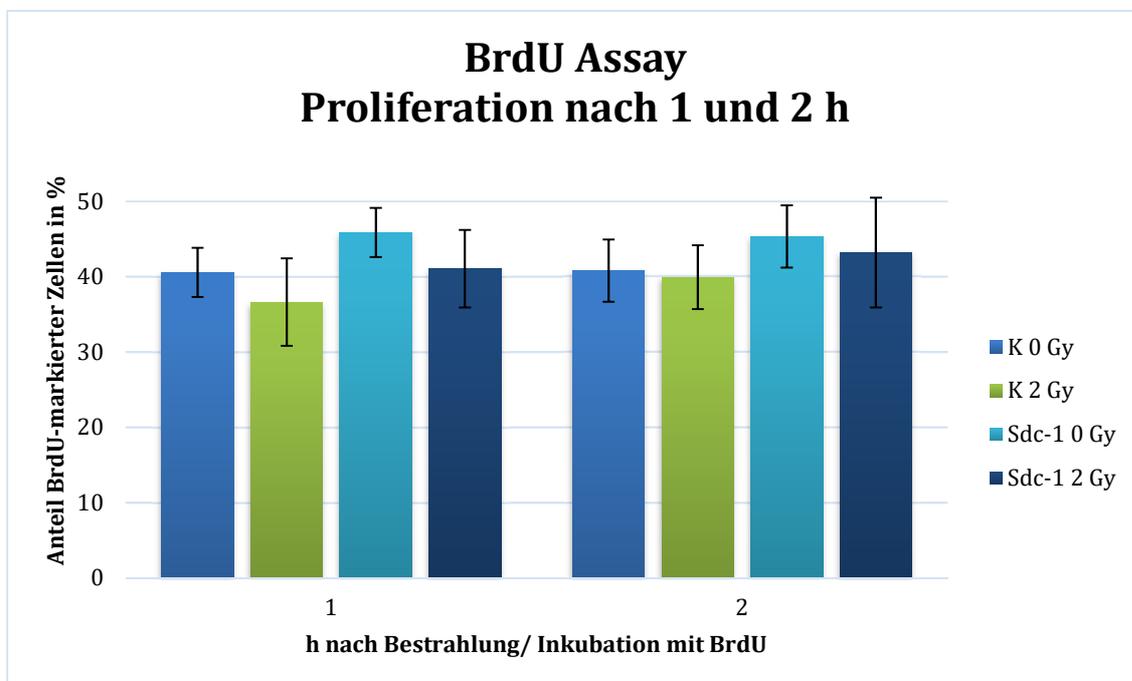


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Proliferation nach Bestrahlung mit 2 Gy; n=3; Zelllinie: MDA-MB-468

Auch wenn sich eine erhöhte Proliferationsrate durch den Syndecan-1-Knockdown andeutet, war diese nicht signifikant. Eine erhöhte Proliferation nach Bestrahlung wurde nicht nachgewiesen (Abbildung 16).

4.3.2 qPCR

Der Einfluss des Syndecan-1 Knockdowns auf potentielle Zielgene wurde mittels qPCR untersucht. Assoziiert mit der Zellproliferation und auch Zellzyklus waren dabei die Cycline A1 und B1, sowie Cyclin-dependent Kinase 6. Es wurden qPCRs mit den neu designten Primern ausgeführt (siehe Kapitel 3.3.6 Primer).

4.3.2.1 Cyclin A1

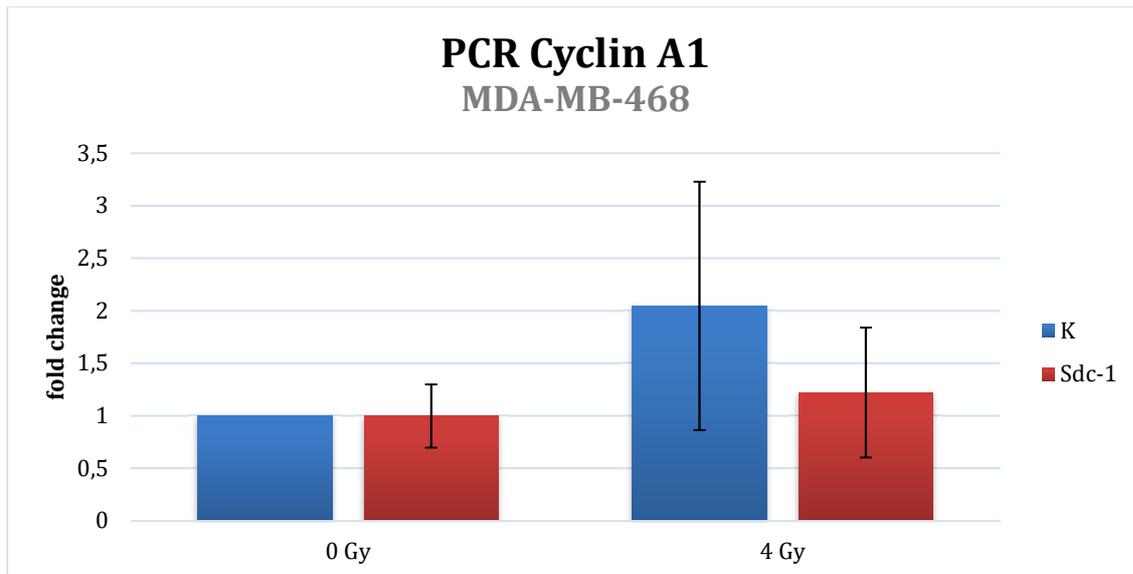


Abbildung 17: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für Cyclin A1, Zelllinie MDA-MB 468, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 27: Multiple lineare Regression auf Fold Change – CCNA1, MDA-MB-468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs CCNA1, Zelllinie: MDA-MB-468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	1,0459	0,0517	
Syndecan-1	-0,0036	0,9942	
Interaktion	-0,8215	0,2533	
Achsenabschnitt	1,0000	0,0128	*
R^2	0,346	Anzahl Observationen	16

Abbildung 17 und Tabelle 27 zeigen die Ergebnisse für Cyclin A1. Eine signifikante Veränderung nach Sdc-1 Knockdown konnte nicht gefunden werden. Gerade nach Bestrahlung streuten die

Werte sehr stark. Da bei der Zelllinie MDA-MB-468 bereits keine signifikanten Veränderungen dokumentiert wurden, wurde auf die Testung von MCF-7 Zellen verzichtet.

4.3.2.2 Cyclin B1

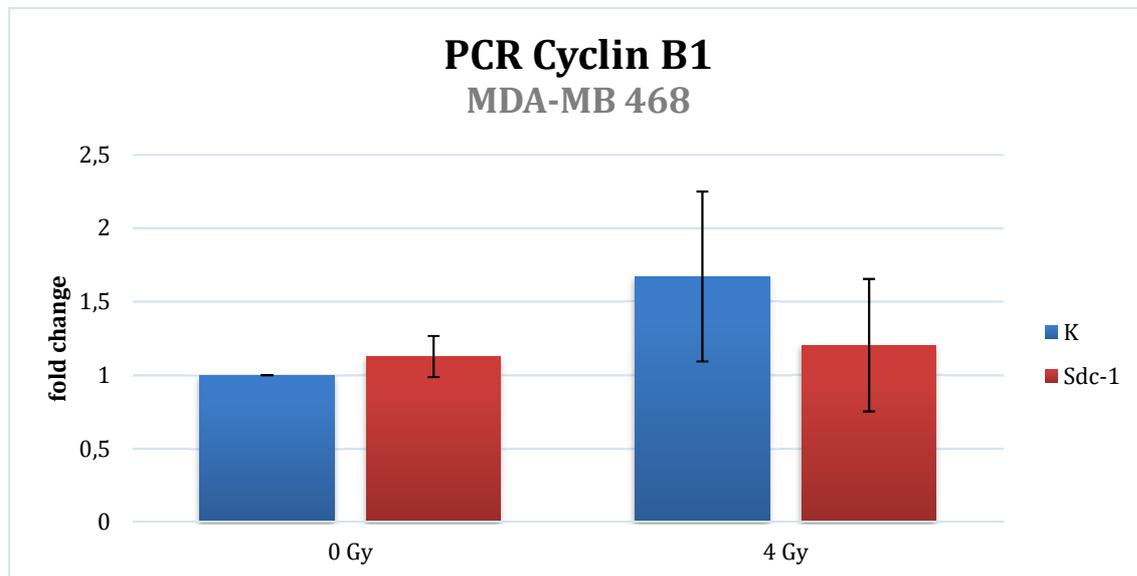


Abbildung 18: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für Cyclin B1, Zelllinie MDA-MB 468, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 28: Multiple lineare Regression auf Fold Change – CCNB1, MDA-MB-468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs CCNB1, Zelllinie: MDA-MB-468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,6724	0,0156	*
Syndecan-1	0,1267	0,6056	
Interaktion	-0,5948	0,1037	
Achsenabschnitt	1,0000	$7,02 \times 10^{-5}$	***
R ²	0,43	Anzahl Observationen	16

Auch bei Cyclin B1 konnten keine signifikanten Veränderungen quantifiziert werden (Abbildung 18). Hier streuten die Werte nach Bestrahlung stark und so wurde auch hier auf die Testung von MCF-7 Zellen verzichtet. Die statistische Untersuchung mittels multipler linearer Regression konnte einen signifikanten Einfluss der Bestrahlung auf den Fold Change zeigen (Tabelle 28).

4.3.2.3 Cyclin-dependent Kinase 6

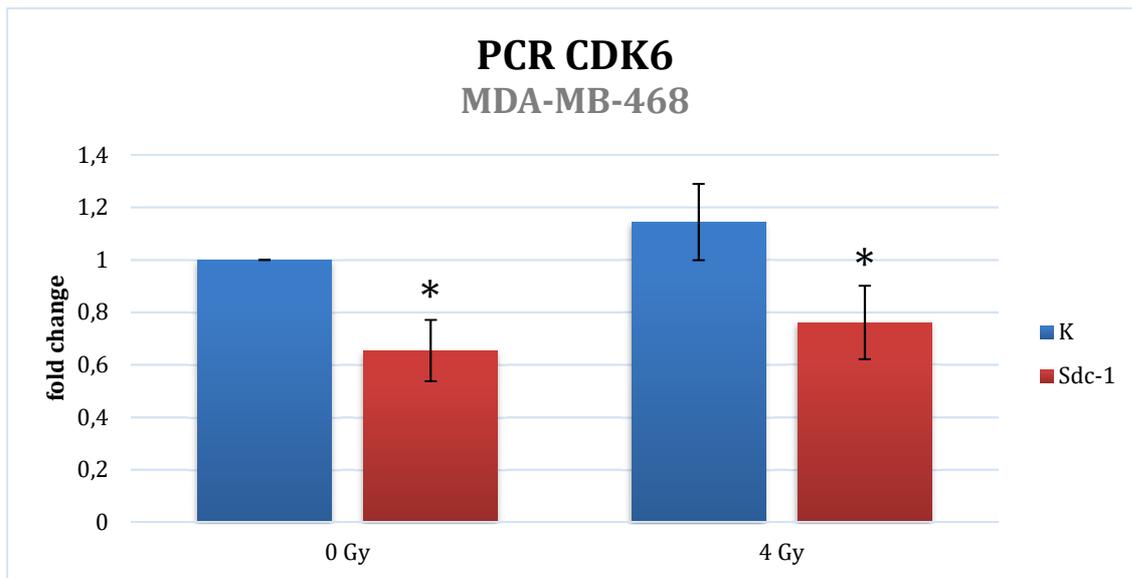


Abbildung 19: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CDK6, Zelllinie MDA-MB 468, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 29: Multiple lineare Regression – CDK6 MDA-MB 468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs CDK6, Zelllinie: MDA-MB-468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,1441	0,1059	
Syndecan-1	-0,3457	0,0012	**
Interaktion	-0,0367	0,7584	
Achsenabschnitt	1,0000	$8,27 \times 10^{-10}$	***
R^2	0,7484	Anzahl Observationen	16

Der Syndecan-1 Knockdown bewirkte eine signifikante Reduktion von CDK6, sowohl unter Bestrahlung als auch ohne (Abbildung 19). Die statistische Analyse zeigte auch hier, dass die Bestrahlung selbst keinen signifikanten Einfluss auf den Fold Change hat und auch die Wirkung des Sdc-1 Knockdowns nicht signifikant beeinflusst (siehe Interaktion) (Tabelle 29). Daher wurden zusätzlich die MCF-7 Zellen auf CDK6 Expression untersucht.

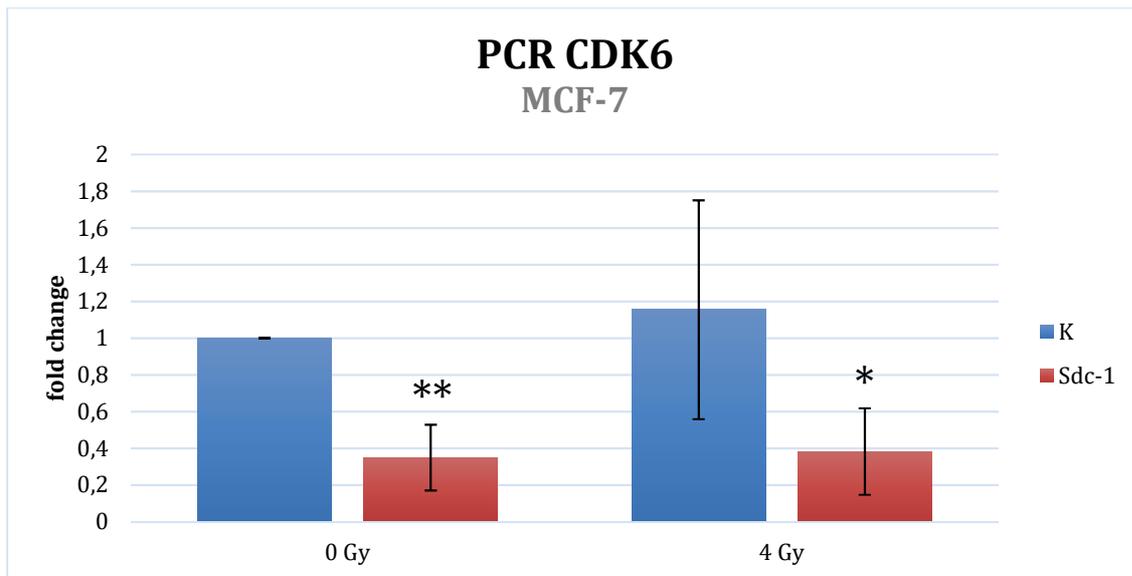


Abbildung 20: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CDK6, Zelllinie MCF-7, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p < 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 30: Multiple lineare Regression CDK6 MCF-7

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs CDK6, Zelllinie: MCF-7			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,1552	0,5216	
Syndecan-1	-0,6503	0,0171	*
Interaktion	-0,1220	0,7201	
Achsenabschnitt	1,0000	$6,06 \times 10^{-5}$	***
R ²	0,61	Anzahl Observationen	16

Auch bei den MCF-7 Zellen kommt es zu einer deutlichen Reduktion von CDK6 nach Sdc-1 Knockdown (Abbildung 20). Wiederum ist hier die Reduktion allein auf den Sdc-1 Knockdown zurückzuführen (Tabelle 30).

4.4 Reparaturprozesse nach Bestrahlung

Um die Reparaturprozesse der Zellen zu analysieren wurden qPCRs an den potentiellen Zielgenen Exonuclease 1, cAMP response element-binding protein 1 und postmeiotic segregation increased 1 durchgeführt. Die funktionellen Auswirkungen der Bestrahlung und der Einfluss von Syndecan-1 auf Reparaturprozesse wurden mit dem γ H2AX-Assay untersucht.

4.4.1 γ H2AX-Assay

Bei dem γ H2AX-Assay wurden die Reparaturprozesse in den Zellen nach Bestrahlung untersucht. Abbildung 21 zeigt den zeitlichen Verlauf der DNA-Doppelstrangreparatur sowohl in den Kontroll-Zellen, als auch in den Sdc-1 defizitären Zellen.

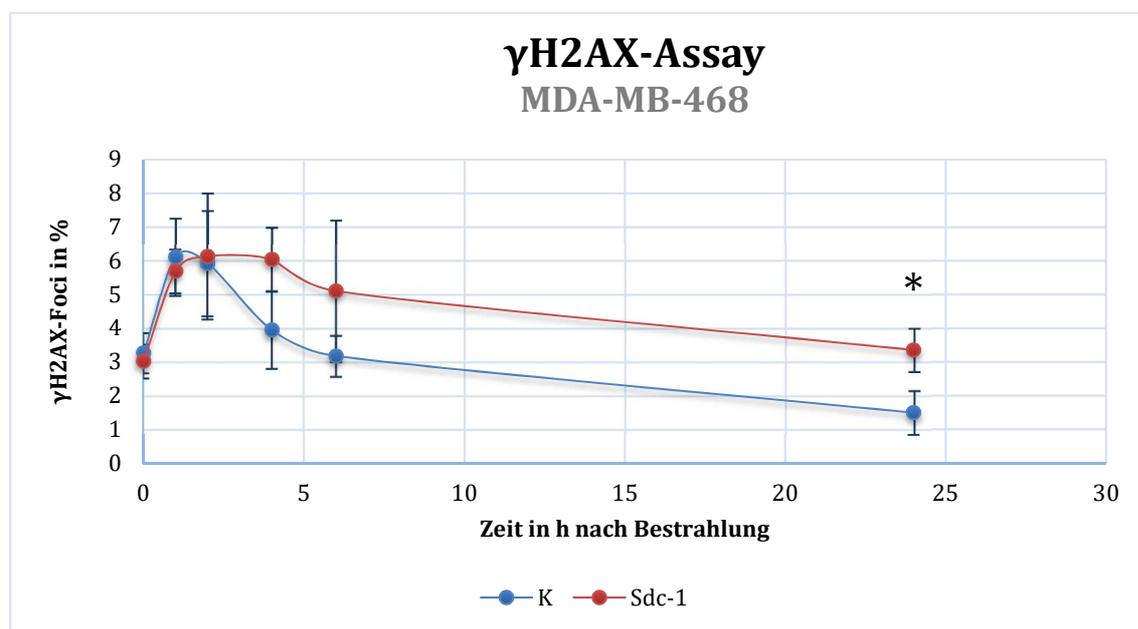


Abbildung 21: DNA-Doppelstrangreparatur im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung; Die Y-Achse zeigt die γ H2AX-Foci in %, die Zeit in Stunden nach Bestrahlung wurde auf der X-Achse eingetragen. Die rote Linie beschreibt den zeitlichen Verlauf der prozentualen γ H2AX-Werte bei den Sydecan-1-defizitären Zellen, während die blaue Linie diese für die Kontrollzellen darstellt. Man erkennt bei beiden Linien zunächst einen steilen Anstieg nach der Bestrahlung. Die Kurve der Kontrollzellen flacht bereits nach wenigen Stunden merklich ab und erreicht bereits nach etwa 5 Stunden den Ausgangswert. Die Kurve der Sdc-1 defizitären Zellen hingegen flacht deutlich langsamer ab und erreicht auch nach 24 Stunden nicht den Ausgangswert. Nach 24 Stunden sind noch signifikant mehr γ H2AX-Foci und damit Doppelstrangbrüche vorhanden, als bei den Kontrollzellen.

Die Menge der γ H2AX-Foci korrespondiert mit dem Vorhandensein von DNA-Doppelstrangbrüchen, während ihre Reduktion mit der DNA-Reparatur assoziiert ist (62).

Bei den Kontrollzellen kann man den typischen Verlauf der Reparaturkurve erkennen (Abbildung 20): Eine anfangs nach Bestrahlung steil ansteigende Kurve, steht für das Auftreten vieler DNA-Doppelstrangbrüche durch den zerstörerischen Einfluss der ionisierenden Strahlung. Doch bereits nach etwa 6 Stunden ist wieder das Ausgangsmaß an Doppelstrangbrüchen erreicht.

Der Kurvenverlauf der Sdc-1 defizitären Zellen zeigt eine deutlich verzögerte DNA-Reparatur. Das Maximum an Doppelstrangbrüchen ist ähnlich wie bei den Kontrollzellen unmittelbar nach der Bestrahlung am größten. Jedoch verläuft die Kurve deutlich flacher und nach 6 Stunden sind nicht einmal die Hälfte der Doppelstrangbrüche repariert. Erst nach 24 Stunden ist das Ausgangsniveau an Strangbrüchen gerade erreicht und somit sind noch signifikant (p-Wert des t-Tests: 0,0245) mehr Brüche vorhanden als bei den Kontrollzellen.

4.4.2 qPCRs

4.4.2.1 EXO1

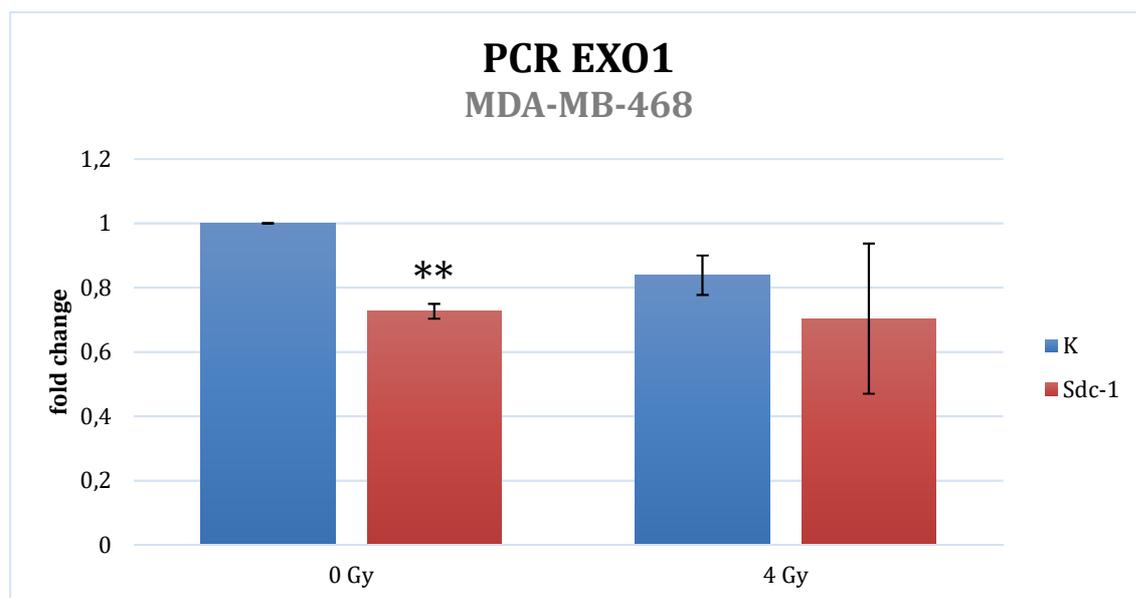


Abbildung 22: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für EXO1, Zelllinie MDA-MB-468, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 31: Multiple lineare Regression auf Fold Change – EXO1, MDA-MB-468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs EXO1, Zelllinie: MDA-MB-468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	-0,1615	0,1414	
Syndecan-1	-0,2733	0,0246	*
Interaktion	0,1386	0,3511	
Achsenabschnitt	1,0000	5,61 x 10 ⁻⁷	***
R ²	0,5837	Anzahl Observationen	12

Bei der Exonuclease 1 kommt es durch den Sdc-1 Knockdown zu einer signifikanten Reduktion bei den triple-negativen Brustkrebszellen (Abbildung 22, Tabelle 31). Nach Bestrahlung streuen die Ergebnisse stärker, eine tendenzielle Reduktion durch Sdc-1 Knockdown ist erkennbar, jedoch nicht signifikant.

Bei den MCF-7 Zellen sind keine signifikanten Ergebnisse erzielt worden, zudem streuen die Werte deutlich stärker (Abbildung 23, Tabelle 32).

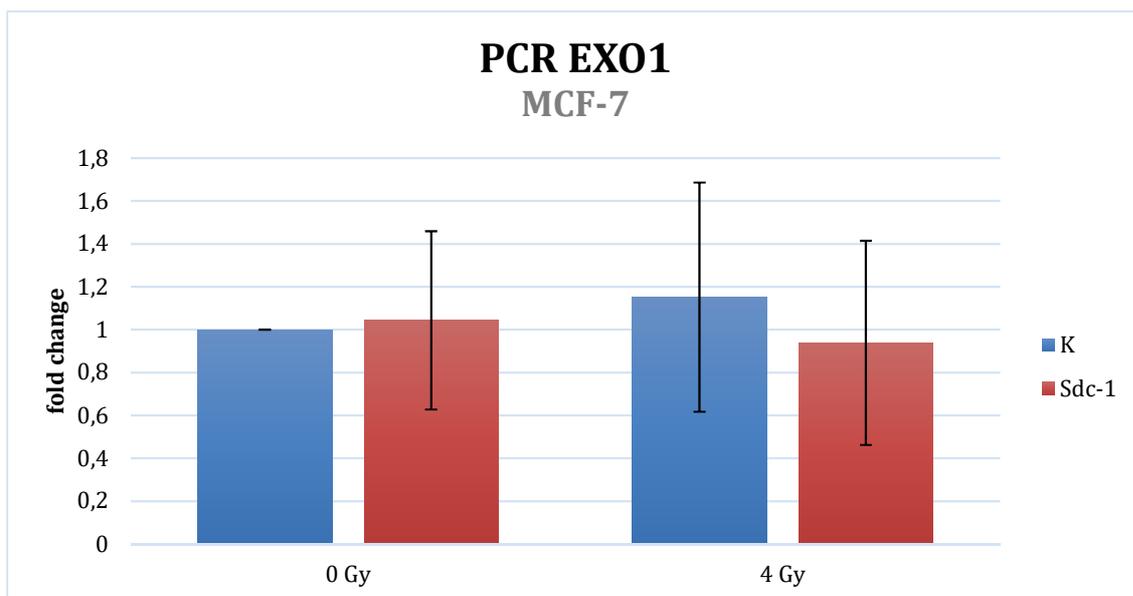


Abbildung 23: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für EXO1, Zelllinie MCF-7, n≥3, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 32: Multiple lineare Regression auf Fold Change – EX01, MCF-7

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCR EX01, Zelllinie: MCF-7			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	-0,1396	0,172	
Syndecan-1	-0,1030	0,305	
Interaktion	-0,0504	0,718	
Achsenabschnitt	1,0000	4,85 x 10 ⁻⁹	***
R ²	0,4437	Anzahl Observationen	16

4.4.2.2 CREB1

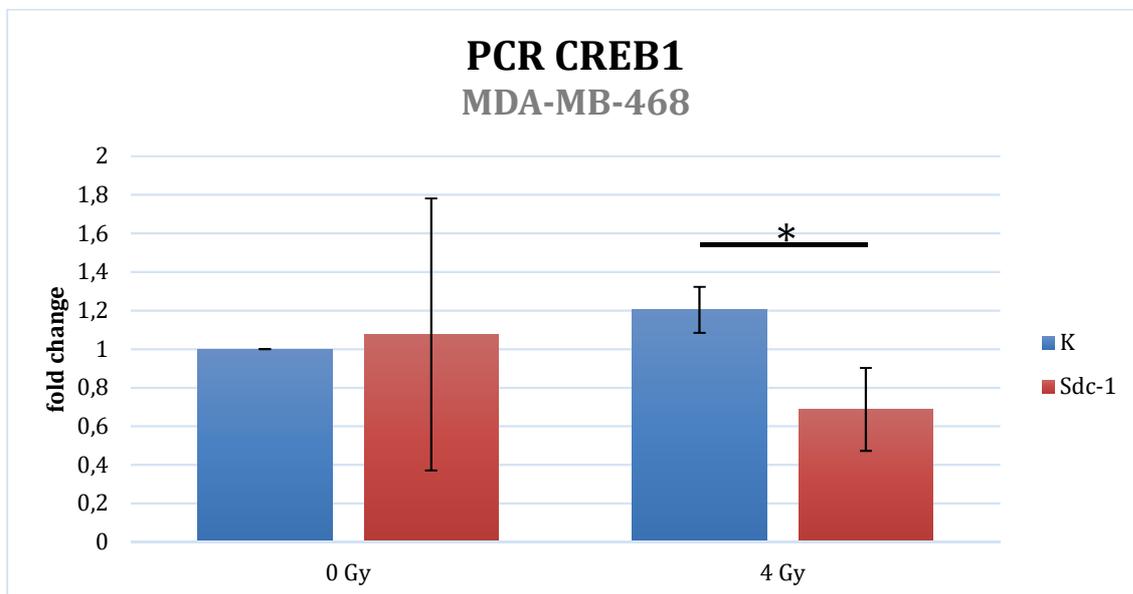


Abbildung 24: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CREB1, Zelllinie MDA-MB 468, n≥3, Signifikanzniveau p≤0,05, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 33: Multiple lineare Regression auf Fold Change – CREB1, MDA-MB-468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCR CREB1, Zelllinie: MDA-MB-468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,2034	0,5235	
Syndecan-1	0,0763	0,8087	
Interaktion	-0,5917	0,2072	
Achsenabschnitt	1,0000	0,0017	**
R ²	0,2796	Anzahl Observationen	12

CREB1 ist nach Bestrahlung und Sdc-1 Transfektion in MDA-MB-468-Zellen signifikant niedriger exprimiert als in den bestrahlten Kontrollzellen (Abbildung 24). Ohne Bestrahlung streuen die Werte sehr stark, daher kann hier keine signifikante Veränderung offenbart werden (Abbildung 24, Tabelle 33). Bei den MCF-7 Zellen wurden wieder keine Veränderungen zwischen den Zellen nachgewiesen (Abbildung 25, Tabelle 34).

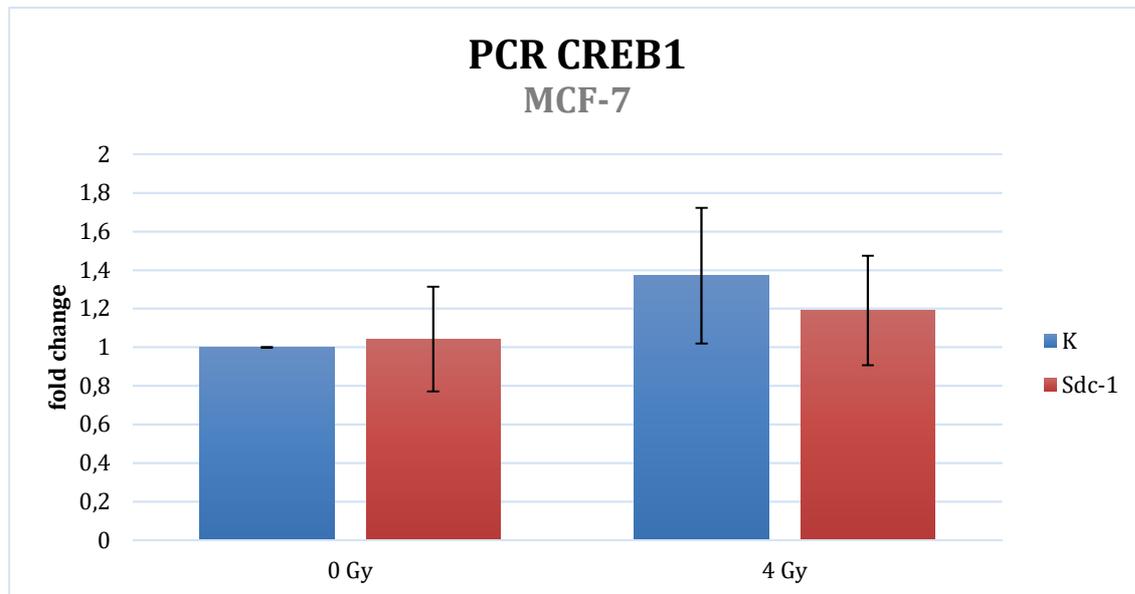


Abbildung 25: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CREB1, Zelllinie MCF-7, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 34: Multiple lineare Regression auf Fold Change – CREB1, MCF-7

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs CREB1, Zelllinie: MCF-7			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,3711	0,0698	
Syndecan-1	0,0424	0,8238	
Interaktion	-0,2225	0,4152	
Achsenabschnitt	1,0000	$6,44e \times 10^{-6}$	***
R^2	0,2888	Anzahl Observationen	16

4.4.2.3 PMS1

Bei PMS1 wurden keine signifikanten Veränderungen bemerkt, weder bei den MDA-MB 468 Zellen, noch bei den MCF-7 Zellen. Die Werte bleiben, von den Einflüssen beinahe unbeeinträchtigt, etwa auf gleichem Niveau (Abbildungen 26-27, Tabellen 35-36). Syndecan-1 Knockdown und die Bestrahlung scheinen hier keinen wesentlichen Einfluss zu haben.

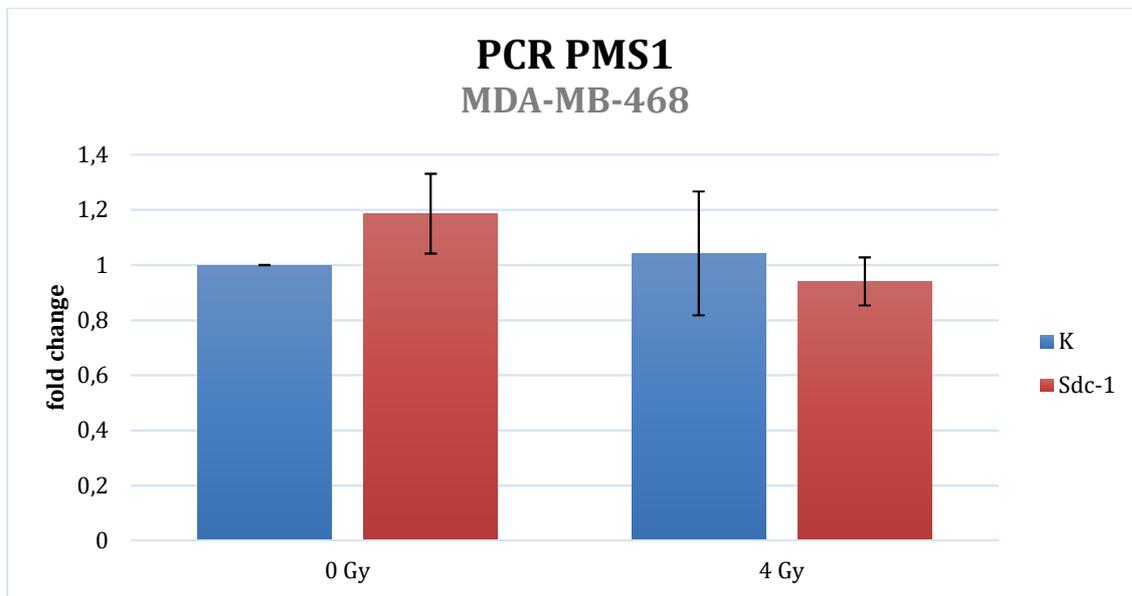


Abbildung 26: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für PMS1neu, Zelllinie MDA-MB 468, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 35: Multiple lineare Regression auf Fold Change – PMS1, MDA-MB-468

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs PMS1, Zelllinie: MDA-MB-468			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,0422	0,716	
Syndecan-1	0,1865	0,126	
Interaktion	-0,2881	0,098	
Achsenabschnitt	1,0000	$6,44 \times 10^{-6}$	***
R^2	0,2985	Anzahl Observationen	16

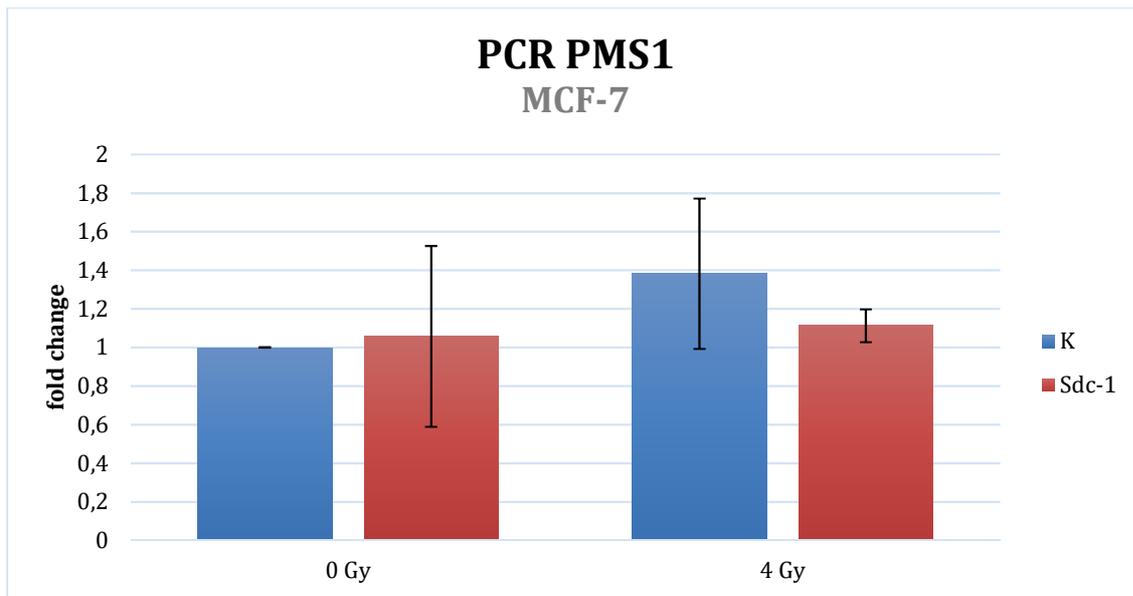


Abbildung 27: Ergebnisse der qPCRs mit Primern für PMS1neu, Zelllinie MCF-7, $n \geq 3$, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Fehlerbalken= Standardabweichung

Tabelle 36: Multiple lineare Regression auf Fold Change – PMS1, MCF-7

Multiple lineare Regression auf Fold Change – PCRs PMS1, Zelllinie: MCF-7			
	Wert	p-Wert	Signifikanz
Bestrahlt (4 Gy)	0,3823	0,1663	
Syndecan-1	0,0579	0,8235	
Interaktion	-0,3275	0,3833	
Achsenabschnitt	1,0000	0,0005	***
R ²	0,2539	Anzahl Observationen	12

4.5 Einfluss des Syndecan-1 Knockdowns auf den Zellzyklus

4.5.1 Zellzyklus-Analyse

Zur Zellzyklus-Analyse wurde eine quantitative DAPI-DNA-Färbung und anschließend eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Zuordnung der Zellen zu einer Phase des Zellzyklus erfolgte dabei anhand ihres DNA-Gehaltes (Abbildungen 28 und 29).



Abbildung 28: Verteilung der Zellzyklusphasen vor und 24 h nach Bestrahlung (Mittelwerte); Zelllinie: MDA-MB 468; n=3, Signifikanzniveau= 0,05

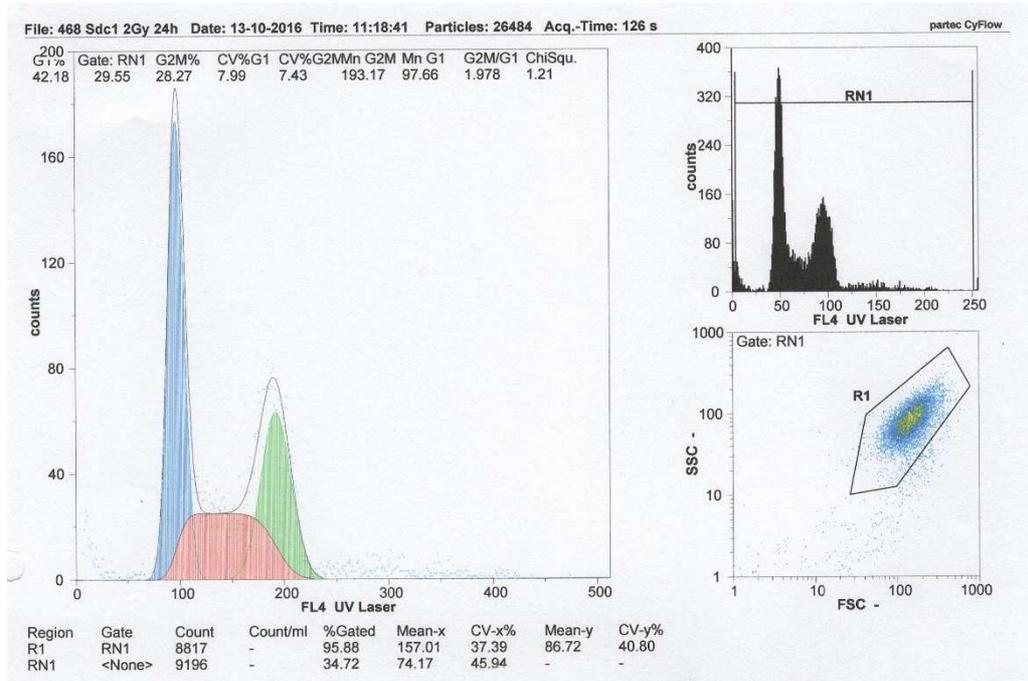
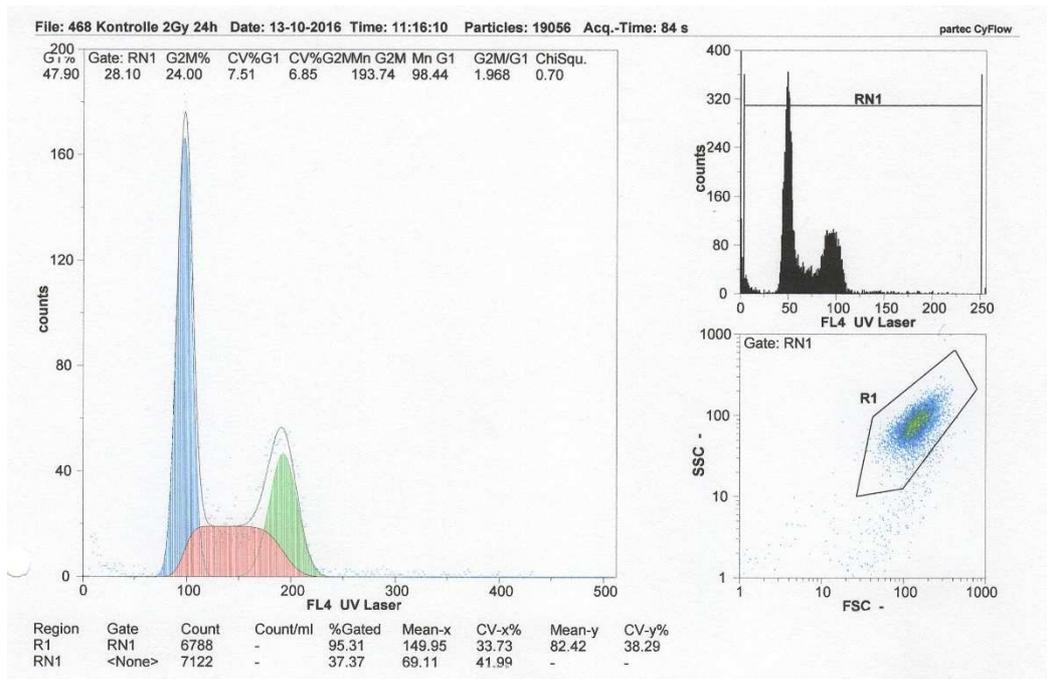


Abbildung 29: Beispiel-Histogramme: Die Histogramme zeigen die Messwerte vom 13.10.2016 für die Kontrollzellen (oben) und die Syndecan-1-defizitären Zellen (unten) 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy. Rechts unten ist jeweils die Zellpopulation zu erkennen. R1 umfasst dabei den Bereich der berücksichtigten Zellen. Darüber ist das Histogramm abgebildet, bei dem die Anzahl der Zellen auf der y-Achse und der DNA-Gehalt auf der x-Achse dargestellt sind. Das linke Diagramm zeigt die Zuordnung zu den einzelnen Phasen durch das Programm. G1 wird blau, G2 grün und die S-Phase rot dargestellt.

Tabelle 37: Statistische Daten zur Verteilung der Zellzyklusphasen; x= fehlender 3. Messwert, p-Wert aus Studentschem T-Test zur jeweils unbestrahlten Kontrolle, Zelllinie: MDA-MB-468, n=3, Signifikanzniveau p=0,05

	G1	G2	S
	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
	Stabw.	Stabw.	Stabw.
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Kontrolle unbestrahlt	46 % 1,782	18 % 2,249	8 % 0,811
Kontrolle bestrahlt (2 Gy)	43 % 4,364 p= 0,33	24 % 1,389 p= 0,03*	8 % 1,669 p= 0,49
Sdc-1 transfiziert, unbestrahlt	45 % x	22 % x	7 % x
Sdc-1 transfiziert, bestrahlt (2 Gy)	40 % 2,125 p= 0,02*	29 % 0,767 p= 0,01**	9 % 1,975 p= 0,47

Der Syndecan-1 Knockdown bewirkt offenbar einen Zuwachs an Zellen in der G2 Phase. Durch die Bestrahlung wird sowohl in den Knockdown-Zellen, als auch in den Kontrollzellen die Zahl der Zellen in der G2 Phase erhöht, zulasten der G1 Phase. Bei der S Phase ergeben sich keine signifikanten Veränderungen. Im direkten Vergleich der Kontrollzellen zu den Sdc-1 defizitären Zellen, sind diese Effekte für die G1 und G2 Phase unter Bestrahlung signifikant (Abbildung 28, Tabelle 37).

4.5.2 qPCR Zellzyklus-Gene

Die Cycline A1 und B1 waren nicht signifikant verändert, unter Syndecan-1 Knockdown verringerte sich allerdings die CDK6 Expression signifikant (siehe Kapitel 4.3.2).

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation sollte unter Nutzung eines in vitro-Ansatzes der Einfluss eines Syndecan-1 siRNA knockdowns auf die Strahlenresistenz von Mammakarzinomzellen untersucht werden. Hierbei konnten signifikante Effekte auf Signal- und Reparaturprozesse der Zellen, sowie auf den Zellzyklus festgestellt werden, die in einem funktionellen Zusammenhang mit einer Syndecan-1-abhängigen Regulation von EXO1, CREB1, CDK6 und Endothelin 1 stehen könnten. Diese Veränderungen werden im Folgenden diskutiert.

5.1 Endothelin 1 Signalweg

Endothelin-1 bindet sowohl parakrin, wie auch autokrin an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (meist Endothelin A Rezeptor, manchmal auch Endothelin B Rezeptor), er kann neben G-Proteinen auch an Gerüstproteine, wie β -Arrestin gekoppelt sein (66). Durch die Kopplung werden diverse Signaltransduktionswege aktiviert, einschließlich Phospholipase C β (66). Dies führt über Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) zu einer Kalziummobilisation und Proteinkinase C (PKC) Aktivierung, sowie eine Aktivierung der MAPK Familie, inklusive ERK Signalweg (66). Außerdem gibt es Interaktionen zwischen ET1-Rezeptoren und Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) über die Rekrutierung und Aktivierung von SRC, was wiederum nachgeschaltete Wege aktiviert (66).

Des Weiteren führt eine Stimulation des ET-1-Rezeptors zur Aktivierung von Phospholipase A (PLA) und Arachidonsäure (AA) und die nachgeschaltete Cyclooxygenase 1 (COX1) und COX2, was wiederum zur Prostaglandin E2 (PGE2) Produktion führt (66). Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Focal Adhesion Kinase (FAK)-paxillin, dies aktiviert RHO-guanine nucleotide exchange factor (RHO-GEF) und PI3K, dies führt in weiteren Schritten zur AKT-, integrin-linked kinase- (ILK) und MTOR- Aktivierung und Inhibition von Prolyl-hydroxylase 2 (PHD2), welche die Aktivität des hypoxia-inducible factors 1 α (HIF1 α) stabilisiert (66).

Der Nuklear Faktor- κ B (NF- κ B) Signalweg wird ebenfalls durch ET1 aktiviert (66).

Über eine Stimulation von RHO-GEF und einem kleinen GTPase Protein, RAS homology A (RHOA), initiiert ET1 RHO-abhängige Signalvorgänge durch RHO-associated coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1), was zu zytoskeletalem Remodelling führt (66).

Abbildung 30 gibt einen Überblick über die betroffenen Signalwege.

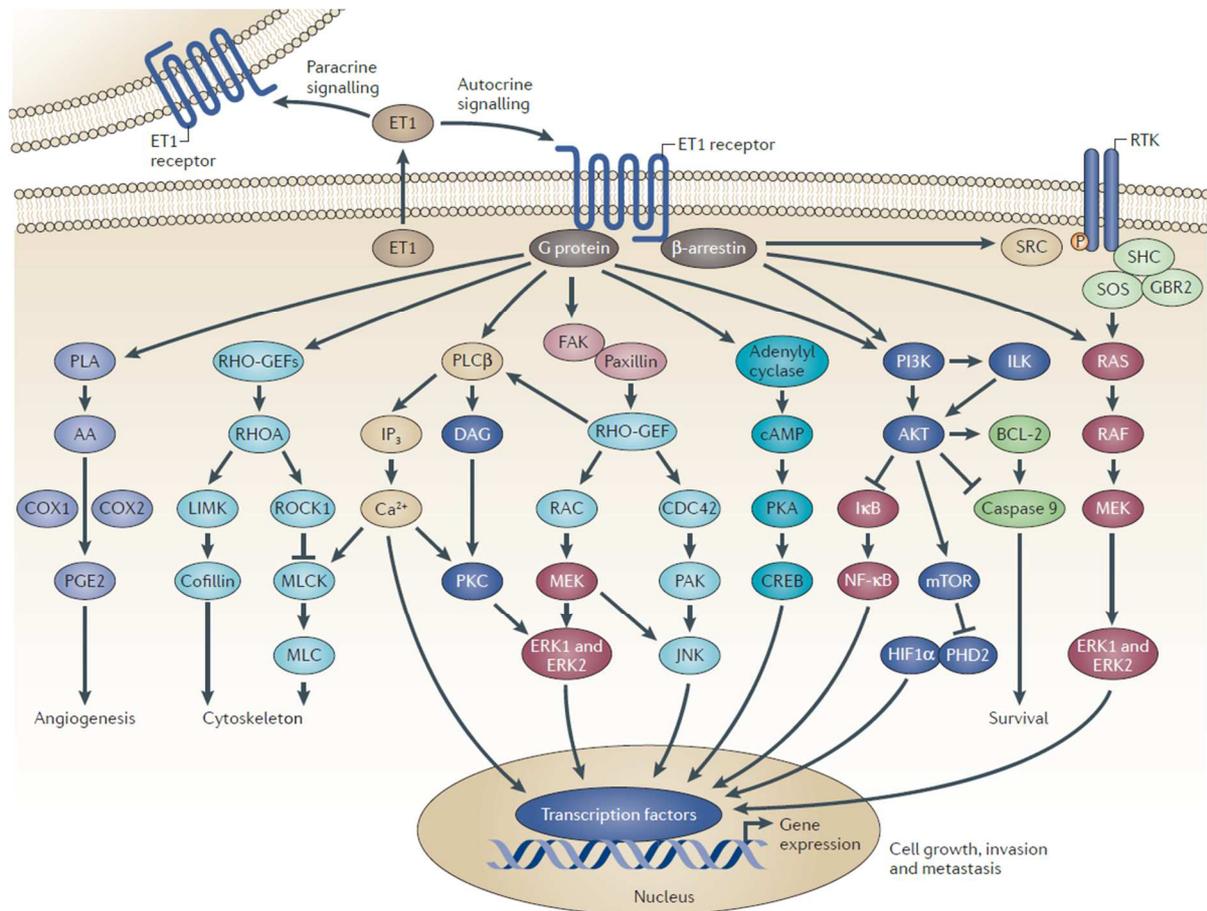


Abbildung 30: Endothelin 1 Signalwege, Nachdruck mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Cancer] (66), copyright (2013)

Eine erhöhte Aktivierung des Endothelinrezeptors kann Tumorbildung und -progression herbeiführen (66). ET1 inhibiert die Apoptose, was einen entscheidenden Schritt in der Tumorgnese darstellt (66). Außerdem moduliert es Zellüberlebenssignalwege, wie PI3K-abhängige AKT Aktivierung oder NF-κB Signalwege (66). Durch ET1 werden Zellproliferation, -Überleben, Epithel-mesenchymale Transition, Angiogenese, Immunzellantwort und Medikamentenresistenz kontext-abhängig gefördert (66).

Auch bei Mammakarzinomzellen konnte eine Korrelation zwischen Endothelin 1 und einem erhöhten malignen Potenzial festgestellt werden, weshalb Endothelin 1 als prognostischer Marker diskutiert wird (67).

Die Endothelin-Rezeptoren wurden als potenzielle Ziele für die Tumorthherapie erwogen. Antagonisten für den Rezeptor wurden bereits in klinischen Studien erforscht, jedoch bisher mit enttäuschenden Ergebnissen. In präklinischen Studien von Haque et al. schien z.B. Zibotentan (ET(A) Rezeptorantagonist) ein vielversprechendes Medikament zu sein (68). In einer klinischen Studie, an Patienten mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom, konnte jedoch kein Vorteil der

Zibotentan-Gabe, gegenüber der Placebo-Gruppe festgestellt werden (beide Gruppen erhielten zusätzlich eine Platin-basierte Chemotherapie) (69). Endothelin-Antagonisten wurden bereits erfolgreich zur Therapie von pulmonaler arterieller Hypertonie getestet (70). Der Endothelin A Rezeptorantagonist ZD4054 zeigte bereits tumorschädigende Wirkung bei Brustkrebszellen und bietet einen vielversprechenden Therapieansatz beim Mammakarzinom (71).

Der Syndecan-1-Knockdown führte zu einer signifikanten Reduktion von Endothelin-1 auf mRNA-Ebene, sowohl nach Bestrahlung, als auch ohne. Dies könnte bedeuten, dass eine Syndecan-1 Überexpression zu einer Erhöhung von Endothelin-1 führt und somit die Tumorprogression unterstützt. Weitere Tests könnten zeigen, ob der Syndecan-1 Knockdown auch Auswirkungen auf Proteinebene hat. So zeigen auf Basis dieser Dissertation von der AG von Prof. Götte durchgeführte ELISA-Analysen von Zellkulturüberständen von MDA-MB-468-Zellen, dass die Menge an ET-1-Protein durch den Syndecan-1 knockdown auch auf Proteinebene signifikant reduziert wird (Prof. Dr. M. Götte, persönliche Mitteilung). Im nächsten Schritt könnte man mit einem Antagonisten den Endothelin-1 Signalweg blockieren und sehen, ob eine Umkehr des Effektes erzielt wird. Eine Blockade des Signalweges könnte als direkte Tumorthherapie erprobt werden.

Weshalb die Strahlenresistenz beim Mammakarzinom bei Syndecan-1-defizienten Zellen erhöht wird, lässt sich mit Endothelin-1 bisher nicht erklären, da eine Reduktion von Endothelin-1 eher tumorschädigend sein sollte.

5.2 Zellzyklus und DNA-Reparatur

5.2.1 CDK6

Cyclin-dependent kinase 6 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Progression des Zellzyklus (72). Beim Mammakarzinom liegt eine Dysregulation beim G₁-S Übergang vor. Dies führt zu unkontrollierter Zellproliferation (73).

Es wurde aber auch gezeigt, dass es eine transkriptionale Rolle bei der Tumor-Angiogenese spielt (72). Eine Überexpression von CDK6 ist assoziiert mit der Entwicklung einiger Krebsarten. In Krebszellen wird CDK6 überexprimiert, während es in physiologischen Zellen einen niedrigen Level hat. CDK6-Knockout-Mäuse entwickeln sich normal, weshalb man eine onkogenetische Rolle von CDK6 vermutet (72). Eine selektive Inhibition von CDK6 stellt möglicherweise eine gute therapeutische Strategie dar (72).

Abbildung 31 stellt die Funktion und Regulation von CDK6 graphisch vereinfacht dar.

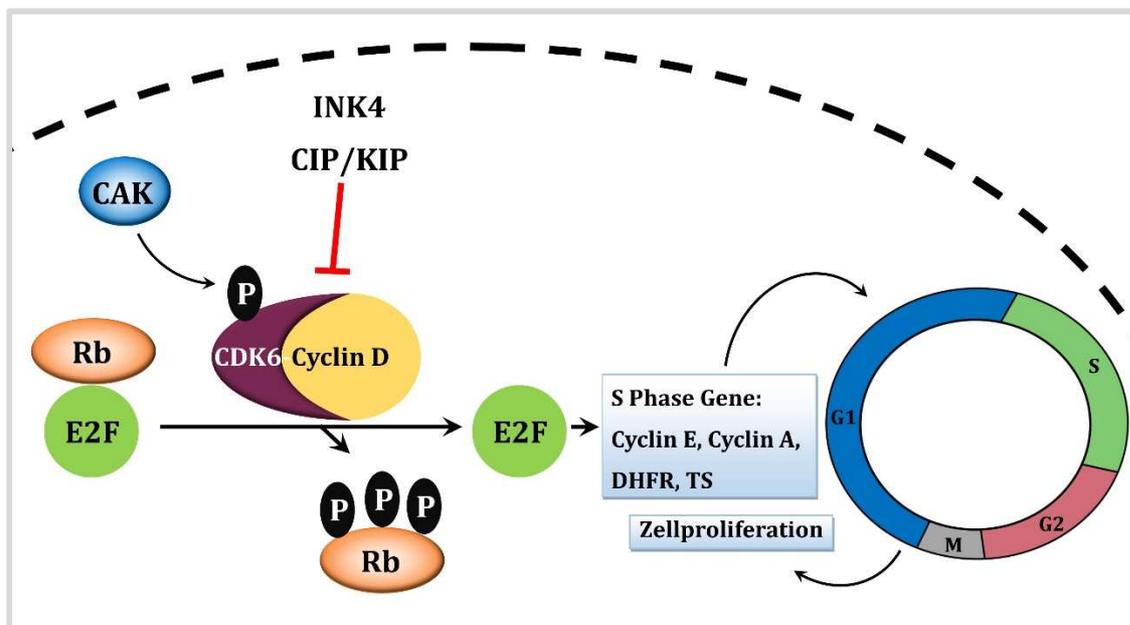


Abbildung 31: Funktion und Regulation von CDK6 (modifiziert nach Tadesse et al. ((72))

CDK6 phosphoryliert das Retinoblastom (Rb) und seine zugehörigen Proteine (Rb) in der G₁ Phase des Zellzyklus und stimuliert E2F. E2F aktiviert dann die Transkription von Genen, codierend für Proteine, die für die DNA-Replikation nötig sind (Eintritt in die S-Phase). Für die Aktivierung von CDK6 müssen D-Typ Cycline binden und CDK6 muss durch CAK phosphoryliert werden (CDK7/Cyclin H/MAT1). INK4s deaktivieren CDK6 und Cip/Kip Proteine und fungieren als negative Modulatoren des CDK6-Cyclin D Komplexes (72,74).

Die Pharmakologische Inhibition von CDK6 gestaltet sich schwierig, es wurde noch kein selektiver Inhibitor für ein individuelles CDK gefunden. Entweder gibt es Inhibitoren für die pan-CDKs

(CDK1/2/4/6/7/9) oder CDK4/6. Bei dieser Inhibition könnten unvorhersehbare Nebenwirkungen auftreten (72). DeMichele et al. testeten den CDK4/6 Inhibitor Palbociclib (PD0332991) bei Patienten mit Rb+, fortgeschrittenem Mammakarzinom, mit dem Ergebnis, dass es gut toleriert wurde und funktionierte (73). In Amerika wurde Palbociclib bereits zugelassen (75). Es wirkt allerdings nur bei Rb-positiven Tumoren.

Des Weiteren führte eine Inhibition von CDK6/4 durch LEE011 (Novartis Oncology) bei Neuroblastom Zellen zu einem Stillstand im Zellzyklus (76). DiRocco et al. beobachteten nach CDK4/6-Inhibition ein Verbleib von renalen Zellen in der G0/G1 Phase, was einen DNA-protektiven Effekt hatte, außerdem wurde die Apoptose verhindert (77). Johnson et al. behandelten Zellen mit CDK4/6 Inhibitoren und beobachtete einen starken, reversiblen Arrest in der G1 Phase. Nach genotoxischem Stress in Form von ionisierender Bestrahlung waren γ H2AX-Formation, DNA-Strangbrüche und DNA damage response gedämpft. Außerdem wurde das Überleben der Zellen verbessert (78).

Die Zytotoxizität von DNA-schädigenden Einflüssen, wie ionisierender Strahlung ist Zellzyklus-abhängig. Die frühe G1 und späte S Phase sind relativ strahlenresistent, während der G1/S Übergangs und die G2/M Phasen relativ strahlensensitiv sind (79,80). Eine verlängerte G1 Phase nach Exposition von Genotoxinen verbessert die Resistenz (81–83).

Der Syndecan-1-Knockdown führte zu einer signifikanten Reduktion von CDK6 auf mRNA-Ebene. Es könnte die Arretierung des Zellzyklus erklären und gleichzeitig auch die erhöhte Strahlenresistenz.

Andererseits könnte die Reduktion von CDK6 die Proliferation negativ beeinflussen. Wie oben erwähnt, führt eine Überexpression zu unkontrollierter, gesteigerter Proliferation. Sollte eine Syndecan-1 Überexpression den gegenteiligen Effekt, also eine gesteigerte Expression von CDK6 herbeiführen, würde dies eine gesteigerte Proliferation und somit einen invasiveren Tumor hervorbringen. Die invasiveren, triple-negativen und wenig differenzierten Mammakarzinome zeigen eine gesteigerte Syndecan-1 Expression (84), was zu diesem Ergebnis passen würde.

5.2.2 CREB1

cAMP response element binding Protein 1 ist assoziiert mit der Tumorprogression von Brustkrebs und erhöht bei Patienten mit schlechter Prognose (85). Son et al. zeigten, dass CREB1 die Metastasierung von Brustkrebszellen fördert (86).

Andererseits unterdrückt CREB1 den glioblastomalen proliferativen Effekt von Stress-induzierter Acetylcholinesterase Variante AChE-R wirkt also antiproliferativ. Somit hat CREB1 möglicherweise eine gewebeabhängige Rolle in humanen Karzinomen (87).

Deng et al. fanden heraus, dass sich durch ionisierende Bestrahlung die Konzentration von nukleärem phosphorylierten CREB von 25 % auf 49 % erhöht. Die Konzentration des nichtphosphorylierten CREB bleibt dagegen unverändert (88). Zwei CRE-bindende Transkriptionsfaktoren, CREB and ATF2, fungieren als transkriptionaler Aktivator und Repressor von neuroendokrin-ähnlicher (NE-like) Differenzierung. Ionisierende Strahlung induziert NE-like Differenzierung durch Anstieg der nukleären Konzentration von Phospho-CREB und cytoplasmatischer Akkumulation von ATF2 bei Prostatakrebszellen (88). Eine erhöhte Anzahl an NE-like Zellen scheint mit einer Prostatakrebsprogression, -wachstum und schlechter Prognose assoziiert zu sein (89,90).

Di Nisio et al. untersuchten die Rolle von Mitgliedern der Cyclic-nucleotide Response Element-Binding (CREB) Familie und zugehörigen nukleären Transkriptionsfaktoren bei der Reaktion auf Bestrahlung von humanen B Lymphomazelllinien und vermutet eine pro-Apoptotische Wirkung von CREB (91).

Fang et al. fanden heraus, dass CREB1 ein kritischer Transkriptionsfaktor von RRM2 (eine kleine Untereinheit der Ribonukleotidreduktase) ist, welcher die Tumoraggressivität erhöht und eine signifikante Korrelation zwischen CREB1 und RRM2 in humanem kolorektalen Krebs darstellt. Daher könne man CREB1 und RRM2 möglicherweise als Biomarker oder als Ziele für medikamentöse Therapie verwenden (92).

Rao et al. untersuchten CREB1-Knockdown Magenkrebszellen und fand heraus, dass Zellproliferation, Koloniebildung, Migration und Invasion inhibiert und ein Verbleiben in der G1/G0 Phase in vitro, als auch unterdrücktes Tumorwachstum in vivo induziert wurde. Außerdem bewirkte der CREB1-Knockdown eine Reduktion seiner nachgeschalteten Gene Cyclin D1, Bcl-2 und MMP-9. Auch er sieht ein therapeutisches Potential in CREB1 (93).

Yao et al. entdeckten, dass die Transkription und Expression von CREB1 bei Ösophaguskrebszellen durch MicroRNA-506 negativ beeinflusst wird (94).

MicroRNA kann sowohl zur Diagnose, Prognose und auch Therapie eingesetzt werden (95). MiRNA-506 wäre vielleicht ein potientes Medikament um CREB1 zu beeinflussen. Es sollte dazu an weiteren Zelllinien getestet werden, um herauszufinden, ob es bei unterschiedlichen Krebsarten auf die gleiche Weise wirkt. Der Syndecan-1 Knockdown führte nach Bestrahlung zu einer signifikanten Reduktion von CREB1 auf mRNA-Ebene. Dieser Zusammenhang zwischen Syndecan-1 und CREB1 bietet möglicherweise einen neuen Angriffspunkt für Therapeutika und sollte daher noch genauer und v. a. auch auf Proteinebene untersucht werden. Vorläufige Daten aus der AG von Prof. Götte zeigen, dass der siRNA-knockdown von Syndecan-1 auch auf Proteinebene zu einer Reduktion der Expression von CREB1 in MDA-MB-468-Zellen führt (Prof. Dr. M. Götte, persönliche Mitteilung). Da CREB1 ein Transkriptionsfaktor ist, kann es die

Transkription anderer Gene beeinflussen, womöglich auch die untersuchten Gene dieser Studie (siehe Kapitel 5.3 und Abbildung 33).

5.2.3 EXO1

Exonuklease 1 ist eine multifunktionelle 5' → 3' Exonuklease und eine DNA-Struktur-spezifische DNA Endonuklease. Sie spielt eine Rolle bei der DNA Replikation, DNA Mismatch-Reparatur und DNA Doppelstrangbruch-Reparatur bei Eukaryoten und trägt zur Meiose, Immunglobulin-Reifung und micro-mediated end-joining bei höheren Eukaryoten bei (96).

Abbildung 32 gibt einen Einblick, in welche DNA Stoffwechsel-Wege EXO1 involviert ist. Momentan ist noch unklar, wie EXO1 mit Syndecan-1 in Zusammenhang stehen könnte.



Abbildung 32: Einflüsse von EXO1 (modifiziert nach (96)); EXO1 ist sowohl bei der Mismatch-Reparatur als auch bei der Doppelstrangbruch-Reparatur beteiligt, spielt eine Rolle bei der Telomer-Instandhaltung, Genomischen Replikation, somatischen Hypermutation, Klassenwechsel-Rekombination, Immunglobulin-Reifung und Lösung von doppel-Holliday junctions während der Meiose.

5.2.4 PMS1

PMS1 nimmt auch an Prozessen der DNA Mismatch-Reparatur (MMR) teil (97). MMR ist ein Pathway, der eine Schlüsselrolle beim Erhalt der Genomstabilität spielt, indem er Basen-Fehlpaarungen, sowie zusätzliche/fehlende Basen während der DNA Replikation und Rekombination korrigiert. Die Proteine MutS α (MSH2-MSH6 und MSH2-MSH3 Heterodimer) und MutL α (MLH1-PMS2, MLH1-PMS1, und MLH1-MLH3 Heterodimer) sind dabei die Hauptakteure (98).

Viele Tumoren sind MMR-defizient (99). Eine Mutation von MMR Genen kann zum sogenannten Lynch Syndrom führen, welches zu einer erhöhten Prädisposition für zahlreiche Karzinome führt, inklusive Kolorektal- und Endometriumkrebs (100).

Eine niedrige Expression von einem der MMR Proteine ist assoziiert mit einer erhöhten Prädisposition für einige Krebsarten, inklusive Kolorektal-, Magen-, Endometrium-, Ovarialkrebs und weiteren (99).

Die Mutationsrate von MMR-defizienten Zellen ist 100 - 1.000 -fach erhöht (101).

Viele Studien belegen, dass MMR-defiziente Tumoren resistent gegen viele Chemotherapeutika sind (102–104).

Die Regulatoren der MMR könnten potentielle Angriffspunkte einer Therapie solcher MMR-defizienten Tumoren sein (99).

Wie PMS1 und Syndecan-1 in Zusammenhang stehen, ist bislang noch unklar.

5.3 Zusammenfassung

In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 konnte gezeigt werden, dass die DNA-Reparaturprozesse nach Bestrahlung unter Syndecan-1-knockdown länger andauern. Auch die untersuchten Zielgene zur DNA-Reparatur ergaben eine reduzierte Expression von Exonuclease 1 der Syndecan-1 defizitären MDA-MB 468 Zellen. Nach Bestrahlung konnte dieser Effekt auch bei CREB1 beobachtet werden.

Der Zellzyklus ist unter Syndecan-1-Einfluss ebenfalls verändert, mehr Zellen sind 24 h nach Bestrahlung in der G2-Phase, in welcher die Reparaturprozesse stattfinden. Syndecan-1 scheint also die Reparaturphase der Zellen zu verlängern, bzw. den Zellzyklus zu arretieren, sodass die Zellen die G2 Phase erst verzögert erreichen. Hierzu passt auch die Reduktion von CDK6, welche bei beiden Zelllinien signifikant war. CDK6 arretiert den Zellzyklus in der G1 Phase reversibel. Eine verlängerte G1 Phase hat einen strahlenprotektiven Effekt und bietet somit eine Erklärung für die Strahlenresistenz unter Syndecan-1 Knockdown.

CDK6 hat auch Einfluss auf die Proliferation.

Im funktionellen BrdU-Experiment zeigte sich jedoch – im Gegensatz zur Zellzyklusanalyse – kein Unterschied zwischen der DNA-Synthese von Kontrollzellen und Zellen, die mit Syndecan-1-siRNA behandelt wurden. Betrachtet man die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse, liegt dies wohl darin begründet, dass sich der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase nicht signifikant verändert, weder nach Syndecan-1 knockdown, noch nach Bestrahlung oder der Kombinationsbehandlung. BrdU wird in neu synthetisierte DNA als Ersatz für Thymidin eingebaut (64). Der Einbau des BrdU tritt hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus auf (105), was eine Erklärung für die scheinbare Diskrepanz zwischen den Daten der Zellzyklusanalyse und dem BrdU-Assay liefert.

Ebenfalls verändert ist der Endothelin 1 Signalweg. Hier konnte eine signifikante Reduktion gezeigt werden, allerdings wiederum nur bei MDA-MB 468 Zellen. Eine erhöhte Aktivierung des Endothelinrezeptors kann Tumorprogression und -genese hervorrufen. Eine Reduktion von Endothelin 1 wäre also ein möglicher Therapieansatz. Es wurden bereits Rezeptor-Antagonisten getestet, leider bisher ohne Erfolg.

Womöglich bildet CREB1 das Bindeglied zwischen all diesen Ergebnissen, da es als Transkriptionsfaktor die Expression der Zielgene beeinflussen kann. Die Abbildung 33 stellt schematisch den potenziellen Zusammenhang dar.

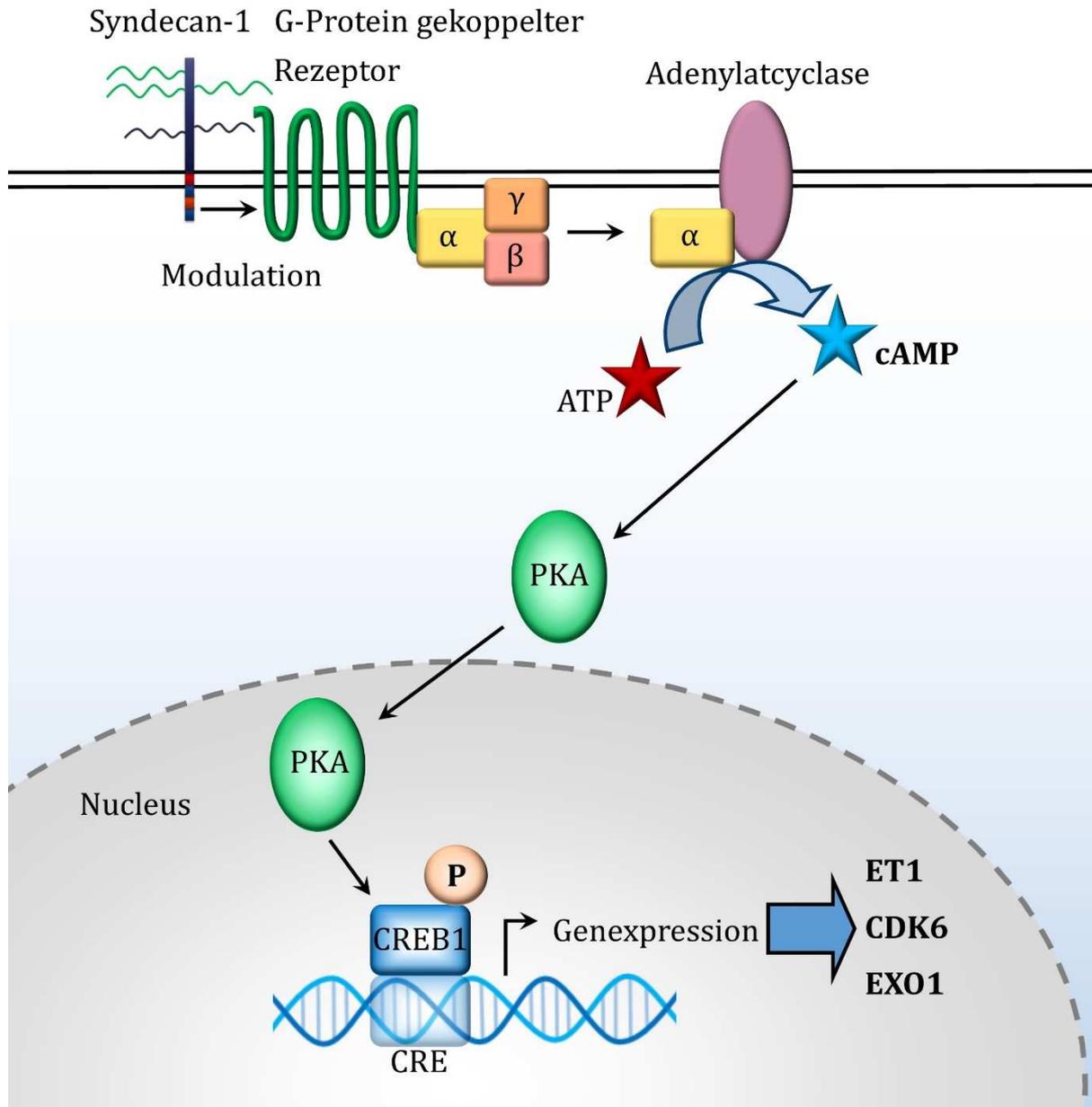


Abbildung 33: Hypothetisches Modell der Syndecan-1-Wirkung im Kontext der Strahlentherapie des Mammakarzinoms. Nach diesen auf Basis von Genexpressionsunterschieden entwickelten Modell könnte Syndecan-1 einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor modulieren (wie z.B. einen der Endothelin-Rezeptoren), woraufhin dies über die α -Untereinheit die Adenylyl cyclase aktiviert. Diese katalysiert die Reaktion von ATP zu cAMP. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche CREB1 phosphoryliert. Dies bindet an der Promotorregion die cAMP-response-element (CRE) Sequenz und kann so die Transkription von Genen induzieren, die nach den Daten der vorliegenden Arbeit Syndecan-1-abhängig reguliert wurden.

Stimulatorische G-Proteine können über ihre α -Untereinheit die Adenylatcyclase aktivieren, während inhibitorische G-Proteine ihre Hemmung herbeiführen können. Die Adenylatcyclase katalysiert die Reaktion von ATP zu cAMP. Der second messenger cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche CREB1 phosphoryliert. cAMP-abhängige Gene enthalten in ihrer Promotorregion eine spezifische Sequenz, die als cAMP-response-element (CRE) bezeichnet wird. Wird CREB1 nun phosphoryliert, kann es die Transkription von Zielgenen induzieren (52).

Nach Recherche in einer Gendatenbank, konnten CREB1 Bindungstellen am Enhancer von Endothelin 1, Exonuclease 1 und Cyclin dependent Kinase 6 gefunden werden (106). CREB1 könnte somit eine Erklärung für alle Ergebnisse liefern, wenn wir davon ausgehen, dass Syndecan-1 das G-Protein in seiner Funktion beeinflusst. Es müsste ein positiver Einfluss sein, denn bei Syndecan-1 Knockdown, kommt es zur Reduktion all dieser Gene. Zu diesem Zeitpunkt ist dieser potentielle Zusammenhang eher hypothetisch und müsste durch weitergehende Analysen gestützt werden. In weiteren Versuchen müsste geklärt werden, ob sich die Abnahme der mRNA unter Syndecan-1 knockdown auf die CREB1-Proteinexpression auswirkt und ob dies zu einer Beeinflussung der cAMP-abhängigen Gene führt.

Eine ähnliche Interaktion von Syndecan-1 wurde aber bei Integrinen entdeckt, dabei interagiert Syndecan-1 direkt mit seiner extrazellulären Domäne mit $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ Integrinen (107). Diese Interaktion konnte mit Synstatin gehemmt werden (107).

Zur Verifizierung dieser Vermutung könnte man, neben weiteren Versuchen auf Proteinebene, den cAMP-Spiegel der Sdc-1 Knockdownzellen erhöhen, z.B. mithilfe des cAMP-Aktivators Forskolin, und sehen, ob sich die Effekte des Knockdowns so umkehren lassen.

5.4 Limitierungen der Studie

Eine Limitierung der Studie ist, dass zunächst nur 2 Zelllinien getestet wurden. Die Ergebnisse lassen sich daher noch nicht verallgemeinern. Zudem haben bereits diese beiden Zelllinien unterschiedliche Reaktionen auf den Syndecan-1 Knockdown gezeigt, eine kontextabhängige Wirkung ist daher naheliegend. Das Mammakarzinom ist sehr heterogen, daher wäre es hilfreich noch weitere Zelllinien zu testen.

Als weitere Limitation ist zu nennen, dass in dieser Studie nur eine einzelne siRNA für den Syndecan-1 knockdown verwendet wurde. Weiterführende Arbeiten der AG von Prof. Götte konnten die in dieser Arbeit generierten Schlüsselergebnisse einer Syndecan-1-abhängigen Regulation von ET-1, CDK6, EXO1 und CREB1 in MDA-MB-468-Zellen mit einer zusätzlichen siRNA-Sequenz unabhängig bestätigen (Thermo Fisher Assay ID 12527 – Sdc1 Exon 6 / bp 1314; Prof. Dr. Götte, persönliche Mitteilung).

Die Targets dieser Studie wurden auf RNA-Ebene getestet, um die Aussagen der Ergebnisse zu bekräftigen, sollte man Schlüsselergebnisse auch auf Proteinebene testen. Weiterführende Arbeiten der AG von Prof. Götte konnten hierbei eine Syndecan-1-abhängige Regulation von ET-1 und CREB1 in MDA-MB-468-Zellen auf Proteinebene bestätigen (Prof. Dr. M. Götte, persönliche Mitteilung).

Grundsätzlich bietet das Zellkulturmodell viele Vorteile, Störungen und Einflüsse sind limitiert und können gezielt verändert werden. Es ist damit ideal für den ersten Schritt in der Grundlagenforschung geeignet. Im einfachen Zellkulturmodell befindet sich allerdings nur eine Zelllinie und kein Mikroenvironment, wie es bei menschlichen Organen zu finden ist. Co-Kulturmodelle oder 3D-Zellkulturen könnten im nächsten Schritt weitere nützliche Erkenntnisse bringen.

5.5 Ausblick

Es wurden einige sehr interessante Zusammenhänge entdeckt, die im nächsten Schritt verifiziert und näher beleuchtet werden sollten. Einige Targets, wie Endothelin 1, CREB1 oder CDK6, könnten womöglich als Ziele einer medikamentösen Therapie erwogen werden. Ihre Reduktion scheint einen tumorschädigenden oder zumindest wachstumshemmenden Einfluss zu haben.

Der strahlenprotektive Effekt des Sydecin-1 Knockdowns könnte auf CDK6 zurückzuführen sein, da ihre Reduktion mit einem DNA-protektiven Effekt assoziiert ist (77). Mit dem Wissen, dass eine Arretierung des Zellzyklus solche Auswirkungen hat, könnte man medikamentös bei besonders resistenten Tumoren vor Bestrahlung eine Beeinflussung des Zellzyklus einbringen. Da die Zellen in der G2, M oder am G1/S Übergang strahlensensitiver sind, könnte man versuchen die Zellen in diesen Phasen zu arretieren. Alopine induziert z.B. einen Arrest in der G2/M Phase in einer Kolonkrebs-Zelllinie (108), und könnte auf Basis der Ergebnisse dieser Studie auch für das Mammakarzinom ein lohnenswertes Therapeutikum darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Weyerstahl T, Stauber M. Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013, S. 352.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA-Cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
3. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Teml K, Weg-Remers S, Wittenberg K, Bares N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Auflage. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Herausgeber. Berlin. 2015 [heruntergeladen am: 28.08.2018]. Verfügbar unter: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf;jsessionid=1B0D53CA99F5DC784FC60AE9595119E4.1_cid363?_blob=publicationFile
4. Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn H-P. Invasive breast cancer: the current WHO classification. *Pathologe.* 2014;35(1):7–17.
5. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5v8-30.
6. Esserman LJ, Joe BN. Clinical features, diagnosis and staging of newly diagnosed breast cancer. Post TW, Herausgeber. Waltham, Massachusetts: UpToDate. 2017 [Letzte Aktualisierung: 02.02.2017; heruntergeladen am: 28.08.2018]. Verfügbar unter: https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-diagnosis-and-staging-of-newly-diagnosed-breast-cancer?source=search_result&search=breast%20cancer%20epidemiology&selectedTitle=1~150#H28333270
7. O'Brien KM, Cole SR, Tse C-K, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, Dressler LG, Geradts J, Millikan RC. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the carolina breast cancer study. *Clin Cancer Res.* 2010;16(24):6100–10.
8. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth

- factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J.* 2009;15(6):593–602.
9. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Rowden D, Solky AJ, Stearns V, Winer EP, Griggs JJ. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol.* 2014;32(21):2255–69.
 10. Ahmed S, Sami A, Xiang J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer.* 2015;22(2):101–16.
 11. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9804):1707–16.
 12. Pagani O, Senkus E, Wood W, Colleoni M, Cufer T, Kyriakides S, Costa A, Winer EP, Cardoso F. International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(7):456–63.
 13. Couchman JR, Gopal S, Lim HC, Norgaard S, Multhaupt HAB. Fell-muir lecture: syndecans: from peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. *Int J Exp Pathol.* 2015;96(1):1–10.
 14. Saunders S., Jalkanen M., O'Farrell S., Bernfield M. Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J Cell Biol.* 1989;108(4):1547–56.
 15. Rapraeger AC, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. A putative membrane proteoglycan associates quantitatively with lipid vesicles. *J Biol Chem.* 1983;258(6):3632–6.
 16. Rapraeger A, Jalkanen M, Bernfield M. Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1986;103(6 Pt 2):2683–96.
 17. Koda JE, Rapraeger A, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *J Biol Chem.* 1985;260(13):8157–62.

18. Saunders S, Bernfield M. Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix. *J Cell Biol.* 1988;106(2):423–30.
19. Sun X, Mosher DF, Rapraeger A. Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin. *J Biol Chem.* 1989;264(5):2885–9.
20. Teng YH-F, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol.* 2011;31(1):3–16.
21. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729–77.
22. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:365–93.
23. Park PW, Reizes O, Bernfield M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J Biol Chem.* 2000;275(39):29923–6.
24. McFall AJ, Rapraeger AC. Characterization of the high affinity cell-binding domain in the cell surface proteoglycan syndecan-4. *J Biol Chem.* 1998;273(43):28270–6.
25. Chen L, Klass C, Woods A. Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(16):15715–8.
26. Hayashida K, Johnston DR, Goldberger O, Park PW. Syndecan-1 expression in epithelial cells is induced by transforming growth factor beta through a PKA-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24365–74.
27. Dews IC, MacKenzie KR. Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(52):20782–7.
28. Beauvais DM, Ell BJ, McWhorter AR, Rapraeger AC. Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J Exp Med.* 2009;206(3):691–705.
29. Couchman JR. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:89–114.

30. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC, Sanderson RD. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*. 2010;115(12):2449–57.
31. Jalkanen M, Rapraeger A, Saunders S, Bernfield M. Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain. *J Cell Biol*. 1987;105(6 Pt 2):3087–96.
32. Hayashida K, Bartlett AH, Chen Y, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010;293(6):925–37.
33. Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest*. 2001;107(2):R9-R14.
34. Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Iwase M, Yoshikai Y, Yanada M, Yamamoto K, Matsushita T, Nishimura M, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T. Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem*. 2001;276(50):47483–8.
35. Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, Saito Y, Kurotaki D, Diao H, Matsui Y, Segawa T, Maeda M, Kojima T, Uede T. Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med*. 2008;205(1):25–33.
36. Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, Lee YJ, Song YW, Herzog C, Theilmeier G, Pap T. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med*. 2009;15(9):1072–6.
37. Jiang D, Liang J, Campanella GS, Guo R, Yu S, Xie T, Liu N, Jung Y, Homer R, Meltzer EB, Li Y, Tager AM, Goetinck PF, Luster AD, Noble PW. Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2049–57.
38. Ikesue M, Matsui Y, Ohta D, Danzaki K, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Kojima T, Tsutsui H, Uede T. Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):1066–74.

39. Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, Bernfield M. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet.* 2000;25(3):329–32.
40. Park PW, Pier GB, Hinkes MT, Bernfield M. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature.* 2001;411(6833):98–102.
41. Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DDS, Pajoohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Brown M, Aquino C, Schwartz AM, Goldberger O, Hinkes MT, Bernfield M. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 23):4517–31.
42. Götte M, Echtermeyer F. Syndecan-1 as a regulator of chemokine function. *ScientificWorldJournal.* 2003;3:1327–31.
43. Alexopoulou AN, Mulhaupt HAB, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(3):505–28.
44. Hassan H, Greve B, Pavao MSG, Kiesel L, Ibrahim SA, Götte M. Syndecan-1 modulates beta-integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast cancer cell adhesion, migration, and resistance to irradiation. *FEBS J.* 2013;280(10):2216–27.
45. Ramani VC, Purushothaman A, Stewart MD, Thompson CA, Vlodaysky I, Au JL-S, Sanderson RD. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *FEBS J.* 2013;280(10):2294–306.
46. Ibrahim SA, Hassan H, Vilardo L, Kumar SK, Kumar AV, Kelsch R, Schneider C, Kiesel L, Eich HT, Zucchi I, Reinbold R, Greve B, Götte M. Syndecan-1 (CD138) modulates triple-negative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6-mediated STAT3 signaling. *PLoS One.* 2013;8(12):e85737.
47. Ibrahim SA, Gadalla R, El-Ghonaimy EA, Samir O, Mohamed HT, Hassan H, Greve B, El-Shinawi M, Mohamed MM, Götte M. Syndecan-1 is a novel molecular marker for triple negative inflammatory breast cancer and modulates the cancer stem cell phenotype via the IL-6/STAT3, Notch and EGFR signaling pathways. *Mol Cancer.* 2017;16(1):57.
48. Binder Gallimidi A, Nussbaum G, Hermano E, Weizman B, Meirovitz A, Vlodaysky I, Götte M, Elkin M. Syndecan-1 deficiency promotes tumor growth in a murine model of colitis-induced colon carcinoma. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174343.
49. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe J-P, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo W-L, Stilwell JL, Pinkel D,

- Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515–27.
50. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014;465(1):1–14.
51. Oberschelp C. Syndecan-1 und niedrigenergetische Bestrahlung und deren Einfluss auf Zellmotilität und -viabilität beim Mammakarzinom [Dissertation]. Münster (Westf.): Westfälische Wilhelms-Universität Münster; 2016.
52. Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2014.
53. Jensen K, Anderson JA, Glass EJ. Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2014;158(3-4):224–32.
54. Forsbach A, Muller C, Montino C, Kritzler A, Curdt R, Benahmed A, Jurk M, Vollmer J. Impact of delivery systems on siRNA immune activation and RNA interference. *Immunol Lett*. 2012;141(2):169–80.
55. Yang S, Chen Y, Ahmadi R, Ho EA. Advancements in the field of intravaginal siRNA delivery. *J Control Release*. 2013;167(1):29–39.
56. Thermo Fisher Scientific. Syndecan-1 siRNA details assay-ID S12634. Waltham, Massachusetts [heruntergeladen am: 28.08.2018]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/sirna/s12634?pluginName=&CID=&ICID=#assay-details-section>
57. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(16):3761–6.
58. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics*. 7. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2013. (Der Experimentator).
59. Ibrahim SA, Yip GW, Stock C, Pan J-W, Neubauer C, Poeter M, Pupjalis D, Koo CY, Kelsch R, Schule R, Rescher U, Kiesel L, Gotte M. Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism. *Int J Cancer*. 2012;131(6):E884-96.

60. Thermo Fisher Scientific. SYTO 9 stain. Waltham, Massachusetts, USA [heruntergeladen am: 28.08.2017]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/syto-9.html>
61. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*. 2007;37(2):120–6.
62. Mariotti LG, Pirovano G, Savage KI, Ghita M, Ottolenghi A, Prise KM, Schettino G, Robson CN. Use of the γ -H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PLoS One*. 2013;8(11):e79541.
63. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982;218(4571):474–5.
64. Mead TJ, Lefebvre V. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. *Methods Mol Biol*. 2014;1130233–43.
65. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung Sonderausgabe PCR. *BIOspektrum*. 2004;(10):92–5.
66. Rosano L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(9):637–51.
67. Wülfing P, Diallo R, Kersting C, Wulfing C, Poremba C, Greb RR, Bocker W, Kiesel L. Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep*. 2004;11(4):791–6.
68. Haque S-u, Dashwood MR, Heetun M, Shiwen X, Farooqui N, Ramesh B, Welch H, Savage FJ, Ogunbiyi O, Abraham DJ, Loizidou M. Efficacy of the specific endothelin a receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in colorectal cancer: a preclinical study. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(8):1556–67.
69. Cognetti F, Bagnato A, Colombo N, Savarese A, Scambia G, Sehouli J, Wimberger P, Sorio R, Harter P, Mari E, McIntosh S, Nathan F, Pemberton K, Baumann K. A Phase II, randomized, double-blind study of zibotentan (ZD4054) in combination with carboplatin/paclitaxel versus placebo in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer sensitive to platinum-based chemotherapy (AGO-OVAR 2.14). *Gynecol Oncol*. 2013;130(1):31–7.
70. Liu C, Chen J, Gao Y, Deng B, Liu K. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(2):CD004434.

71. Smollich M, Götte M, Fischgrabe J, Macedo LF, Brodie A, Chen S, Radke I, Kiesel L, Wulfing P. ETAR antagonist ZD4054 exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant in breast cancer therapy, and improves in vivo efficacy of anastrozole. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(2):345–57.
72. Tadesse S, Yu M, Kumarasiri M, Le BT, Wang S. Targeting CDK6 in cancer: state of the art and new insights. *Cell Cycle.* 2015;14(20):3220–30.
73. DeMichele A, Clark AS, Tan KS, Heitjan DF, Gramlich K, Gallagher M, Lal P, Feldman M, Zhang P, Colameco C, Lewis D, Langer M, Goodman N, Domchek S, Gogineni K, Rosen M, Fox K, O'Dwyer P. CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rb+ advanced breast cancer: phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):995–1001.
74. Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E. Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):1775–83.
75. Turner NC, Ro J, Andre F, Loi S, Verma S, Iwata H, Harbeck N, Loibl S, Huang Bartlett C, Zhang K, Giorgetti C, Randolph S, Koehler M, Cristofanilli M. Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(3):209–19.
76. Rader J, Russell MR, Hart LS, Nakazawa MS, Belcastro LT, Martinez D, Li Y, Carpenter EL, Attiyeh EF, Diskin SJ, Kim S, Parasuraman S, Caponigro G, Schnepp RW, Wood AC, Pawel B, Cole KA, Maris JM. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(22):6173–82.
77. DiRocco DP, Bisi J, Roberts P, Strum J, Wong K-K, Sharpless N, Humphreys BD. CDK4/6 inhibition induces epithelial cell cycle arrest and ameliorates acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(4):F379-88.
78. Johnson SM, Torrice CD, Bell JF, Monahan KB, Jiang Q, Wang Y, Ramsey MR, Jin J, Wong K-K, Su L, Zhou D, Sharpless NE. Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2528–36.
79. Sinclair WK, Morton RA. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res.* 1966;29(3):450–74.
80. Terasima T, Tolmach LJ. X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells. *Science.* 1963;140(3566):490–2.

81. Elkind MM, Sutton H. X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature*. 1959;184:1293–5.
82. Elkind MM, Sutton H. Radiation response of mammalian cells grown in culture. 1. repair of X-ray damage in surviving chinese hamster cells. *Radiat Res*. 1960;13:556–93.
83. Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*. 2003;22(37):5834–47.
84. Nguyen TL, Grizzle WE, Zhang K, Hameed O, Siegal GP, Wei S. Syndecan-1 overexpression is associated with nonluminal subtypes and poor prognosis in advanced breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(4):468–74.
85. Chhabra A, Fernando H, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. *Oncol Rep*. 2007;18(4):953–8.
86. Son J, Lee J-H, Kim H-N, Ha H, Lee ZH. cAMP-response-element-binding protein positively regulates breast cancer metastasis and subsequent bone destruction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(2):309–14.
87. Perry C, Sklan EH, Soreq H. CREB regulates AChE-R-induced proliferation of human glioblastoma cells. *Neoplasia*. 2004;6(3):279–86.
88. Deng X, Liu H, Huang J, Cheng L, Keller ET, Parsons SJ, Hu C-D. Ionizing radiation induces prostate cancer neuroendocrine differentiation through interplay of CREB and ATF2: implications for disease progression. *Cancer Res*. 2008;68(23):9663–70.
89. Yuan T-C, Veeramani S, Lin M-F. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):531–47.
90. Amorino GP, Parsons SJ. Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004;14(4):287–300.
91. Di Nisio C, Sancilio S, Di Giacomo V, Rapino M, Sancillo L, Genovesi D, Di Siena A, Rana RA, Cataldi A, Di Pietro R. Involvement of cyclic-nucleotide response element-binding family members in the radiation response of Ramos B lymphoma cells. *Int J Oncol*. 2016;48(1):28–36.
92. Fang Z, Lin A, Chen J, Zhang X, Liu H, Li H, Hu Y, Zhang X, Zhang J, Qiu L, Mei L, Shao J, Chen X. CREB1 directly activates the transcription of ribonucleotide reductase small subunit M2

- and promotes the aggressiveness of human colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(47):78055–68.
93. Rao M, Zhu Y, Cong X, Li Q. Knockdown of CREB1 inhibits tumor growth of human gastric cancer in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2017;37(6):3361–8.
 94. Yao W-J, Wang Y-L, Lu J-G, Guo L, Qi B, Chen Z-J. MicroRNA-506 inhibits esophageal cancer cell proliferation via targeting CREB1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):10868–74.
 95. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122–43.
 96. Keijzers G, Liu D, Rasmussen LJ. Exonuclease 1 and its versatile roles in DNA repair. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016;51(6):440–51.
 97. Muro Y, Sugiura K, Mimori T, Akiyama M. DNA mismatch repair enzymes: genetic defects and autoimmunity. *Clin Chim Acta*. 2015;442:102–9.
 98. Traver S, Coulombe P, Peiffer I, Hutchins JRA, Kitzmann M, Latreille D, Mechali M. MCM9 is required for mammalian DNA mismatch repair. *Mol Cell*. 2015;59(5):831–9.
 99. Guillotin D, Martin SA. Exploiting DNA mismatch repair deficiency as a therapeutic strategy. *Exp Cell Res*. 2014;329(1):110–5.
 100. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer*. 1995;64(6):430–3.
 101. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(7-8):391–407.
 102. Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1091–101.
 103. Hewish M, Lord CJ, Martin SA, Cunningham D, Ashworth A. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(4):197–208.
 104. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res*. 1998;4(1):1–6.

105. Zhao P, Fu JL, Yao BY, Jia YR, Zhou ZC. S phase cell percentage normalized BrdU incorporation rate, a new parameter for determining S arrest. *Biomed Environ Sci.* 2014;27(3):215–9.
106. Weizmann Institute Of Science. GeneCards: human gene database. Israel: Weizmann Institute Of Science [heruntergeladen am: 28.08.2018]. Verfügbar unter: <http://www.genecards.org/>
107. Rapraeger AC. Synstatin: a selective inhibitor of the syndecan-1-coupled IGF1R- α 3 integrin complex in tumorigenesis and angiogenesis. *FEBS J.* 2013;280(10):2207–15.
108. Zhang L, Zheng Y, Deng H, Liang L, Peng J. Aloperine induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 human colon cancer cells. *Int J Mol Med.* 2014;33(6):1613–20.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnummer	Titel der Abbildung	Seite
1	Syndecan-1 Aufbau und Funktion	17
2	Einflüsse und Funktionen von Syndecan-1	18
3	Einschleusen der siRNA in die Zelle mithilfe eines Liposoms	23
4	Gelelektrophorese CCNA1	32
5	Gelelektrophorese CCNB1	32
6	Gelelektrophorese CDK6	33
7	Gelelektrophorese EXO1 und PMS1	33
8	Gelelektrophorese CREB1	33
9	Gelelektrophorese PMS1neu	34
10	Standard GeneRuler Low Range DNA Skala	38
11	Versuchsaufbau Zellen für γ H2AX-Experiment	40
12	Versuchsaufbau für das BrdU-Experiment	44
13	Ergebnisse der qPCRs mit TaqMan-Sonde für Syndecan-1	55
14	Ergebnisse der qPCRs mit TaqMan-Sonde für Endothelin 1, Zelllinie MDA-MB 468	58
15	Ergebnisse der qPCRs mit TaqMan-Sonde für Endothelin 1, Zelllinie MCF-7	59
16	Zeitlicher Verlauf der Proliferation nach Bestrahlung mit 2 Gy	60
17	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für Cyclin A1, Zelllinie MDA-MB 468	61
18	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für Cyclin B1, Zelllinie MDA-MB 468	62
19	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CDK6, Zelllinie MDA-MB 468	63

20	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CDK6, Zelllinie MCF-7	64
21	DNA-Doppelstrangreparatur im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung	65
22	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für EXO1, Zelllinie MDA-MB-468	66
23	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für EXO1, Zelllinie MCF-7	67
24	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CREB1, Zelllinie MDA-MB 468	68
25	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für CREB1, Zelllinie MCF-7	69
26	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für PMS1neu, Zelllinie MDA-MB 468	70
27	Ergebnisse der qPCRs mit Primern für PMS1neu, Zelllinie MCF-7	71
28	Verteilung der Zellzyklusphasen vor und 24 h nach Bestrahlung (Mittelwerte)	72
29	Beispiel-Histogramme	73
30	Endothelin 1 Signalwege	76
31	Funktion und Regulation von CDK6	78
32	Einflüsse von EXO1	81
33	Hypothetisches Modell der Syndecan-1-Wirkung im Kontext der Strahlentherapie des Mammakarzinoms	84

8 Tabellenverzeichnis

Tabellen- nummer	Titel der Tabelle	Seite
1	Molekulare Subtypen von Brustkrebs	13
2	Syndecan-1 siRNA Details	24
3	Mastermix Zusammensetzung	26
4	Cycler-Protokoll zur cDNA-Herstellung	26
5	Pipettierschema Mastermix für q-RT-PCR	27
6	Mastermix für Gradienten-PCR	28
7	Schritte der Gradienten-PCR	29
8	Primerdetails	31
9	Mastermixe für qPCR Protokoll 2	35
10	PCR-Protokoll 2	36
11	Geräte und allgemeine Materialien	47
12	Zellkultur	48
13	siRNA Transfektion	48
14	RNA Isolierung, Umschreiben in cDNA	49
15	PCR Protokoll 1	49
16	TaqMan-Sonden	49
17	PCR Protokoll 2, Gradienten-PCR	50
18	Primer	51
19	Gelelektrophorese	51-52
20	γ H2AX-Assay	52-53

21	Zellzyklus-Analyse	53
22	BrdU-Assay	53-54
23	Multiple lineare Regression auf Fold Change – Sdc-1, MDA-MB 468	55
24	Multiple lineare Regression auf Fold Change – Sdc-1, MCF-7	56
25	Multiple lineare Regression auf Fold Change – ET1, MDA-MB 468	58
26	Multiple lineare Regression auf Fold Change – ET1, MCF-7	59
27	Multiple lineare Regression auf Fold Change – CCNA1, MDA-MB-468	61
28	Multiple lineare Regression auf Fold Change – CCNB1, MDA-MB-468	62
29	Multiple lineare Regression – CDK6 MDA-MB 468	63
30	Multiple lineare Regression CDK6 MCF-7	64
31	Multiple lineare Regression auf Fold Change – EXO1, MDA-MB-468	67
32	Multiple lineare Regression auf Fold Change – EXO1, MCF-7	68
33	Multiple lineare Regression auf Fold Change – CREB1, MDA-MB-468	68
34	Multiple lineare Regression auf Fold Change – CREB1, MCF-7	69
35	Multiple lineare Regression auf Fold Change – PMS1, MDA-MB-468	70
36	Multiple lineare Regression auf Fold Change – PMS1, MCF-7	71
37	Statistische Daten zur Verteilung der Zellzyklusphasen	74

10 Lebenslauf

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all den Menschen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Götte danke ich für die Auswahl des interessanten und vielversprechenden Themas, die Planung der Arbeit, die Bereitstellung der erforderlichen Mittel und die ausgezeichnete Betreuung während der Doktorarbeit. Auch für die Möglichkeit, bei der Tagung der NWGGG meine Ergebnisse zu präsentieren zu können, bin ich sehr dankbar. Ebenso danke ich Prof. Dr. Greve, der mich ebenfalls bei meiner Arbeit unterstützt hat.

Mein besonders herzlicher Dank richtet sich an Birgit Pers und Annette von Dülmen, die mir so geduldig die Methoden vermittelt haben, und immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Den Verantwortlichen für das MedK-Programm danke ich für die finanzielle Unterstützung und auch für die vielen nützlichen Seminare und Vorlesungen, die sie organisiert haben und die bei der Durchführung meiner Arbeit sehr hilfreich waren.

Meinem Bruder, Dr. Simon Rottke, danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und der Durchsicht der Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinem Mann Jacob und meinem Sohn Salih für den Rückhalt und die Aufmunterungen, und meinen Eltern für die fortwährende und tatkräftige Unterstützung und die kritische Durchsicht meiner Arbeit. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen konnte und dass ihr mir in schwierigen Situationen zur Seite standet!