

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

**Syndecan-1 und niedrigenergetische Bestrahlung und deren Einfluss auf
Zellmotilität und -viabilität beim Mammakarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Oberschelp, Christof

aus Steinfurt, Deutschland

2016

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Götte
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel
Referent: Prof. Dr. Martin Götte
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

Zusammenfassung

Syndecan-1 und niedrigenergetische Bestrahlung und deren Einfluss auf Zellmotilität und -viabilität beim Mammakarzinom

Oberschelp, Christof

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne neoplastische Erkrankung bei Frauen. Zur besseren Therapieplanung und Prognoseeinschätzung geht man dazu über jedes einzelne Karzinom molekulargenetisch genau zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die Bedeutung des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1 für die Zellmotilität und -viabilität in Mammakarzinomzellen untersucht. Da es Hinweise darauf gibt, dass Radiotherapie im Bereich niedriger Energiedosen die Metastasierung der Karzinome anregen kann, wurden die Zellen in vielen Versuchen auch mit einem Linearbeschleuniger bestrahlt.

Syndecan-1-defiziente MDA-MB-231 exprimierten vermehrt Tenascin-C und zeigten eine erhöhte Zellmotilität, welche durch eine Bestrahlung zusätzlich erhöht wurde. Die Bestrahlung führte außerdem bei tripelnegativen Brustkrebszelllinien zu einer gesteigerten Rac-1- und einer reduzierten Tenascin-C-Expression. Weiterhin zeigte sich, dass die Zellviabilität von MDA-MB-468 und MCF-7 durch Syndecan-1-Depletion reduziert wurde. Die durchgeführte digitalholographische Mikroskopie und die Genexpressionanalysen lassen auf eine erhöhte Zellmotilität bei Syndecan-1-depletierten und bestrahlten Mammakarzinomzellen schließen, was für Therapie und Prognose des Mammakarzinoms von Bedeutung sein kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2016

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Syndecan-1 und niedrigenergetische Bestrahlung und deren Einfluss auf Zellmotilität
und -viabilität beim Mammakarzinom“

in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, unter Anleitung von Prof. Dr.
Martin Götte:

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit 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, 19.04.2016

Ort, Datum

Christof Oberschelp

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1 Einleitung	5
1.1 Aufbau und Funktion der weiblichen Brust (Schünke et al., 2011).....	6
1.2 Brustkrebs.....	7
1.2.1 Prävalenz und Ätiologie.....	7
1.2.2 Diagnose und Therapie.....	9
1.3 Syndecan-1.....	11
1.4 Fragestellung.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Brustkrebszelllinien.....	13
2.1.1 MDA-MB-231.....	13
2.1.2 MDA-MB-468.....	13
2.1.3 MCF-7.....	14
2.2 Kultivierung der Brustkrebszellen.....	14
2.3 siRNA-Transfektion.....	15
2.4 Kontrolle der Transfektion/Durchflusszytometrie/BrdU.....	16
2.5 Bestrahlung.....	18
2.6 Genexpressionsanalyse - Quantitative Real-Time-PCR.....	19
2.6.1 RNA-Präparation.....	19
2.6.2 Konzentrationsbestimmung:.....	20
2.6.3 Umschreiben der RNA in cDNA.....	20
2.6.4 Durchführung und Ablauf der Real-Time-PCR.....	21
2.6.5 Real-Time-PCR-Protokoll 1.....	22
2.6.6 Real-Time-PCR-Protokoll 2.....	23
2.7 Genexpressionsanalyse: SDS-PAGE und Western Blot.....	25
2.7.1 Proteinlysate.....	25
2.7.2 BCA-Test.....	26
2.7.3 SDS-PAGE.....	27
2.7.4 Blotting.....	29
2.8 Proliferationsassay (MTT-Test).....	31
2.9 Motilitätsanalyse mit digitalholographischer Mikroskopie (DHM).....	33
2.10 Statistik und Analytik.....	34
3 Ergebnisse	38
3.1 Durchflusszytometrische Kontrolle des siRNA-Knockdowns.....	38
3.2 Genexpressionsanalysen zur Überprüfung der Regulation von Zielgenen.....	40

3.2.1 Darstellung der veränderten Genregulation nach Transfektion mit Sdc-1-siRNA und nach Bestrahlung mit 2 Gray.....	41
3.3 Expressionsanalyse von FAK und P-FAK auf Proteinebene.....	44
3.4 Einfluss der siRNA-Transfektion auf die Proliferation von MDA-MB-468- und MCF-7-Brustkrebszellen.....	45
3.5 Digitalholographische Mikroskopie.....	47
4 Diskussion.....	50
4.1 Regulation bestimmter Zielgene durch Syndecan-1 und Bestrahlung.....	51
4.2 Proliferative Eigenschaften.....	54
4.3 Motilitätseigenschaften.....	55
4.4 Kritische Beurteilung des Studienaufbaus.....	55
4.5 Fazit	57
5 Literaturverzeichnis.....	60
Lebenslauf.....	71

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy desoxyribonucleid acid
Cp	Crossing point
Ct	Cycle threshold
ctrl	Kontrolle
ddH ₂ O	double distilled water / doppelt destilliertes Wasser
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Δ	Delta
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	Et alii/und andere
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorting

FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Salzsäure
H₂O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
mRNA	messenger ribonucleid acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n	Stichprobenmenge
NaCl	Natriumchlorid
NADH/NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid/-phosphat (reduzierte Formen)
NaF	Natriumfluorid
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat
O₂/CO₂	Sauerstoff/Kohlenstoffdioxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	pondus/potentia Hydrogenii
qPCR	quantitative Real Time PCR
RNA/RNS	Ribonukleinsäure

RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
®	Copyright
Sdc1	Syndecan-1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline tween
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
™	Unregistered Trade Mark
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

Maßeinheiten

l	Liter
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
kg	Kilogramm
g	Gramm
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
ng	Nanogramm
m	Meter
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
h	Stunde
min	Minute
sek	Sekunde
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
M	Molar
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
mA	Milliampere
V	Volt
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
rpm	rounds per minute
Vol.	Volumen
%	Prozent

1 Einleitung

Die physiologische Funktion der weiblichen Brustdrüsen besteht in der Produktion und Abgabe von Muttermilch an ein Neugeborenes (Laktation) zu dessen Ernährung. Ausgelöst wird dies zuerst durch den verminderten Spiegel der Sexualhormone Gestagen und Östrogen und einen erhöhten Spiegel von Prolaktin. Nach der Geburt setzt die Laktation auch reflektorisch durch den Saugreiz des Säuglings ein, welcher die Ausschüttung von Oxytocin aus der Hypophyse hervorruft. Zusätzlich bewirkt es die Kontraktion der Myoepithelzellen, welche um die Alveolen herumliegen und so die Muttermilch aktiv herauspressen (Horstmann et Dabelow, 1957).

Als Pathologie ist das Brustdrüsenkarzinom die in Deutschland, wie auch in anderen Industrienationen, am häufigsten auftretende maligne Neubildung bei Frauen. Alleine im Jahr 2010 wurden in Deutschland 70.340 Neuerkrankungen und 17.466 Sterbefälle bei Frauen registriert, was 119,6 Neuerkrankungen und 24,0 Sterbefälle pro 100.000 Frauen ausmacht (Internetverweis 1).

Dass Rezeptorstatus und eventuell vorhandene Metastasen einen entscheidenden Einfluss auf die Therapie und Prognose des Mammakarzinoms haben, ist schon länger bekannt. TNBCs (triple negative breast cancer) sind dadurch gekennzeichnet, dass sie weder Östrogen-, noch Progesteronrezeptoren, noch den human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) an der Zelloberfläche tragen, welche für bedeutende Therapiemaßnahmen verwendet werden. So haben TNBCs ein kürzeres metastasenfreies Intervall und eine schlechtere Prognose als rezeptorpositive Karzinome (Aghili, *et al.*, 2013).

Die vorliegende Dissertationsarbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss eine Defizienz des Proteoglycans Syndecan-1 und eine Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen auf die Zellmotilität und die Zellviabilität von Brustkrebszellen mit verschiedenem Rezeptorstatus hat.

Zunächst werde ich kurz einen Überblick über den Aufbau und die Funktion der weiblichen Brust vermitteln, um dann etwas genauer auf das Krankheitsbild des Mammakarzinoms einzugehen bevor im Material- und Methodenteil die im Rahmen

dieser Dissertationsarbeit verwendeten Vorgehensweisen und Verfahren erläutert werden.

1.1 Aufbau und Funktion der weiblichen Brust (Schünke *et al.*, 2011)

Während der embryonalen Entwicklung bilden sich entlang einer Linie zwischen Axilla (Achsel) und Leistenbeuge die Anlagen der Brustdrüsen aus. Entlang dieser Milchleiste kann es zur Ausbildung akzessorischer Brustwarzen kommen. Normalerweise bilden sich aber nur die Anlagen im Bereich des Thorax vollständig aus.

Bei den Mädchen kommt es nach der Menarche (erste Regelblutung) unter dem Einfluss von Sexualhormonen zum verstärkten Wachstum des Stromas und des Drüsengewebes.

Die Mamma ist in etwa kegelförmig mit einer stärkeren Rundung in der unteren Hälfte. Sie ist aufgebaut aus, mit Fettgewebe ausgefülltem, bindegewebigem Stroma und Drüsengewebe, dessen Ausführungsgänge in der Papilla mammaria (Brustwarze) enden. Die Papilla mammaria oder auch Mammille ist von der stark pigmentierten Areola mammae (Warzenhof) umgeben, in deren Bereich die Glandulae aerolares (Schweiß- und Talgdrüsen) münden.

Nach dorsal liegt die Mamma den Musculi pectoralis major (großer Brustmuskel), serratus anterior (vorderer Sägemuskel) und obliquus externus abdominis (schräger äußerer Bauchmuskel) auf, von denen sie nur durch die Fascia pectoralis (Brustfaszie) getrennt ist. Mit den angrenzenden Faszien ist sie durch lockeres Bindegewebe verwachsen.

Die Brustdrüse jeder Mamma setzt sich aus etwa zehn bis zwanzig einzelnen Lappen, den Lobi glandulae mammariae zusammen, die gemeinsam über den Ductus lactifer colligens (Milchgang) und den Sinus lactifer (Milchsack) auf der Mammille münden.

Die einzelnen Lobi glandulae mammariae sind wiederum in Lobuli glandulae mammariae unterteilt (Brustdrüsenläppchen), die zusammen mit dem Terminalduktus die TDLE (Terminalduktus-Lobulus-Einheit) bilden, die Funktionseinheit der laktierenden Brust. Im Bindegewebe zwischen den einzelnen Lobuli liegen

Stammzellen, die sich während des Umbaus von der nicht-laktierenden zur laktierenden Brust teilen, und so den Um- und Ausbau des Gangsystems und der Endstücke ermöglichen. Der Großteil der malignen Mammakarzinome geht auf diese Zellen zurück (Lüllmann-Rauch, 2006).

1.2 Brustkrebs

1.2.1 Prävalenz und Ätiologie

Das Mammakarzinom ist die in den Industrienationen häufigste Krebserkrankung der Frau. Pro 100.000 Einwohnerinnen erkrankten in Deutschland im Jahr 2010 168,9 Frauen an Brustkrebs und 41,9 Frauen pro 100.000 Einwohnerinnen starben im gleichen Jahr an Brustkrebs (Internetverweis 1). Brustkrebs kann an der gesamten Brust auftreten. Teilt man die Brust aber in Quadranten und die Mamille ein, ergibt sich für das Vorkommen eine ungleiche Verteilung auf die verschiedenen Bereiche der Brust (Abbildung 1).

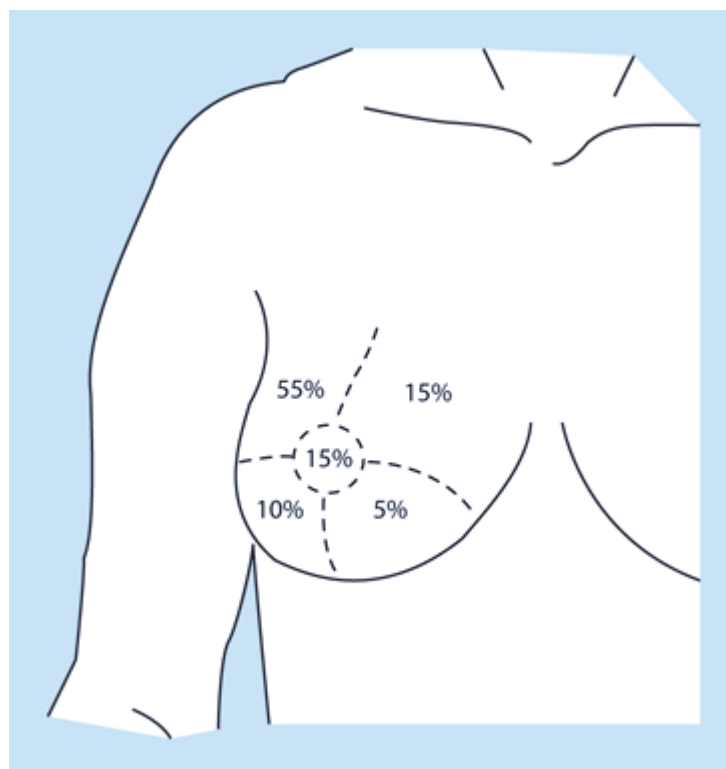


Abbildung 1: Lokalisationsverteilung von Brustkrebs (Internetverweis 2)

Die meisten Fälle von Brustkrebs treten sporadisch auf, schätzungsweise nur etwa 5-10% sind genetisch bedingt, größtenteils durch die Genmutationen BRCA-1 und BRCA-2. Als wichtigste Risikofaktoren für Brustkrebs gelten neben der erblichen Vorbelastung Nikotinabusus, fettreiche Ernährung und Übergewicht, ein hormonelles Ungleichgewicht oder eine HRT (hormone replacement therapy) und die Tatsache ob und wann Frauen Kinder bekommen haben (Howell *et al.*, 2014). Die verschiedenen Risikofaktoren haben alle einen Einfluss auf die mammographische Dichte. Eine hohe mammographische Dichte, was einem geringen Fett- und einem größeren Drüsen- und Bindegewebsanteil in der Brust entspricht, geht mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken einher (Internetverweis 3).

Beim Vorliegen einer BRCA1-Mutation wird die Wahrscheinlichkeit einer Frau bis zum Alter von 70 Jahren an Brustkrebs zu erkranken mit 65% angegeben, bei Vorliegen der BRCA2-Mutation mit etwa 45% (Antoniou *et al.*, 2003).

Wie bei allen Arten von Krebs führen Mutationen zum Verlust von wachstumshemmenden Funktionen. Bei Brustkrebs unterscheiden sich Brustkrebszellen, wie bei allen Krebsarten, von gesunden Brustdrüsenzellen durch ein paar wesentliche Kennzeichen, die Hanahan und Weinberg 2000 in einem Modell zusammen gefasst haben:

- Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
- Unempfindlichkeit gegenüber Signalen, die das Wachstum hemmen oder Apoptose induzieren
- Unbegrenztes Wachstums- und Teilungspotential
- Mangelnde Fähigkeit zu Apoptose
- Eigene Versorgung mit Blut durch Angiogenese
- Invasion und Metastasierung (Hanahan et Weinberg, 2000)

Im Jahr 2011 wurde diese noch einmal um zwei weitere Aspekte erweitert:

- Fähigkeit den Zellmetabolismus zu modifizieren oder zu reprogrammieren um eine möglichst effektive neoplastische Proliferation zu ermöglichen
- Mechanismen um der immunologischen Zerstörung, vor allem durch T- und B-Lymphozyten, Macrophagen und natürlichen Killerzellen, zu entkommen

Zusätzlich zu den Kennzeichen nennen sie noch zwei weitere Charakteristika von Tumorzellen: genetische Instabilität und Mutabilität und Tumor-fördernde Entzündung (Hanahan et Weinberg, 2011).

1.2.2 Diagnose und Therapie

Diagnose

Zur Basisdiagnostik des Mammakarzinoms gehören die Inspektion und die Palpation von Brust und Lymphabflussgebieten, sowie die Mammographie und der Ultraschall (Internetverweis 4). Bei dem eindeutigen Verdacht bei Frauen unter 40 ist der Ultraschall das bildgebende Verfahren der ersten Wahl (Nothacker *et al.*, 2009). Bei einer auffälligen Basisdiagnostik sollten weitere bildgebende und histologische Untersuchungen erfolgen.

Als bildgebende Verfahren stehen Mammographie, Sonographie und Kontrastmittel-MRT zur Verfügung (Internetverweis 4). Die Mammographie, welche auch bei dem deutschen Vorsorgeuntersuchungsprogramm genutzt wird (Internetverweis 5) sollte bei Frauen ab dem 40 Lebensjahr eingesetzt werden (NICE, 2009), bei einem unklaren Befund, sollte diese um die Sonographie erweitert werden (Nothacker *et al.*, 2009; NICE, 2009). Das Kontrastmittel-MRT sollte nicht routinemäßig, sondern nur dann erfolgen, wenn eine MRT-gestützte Intervention möglich ist (NICE 2009).

Zur diagnostischen Sicherung sollte eine bildgebungsgestützte Stanz- oder Vakuum- oder eine offene Biopsie durchgeführt werden (Albert *et al.*, 2008).

Besteht der Verdacht auf eine Metastasierung oder ist das Karzinom schon in einem fortgeschrittenen Stadium, so ist der prätherapeutische Goldstandard ein Staging

bestehend aus einer Röntgen-Thorax-Untersuchung, einer Leber-sonographie und einer Skelettszintigraphie (Alderson *et al.*, 1983, NICE 2009).

Therapie

Die Grundlage einer jeden Behandlung eines Mammakarzinoms bildet die operative Therapie mit dem Ziel einer R0-Resektion (Minimaler Sicherheitsabstand 1mm; Houssami *et al.*, 2010), die als brusterhaltende Operation oder als Mastektomie durchgeführt werden kann.

Zur operativen Therapie eines invasiven Mammakarzinoms gehört auch eine Sentinellymphknoten-Entfernung zur Bestimmung des histologischen Nodalstatus (Kuehn *et al.*, 2005). Bei nachgewiesenen Metastasen in dem Sentinel, ist anschließend eine komplette Axillendissektion indiziert (NZGG, 2009).

Je nach Stadium und histologischem Ergebnis gibt es verschiedene Konzepte adjuvanter oder neoadjuvanter Strahlentherapie, systemischer Chemotherapie, endokrinen Therapieformen oder die Möglichkeit des Einsatzes von Trastuzumab (Internetverweis 4). Bei Inoperabilität und weit fortgeschrittenem Karzinom ist eine systemische Chemotherapie der Goldstandard, die bei weiterhin bestehender Inoperabilität um eine Strahlentherapie erweitert werden kann. Ist der Tumor operabel, ist eine postoperative Strahlentherapie indiziert. Ob die Reihenfolge von Strahlen- und Chemotherapie einen Einfluss auf das klinische Outcome hat, ist bisher nicht geklärt (Kaufmann *et al.*, 2010). Additiv zur Strahlentherapie kann bei HER2/neu-Rezeptorpositiven Mammakarzinomen eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab durchgeführt werden (Viani *et al.*, 2007). Parallel oder anschließend zur Radiotherapie ist bei Hormonrezeptor-positiven Karzinomen auch eine endokrine Therapie mit GnRH-Analoga (gonadotropin releasing hormone), selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM), Aromatasehemmern oder Gestagenen möglich (Schiavon et Smith, 2014). Bei Östrogenrezeptorpositivität kann so zum Beispiel Tamoxifen, ein SERM, eingesetzt werden (Jordan, 2014).

1.3 Syndecan-1

Das Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-1 (NCBI-Datenbank, Gen ID: 6382) aus der Syndecan-Proteoglykan-Familie, welches auf dem SDC1-Gen kodiert ist, erfüllt als transmembranes Protein wichtige Funktionen der Zell-Zell-Verbindungen, des Signalaustausches zwischen Extrazellulärraum und Zellinnerem und der Organisation des Zytoskeletts, wodurch es für Forschung an jeder Art von proliferativen oder neoplastischen Krankheitsgeschehen interessant wird (Mali *et al.*, 1990). Von den vier Mitgliedern der Syndecan-Familie wird Syndecan-1 im adulten Organismus vorrangig auf Epithelzellen und Keratinozyten exprimiert, wenig exprimiert findet es sich auch auf Endothel- und Nervenzellen (Bernfield *et al.* 1999).

Syndecan-1 hat außerdem eine besondere Bedeutung für Weiterleitung von Signalen verschiedener Wachstumsfaktoren ins Zellinnere. So ist Syndecan-1 zum Beispiel für eine Signalweiterleitung des VEGF (vascular endothelial growth factor) nötig (Rapraeger *et al.*, 2013) und seine Heparansulfat-Ketten spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung von Zytokinen (Ramani *et al.*, 2013).

In der hiesigen Arbeitsgruppe wurde vor allem zur Bedeutung von Syndecan-1 in der Pathogenese und im Krankheitsverlauf von Endometriose und Brustkrebs geforscht. In verschiedenen Arbeiten wurde so zum Beispiel nach Syndecan-1-Depletion in MDA-MB-231 eine erhöhte Integrin-abhängige Zelladhäsion und -motilität, eine Reduktion des konstitutiven NF- κ B-Signals (nuclear factor kappaB), eine durch FAK-Hyperaktivität (focal adhesion kinase) reduzierte Radiosensitivität (Hassan *et al.*, 2012) sowie eine erhöhte Invasivität festgestellt (Ibrahim *et al.*, 2012).

Gleichzeitig deuten aktuelle Studien auf eine Korrelation zwischen hohe Syndecan-1-Leveln mit schlechter Prognose und einem aggressiven Phänotyp hin (Lendorf *et al.*, 2011).

1.4 Fragestellung

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es die bisherigen Kenntnisse über die Rolle von Syndecan-1 in der Pathogenese und im Krankheitsverlauf von Brustkrebs zu erweitern und bisherige Ergebnisse der Arbeit des hiesigen Arbeitskreises zu bestätigen.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Aspekt der Zellmotilität von tripelnegativen Mammakarzinomzellen und wie diese durch Syndecan-1 und Bestrahlung mit einem Linearbeschleuniger modifiziert wird.

In Bezug auf die durch Syndecan-1-Depletion erhöhte Zellmotilität interessierte es, welche weiteren Zielgene, die im Motilitätsverhalten eine Rolle spielen, in ihrem Expressionsmuster verändert werden. Außerdem sollte der Verdacht untersucht werden, dass Bestrahlung im Bereich niedriger Strahlendosen möglicherweise motilitätsfördernd wirkt und ob sich das auch auf Protein- bzw. mRNA-Ebene oder ganz bildlich in einer videomikroskopischen Aufzeichnung darstellen lässt.

Als Nebenfragen sollte neben der Zellmotilität auch die Zellviabilität untersucht werden. Hier vor allem im Vergleich zwischen Hormonrezeptor-positiven und tripelnegativen Mammakarzinom-Zelllinien.

Zusammenfassend galt es das Zellverhalten von Brustkrebszellen und die Rolle von Syndecan-1 und Bestrahlung in der Zellmotilität zu untersuchen, mit dem Ziel eines besseren Verständnisses des Krankheitsbildes und dem Eruiieren möglicher Zielstrukturen für neue Therapieansätze.

2 Material und Methoden

Die Intention dieser Dissertationsarbeit ist es den Einfluss des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1 und von ionisierender Gammastrahlung auf die Zellviabilität und die Zellmotilität der tripelnegativen MDA-MB-231- und MDA-MB-468- und der Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven MCF-7-Brustkrebszelllinien zu untersuchen.

Die Brustkrebszellen wurden hierfür kultiviert, transfiziert, bestrahlt und für Genexpressionsanalysen zu RNA- oder Proteinlysaten weiterverarbeitet. Um Zellviabilität und -motilität zu untersuchen wurden sie hingegen in Proliferationsassays weiterverwendet oder ihr Verhalten wurde unter einem Videomikroskop aufgezeichnet und analysiert.

Die verwendeten Materialien und Methoden sind im Folgenden genau beschrieben.

2.1 Brustkrebszelllinien

Das vorwiegende Interesse lag in dieser Dissertation auf der Untersuchung der invasiveren TNBC-Zellen. Repräsentiert wurden diese in den Versuchen durch MDA-MB-231 und MDA-MB-468. Zum Vergleich wurden aber auch Tests mit der hormonrezeptorpositiven Zelllinie MCF-7 durchgeführt. Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um humane Brustkrebszellen, die aus erkrankten Patientinnen entnommen und immortalisiert wurden, wodurch sie sich unbegrenzt teilen können und ideal geeignet sind um in-vitro-Versuche zum Verhalten von Brustkrebszellen durchzuführen.

2.1.1 MDA-MB-231

Bei der verwendeten Zelllinie MDA-MB-231 [CLS] handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die aus dem Pleuraexsudat einer 51-jährigen Kaukasierin isoliert wurde (Cailleau *et al.*, 1974).

Da sie weder ER- (Östrogen-), noch PR- (Progesteron-), noch Her2/neu-Rezeptoren (human epidermal growth factor receptor 2) auf ihrer Zellmembran aufweist, gehört sie zu der Gruppe der TNBC-Zelllinien, welche unter den Mammakarzinomen die schlechtesten Prognosen haben (Fisher *et al.*, 1990; Lacroix *et al.*, 2004; Tischkowitz *et al.*, 2007).

2.1.2 MDA-MB-468

So wie MDA-MB-231 gehört auch MDA-MB-468 zu den TNBC-Zelllinien. Sie gilt aber als weniger maligne, weniger invasiv und ist etwas weniger entdifferenziert als MDA-MB-231 (Zhang *et al.*, 1991). Isoliert wurde MDA-MB-468 aus einem Pleuraerguß einer 51-jährigen schwarzen Patientin mit Adenokarzinom in der Brust (Cailleau *et al.*, 1978).

2.1.3 MCF-7

Im Gegensatz zu den beiden vorher beschriebenen Brustkrebszelllinien sind die verwendeten MCF-7-Zellen östrogen- und progesteronrezeptorpositiv (Engel and Young 1978). Isoliert wurden diese bei einer Pleurapunktion einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit Mammakarzinom (Soule *et al.*, 1973). Das Vorhandensein von Hormonrezeptoren geht mit einer im Vergleich zu den TNBC-Zellen niedrigeren Invasivität einher (Brooks *et al.*, 1973).

2.2 Kultivierung der Brustkrebszellen

Die untersuchten Zellen wurden in Tissue-Culture-Flaschen [Sarstedt] ausgesät und zur Untersuchung in Tissue-Culture-6-Well-Platten [Sarstedt] herangezüchtet. Um ideale Wachstumsbedingungen für die verschiedenen Zellen herzustellen, wurden unterschiedliche Inkubatoren mit unterschiedlichen Einstellungen verwendet:

- MDA-MB-231 und MDA-MB-468 wurden im HERAcell 150i CO₂ Incubator [Thermo Scientific] bei 37°C, 7,5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchtigkeit und
- MCF-7 wurden im SANYO CO₂ Incubator bei 37°C, 3,3% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert

Die Arbeiten an den noch lebenden Zellen wurden alle unter sterilen Bedingungen durchgeführt. So wurden die Zellkulturgefäße nur unter der Sterilwerkbank (HERAsafe [Heraeus]) geöffnet. Um die Kulturgefäße auf mögliche Kontaminationen zu untersuchen und um einen Eindruck von der Zelldichte in dem Gefäß zu bekommen wurden diese vor jedem wichtigen Arbeitsschritt unter einem Phasenkontrastmikroskop [Axiovert 100, Zeiss] untersucht. Nach Heranzüchten der Zellen in einer Zellflasche, wurde das Nährmedium von den Zellen abgenommen, die Zellen wurden zweimal mit PBS (phosphate buffered saline) [Gibco] gewaschen und mit einer zweiminütigen Einwirkungszeit abtrypsiniert [Sigma]. Zur Inaktivierung wurden ca. 5ml PBS mit 10% FKS (fetales Kälberserum) [PAA] in ein CentriStar™ Falcontube [CORNING] gefüllt, in das die abtrypsinierten Zellen gegeben wurden. Nach einer fünfminütigen

Abzentrifugation (Multifuge 3 S-R [Heraeus]) bei 1.500rpm wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Zellpellet in ca. 5ml frischem Medium aufgenommen.

Sollten die Zellen nur passagiert werden, damit die Zellen in den Kulturflaschen nicht zu dicht wachsen, wurden von den 5ml etwa 1,5ml wieder in die Flasche gegeben und diese noch bis auf etwa 10ml mit Medium aufgefüllt.

Wollte man aber eine sehr bestimmte Zellzahl für einen Versuch aussäen, wurde die Zellkonzentration in der Lösung mithilfe einer Neubauerplatte [Marienfeld] bestimmt. Um zu erreichen, dass pro Well etwa 3×10^5 bis 4×10^5 Zellen ausgesät werden, wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 40 μ l Trypanblau [Sigma] vermischt und ein Tropfen davon auf eine Neubauerplatte gegeben. Unter einem Mikroskop [Zeiss] wurde die Platte ausgezählt und aus dem Ergebnis die Lösungsmenge bestimmt, die die gewünschte Anzahl Zellen enthält. Diese Menge wurde in die jeweiligen 6er-Wells überführt, die dann bis zu einem Milliliter mit dem idealen Nährmedium aufgefüllt wurden:

- MDA-MB-231: DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x, 4,5g/L Glucose, [+] L-Glutamin, [-] Pyruvate) [Gibco® by life technologies™] + 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin [PAA]
- MDA-MB-468: DMEM-AQmedia [Sigma-Aldrich® by Life Science] + 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin
- MCF-7: RPMI-1640 [Gibco®] + 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin

2.3 siRNA-Transfektion

Die Transfektion mit siRNA fand jeweils 24h nach dem Aussäen von 4×10^5 Zellen in zwei Millilitern Medium auf einer 6-Well-Zellkulturflasche statt.

Zuerst wurden jeweils zwei Mastermixe in gleichen Mengen hergestellt. Je einer mit ctrl- [Applied Biosystems] und einer mit Syndecan-1-siRNA [Applied Biosystems]. Pro transfiziertem Well wurden 160 μ l Mastermix eingesetzt. Dieser setzte sich aus zwei Anteilen aus je 80 μ l zusammen, die zuerst separat inkubiert wurden. Einer setzte sich

immer aus 78µl OptiMEM [Gibco®] und 2µ DharmaFECT® [Thermo Scientific™] zusammen, wohingegen der zweite aus 78µl OptiMEM und 2µl der ctrl- oder der Syndecan-1-siRNA bestand. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die beiden Anteile zusammengeführt und inkubierten weitere 20 Minuten. Während der Inkubationszeit wurde das Nährmedium von den Zellen genommen. Darauf wurden sie einmal mit PBS gewaschen und es wurden 840µl OptiMEM pro Well vorgelegt.

Nach ausreichender Inkubation wurden die 160µl, bestehend aus DharmaFECT, siRNA und OptiMEM vorsichtig tropfenweise auf die vorbereiteten Zellen gegeben.

Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit dem Transfektionsmedium wurde dieses nach einmaligem Waschen mit PBS durch 2ml DMEM bzw. RPMI mit 10% FKS ausgetauscht.

Zur Herstellung von RNA- oder Proteinlysaten wurden die Zellen nach dem Mediumwechsel noch einen Tag inkubiert. Zur Fixierung der Zellen mit BrdU (Bromdesoxyuridin) hat sich eine Inkubationszeit von weiteren 48 Stunden nach Mediumwechsel als am geeignetsten herausgestellt.

2.4 Kontrolle der Transfektion/Durchflusszytometrie/BrdU

Um zu kontrollieren, ob die Transfektion mit siRNA funktioniert und wie sie sich im Zeitverlauf auf die Expression von Syndecan-1 auswirkt, wurde 48 und 72 Stunden nach der Transfektion MDA-MB-231-Zellen eine Durchflusszytometrie mit dem CyFlow® Space [Partec] durchgeführt und die Menge an Syndecan-1 in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen bestimmt.

In der durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper oder Farbstoff inkubiert, der an bestimmte Zellstrukturen bindet. In einem FACS-Gerät (fluorescence activated cell sorting) fließen die markierten Zellen durch eine Kapillare, in der sie einen Laserstrahl passieren. Darauf emittieren sie aufgrund ihrer Markierung Licht einer bestimmten Wellenlänge. Das emittierte Licht wird auf verschiedene Detektoren im FACS geleitet und von ihnen

vermessen. Aufgrund dieser Messung werden die Zellen sortiert, quantifiziert und analysiert (Hulett H *et al.*, 1969).

Um den Effekt der Transfektion auch im Zeitverlauf zu untersuchen, wurde das BrdU-Labeling 48 und 72 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Nach 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium gegen DMEM mit 10% FKS ausgetauscht.

Vor Abnahme des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurde die BrdU-Stammlösung (0,023g BrdU (0,015M) [Serva], 0,02g d-Cytidine [Sigma-Aldrich®] und 5ml dH₂O (sterilfiltriert)) mit DMEM in einem Verhältnis von 1:400 verdünnt. Pro Well wurde je 1ml verdünnte BrdU-Lösung verwendet. Bei der Verwendung der BrdU-Lösung wurde stets auf einen ausreichenden Lichtschutz geachtet, da die Lösung lichtempfindlich ist.

Auf die gewaschenen Zellen wurde dann das mit BrdU-Stammlösung versehene DMEM gegeben und die Zellen wurden für eine Stunde unter Lichtausschluss inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden das Medium abgenommen und die Zellen wurden abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und in Falcontubes überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 150 x g wurden die Überstände verworfen und die Zellpellets in 700µl 70%igem Ethanol bei -18°C gelagert.

Zur Färbung der markierten Zellen wurden diese zuerst zehn Minuten bei 150 x g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5ml PBS aufgenommen und noch einmal 10min bei 150 x g abzentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet nun zur kombinierten Säuredenaturierung und Proteolyse in 2ml Pepsin-HCl (0,02g Pepsin [Serva]; 100ml 2N Hcl [Merck]) aufgenommen und 30min im Dunkeln schüttelnd inkubiert (Van Erp *et al.*, 1988).

Im Anschluss wurde die Suspension mit 5ml PBS verdünnt und wieder für 10min bei 1.500rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5ml PBS aufgenommen und wieder 10min bei 150 x g zentrifugiert und darauf sehr gut trocknen gelassen.

Das nun zurückbleibende Pellet wurde in 100µl PBS/BSA (0,1%ig) [Dulbecco] aufgenommen und 10µl des Antikörpers wurden hinzugegeben. Dann wurde die Probe wieder für 30min im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Zur Kontrolle wurde nach 48 und 72h jeweils eine Probe mit dem Antikörper Anti-human CD19PE [Diatec], der an den B-Zell-Corezeptor bindet, getestet. Für die Messung der Menge an Syndecan-1 sowohl nach 48, also auch nach 72 Stunden und jeweils bei einer Probe, die mit ctrl-siRNA und einer Probe, die mit Sdc-1-siRNA transfiziert wurde, wurde der Anti-human CD138PE [Immutec] verwendet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden der Suspension 5ml PBS hinzugefügt bevor diese wieder 10min bei 150 x g zentrifugiert wurde. Die als Pellet abgetrennten Zellen wurden nun in 1,5ml Propidiumjodidlösung (5mg Propidiumjodid [Serva]; 100ml Tris (0,1M, pH 7,5) [Sigma-Aldrich®]) aufgenommen, wieder 30min im Dunkeln geschüttelt, um dann durchflusszytometrisch zu bestimmen wie viel Syndecan-1 die Zellen exprimieren.

2.5 Bestrahlung

Da die Fragestellung war, ob Strahlentherapie von Brustkrebs sich auch auf mögliche Metastasierung auswirken kann, wurden die Zellen zur Vorbereitung auf die Experimente bzw. Messungen mit 2 Gray von einem TrueBeam Linearbeschleuniger [Varian] bestrahlt.

Die Bestrahlung fand immer 24 Stunden nach Transfektion und direkt im Anschluss an den Medienwechsel, bei dem das Transfektionsmedium abgenommen wurde, statt.

Wurden die Zellen danach für eine Videomikroskopie weiterverwendet, wurden sie vor der Bestrahlung schon in ein µ-Dish mit 35mm Durchmesser und Glasboden [ibidi®] umgesetzt.

2.6 Genexpressionsanalyse - Quantitative Real-Time-PCR

Die qRT-PCR (quantitative Real-Time-PCR) beruht auf dem Prinzip der normalen Polymerasekettenreaktion (Kleppe *et al.*, 1971). Durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Sonden, deren Signal während der Zyklen ausgewertet wird, ist es bei diesem Verfahren allerdings möglich in Echtzeit, noch während die PCR abläuft, zu erkennen, wann die registrierte Fluoreszenz einen Schwellenwert überschreitet. Da die emittierte Fluoreszenz direkt proportional zu den eingebauten Sonden und somit zu der Anzahl der DNA-Kopien ist, bietet die qRT-PCR die Möglichkeit gewonnene DNA zu quantifizieren.

2.6.1 RNA-Präparation

Zur RNA-Präparation wurde das innuPREP RNA Mini Kit [analytikjena] verwendet, mit dem RNA aus verschiedenen Ausgangsmaterialien extrahiert werden kann, in diesem Fall aus humanen immortalisierten Brustkrebszellen. Neben dem Lysepuffer und Waschlösungen enthält das Set auch die nötigen Receiver und Elution Tubes, sowie zwei verschiedene Spin-Filter mit speziellen Membranen zur DNA-Bindung und RNA-Reinigung.

Die Herstellung der RNA-Lysate erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion bzw. 24 Stunden nach dem Medienwechsel. Nach Abnehmen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden 400µl Lysepuffer in jedes Well gegeben und eine Inkubationszeit von zwei Minuten abgewartet bevor die Zellen mit einem Zellschaber [Sarstedt] abgekratzt und zur selektiven Entfernung von gDNA (genomic DNA) in den Spin-Filter D auf einem Receiver Tube übertragen wurden. Alternativ konnten die lysierten Zellen in ein 1,5ml Eppendorfgesäß überführt und bei -80°C gelagert werden.

Nachdem die Tubes zwei Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert wurden, konnte der Spin-Filter D verworfen werden, in dem die gDNA abgetrennt wurde. Dem Filtrat wurden etwa 400µl 70%iges Ethanol hinzugefügt, bevor dieses auf den Spin-Filter gesetzt wurde, der einen neuen Receiver Tube unter sich hatte. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Receiver Tube mit dem Filtrat verworfen, da im Spin Filter R

eine selektive RNA-Bindung stattgefunden hatte. Um die RNA aufzureinigen wurde der Spin Filter R nun auf einen neuen Receiver Tube gesetzt und nach Zugabe von 500µl der Waschlösung HS eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Wieder wurde der Receiver Tube verworfen und der Filter auf einen Neuen gesetzt. Jetzt wurden je 750µl der Waschlösung LS auf den Spin Filter pipettiert und erneut wurden die Gefäße eine Minute zentrifugiert.

Um nun den letzten Rest Ethanol zu entfernen wurden die Filter noch einmal auf einen neuen Receiver Tube platziert und weitere drei Minuten zentrifugiert.

Zum Schluss wurde die RNA, die immer noch im Spin Filter R gebunden war, aus diesem gelöst. Die Spin Filter wurden auf die Elution Tubes gesetzt und es wurden je 50µl RNase-freies Wasser auf die Membran im Spin Filter gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die RNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 6.000 x g aus der Membran gelöst. Der Spin Filter R konnte nun verworfen werden, da die RNA sich nun in dem Elution Tube befand.

2.6.2 Konzentrationsbestimmung:

Die RNA-Konzentration wurde mit einem eppendorf BioPhotometer 6131 bestimmt. Hierzu wurde ein Blank mit 60µl Nuklease-freiem Wasser eingesetzt. Anschließend wurden je 3µl der Proben und 57µl Nuklease-freies Wasser zur photometrischen Messung bei 260nm in die Küvetten [UVette®, Eppendorf] eingesetzt. Aus der Differenz der Extinktion zwischen dem Blank und den Proben und der genannten Verdünnung konnte das Photometer die RNA-Konzentration in den unverdünnten Proben berechnen.

Die Proben wurden nun entweder bei -80°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

2.6.3 Umschreiben der RNA in cDNA

Bevor die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurden die RNA-Konzentration in den Proben angeglichen. Hierzu rechnete man mithilfe der

photometrisch bestimmten Konzentration aus, welchem Volumen 1 µg RNA entspricht, pipettierte dieses in ein Eppendorfgesäß und füllte dieses mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl auf. Zum Umschreiben wurde das cDNA-Preparation-Kit [Applied Biosystems®] verwendet. In einem separaten Eppendorfgesäß wurde ein Mastermix aus 2 µl RT-Puffer, 0,8 µl dNTP-Mix 100mM, 2 µl Random Primern 10x, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase 50 Units/µl pro Well angemischt.

Nachdem dieser dann in die Wells zu den Proben gegeben wurde, wurden diese in den Thermocycler T personal [Biometra®] gestellt und ein Programm mit folgenden Thermozyklen angestellt:

- 10min bei 25°C
- 120min bei 37°C
- 5min bei 85°C
- bis zur Entnahme aus dem Thermocycler 4°C

Nach Abschluss der reversen Transkription wurden die fertigen cDNA-Proben bei -18°C gelagert oder direkt für eine Real-Time-PCR eingesetzt.

2.6.4 Durchführung und Ablauf der Real-Time-PCR

Anders als bei herkömmlichen Polymerasekettenreaktionen ermöglichen es Real-Time-PCRs, dass man schon während die unterschiedlichen Thermozyklen ablaufen, die bereits synthetisierten DNA-Kopien quantifizieren kann. Dies ist möglich aufgrund einer Fluoreszenzreaktion. Am 5'-Ende der TaqMan®-Sonden befindet sich ein Quencher und am 3'-Ende ein Reporter-Oligonukleotid. Das Reporter-Oligonukleotid fluoresziert normalerweise, wird aber durch den Quencher in seiner Nähe gehemmt, sodass zunächst keine Fluoreszenzemission stattfindet. Allerdings besitzt die Taq-Polymerase auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, sodass sie die Sonden am 5'-Ende der neu synthetisierten DNA-Kopien am Ende jedes Zyklus abspaltet. Der Quencher verliert so die Nähe zum Reporter-Oligonukleotid und somit auch seine hemmende Wirkung auf

diesen. Das Ergebnis ist die Emission von Licht einer speziellen Wellenlänge. Diese Emission ist außerdem proportional zur Anzahl der neu entstandenen DNA-Kopien.

Je nachdem welche Sonden für die zu untersuchenden DNA-Abschnitte zur Verfügung standen wurden unterschiedliche Protokolle für die qPCR verwendet.

2.6.5 Real-Time-PCR-Protokoll 1

Bei diesem Protokoll wurden für jede hergestellte cDNA-Probe Doppelwerte gemessen. Die verwendeten Sonden stammten aus dem TaqMan® Gene Expression Assay [Applied Biosystems®] (Internetverweis 5). Als Housekeeping-Gen fungierte 18S (hs99999901_s1). Verwendet wurden mit diesem Protokoll cDNA die aus MDA-MB-231-, MDA-MB-468- und MCF-7-Zellen hergestellt worden waren. Eingesetzt wurde die TaqMan-Sonde Rac-1 (hs019024321_s1).

Zu Beginn wurden je zwei Mastermixe hergestellt. Einer mit den Sonden des Housekeeping-Gens und einer mit der Rac-1-Sonde. Pro cDNA-Probe stellte sich der Mastermix wie folgt zusammen:

- 6,25µl TaqMan® 2xPCR Master Mix
- 3,125µl Nuklease-freies H₂O
- 0,625µl der Sonde

Von dem fertigen Mastermix wurden pro Probe 10µl in eine 96-Well-PCR-Reaktionsplatte [peqlab] vorgelegt. Im Anschluss wurden jeweils 2,5µl der cDNA-Proben hinzupipettiert. Anders als bei Protokoll 2 wurden die cDNA-Proben hier vorher nicht mit weiteren 80µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

Die befüllte Reaktionsplatte wurde mit einer Folie beklebt und kurz in der Multifuge 3 S-R [Heräus] zentrifugiert, damit sich Mastermix und cDNA vermischt am Boden der einzelnen Wells befanden. Die qPCR wurde in dem 7300 Real-Time PCR System [Applied Biosystems®] durchgeführt und mit der zugehörigen Software ausgewertet. Das Schema sah wie folgt aus:

- 2min bei 50°C
- 10min bei 95°C zur initialen Aktivierung
- 40 Zyklen bestehend aus:
 - 15s bei 95°C zum Melting
 - 1min bei 60°C zum Annealing und zur Elongation

2.6.6 Real-Time-PCR-Protokoll 2

Anders als bei Protokoll 1 wurden hier Dreifachwerte für jede einzelne Probe gemessen und als Housekeeping-Gen fungierte HPRT und nicht 18S. Außerdem wurden die 20µl cDNA vor der Verwendung mit weiteren 80µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

Untersucht wurden mit diesem Verfahren Tenascin-C und Malat-1.

Zur Herstellung der beiden Mastermixe wurden zunächst pro zu vermessender Probe 0,1µl Taq-Antikörper (1,1µg/µl) [Clontech, Deutschland] und 0,1µl Super-Taq (5 Units/µl) [HT-Biotechnology, Großbritannien] zusammen in ein Eppendorfgefäß pipettiert, abzentrifugiert und 25min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die weiteren Bestandteile der Mastermixe hinzugegeben. Diese setzten sich zusammen aus:

- 2,5µl 10xPCR-Puffer [HT Biotechnology, Großbritannien] und SYTO9 [Invitrogen, Deutschland] (3,2 µl SYTO9 / 1.000µl PCR-Puffer)
- 0,5µl MgCl₂ (25mM) [Merck]
- 0,5µl dNTPs (5mM UTP, 5mM TTP, 10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP) [BIORON, Deutschland]
- 0,5µl UDG (Uracil-DNA-Glycosylase) (1U/µl) [BIORON, Deutschland]
- 1,0µl Primer forwards (5pmol/µl) [Eurogentec] und 1,0µl Primer revers (5pmol/µl) [Eurogentec] für den DNA-Abschnitt von Interesse bzw. 3,0µl des hsHPRT-Assays [© QIAGEN]

- Nuklease-freiem H₂O, dass jede zu vermessende Probe (inkl. 2µl cDNA) auf ein Vol. von 25µl auffüllt.

Von den fertigen Mastermixen wurden 23µl in die vorbereiteten und beschrifteten Eppendorfgefäße gegeben bevor jeweils 2µl cDNA (10ng) hinzu pipettiert wurden. Nun waren die Proben fertig um in dem Rotor-*Gene* Q [© QIAGEN] platziert zu werden. In der zugehörigen Software „Rotor-*Gene* - Pure Detection“ (Software-Version 2.0.2) wurden die für die jeweiligen Primer idealen Thermozyklen eingestellt.

Für die Tenascin-C-Primer wurde folgendes Schema verwendet:

- 15min bei 37°C für den UDG-abhängigen Verdau möglicher kontaminierender DNA
- 5min bei 95°C für die Denaturierung der UDG
- 40 Zyklen zur Amplifizierung der DNA-Abschnitte:
 - 30sek bei 95°C zur Aufspaltung der DNA in ihre beiden Einzelstränge
 - 40sek bei 62°C zum Primer-Annealing
 - 30sek bei 72°C zur Synthese des neuen DNA-Abschnitts durch die Taq-Polymerase
- 90sec bei 50°C und anschließendes Schmelzen in 5sek-langen 0,5°C-Schritten von 50°C bis 99°C

Für die Malat-1-Primer wurde folgendes Schema verwendet:

- 15min bei 37°C für den UDG-abhängigen Verdau möglicher kontaminierender DNA
- 5min bei 95°C für die Denaturierung der UDG
- 40 Zyklen zur Amplifizierung der DNA-Abschnitte:
 - 30sek bei 95°C zur Aufspaltung der DNA in ihre beiden Einzelstränge
 - 40sek bei 55°C zum Primer-Annealing

- 30sek bei 72°C zur Synthese des neuen DNA-Abschnitts durch die Taq-Polymerase
- 90sec bei 50°C und anschließendes Schmelzen in 5sek-langen 0,5°C-Schritten von 50°C bis 99°C

Die Intensität der grünen Fluoreszenz von SYTO9 wurde von dem Gerät bei einer Wellenlänge von 510nm gemessen und auch grafisch dargestellt.

2.7 Genexpressionsanalyse: SDS-PAGE und Western Blot

Anders als die Polymerase-Kettenreaktion bietet die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) die Möglichkeit die Genexpression nicht auf Ebene der mRNA, sondern auf der der Proteine zu untersuchen. Der Vorteil davon ist, dass wirklich nur die Proteinmengen bestimmt werden, die die Zellen definitiv produziert haben. Misst man hingegen nur die Menge an produzierter mRNA, besteht noch die Möglichkeit, dass die Menge an mRNA nicht proportional zur Menge der später entstehenden Proteine ist.

Wie auch bei der qPCR wurden die Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät, transfiziert und bestrahlt. Einen Tag nach der Bestrahlung bzw. nach dem Medienwechsel wurde dann die Proteinlyse durchgeführt.

2.7.1 Proteinlysate

Zu Beginn wurden dem RIPA-Puffer (Radio-Immuno-Precipitation-Assay-Puffer) (25mM Tris Cl (pH 7,4) [Sigma], 137mM NaCl [Carl Roth], 1% Triton X-100 (V/V) [Sigma], 2mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) [AppliChem]) Inhibitoren hinzugefügt. Auf einen Milliliter RIPA-Puffer kamen 10µl Proteinase-Inhibitor [Sigma], 100µl NaF (Natriumfluorid) (10mM) [Sigma], 10µl Na₃VO₄ (Natriumorthovanadat) (1mM) [Sigma], 100µl β-Glycerolphosphat (10mM) [Sigma] und 10µl Phospho-Stopp [Roche]. Während des gesamten Vorgangs wurden die Proben permanent auf Eis gelassen.

Zur Vorbereitung der Zellen wurde das Nährmedium abgenommen und sie wurden zweimal sorgfältig mit PBS gewaschen um das FKS möglichst vollständig zu entfernen.

Nach Zugabe von 150-200µl RIPA-Puffer mit frisch zugesetzten Inhibitoren wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers in Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden 10min bei 13.000rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die verbleibenden Zellpellets wurden verworfen. Mit dem Überstand wurde der BCA-Test (Bicinchoninsäure-Test) zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben durchgeführt.

2.7.2 BCA-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den hergestellten Lysaten bediente man sich der BCA-Reaktion. Verwendet wurde hierfür das Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay.

Auf einer 96-Well-Platte wurden pro Lysat, wessen Proteinkonzentration bestimmt werden sollte, zweimal 22,5µl des RIPA-Puffers gegeben, den man für die Herstellung der Lysate verwendet hatte und 2,5µl des Lysats. Des weiteren wurden zweimal 25µl RIPA-Puffers als Blank in je ein Well gegeben.

In einem Falcontube wurde anschließend das BCA-Reagenz aus seinen beiden Anteilen zusammen gemischt. Auf 1ml Reagenz A kamen 20µl Reagenz B. In jedes der vorbereiteten Wells wurden zusätzlich zum RIPA-Puffer und den Proteinproben noch je 200µl des fertigen Reagenzes gegeben. Anschließend wurde die Platte mit Alufolie bedeckt und 30 Minuten in einen Inkubator mit 37,5°C, 3,3% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gelegt.

Da die Proteine in den Proben in der alkalischen Lösung Cu²⁺ zu Cu⁺ reduzieren und Bicinchoninsäure mit den entstandenen Cu⁺ einen violetten Komplex bildet, dessen Absorptionsmaximum bei 562nm liegt, kann durch die photometrische Bestimmung dieses Komplexes mit dem ELISA-Reader (VERSAmax microplate reader) [Molecular Devices] auf die Konzentration an Proteinen in den Proben geschlossen werden (Holtzhauer M, 2009).

Da pro Lysat zwei Wells verwendet wurden, wurde aus beiden gemessenen Werten der Mittelwert bestimmt. Das Gleiche wurde mit den gemessenen Werten der Blanks gemacht, sodass aus beiden Mittelwerten die Proteinkonzentration berechnet werden konnte.

2.7.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient dem Auftrennen der in den Proben enthaltenen Proteine nach deren molekularem Gewicht. Das Natriumdodecylsulfat bindet an die denaturierten Proteine und überdeckt deren Eigenladung mit seiner negativen Ladung. Die Menge des SDS, das an das Protein bindet, ist proportional zu dessen Größe und die negative Ladung des SDS führt dazu, dass dieses sich gegenseitig voneinander abstößt, wodurch das Protein in eine lineare Form gebracht wird. Die Länge der Molekülkette jedes Proteins ist nun proportional zu dessen Molekulargewicht, wodurch sich die Proteine in der Polyacrylamidmatrix, die hier wie ein Netz fungiert, das kleine Proteine schneller durchlässt als größere, bei einer angelegten Spannung nach ihrer Größe auftrennen. Ihre Laufgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht (Summers *et al.*, 1965).

Vor dem Gießen des SDS-Gels wurden die Glasplatten gereinigt und in das BioRad®-System [BioRad Laboratories] eingesetzt.

Zuerst wurden die Trenngele in einem Falcontube vorbereitet. Um Phospho-FAK (Phospho-Focal-Adhesion-Kinase) und FAK nachzuweisen wurde ein 7,5%iges Polyacrylamidtrenngel verwendet. Für zwei Gele wurde dieses aus 2,09ml 30%ige Acrylamidlösung, 3,3ml Trenngelpuffer (1,875 M TrisCl pH 8,9 [Roth], 0,25% SDS pH 8,9 [Sigma]), 2,92ml H₂O_{bidest}, 7,59µl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) [BioRad Laboratories] und 58µl 10%igem APS (Ammoniumpersulfat) [BioRad Laboratories] hergestellt. Das fertig gemischte Gel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und mit gesättigtem 1-Butanol [Merck] übergossen, damit es eine gerade Linie zum Sammelgel bildet. Nachdem man das Trenngel 35min polymerisieren lassen hat, wurde das Butanol abgegossen und der Raum zwischen den Glasplatten mit Wasser gewaschen und danach mit Filterpapier abgetrocknet.

Auf das Trenngel wurde im Folgenden das Sammelgel gegossen, welches für zwei Gele aus 2ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 660 μl Sammelgelpuffer (0,3M TrisCl pH 6,7 [Roth], 0,5% SDS pH 6,7 [Sigma]), 560 μl 30%iger Acrylamidlösung, 4 μl TEMED und 30 μl 10%igem APS gemischt wurde. Es wurde so viel Gel eingefüllt, bis es über die Glasplatten überlief. Dann wurde der Kamm des BioRad-Systems eingesetzt, der die Taschen für die Proteinlysate formen sollte. Auch die Sammelgele wurden 35min polymerisieren gelassen.

Während die Gele polymerisierten, wurden die Proteinproben vorbereitet. Ziel war es je 30 μg Protein in jede Tasche zu platzieren. Im vorangegangenen BCA-Test wurden bereits die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt, sodass man ausrechnen konnte, wie viel Lysat, 5x SDS-Additiv (10% (1M pH 6,8), 25% Glycerol, 50% 10%iges SDS, 0,5mg 0,1%iges Bromphenolblau [Merck], 15% dH_2O) und β -Mercaptoethanol [Merck] benötigt wird, um die gewünschte Proteinmenge zu erhalten. Das benötigte Volumen SDS-Additiv entsprach einem Fünftel der Lysatvolumens und vom β -Mercaptoethanol brauchte man wiederum ein Drittel des Volumens des SDS-Additivs. Das SDS denaturiert die Proteine und lagert sich diesen an, sodass es deren negative Eigenladung überdeckt und das β -Mercaptoethanol bricht die Disulfidbrücken auf. Die so in einzelnen Eppendorfgefäßen vorbereiteten Proteinproben wurden vor dem Einfüllen in die Taschen in dem Gel noch fünf Minuten bei 95°C in einem Block Heater [Stuart Scientific] denaturiert und kurz bei 13.000rpm zentrifugiert.

Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Gele in das Mini-PROTEAN® Tetra System [BioRad Laboratories] eingeklemmt, welches dann mit Laufpuffer (5fach Stocklösung: 0,5M Tris [Roth], 1,92M Glycin [Merck], 0,5% SDS [Sigma], pH 8,8) aufgefüllt wurde. Nun wurden die denaturierten Proteinproben und pro Gel mindestens einmal 3 μl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder Markers [Fermentas] in die Geltaschen eingefüllt. Der Marker enthielt verschiedene Proteine bestimmten Molekulargewichts und diente dazu, dass man die Banden, die man nach dem Blotten sehen konnte, in eine Größenordnung einsortieren konnte.

Bei 0,02A wurden die Proteinproben etwa 15min laufen gelassen, sodass sich die Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel aufreichten. Daraufhin wurde

die Stromstärke auf 0,05A erhöht und die Proben liefen weitere 60min durch das Gel, in dem sie sich elektrophoretisch nach ihrer Größe auftrennten.

2.7.4 Blotting

In der Zwischenzeit wurde das anschließende Blotting vorbereitet. Hierzu wurden acht Lagen eines Blotting Papiers (580x600mm) [ALBET LabSciences] für die Gele passend zugeschnitten und im Blottingpuffer (0,25M Tris, 1,92M Glycin, 20% Methanol, 70% H₂O_{bidest}, pH 8,4 [Merck]) vorinkubiert. Die Nitrocellulosemembran (Amersham™ Hybond™ ECL Membran) [GE Healthcare], auf die die Proteine übertragen werden sollen, wurde erst unmittelbar vor der Entnahme des Gels zugeschnitten und 2min in Wasser aktiviert und danach im Blottingpuffer inkubiert.

Um die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurden in der Semi-dry-cell vier der speziellen Filter, die Membran, die Gele und nochmal vier Filterpapiere in dieser Reihenfolge aufeinander geschichtet. Das Blotting dauerte bei 16V Spannung etwa 75min. In dieser Zeit wanderten die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung aus dem Gel in die Membran.

Nach dem Blotten wurde die Membran kurz mit Ponceau-S solution [Sigma] angefärbt um zu kontrollieren, ob die Proteine auf diese übertragen wurden. Hat das Blotten funktioniert, wurde die Membran auf einem Schütteltisch kurz mit Wasser vom Ponceau-S befreit, bevor diese 60min mit Magermilch (5g Skim Milk Powder [Fluka® Analytical] in 100ml 1fach TBST (10fach TBS-Stocklösung: 0,5M Tris, 150mM NaCl [Carl Roth], pH 7,6; 1:10 mit H₂O_{bidest} verdünnt mit 1ml Tween®20 [Sigma])) blockiert wird. Daran anschließend wird die Membran dreimal fünf Minuten mit TBST gewaschen, bevor der primäre Antikörper in einem Verdünnungspuffer auf die Membran gegeben wird. Zum Nachweis von P-FAK, FAK und Tubulin handelt es sich dabei um 10ml 1x TBST mit 0,5g BSA (Bovine Serum Albumin [Sigma]), wo 10µl P-FAK- [Cell Signaling Technology] bzw. FAK-Antikörper [Cell Signaling Technology] oder als Kontrolle 2,5µl α-Tubulin-Antikörper (Mouse-anti-human Tubulin) [Sigma] hinzugegeben werden. Die Membran wurde so über Nacht bei -4°C schüttelnd inkubiert. Die Kontrolle mit Tubulin wurde durchgeführt um die Menge an

Gesamtprotein quantifizieren zu können und so die einzelnen Western Blots miteinander vergleichbar zu machen.

Am folgenden Tag wurde der primäre Antikörper abgenommen und gegebenenfalls für eine erneute Verwendung bei -18°C aufbewahrt. Nach einem Waschvorgang (dreimal fünf Minuten mit TBST) wurde der sekundäre Antikörper hinzugefügt. Für P-FAK und FAK waren dies 2µg Gout-anti-rabbit [CALBIOCHEM®] in 10ml Magermilch und für α-Tubulin 1µg Gout-anti-mouse [CALBIOCHEM®] in 10ml Magermilch. Nach einstündiger Inkubation auf dem Kipptisch wurde der verdünnte Antikörper abgenommen und die Membran noch einmal gewaschen.

Die gewaschene Membran wurde in einer Plastiktüte in der Hyperkassette fixiert. Nun wurden zügig das ECL (Enhanced Chemoluminescence) Western Blot Substrate [Pierce®] im Verhältnis 1:1 aus seinen beiden Anteilen SuperSignal® Peroxid Solution und SuperSignal® Enhancer Solution gemischt. Für die Entwicklung von zwei Gelen wurden dafür jeweils 500µl genommen. Die Membran wurde eine Minute lang sorgfältig mit dieser Mischung gespült. Knapp neben die Membran wurde ein Signalgeber platziert. Anschließend wurde das Licht ausgeschaltet, nur eine Rotlampe blieb eingeschaltet. Im Dunkeln wurde ein Stück Röntgenfilm (CL-XPosure™ Film 18x24 cm) [Thermo Scientific] ausgeschnitten, welches auf die Plastiktüte, in der sich die Membran befand, gelegt wurde. Nun wurde die Hyperkassette [Amersham pharmacia biotech] geschlossen und die Filmentwicklung abgewartet. Abhängig vom Antikörper dauerte dies bei P-FAK und FAK ungefähr 15 min und bei Tubulin nur etwa 8min.

Anschließend wurde der Film aus der Hyperkassette genommen und für etwa 30 Sekunden in der Entwicklerlösung [AGFA] gehalten. Wenn im Rotlicht Banden auf dem Film zu erkennen waren, wurde dieser erst in Wasser, dann in 1%iger Essigsäure [Merck] und zum Schluss in der Fixierlösung [AGFA] geschwenkt. Waren noch keine Banden zu sehen, dann wurde der Film noch etwas länger in die Entwicklerlösung gelegt.

Nach der Fixierung konnte das Licht auch wieder angeschaltet werden und der Film mit einem Fön getrocknet werden. Um später nachvollziehen zu können, welche Bande

Proteine einem bestimmten Gewicht entspricht, sollte der Film unverzüglich mithilfe des auf der Membran sichtbarem vormarkiertem Marker und dem Signalgeber markiert werden.

Im Anschluss wurde die Membran gestrippt oder bei -20°C eingefroren.

Zum Strippen wurde die Membran zweimal fünf, und einmal 20 Minuten auf dem Kipptisch mit der Strippinglösung (0,1 M Glycin, 0,15 M NaCl, pH 2,5) und danach dreimal je fünf Minuten mit TBST gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit Magermilch auf dem Kipptisch und ein weiterer Waschvorgang mit TBST (dreimal fünf Minuten).

Nun konnte ein neuer primärer Antikörper auf die Membran gegeben werden. Das folgende Procedere verlief dann wie bei dem ersten primären Antikörper. Eine Membran konnte so etwa 3-4mal gestrippt und wiederverwendet werden.

Als erstes wurde immer auf P-FAK, als zweites auf FAK und beim dritten Mal auf Tubulin getestet.

2.8 Proliferationsassay (MTT-Test)

Um den Einfluss von Syndecan-1-Defizienz auf die Zellviabilität bzw. auf die Proliferation der untersuchten Brustkrebszellen zu untersuchen, wurden mehrere MTT-Proliferationsassays durchgeführt.

Die Grundlage des MTT-Tests bildet die Tatsache, dass sich die Stoffwechselaktivität von Zellen in etwa durch die Menge der Reduktionsäquivalenten NADPH und NADH bemessen lässt, die im Citratzyklus, im Pentosephosphatweg und in der Glykolyse gebildet werden. Um die entstandene Menge der Reduktionsäquivalenten zu quantifizieren, nutzt man eine Farbreaktion, die am Endoplasmatischen Retikulum von NADH und NADPH angetrieben wird. Hierbei wird 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), ein Tetrazoliumsalz, das in Wasser gelöst eine gelbe Farbe hervorruft, zu dem wasserunlöslichen, violett-blauen Formazan umgebaut. Die Farbreaktion von gelb zu violett-blau ist somit linear abhängig von der vorhandenen

Menge an Reduktionsäquivalenten und somit auch linear zur Aktivität der drei Energiebereitstellenden Stoffwechselwege (Liu *et al.*, 1997).

Zunächst wurden die Zellen wie bereits beschrieben in 6er-Wells mit 4×10^5 Zellen/ml ausgesät, pro Zelllinie und Versuchsansatz reichte dafür je ein Well zur Kontrolle und eines für den Syndecan-1-Knockdown. Die Zellen wurden am Tag nach der Aussaat transfiziert, einen weiteren Tag später wurde das Medium gewechselt und 48 Stunden später wurden sie trypsiniert, abzentrifugiert und das Zellpellet in Medium ohne Phenolrot (DMEM High glucose (4,5g/l) [PAA] bzw. RPMI 1640 [PAA]) aufgenommen, ausgezählt und mit dem gleichen Medium auf eine Konzentration von 10^5 Zellen pro Milliliter verdünnt.

In einer 96er-Wellplatte wurden dann eine Titrationsreihe angelegt. Pro Zelllinie und Behandlungsart (Kontrolle oder Syndecan-1-Defizienz) wurde mit 100µl der Zellsuspensionen begonnen, was einer Menge von 10^5 Zellen in jedem Well entspricht. In den jeweils drei darunter liegenden Wells wurde nur noch die Hälfte der Zellen ausgesät und auf 100µl Medium aufgefüllt. Diese Titrationsreihe wurde so fortgesetzt, dass im letzten Well nur noch etwa 156 Zellen in 100µl Medium ausgesät wurden.

Nach dem Aussäen der Zellen wurden diese für etwa 72 Stunden in den Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ gestellt, bevor in jedes Well 10µl MTT-Lösung (250mg MTT Pulver [Sigma] in 50ml PBS, steril filtriert) gegeben wurde. Abhängig von den Reduktionsäquivalenten NADPH und NADH reduzierten die Zellen hieraus den wasserunlöslichen Farbstoff Formazan. Nach weiteren vier Stunden im CO₂-Inkubator wurde die Reaktion mit 100µl Stopp-Lösung (10% SDS, 50% N,N-Dimethylformamid [Sigma] in destilliertem H₂O, pH 4,7) pro Well angehalten. Damit sich die ausgefallenen Formazankristalle in dem Stopp-Puffer auflösten, wurde die 96-Well-Platte 24h bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor die Proben photometrisch bei 595nm im ELISA-Reader vermessen wurden.

2.9 Motilitätsanalyse mit digitalholographischer Mikroskopie (DHM)

Um den Einfluss von Bestrahlung und Syndecan-1-Defizienz auf die Zellmotilität zu quantifizieren, wurden Untersuchungen an MDA-MB-231-Zellen mit digitalholographischer Mikroskopie (DHM) durchgeführt.

Für die DHM Untersuchungen wurden die Zellen an Tag 1 ausgesät und an Tag 2 transfiziert. Am Tag 3 wurden die Zellen nach Abnahme des Transfektionsmediums abtrypsiniert und gezählt und anschließend 20.000 Zellen in 800µl Medium in ein µ-Dish mit 35 mm Durchmesser und Glasboden [ibidi®] ausgesät. Ein Teil der so vorbereiteten Zellen wurde mit 2 Gray bestrahlt. Am darauf folgenden Tag wurde mit den DHM Untersuchungen im Vergleich zu nicht bestrahlten Proben (Kontrollen) begonnen.

Da während den Untersuchungen mit digitalholographischer Mikroskopie keine CO₂-Begasung möglich war, wurde DMEM ohne NaHCO₃ [Biochrom] mit 10% FKS und 25mM HEPES ((4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) (1 M) [Biochrom] als gepuffertes Nährmedium eingesetzt, um den pH-Wert über 48 Stunden konstant zu halten. Zusätzlich wurden die Kunststoffdeckel der µ-Dishes durch Glasdeckel [ibidi®] ersetzt.

Für die Untersuchungen wurde ein für die DHM modifiziertes inverses iMIC-Mikroskop [TILL Photonics GmbH, Deutschland] verwendet. Das Prinzip der DHM ist in Abbildung 2 dargestellt. Als Objektiv diente ein LD Acroplan 20x/0,4 Korr Mikroskopobjektiv [Zeiss]. Die kohärente Lichtquelle war ein frequenzverdoppelter Neodym Yttrium-Aluminium Granat-Laser (Compass 315M-100) [Coherent GmbH, Deutschland] mit einer Lichtwellenlänge von 532 nm.

Nach Einsetzen der Proben wurde mithilfe der Steuersoftware TILLvisION (TILL Photonics) die zu untersuchenden Zellen in Position gebracht und die Belichtung mit Laserlicht eingestellt. Während der anschließend gestarteten Messungen wurden die Zellen mit Laserlicht durchleuchtet und jeweils mit einem Charge Coupled Device (CCD) Sensor (DMK 41BF02) [ImagingSource, Deutschland] alle 5min ein digitales Hologramm zur späteren Auswertung mit dem Computer gespeichert (Kemper *et al.*, 2006a) erfolgte.

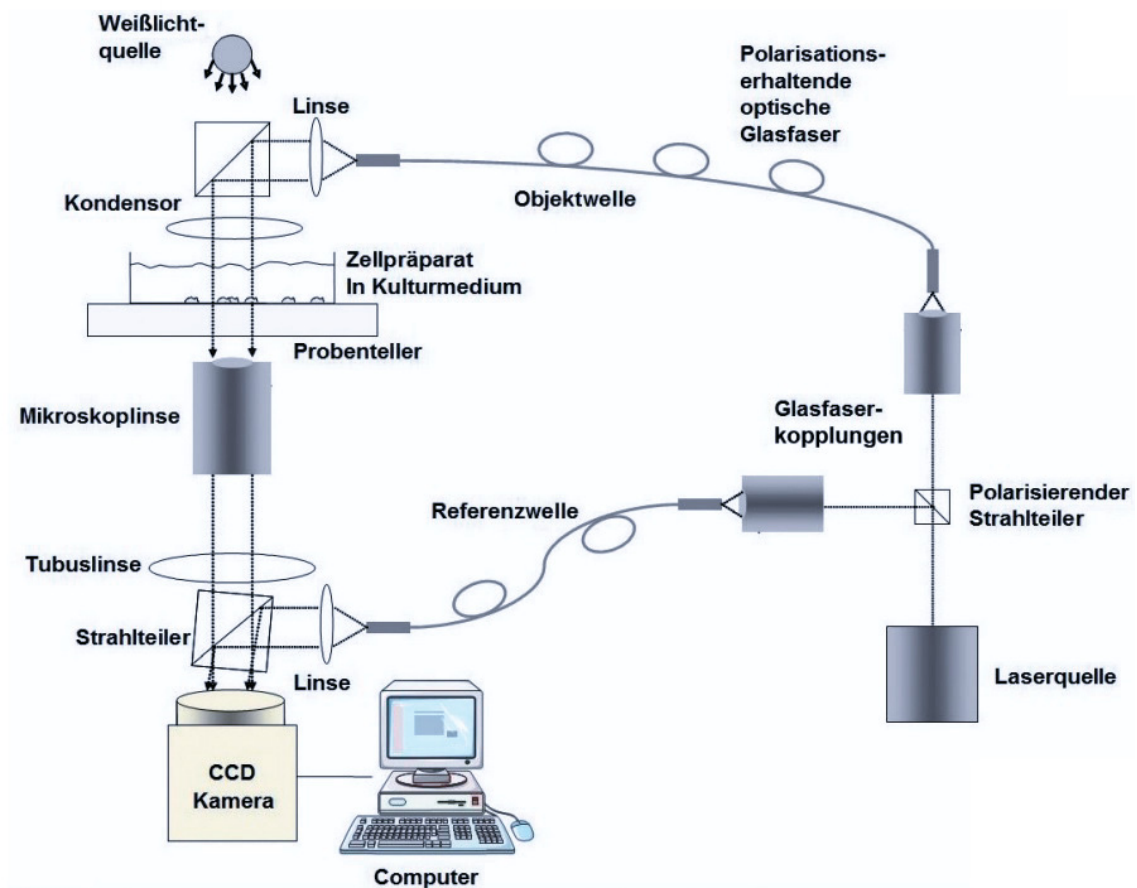


Abbildung 2: Durchlicht-Anordnung zur digitalholographischen Mikroskopie (Kemper et al, 2013)

Zur Untersuchung Einflusses des Knockdowns und der Bestrahlung, wurden je zwei DHM-Messreihen mit Bestrahlung und mit Knockdown, ohne Bestrahlung aber mit Knockdown, mit Bestrahlung aber ohne Knockdown und ohne Bestrahlung und ohne Knockdown durchgeführt.

2.10 Statistik und Analytik

Um die erhobenen Daten auf statistische Signifikanz zu überprüfen, wurde mit OpenOffice™ beta 4.1.0 [Apache] der t-Test durchgeführt. Aus gemessenen Werten von n unabhängigen Versuchen wurden sowohl Mittelwerte, als auch Standardabweichungen bestimmt.

Je nach Versuch und Art der Datenerhebung wurden die Daten unmittelbar ausgewertet oder es wurden noch ,wie in den folgenden Absätzen beschrieben, Berechnungen mit den erhobenen Daten durchgeführt.

Kontrolle der Transfektion/Durchflusszytometrie/BrdU

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen gezählt und die Intensität ihrer Fluoreszenz bestimmt. Die Sysmex Partec FloMax®: Flow Cytometry Analysis Software [Partec] stellt die so ermittelten Daten in einem Histogramm dar. Auf der horizontalen Achse wird die Fluoreszenzintensität und auf der vertikalen Achse die Anzahl der gezählten Zellen wiedergegeben.

Da die Zellen hier mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden, ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zu der Anzahl der Bindungsstellen/Antigene der Zelle; die Zelle leuchtet also umso stärker, je mehr Bindungsstellen sie hat.

Durch das Programm wird also gezeigt wie stark die markierten Zellen relativ zueinander leuchten. Zellen einer Population, die in etwa gleich stark markiert sind, also etwa gleich viele Bindungsstellen haben, werden in dem Histogramm in etwa in der Gauß'schen Normalverteilung abgebildet. Beim Auswerten muss man also Bereiche verschieden starker Fluoreszenz festlegen. Führt man nach einem Knockdown eine Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörper des auszuschaltenden Proteins durch, wäre zu erwarten, dass bei einem erfolgreichen Knockdown eine sehr niedrige Fluoreszenz und bei einem fehlgeschlagenen Knockdown eine hohe Fluoreszenz gemessen wird (Radbruch, 2000).

Real Time PCR

Da bei der Real-Time-PCR mit TagMan-Sonden ein Fluoreszenzsignal in dem Moment entsteht, wenn die Sonden in einen DNA-Strang eingebaut werden, ist die Fluoreszenz proportional abhängig von der Anzahl der verbauten Sonden. Um die Fluoreszenz quantifizierbar zu machen, wird der Ct-Wert (Cycle threshold) ermittelt. Dieser Wert

MTT-Proliferationsassay

Die Gewinnung von verwertbaren Daten erfolgte durch den ELISA-Reader, der bei einer Wellenlänge von 595nm die Absorptionswerte der Proben gemessen hatte. Um die Werte untereinander vergleichbar zu machen, wurde jeweils ein Blank-Wert mitgemessen und von dem Messwert der Probe abgezogen. Aus den verschiedenen Messwerten der Proben mit der jeweils gleichen Menge an Zellen wurde der Mittelwert errechnet und mit den korrespondierenden Mittelwerten der Kontrolle (=100%) ins Verhältnis gesetzt und grafisch dargestellt.

Digitalholographische Mikroskopie

Um die digitalen Hologramme auszuwerten, sind mehrere Schritte und Computerprogramme notwendig. Zuerst mussten aus den Hologrammen numerisch quantitative Phasenkontrastbilder rekonstruiert werden, damit in einem zweiten Schritt automatisiert die Migrationstrajektorien der Einzelzellen quantifiziert werden können.

Das zur numerischen Rekonstruktion verwendete Programm dcHolo wurde vom CeBOP (Centrum für Biomedizinische Optik und Photonik) entwickelt (Carl *et al.*, 2004; Kemper *et al.*, 2006b). Mit diesem Programm lassen sich die quantitative Phasenkontrastbilder berechnen, die Formveränderungen und Bewegungen der Zellen quantifizieren. Als Ergebnis erhält man ein Graustufenbild welche die durch die Zellen bewirkten optischen Weglängenänderungen quantifiziert.

Um nun die von den einzelnen Zellen zurückgelegten zu Strecken analysieren wurden die Migrationstrajektorien der Zellen, wie in Kemper *et al.*, 2010, beschreiben, automatisiert mit dem Programm trackhack bestimmt. Zum Vergleich wurden die so bestimmten Migrationstrajektorien der Zellen wurden auf den Ausgangspunkt (0,0) normiert und in ein Diagramm eingetragen. Des Weiteren wurden von jeder Zelle die Distanz vom Ursprungspunkt bis zum Endpunkt zu ermittelt und deren Mittelwerte berechnet um so das Migrationsverhalten der verschieden behandelte Zellpopulationen miteinander zu vergleichen. Zur Quantifizierung wurde der Motilität wurde schließlich das Mean Squared Displacement (Sridharan *et al.*, 2011) berechnet.

3 Ergebnisse

Die Intention dieser Dissertationsarbeit bestand darin, die Rolle von Syndecan-1 im Zellverhalten von Mammakarzinomzellen genauer zu eruieren und im hiesigen Arbeitskreis erstellte Hypothesen zum Einfluss von Syndecan-1 auf Zellmotilität und -viabilität zu überprüfen bzw. bisherige Kenntnisse zu erweitern. Parallel zum Interesse an der Funktion von Syndecan-1 wollte man auch untersuchen wie Mammakarzinomzellen auf niedrigerenergetische Bestrahlung reagieren und Hinweise darauf finden, dass diese einen Einfluss auf die Zellbeweglichkeit und die Zellstoffwechselaktivität hat.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorhin beschriebenen Untersuchungen und Versuche dargestellt.

3.1 Durchflusszytometrische Kontrolle des siRNA-Knockdowns

Um bei allen durchgeführten Tests Fehlerquellen bei der Transfektion möglichst auszuschließen wurde als einfache Kontrolle der Transfektion eine Durchflusszytometrie mit n=1 durchgeführt (Kapitel 2.3). Auf Abbildung 4 lässt sich grafisch bereits ablesen, dass bei den Proben mit einem Syndecan-1-siRNA-Knockdown eine viel niedrigere Fluoreszenz registriert wurde, als bei den Proben, an denen der Knockdown mit ctrl-siRNA durchgeführt wurde und die ermittelten MFIs (Mean-fluorescence-intensity) bestätigen das.

	MFI 48h nach Transfektion	MFI 72h nach Transfektion
CD19 an Proben mit ctrl-siRNA-Knockdown	0,6	0,75
CD138 an Proben mit ctrl-siRNA-Knockdown	19,61	16,51
CD138 an Proben mit Sdc-1-siRNA-Knockdown	3,22	3,64

Dass sowohl in der Messung nach 48 als auch nach 72 Stunden die MFI mit 0,6 und 0,75 so niedrig ist, zeigt, dass die Durchflusszytometrie an sich funktioniert hat, da auf den Brustkrebszellen kaum B-Zell-Corezeptoren zu erwarten waren.

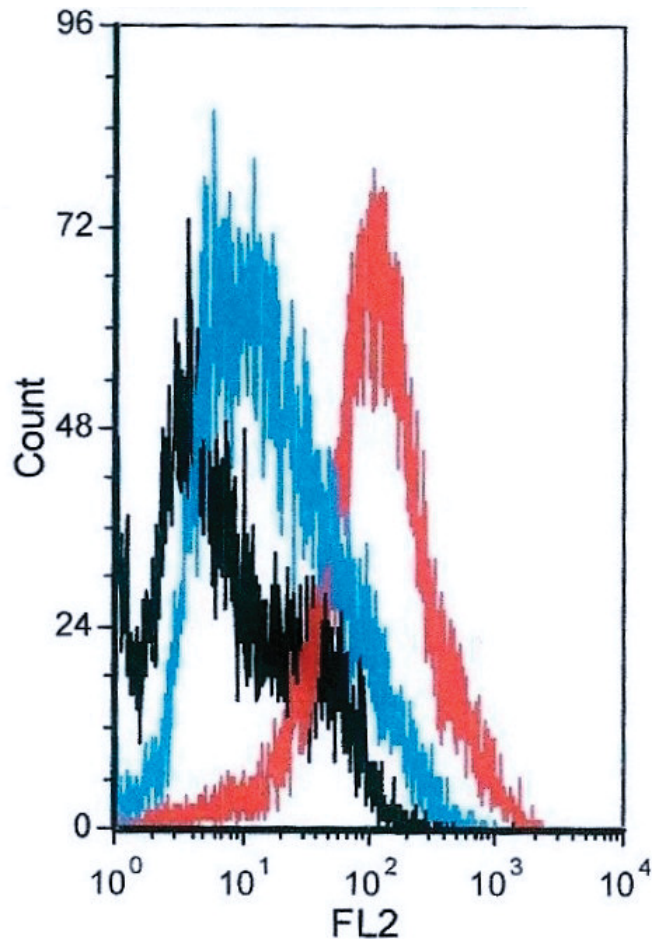


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Kontrolle des Syndecan-1-siRNA-Knockdowns an MDA-MB-231 48h nach Transfektion. Schwarz: Anti-human CD19PE [Diatec] nach ctrl-siRNA-Knockdown. Blau: Anti-human CD138PE [Immunotec] nach Sdc-1-siRNA-Transfektion. Rot: Anti-human-CD138PE nach ctrl-siRNA-Transfektion

Bei beiden Messungen wurde bei den Proben, die mit ctrl-siRNA behandelt wurden, eine sehr hohe MFI von 19,61 nach 48 bzw. 16,51 nach 72 Stunden ermittelt, was zeigt,

dass der Kontrollknockdown vermutlich keinen Einfluss auf die Syndecan-1-Expression hat. Wenn man sich im Vergleich dazu die MFIs von 3,22 nach 48 und 3,64 nach 74 Stunden bei den Proben, die mit Sdc-1-siRNA behandelt wurden anschaut, bestätigen diese Werte, dass auf den Proben kaum noch Syndecan-1 exprimiert sein kann, da das Verhältnis der MFIs der Proben nach Sdc-1-siRNA-Transfektion zu denen mit ctrl-siRNA-Transfektion nach 48h bei 1 : 6,09 bzw. nach 72 h bei 1 : 4,536 liegt.

Die Messdaten legen nahe, dass sowohl nach 48 als auch nach 72h Stunden nach der Transfektion eine Transfektion mit Sdc-1-siRNA einen sehr effektiven Knockdown bewirkt. Möchte man mit der vorhanden Messung den idealen Zeitpunkt nach Transfektion für weitere Tests ermitteln, so scheint es ideal, weitere Versuche 48h nach Transfektion durchzuführen, da hier das Verhältnis der MFIs von Proben mit und ohne Sdc-1-Knockdown am höchsten ist. Zudem lässt ein Anstieg der MFI von 3,22 auf 3,64 zwischen der achtundsiebzigsten und der zweiundsiebzigsten Stunde vermuten, dass in dieser Zeit die Expression von Syndecan-1 auf der Zelloberfläche schon wieder leicht zugenommen hat.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Syndecan-1-Expression auf der Zelloberfläche der verschiedenen Proben können so ausgelegt werden, dass die Transfektion mit siRNA eine geeignete Methode ist um die Syndecan-1-Expression auf den Zellen auf ein Minimum zu reduzieren.

3.2 Genexpressionsanalysen zur Überprüfung der Regulation von Zielgenen

Nach Transfektion und eventueller Bestrahlung mit einem Linearbeschleuniger, wurden mittels qRT-PCR bestimmte Zielgene untersucht, deren Expression möglicherweise durch die vorangegangene Behandlung hoch- oder herunter reguliert wurde. Als Grundlage für die Untersuchung bediente man sich den Ergebnissen eines Affymetrix-Screenings. Bei einem Affymetrix-Microarray handelt es sich um einen Mikrochip, auf dem eine große Anzahl von DNA-Einzelstrangabschnitten fixiert ist, die mit komplementärer mRNA hybridisieren können. Sie erlauben es in kürzester Zeit nachzuweisen, ob in einer Probe eine bestimmte mRNA enthalten ist und ob von ihr in einer Probe im Vergleich zu einer anderen mehr oder weniger vorhanden ist (Maskos et

Southern, 1992). Da diese Dissertationsarbeit sich auf die Auswirkungen von niedrigerenergetischer Bestrahlung und die Rolle von Syndecan-1 konzentrieren sollte, wurde nach mRNAs gesucht, die möglicherweise mit Motilität und Viabilität im Zusammenhang stehen und laut Affymetrix-Screening hoch- oder runterreguliert waren. Beim Auswerten des Affymetrix-Microarrays sind zwei mRNAs aufgefallen, die für eine genauere Untersuchung interessant sein könnten: TNC (Tenascin C) und MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1). Außerdem wurde aus den zur Verfügung stehenden TaqMan-Sonden *Rac1* als untersuchungswürdig angesehen, da auch dieses mit der Zellmotilität in Verbindung steht. *Rac1* wurde daher nach dem beschriebenen Real-Time-PCR Protokoll 1 (Kapitel 2.5.5) untersucht, wohingegen für TNC und MALAT1 keine TaqMan-Sonden verfügbar waren und diese gemäß dem Real-Time-PCR Protokoll 2 (Kapitel 2.5.6) untersucht wurden.

3.2.1 Darstellung der veränderten Genregulation nach Transfektion mit Sdc-1-siRNA und nach Bestrahlung mit 2 Gray

Rac1

Die Regulation von *Rac1* wurde an MDA-MB-231-, MDA-MB-468- und an MCF7-cDNA-Proben untersucht. Für die Proben der TNBC-Zellen wurde die qPCR dreimal mit einer Gesamtprobenanzahl von n=9 wiederholt, wobei bei jedem Versuch pro Probe ein Mittelwert aus zwei einzelnen Messungen zur Berechnung ermittelt wurde.

Bei der Auswertung der qPCR mit der *Rac1*-TaqMan-Sonde an MDA-MB-231-Zellen zeigte sich die Tendenz ab, dass eine Bestrahlung die Expression von *Rac1* hochreguliert (Abbildung 5). Nach dreifacher Wiederholung des Versuchs und einer Gesamtprobenzahl von n=9 konnte eine signifikante Hochregulation ($p < 0,05$) bei den Proben festgestellt werden, die entweder nur bestrahlt, oder aber bestrahlt und transfiziert wurden. Die Fold-Change-Werte legen die Tendenz nahe, dass auch Syndecan-1-Defizienz in Maßen die Expression von *Rac1* erhöht, da der Mittelwert der Fold-Change-Werte hier bei etwa 2,46 lag bei einer Standardabweichung von etwa 0,89. Um sicherere Aussagen treffen zu können, könnte man n noch einmal erhöhen. Dass die Fold-Change-Werte so stark variieren und teilweise größer als 12 sind, liegt vermutlich

daran, dass in allen Proben die Konzentration von mRNA sehr niedrig war, was zu einer erhöhten Messgenauigkeit führt.

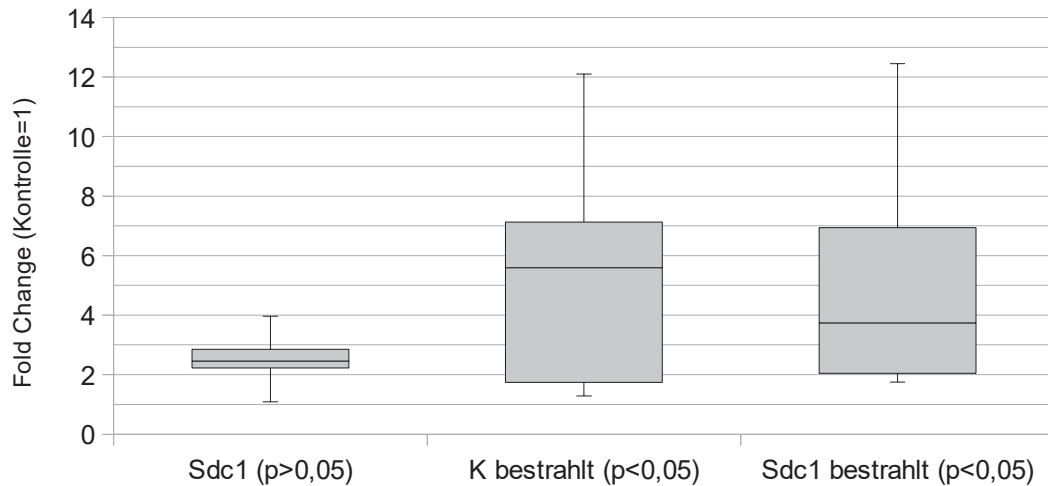


Abbildung 5: Absolute Expression von *Rac1*-mRNA in den MDA-MB-231-Zellen nach Transfektion mit *Sdc1*-siRNA und/oder Bestrahlung mit 2 Gray. Die y-Achse stellt die Fold-Change-Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (=1) dar; n=9

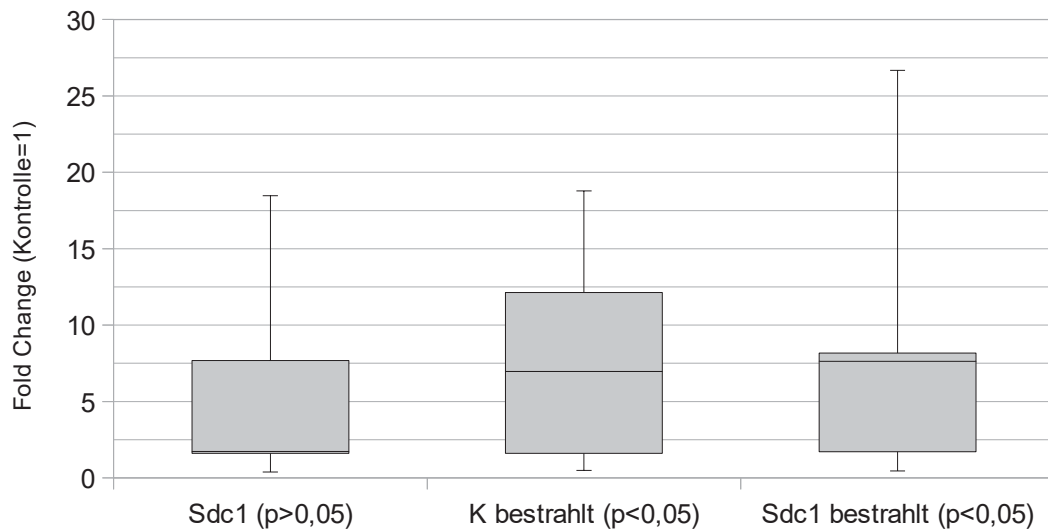


Abbildung 6: Absolute Expression von *Rac1*-mRNA in den MDA-MB-468-Zellen nach Transfektion mit *Sdc1*-siRNA und/oder Bestrahlung mit 2 Gray. Die y-Achse stellt die Fold-Change-Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (=1) dar; n=9

Beim gleichen Versuchsaufbau mit der zweiten TNBC-Zelllinie MDA-MB-468 traten

ähnliche Ergebnisse wie bei den MDA-MB-231-Zellen auf (Abbildung 6). Wieder zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Expression von Rac1-mRNA nach Bestrahlung und nach der Kombination aus Bestrahlung und Transfektion. Ebenso zeigen die Fold-Change-Werte der Messungen an Proben, die nur eine Transfektion erfahren haben, eine Tendenz zur Hochregulation der Rac1-Expression, jedoch verfehlt auch bei diesem Versuch der p-Wert mit etwa 0,12 die Signifikanz.

Der gleiche Versuch wurde auch mit cDNA-Proben der Östrogenrezeptor-positiven MCF-7-Zellen durchgeführt. Auch hier zeigte sich dieselbe Tendenz. Der Mittelwert der Fold-Change-Werte nach dem ersten Versuchsdurchlauf mit drei separaten Proben lag bei den transfizierten Zellen bei 6,06, bei den bestrahlten Zellen bei 6,6 und bei den bestrahlten transfizierten Zellen bei 23,58. Allerdings reichten die p-Werte von 0,07 bei den bestrahlten bis 0,18 bei den transfizierten Zellen. Da keine Signifikanz erkennbar war, wurde der Versuch nicht wiederholt, wobei eine größere Probenanzahl und mehrere Versuchswiederholungen möglicherweise die Tendenz bestätigt hätten.

Tenascin-C

Bei der Untersuchung der Regulation von Tenascin-C ergab die dreifache Wiederholung des Versuchs mit einer Gesamtprobenanzahl von n=9, eine signifikante Hochregulation

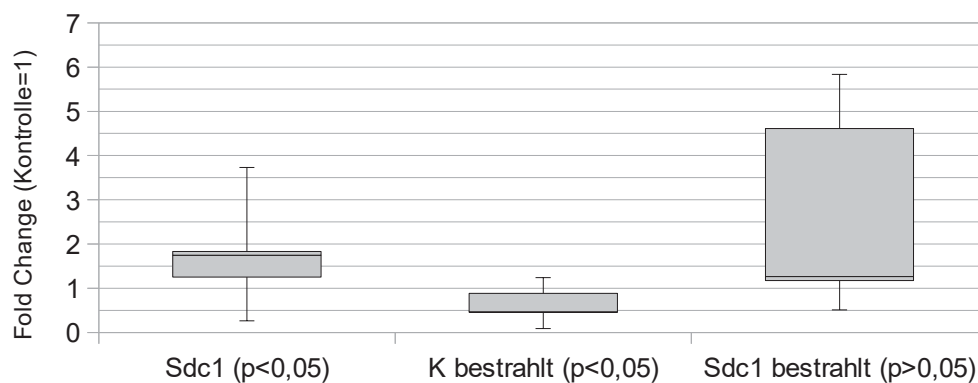


Abbildung 7: Absolute Expression von Tenascin-C-mRNA in den MDA-MB-231-Zellen nach Transfektion mit Sdc1-siRNA und/oder Bestrahlung mit 2 Gray. Die y-Achse stellt die Fold-Change-Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (=1) dar; n=9

von TNC nach Transfektion und ein signifikante Herabregulation nach Bestrahlung (Fold-Change=0,663; STABW=0,313) (Abbildung 7). Bei der Kombination aus Bestrahlung und Transfektion lassen die Fold-Change-Werte (Mittelwert 2,542 mit einer Standardabweichung von 2,163) auf eine Hochregulation von Tenascin-C schließen, aufgrund der hohen Varianz konnte dies aber nicht signifikant belegt werden ($p=0,056$).

3.3 Expressionsanalyse von FAK und P-FAK auf Proteinebene

Mittels Western Blots wurde versucht eine durch Bestrahlung regulierte Expression von FAK und P-FAK ((phospho) focal adhesion kinase) nachzuweisen. Nach mehreren erfolglosen Versuchen wurde dieser Versuch aber abgebrochen.

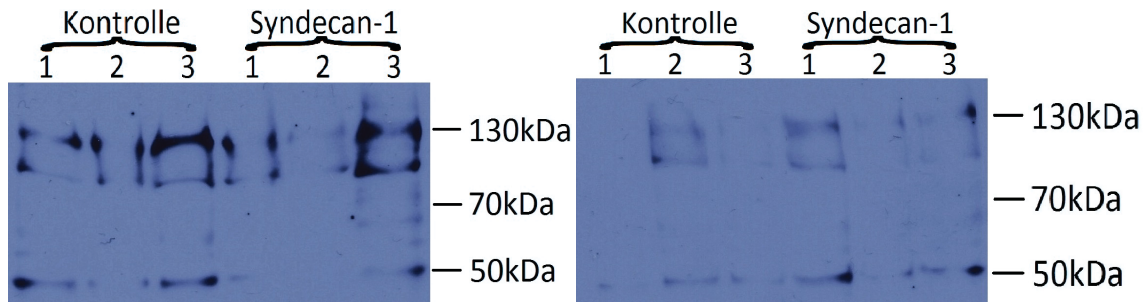


Abbildung 8: Anti-P-FAK an unbestrahlten MDA-MB-231-Proteinlysaten

Abbildung 9: Anti-P-FAK an bestrahlten MDA-MB-231-Proteinlysaten

Auch nach sehr langen Belichtungszeiten von 50min waren die Signale auf dem Film nicht sehr stark. Bei dem Versuch P-FAK nachzuweisen kann es daran gelegen haben, dass trotz der Verwendung von Phospho-Stopp, eine Dephosphorylierung stattgefunden hat.

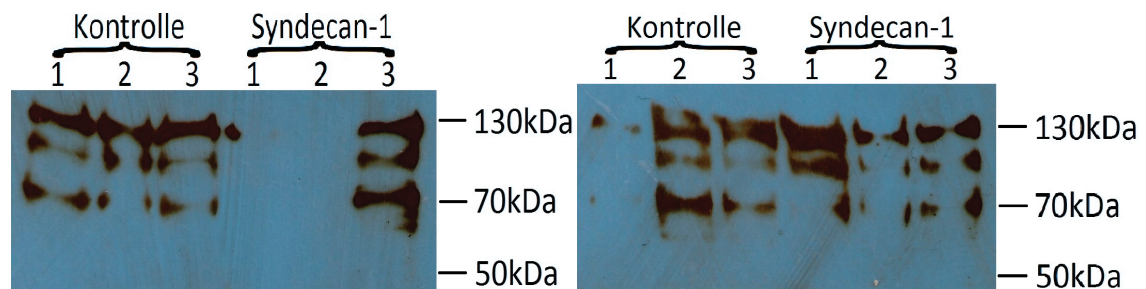


Abbildung 10: FAK an unbestrahlten MDA-MB-231-Proteinlysaten

Abbildung 11: FAK an bestrahlten MDA-MB-231-Proteinlysaten

Sowohl bei dem versuchten Nachweis von P-FAK, als auch von FAK wurden jeweils drei Bande auf dem Film sichtbar. Die erste bei etwa 130kDA, was zu einem Molekulargewicht von P-FAK und FAK von etwa 125kDA passt. Allerdings wurden auch im Bereich von weniger als 130kDA mehrere Banden nachgewiesen, was durch einen Zerfall oder Abbau von P-FAK und FAK bedingt sein kann. Die Antikörper könnten an die passenden Antigene auf Fragmenten der Proteine gebunden und so im niedrigeren kDa-Bereich ein Signal abgegeben haben.

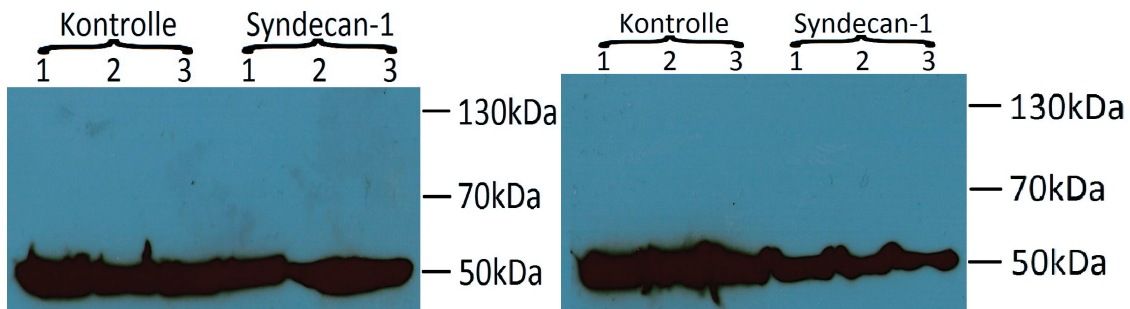


Abbildung 12: Anti-Tubulin an unbe- strahlten MDA-MB-231-Proteinlysaten
 Abbildung 13: Anti-Tubulin an bestrahlten MDA-MB-231-Proteinlysaten

Bei der Versuchsdurchführung mit Tubulin-Antikörpern, welches ein Molekulargewicht von etwa 50kDA besitzt, zeigte sich immer schon nach kürzester Belichtungszeit ein sehr starkes Signal auf dem Film bei etwa 50kDA, sodass davon auszugehen ist, dass die Herstellung der Proteinlysate funktioniert hat. Es wurde diskutiert, ob defekte Antikörper oder ob ein Zerfall der Proteine Ursache für die schlechte Auswertbarkeit der Western Blots sein könnten. Aber auch nach mehrfacher Versuchsdurchführung, unter anderem auch mit neuen Antikörpern, konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

3.4 Einfluss der siRNA-Transfektion auf die Proliferation von MDA-MB-468- und MCF-7-Brustkrebszellen

In den MTT-Assays wurde untersucht, ob die Syndecan-1-siRNA-Transfektion einen Einfluss auf die Proliferation von MDA-MB-468- und MCF-7-Zellen hat um die

bisherigen Ergebnisse zu MDA-MB-231-Zellen aus der hiesigen Arbeitsgruppe zu erweitern.

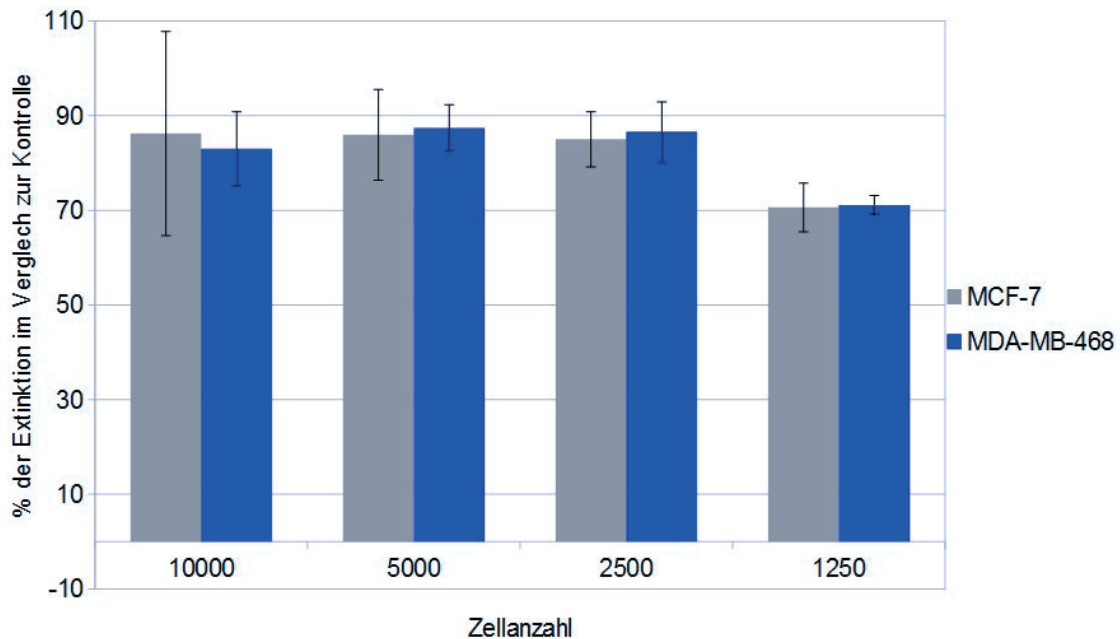


Abbildung 14: MTT-Assays an MCF-7 und MDA-MB-468. Dargestellt ist die gemessene Extinktion von Proben nach Syndecan-1-siRNA-Transfektion im Vergleich zur Negativkontrolle; MCF-7: n=9; MDA-MB-468: n=6

Abbildung 14 zeigt, dass bei MCF-7 und MDA-MB-468 die photometrisch gemessene Extinktion durch das Formazan niedriger lag als bei der Kontrolle. In den Messungen mit einer hoher Anzahl eingesetzter Zellen (2.500 bis 10.000 Zellen pro 100µl) wurde nach Normierung durch jeweiligen Abzug der Blanks Extinktionswerte von zwischen 80 und 90 Prozent im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Wurden weniger Zellen eingesetzt, wurden sogar noch niedrigere Werte gemessen, allerdings sind diese Werte nicht so zuverlässig, da schon geringe Pipettierfehler größere Auswirkungen auf die Messung haben.

Der Versuch wurde sowohl mit MCF-7, als auch mit MDA-MB-468 dreimal wiederholt mit einer Gesamtprobenanzahl von n=9. Allerdings wurden bei MDA-MB-468 in einem Versuch nur jeweils ein Zehntel der Zellen eingesetzt. Hier zeigten sich bei der photometrischen Messung zwar die selben Tendenzen, aber in der rechnerischen

Auswertung habe ich diesen Versuchsdurchlauf aus Gründen der Vergleichbarkeit nicht berücksichtigt.

Zusätzlich habe ich auf Basis der Daten von den Versuchen mit 5.000 eingesetzten Zellen pro 100 μ l den p-Wert berechnet, was bei beiden Zelllinien $p < 0,01$ ergab.

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte Extinktion bei der photometrischen Bestimmung gibt einen Hinweis darauf, dass die Zellviabilität in den beiden Mammakarzinomzelllinien durch die Transfektion verringert wird.

3.5 Digitalholographische Mikroskopie

Die Videomikroskopien wurden an MDA-MB-231 durchgeführt. In den Videomikroskopien wurde der Einfluss von Syndecan-1-Defizienz und von Bestrahlung separat und kombiniert untersucht und jeweils in zweifacher Ausführung $n=2$ durchgeführt. Aus den jeweils beiden einzelnen Messungen wurden die zurückgelegten Trajektorien einzelner Zellen aufgezeichnet und analysiert.

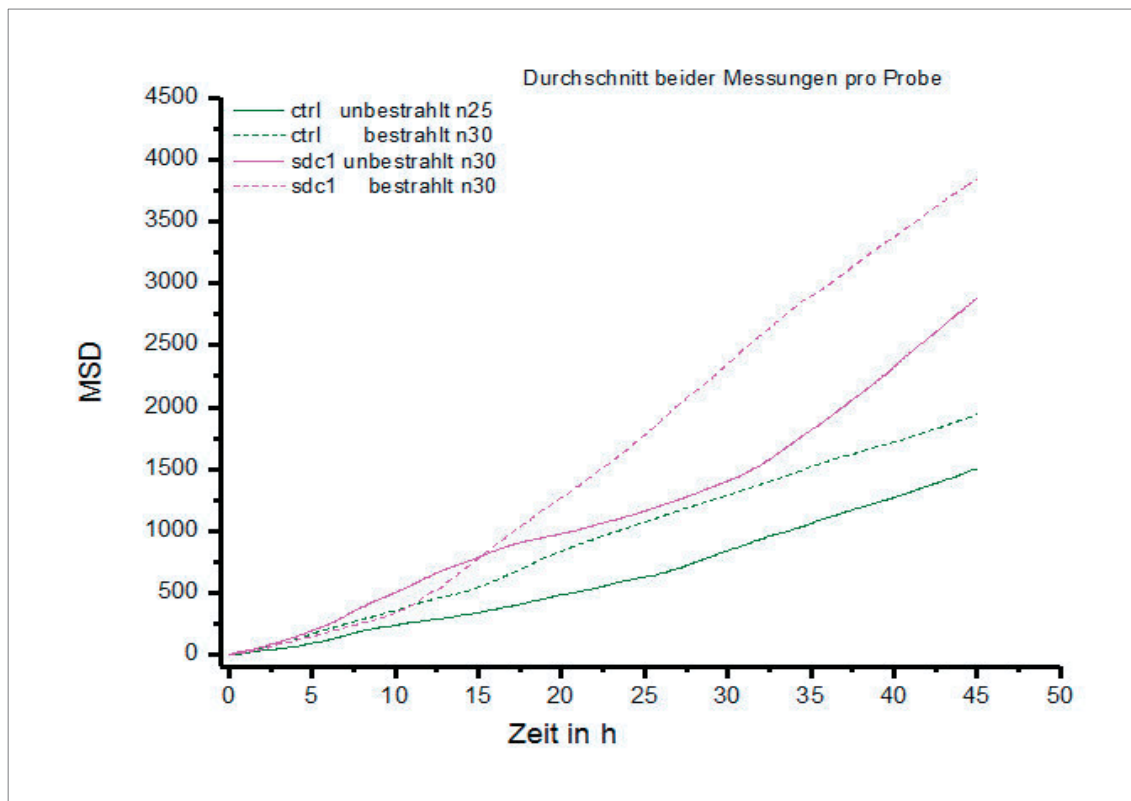


Abbildung 15: MSD (Mean Square Displacement) von MDA-MB-231 im Zeitverlauf über 45h; $n=2$; Anzahl analysierte Zellen siehe Diagramm

In Abbildung 15 ist erkennbar, dass transfizierte und bestrahlte Zellen jeweils einzeln eine höhere Migrationsaktivität als die Kontrollgruppe zeigen, wobei die transfizierten im Durchschnitt einen noch größeren MSD aufweisen als die bestrahlten. Wurden die Zellen sowohl bestrahlt, als auch transfiziert, erhöhte sich die Tendenz zur verstärkten Migrationsaktivität noch weiter. Vergleicht man die verschiedenen behandelten Zellen nur in Hinsicht auf den maximalen Abstand vom Ursprungspunkt (Abbildung 16), so waren die Zellen, die transfiziert oder transfiziert und bestrahlt wurden im Laufe der Messung im Durchschnitt signifikant ($p < 0,05$) weiter vom Startpunkt entfernt, als die nicht transfizierten Zellen. Für die Zellen, die nur bestrahlt wurden, wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, jedoch lässt mich im Hinblick auf die Auswertung in Abbildung 15, vermuten, dass Bestrahlung und Syndecan-1-Defizienz jeweils einzeln für sich die Migrationsaktivität von MDA-MB-231 erhöhen und diese Effekte sich auch kombinieren lassen.

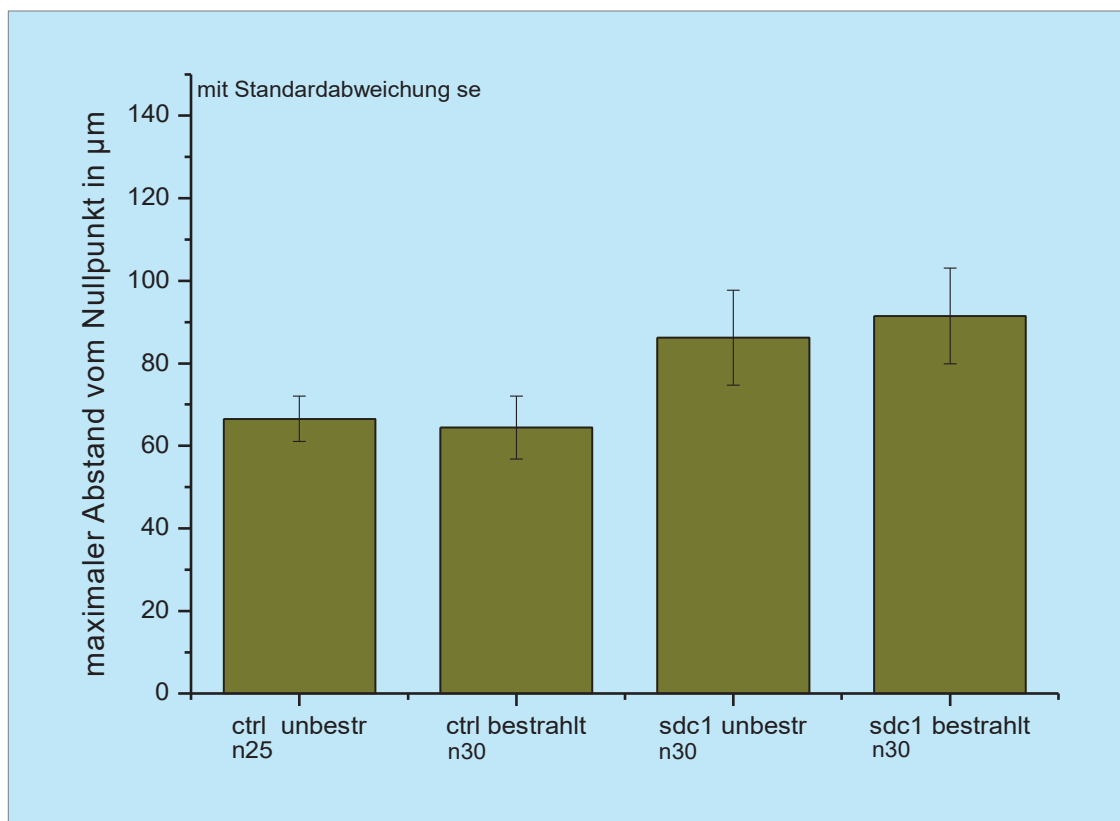


Abbildung 16: Quantifizierter maximaler Abstand der einzelnen Zellen im Durchschnitt vom Ausgangspunkt

In Abbildung 17 sind die Trajektorien aller getrackten Zellen in jeweils einem Diagramm dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ausgangspunkte aller Zellen auf denselben Nullpunkt gesetzt. Diese Abbildung dient hier mehr der Veranschaulichung, als quantitative Auswertung dient hier Abbildung 16.

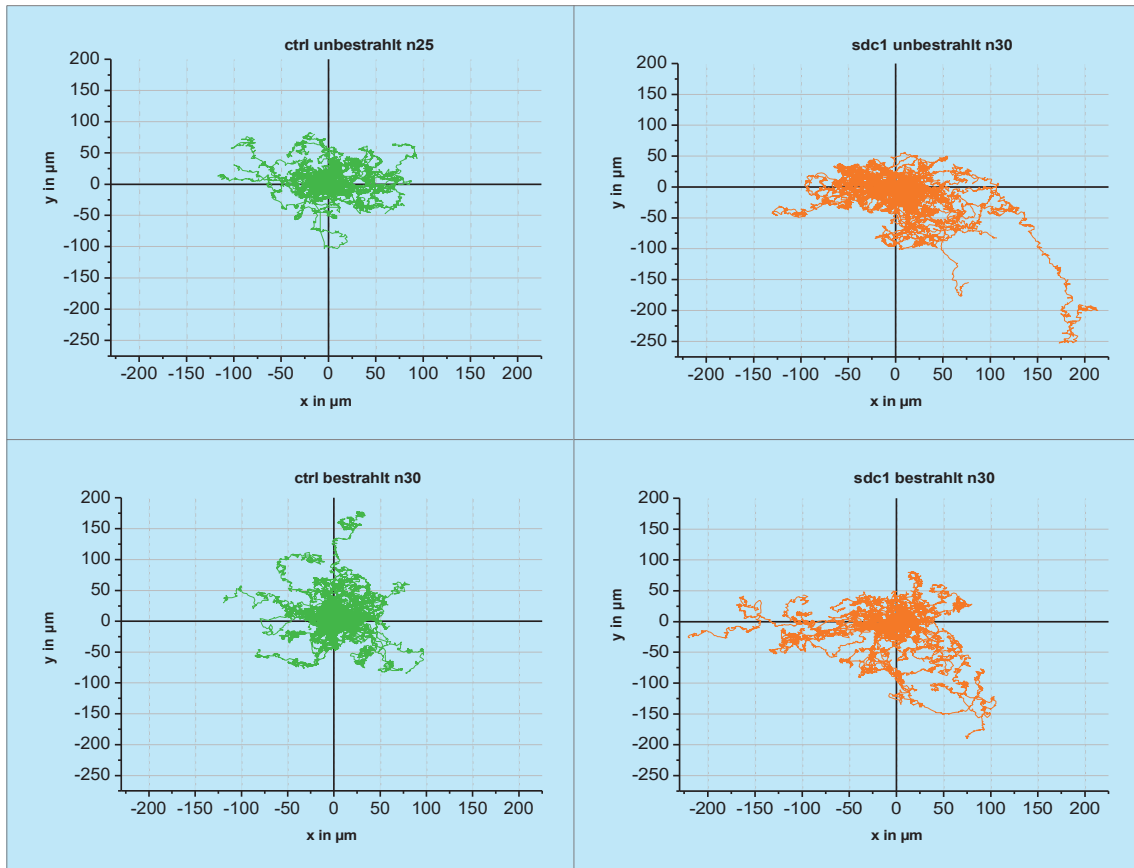


Abbildung 17: Bewegung getrackter MDA-MB-231-Zellen vom Nullpunkt

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollten bestehende Kenntnisse über die Bedeutung von Syndecan-1 in Mammakarzinomen erweitert und bestehende Vermutungen über den Einfluss von Bestrahlung mit niedrigen Energiedosen auf die Metastasierungswahrscheinlichkeit von Mammakarzinomzellen bestärkt werden.

In der bisherigen Forschung der Arbeitsgruppe an Syndecan-1 konnte das Wissen um dessen Bedeutung in proliferativen und motilitätsassoziierten Vorgängen erweitert werden. So fand man heraus, dass Syndecan-1-Verlust in tripelnegativen Mammakarzinomzellen Zelladhäsion und -migration verstärkt und zu erhöhter Strahlenresistenz führt (Hassan *et al.*, 2012). Gleichzeitig scheint aber Syndecan-1-Defizienz die Tumorgenese von Mammakarzinomen zu verhindern, da es einen Einfluss auf die Krebsstammzellfunktion zu haben scheint (McDermott *et al.*, 2007).

Da Strahlentherapie einen Grundbaustein der Mammakarzinomtherapie darstellt und Syndecan-1-Depletion den beschriebenen Einfluss auf die Strahlenresistenz hat, entstand das Interesse an einer genaueren Untersuchung der Syndecan-1-Funktion in Verbindung mit einer der Strahlentherapie ähnlichen Behandlung.

Bei der Strahlentherapie werden durch die Bestrahlung Wassermoleküle ionisiert und es entstehen hochtoxische freie Radikale, die Schäden in der DNA hervorrufen können, die die Reparaturfähigkeit der Zelle übersteigen, sodass diese ihre Teilungsfähigkeit verliert oder in Apoptose geht (Lomax *et al.*, 2013). Neben dem dadurch entstehenden Benefit für die Patienten ist Bestrahlung aber auch selber karzinogen, da durch sie Mutationen verursacht werden, die dazu führen können, dass das zelleigene Wachstumskontrollsystem ausfällt und geschädigte Zellen nicht in Apoptose gehen, sondern sich unbegrenzt weiter teilen (Swenberg *et al.*, 2011).

Um sowohl die Bedeutung von Syndecan-1, als auch den Einfluss von Bestrahlung auf die Expressionsmuster verschiedener Gene und die Zellmotilität genauer zu untersuchen, wurden daher in den meisten besprochenen Versuchsabläufen eine Syndecan-1-Depletion und eine Bestrahlung der Zellproben durchgeführt bevor verschiedene Messungen und Versuche vorgenommen wurden.

4.1 Regulation bestimmter Zielgene durch Syndecan-1 und Bestrahlung

Mittels Western Blots wurde versucht eine Regulierung der FAK- bzw. P-FAK-Expression nachzuweisen, da bereits bekannt war, dass die Syndecan-1-Depletion mit einer erhöhten Aktivität des FAK-Signalwegs einherging (Hassan *et al.*, 2013) und diese wiederum mit einer erhöhten Strahlenresistenz in Verbindung steht (Hehlhans *et al.*, 2012). Der Versuch einen möglicherweise ebenfalls durch Bestrahlung hoch regulierten FAK-Signalweg nachzuweisen, ist hier misslungen.

Stattdessen wurden in Real-Time-PCRs weiter Zielgene untersucht, die mit Motilitätsveränderungen in Verbindung stehen könnten.

Rac1

Rac1 gehört zur Rac-Unterfamilie der Rho-GTPasen. Es ist eine etwa 21kDa schwere GTPase, die verschiedene Zellfunktionen wie Zellwachstum, zytoskelettale Reorganisation und die Aktivierung von Proteinkinasen übernimmt (Ridley, 2006). Sie wird in allen Geweben exprimiert und reguliert die Zellmotilität über die Ausbildung von Lamellipodien (Parri *et Chiarugi*, 2010). Da die Deregulation der Zellmotilität eines der Schlüsselevents für die Invasivität und Metastasierung von Karzinomen ist (Hanahan *et Weinberg*, 2011), wird eine erhöhte Rac1-Aktivität schon als mögliches Therapieziel für die Pharmakotherapie von Leber- und Mammakarzinomen und weiteren Tumorarten diskutiert (Dokmanovic *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008).

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben wurden in MDA-MB-231 und -468 nach Bestrahlung mit 2 Gray von einem Linearbeschleuniger eine signifikant erhöhte Expression von Rac1 festgestellt. Wurden die Zellen nur bestrahlt ergab sich bei MDA-MB-231 ein Fold-Change-Wert von 5,788 (STABW 4,002) und bei MDA-MB-468 von 8,315 (6,955). Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch bei den Proben aufweisen, die transfiziert und bestrahlt wurden. Wurden die Proben nur transfiziert ergab sich bei MDA-MB-231 ein Fold-Change von 2,457 und bei MDA-MB-468 von 5,095, allerdings konnte hier aufgrund hoher Varianz keine Signifikanz gezeigt werden. Generell gab es bei allen Messungen eine hohe Standardabweichung, da Rac1 wegen seiner insgesamt niedrigen Expression in den Proben relativ schwer zu quantifizieren war.

Die Ergebnisse lassen aber den starken Verdacht zu, dass die Bestrahlung mit 2 Gray die Expression von Rac1 in beiden Zelllinien stark hoch reguliert und folglich einen aktivierenden Einfluss auf die Zellmotilität hat. Für eine die Syndecan-1-Depletion konnte dieser Effekt zwar nicht gezeigt werden, aber die Messungen geben zumindest Anlass zu weiteren Untersuchungen.

Die in dieser Dissertationsarbeit gemessene Erhöhung der Rac1-Aktivität durch Bestrahlung wirft folglich die Frage auf, ob Bestrahlung oder zumindest solche in niedrigen Strahlendosen die Metastasierungswahrscheinlichkeit von Tumorzellen erhöht. Bei in-vitro Bestrahlungen von MDA-MB-231 wurden schon eine erhöhte Invasivität der Zellen in Verbindung mit einer erhöhten Aktivität von MMP-2 (Matrix-Metallo-Proteinase-2) festgestellt (Paquette *et al.*, 2007). Bei Mäusen wurde sogar eine Stimulation der Karzinomzellmigration und der Entwicklung von Lungenmetastasen durch Bestrahlung der Brustdrüsen mit vier Dosen von 6 Gray innerhalb von 24h festgestellt (Bouchard *et al.*, 2013).

Da erhöhte Zellmotilität ein Zellinvasion und Metastasierung begünstigender Faktor ist, werden bereits Therapieansätze gegen Metastasierung diskutiert, die auf die Zellmotilität zielen (Wells *et al.*, 2013).

Tenascin-C

Bei Tenascin-C handelt es sich um ein Glycoprotein aus der Tenascin-Genfamilie, die eine Gruppe von Extrazellulären-Matrix-Proteinen bilden, welches auf dem TNC-Gen kodiert ist (Siri *et al.*, 1991; Nies *et al.*, 1991). Tenascin-C spielt bei verschiedenen Gewebetypen eine Rolle bei Entwicklung, Krankheit und Verletzung und in Arealen des zentralen Nervensystems, in denen auch im adulten Alter noch Neurogenese stattfindet und im Hypothalamus (Wiese *et al.*, 2012). Auch bei biomechanischer Schädigung in Knochen wurde es in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen (Webb *et al.*, 1997).

Wie auch bei Rac-1 ist auch für Tenascin-C eine regulatorische Verbindung zu Matrix-Metalloproteinasen nachgewiesen worden, die in Umbauprozessen wie auch bei Tumorwachstum eine Rolle spielen (Jackson *et al.*, 2010). Durch eine Interaktion von Tenascin-C mit Fibronectin wird die MMP-Aktivität hoch reguliert (Temple *et al.*, 1994).

Die Tenascin-C-Expression im Stroma von Mammakarzinomen zeigte keinerlei Verbindung zum Auftreten von Metastasen, aber die Expression in den Invasionsrändern nach chirurgischer Therapie lässt sich als prädiktiver Marker für das Auftreten von Metastasen nutzen. Eine hohe Expression von Tenascin-C korreliert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine Metastasierung und für Lokalrezidive (Jahkola *et al.*, 1998). Befinden sich Mammakarzinome in einem fortgeschrittenen Stadium lässt sich eine generell erhöhte TNC-Aktivität messen (Tokes *et al.*, 2009).

In Glioblastomen wurde eine Assoziation zwischen Tenascin-C und Tumorblutgefäßen, besonders Mikrobloodgefäßen festgestellt (Brösicke *et al.*, 2013). Der Nachweis von Tenascin-C an Blutgefäßen wurde auch mit kürzeren krankheitsfreien Intervallen in Verbindung gesetzt, wodurch Tenascin-C als prognostischer Marker für Rezidive diskutiert wird (Herold-Mende *et al.*, 2002).

In den qPCRs, die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführt wurden, ergab sich eine signifikante Hochregulation der TNC-mRNA nach Syndecan-1-Depletion (Fold Change=1,784; STABW=0,803; $p<0,05$) wohingegen eine Bestrahlung mit 2 Gray zu einer verminderten Expression von TNC führte (Fold Change=0,663; STABW=0,313; $p<0,05$). Kombinierte man Bestrahlung und Transfektion, konnte zwar bei $n=9$ sehr knapp keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden ($p=0,056$), aber mit einem Fold Change von 2,542 und einer Standardabweichungen von 2,163, deutete sich an, dass der TNC-fördernde Effekt durch Syndecan-1-Depletion gegenüber dem durch Bestrahlung hemmenden Effekt überwiegt.

Über Interaktionen zwischen Syndecan-1 und TNC ist bisher wenig bekannt. Hohe Aktivität sowohl von Syndecan-1, als auch von TNC korrelieren jeweils mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium bzw. mit einer schlechteren Prognose (Lendorf *et al.*, 2011; Jahkola *et al.*, 1998; Tokes *et al.*, 2009). Insofern scheint eine Hochregulierung von TNC durch Syndecan-1-Depletion erst einmal widersprüchlich. Zieht man aber die Kenntnisse aus der Videomikroskopie hinzu, in der eine durch Syndecan-1-Depletion gesteigerte Motilität festgestellt wurde (Kapitel 3.5), passt dies zu Versuchen mit TNC-Antikörpern an Glioblastomzellkulturen, deren Anwesenheit, sowohl die Proliferation der Zellen um ca. 30% und deren Migration um 30,6-46,7% reduzierte. Folglich lässt sich vermuten, dass Tenascin-C eine Rolle bei der Proliferation und Migration von

Zellen spielt (Herold-Mende *et al.*, 2002). In weiterführenden Versuchen wäre es interessant zu untersuchen, ob es eine direkte Interaktion zwischen TNC und Syndecan-1 gibt bzw. über welche Signalwege die beiden Proteine sich beeinflussen.

4.2 Proliferative Eigenschaften

Die MTT-Assays dienen zur Beurteilung der Zellviabilität. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht die Quantifizierung der Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH, indem diese am Endoplasmatischen Retikulum der Zelle eine Farbreaktion hervorrufen, in der sich ein, in Wasser gelöst, gelbliches Tetrazoliumsalz in das blau-violette Formazan umwandelt. Die durch das Formazan bedingte Extinktion verhält sich linear zur Menge der verbrauchten Reduktionsäquivalenten (Liu *et al.*, 1997). Dadurch wurde in den MTT-Assays sowohl bei MCF-7 als auch bei MDA-MB-468 nach Syndecan-1-Depletion eine jeweils um etwa 15% reduzierte Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt.

Diese Ergebnisse fügen sich gut in die bisherige Datenlage ein. So wurden ähnliche Ergebnisse bereits in der hiesigen Arbeitsgruppe an MDA-MB-231 (Ibrahim *et al.*, 2012) dokumentiert. Auch wurden an 12Z-Endometriosezellen, die nach einer Transfektion mit pre-miR-10b kaum noch Syndecan-1 exprimieren, eine um etwa 15% verringerte Zellviabilität festgestellt (Götte *et al.*, 2011).

Die Rolle von Syndecan-1 in der Tumorgenese wurde schon ausführlich untersucht. So wurde festgestellt, dass Syndecan-1-defiziente Mäuse resistent gegenüber Wnt1-induzierter Brustkrebsentstehung waren. Die Abwesenheit von Syndecan-1 verhinderte eine Zunahme der Stammzellfunktion in den epithelialen Brustdrüsenzellen, welche eine Neoplasievorstufe für das Mammakarzinom darstellt (McDermott *et al.*, 2007). Neben seiner Beteiligung an Zell-Zell-Kontakten und Zellmigration ist Syndecan-1 auch daran beteiligt Signale aus dem Extrazellulärraum ins Zellinnere zu leiten (Bernfield *et al.*, 1999). Insofern passen die Ergebnisse aus dieser Dissertationsarbeit zu der bisherigen Datenlage, da ein Syndecan-1-Knockdown bei beiden untersuchten Zelllinien, die Zellviabilität verminderte, wohingegen eine Zunahme der Zellviabilität charakteristisch für neoplastische Veränderungen ist (Hanahan et Weinberg, 2011).

Diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der aktuellen Studienlage erhärten die Vermutung, dass Syndecan-1 einen möglichen Therapieansatz bietet um Zellwachstum in Mammakarzinomen zu unterbinden.

4.3 Motilitätseigenschaften

Bei vorangegangenen Videomikroskopien wurde schon eine erhöhte Zellmotilität von MDA-MB-231 nach Syndecan-1-Depletion mit siRNA festgestellt (Ibrahim *et al.*, 2012). In dieser Dissertationsarbeit konnten die Ergebnisse noch einmal signifikant bestätigt werden. Bei einer zweifachen Durchführung ist es nicht gelungen auch die Erhöhung der Motilität durch Bestrahlung zu belegen, aber in den durchgeführten Videomikroskopien zeigte sich nach 45 Stunden ein MSD bei den unbestrahlten Zellen ohne Syndecan-1-Depletion von $1.500\mu\text{m}^2$, von etwa $1.875\mu\text{m}^2$ bei bestrahlten Zellen ohne Syndecan-1-Defizienz, von $2.875\mu\text{m}^2$ bei den unbestrahlten Zellen nach Transfektion und von $3.800\mu\text{m}^2$ bei den Zellen nach Bestrahlung und Transfektion. Da das MSD die mittlere quadratische Verschiebung pro Zeit angibt, also nicht nur die maximale Entfernung zum Ausgangspunkt, sondern auch die insgesamt zurück gelegte Strecke, ist es gut geeignet um die Migrationsaktivität der Zellen zu beschreiben (Sridharan *et al.*, 2011).

Die Videomikroskopien zeigen unmittelbar ein verstärktes Migrationsverhalten bei MDA-MB-231 bei Syndecan-1-defizienten Zellen wie auch bei bestrahlten Zellen. Da bei Mäusen bereits eine erhöhte Karzinomzellmigration und die Entwicklung von Lungenmetastasen durch Bestrahlung der Brustdrüsen mit vier Dosen von 6 Gray innerhalb von 24h nachgewiesen wurde, erscheinen die gemessenen Effekte plausibel (Bouchard *et al.*, 2013).

4.4 Kritische Beurteilung des Studienaufbaus

Im Laufe dieser Dissertationsarbeit könnten valide Ergebnisse bezüglich Zellmotilität und –viabilität sowie zu der Expression verschiedener Zielgene unter dem Einfluss von Syndecan-1-Depletion und Bestrahlung erzielt werden. Die Ergebnisse selbst tragen

zum besseren Verständnis von Mammakarzinomzellen und deren Verhalten bei, doch vor allem bieten sie Ansätze für weitere und vertiefende Studien an.

Es ist gelungen bestehende Vermutungen zur motilitätsregulierenden Funktion des Heparan-Proteoglykans Syndecan-1 zu bestätigen und um Kenntnisse zu dem Einfluss von Bestrahlung auf die Zellmigration zu erweitern. Neben der unmittelbaren Untersuchung der Zellmotilität mittels digitalholographischer Videomikroskopie, konnte auf mRNA-Ebene von Zielgenen, die bei der Zellmigration eine Rolle spielen, ebenfalls eine veränderte Genexpression nach Syndecan-1-Depletion gezeigt werden. Zusätzlich zur regulatorischen Funktion von Syndecan-1 konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray die Expressionsmuster von motilitätsmodulierenden Zielgenen beeinflusst und damit auch direkten Einfluss auf die Migrationsaktivität der Zelle hat.

Eine Schwachstelle der Ergebnisse liegt bei der Untersuchung der Expression der Zielgene, die lediglich auf mRNA-Ebene mit Real-Time-PCRs, zu validen Ergebnissen geführt hat. In vertiefenden Studien wäre es interessant zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte sich mittels Western Blots auch auf Proteinebene nachweisen ließen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine erhöhte Transkription bestimmter Zielgene auch mit einer gesteigerten Translation einhergeht. Außerdem sind sowohl bei den Ergebnissen der qPCRs mit signifikanten Ergebnissen, als auch bei denen, in denen keine signifikante Regulation nachgewiesen werden konnte teilweise sehr hohe Standardabweichungen berechnet worden. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, empfiehlt es sich die Probenanzahl noch einmal zu erhöhen. Möglicherweise könnten sich so auch Effekte, die bisher unter der Signifikanzgrenze liegen, sichtbar werden. Gleiches gilt auch für die Ergebnisse der Videomikroskopien.

Interessant wäre es auch ähnliche Versuche mit unterschiedlichen Energiedosen durchzuführen, um zu eruieren, wann der motilitätssteigernde Effekt der Bestrahlung am größten ist, und wann er wieder abnimmt. Erweiternd könnten die Videomikroskopien auch an Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomzellen durchgeführt werden, da bei der verwendete MCF-7-Zelllinie auf mRNA-Ebene bei den hier untersuchten Zielgenen keine signifikanten Änderung der Expression festgestellt

werden konnte und man untersuchen könnte, ob sich das auch in einer videomikroskopischen Untersuchung bestätigen würde.

Um die Ergebnisse noch aussagekräftiger im Bezug auf Therapie und Krankheitsverlauf von Mammakarzinomen zu machen, sehe ich ein großes Potential in in-vivo-Versuchen, zum Beispiel an Mäusen mit induzierten Mammakarzinomen. Durch Bestrahlung induzierte Lungenmetastasen bzw. eine erhöhte Karzinomzellmigration wurden bereits beobachtet (Bouchard *et al.*, 2013). Da in den hier durchgeführten Videomikroskopien die Syndecan-1-Depletion aber einen noch größeren Einfluss auf die Zellmigration hatte als die Bestrahlung, könnte man sich überlegen, ob es interessant ist, Versuche an Syndecan-1-defizienten Mäusen mit induzierten Mammakarzinomen durchzuführen. Gerade im Hinblick auf die außerdem beobachtete Resistenz gegenüber strahleninduzierten Mammakarzinomen (Hassan *et al.*, 2013) erscheint mir dies besonders interessant, sollte es nicht an der Durchführbarkeit scheitern.

4.5 Fazit

Das Mammakarzinom ist in Deutschland sowohl die Krebserkrankung mit der höchsten Inzidenz, als auch die mit der höchsten Mortalität.

In dieser Dissertationsarbeit wurde die Bedeutung des Heparan-Proteoglykans Syndecan-1 für die Zelleigenschaften und das Zellverhalten von Mammakarzinomen unterstrichen und mögliche Einflüsse von Bestrahlung auf Brustkrebszellen untersucht.

Unter Syndecan-1-Defizienz kommt es zu einer erhöhten Transkription des Tenascin-C-Gens in MDA-MB-231 und zu einer Verstärkung deren Zellmigration. Gleichzeitig führte eine Syndecan-1-Depletion in MDA-MB-468 und MCF-7 zu einer reduzierten Zellviabilität.

Wurden MDA-MB-231 oder MDA-MB-468-Zellen mit 2 Gray bestrahlt, erhöhte das in diesen die Expression von Rac1 auf mRNA-Ebene, wohingegen die Expression von Tenascin-C durch die Bestrahlung reduziert wurde. Wie auch nach einem Syndecan-1-Knockdown, wurde auch durch die Bestrahlung die Migrationsaktivität von MDA-MB-231 angeregt.

Kombinierte man Syndecan-1-Defizienz mit Bestrahlung, so waren die Ergebnisse erwartungsgemäß im Bezug auf die Ergebnisse, die bei Zellen erzielt wurden, die nur bestrahlt oder nur transfiziert wurden, gleiche Effekte verstärkten sich, entgegengesetzte hoben sich auf.

Mithilfe verschiedener Methoden wurde gezeigt, dass Syndecan-1-Depletion und Bestrahlung mit 2 Gray Zellmigration bei Mammakarzinomzellen verstärken. Dies konnte sowohl ganz unmittelbar in Videomikroskopien gezeigt werden, als auch indirekt über eine veränderte Expression bestimmter Zielgene, die mit Zellmotilität im Zusammenhang stehen.

Folglich könnte Syndecan-1 als Zielstruktur für Prognose oder Therapieplanung beim Mammakarzinom an Bedeutung gewinnen. Syndecan-1-Depletion erhöht Zelladhäsion und -migration und vermittelt Strahlenresistenz (Hassan *et al.*, 2013). Eine erhöhte Expression von Syndecan-1 geht mit einem schlechten klinischen Outcome einher (Ibrahim *et al.*, 2012), wodurch sich mithilfe einer Untersuchung der Syndecan-1-Expression in Mammakarzinomen möglicherweise Aussagen über die Metastasierungswahrscheinlichkeit und Prognose machen lassen und die Therapieplanung der Syndecan-1-Expression angepasst werden kann. Oder aber eine mögliche Regulation der Syndecan-1-Expression in-vivo könnte den Therapieverlauf positiv beeinflussen.

Die Ergebnisse zu den mit 2 Gray bestrahlten Mammakarzinomzellen und Versuche, in denen Mammakarzinome in Mäusen bestrahlt wurden und daraufhin eine erhöhte Tendenz zu Lungenmetastasen und einer erhöhten Karzinomzellmigration beobachtet wurde (Bouchard *et al.*, 2013), könnten dazu anregen die Veränderungen in Mammakarzinomen nach Strahlentherapie genauer zu untersuchen. In dem Fall, dass weitere Studien diese Tendenz bestätigen, wäre es möglich Ansätze zu suchen um diesen Effekt zu verhindern, um den Benefit von Strahlentherapie beim Mammakarzinom weiter zu erhöhen bzw. strahleninduzierte Metastasierung zu unterbinden.

Zukünftige Studien könnten die beobachteten Einflüsse von Syndecan-1 und Bestrahlung bestärken und zu einem besseren Verständnis dieser Abläufe beitragen und

im Folgenden an einer Modulation dieser Prozesse zugunsten des Therapieverlauf arbeiten.

5 Literaturverzeichnis

- Aghili M , Lashkari M , Farrokhpey AH , Izadi S (2013). Triple-Negative Breast Cancer Survival in Iranian Patients. *Acta Medica Iranica, Vol. 51, No. 8*: 560-565
- Albert US und die Mitglieder der Planungskommission und Arbeitsgruppenleiter der Konzertierten Aktion Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland. Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland, 1. Aktualisierung 2008. *München: Zuckschwerdt Verlag*
- Alderson PO, Adams DF, McNeil BJ, Sanders R, Siegelman SS, Finberg HJ, Hessel SJ, Abrams HL (1983). Computed tomography, ultrasound, and scintigraphy of the liver in patients with colon or breast carcinoma: a prospective comparison. *Radiology 149(1)*:225-230
- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg Å, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF (2003). Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A combined Analysis of 22 Studies. *Am. J. Hum. Gen. 71*: 1117-1130
- Bernfield M, Götte M, Park PW et al. (1999). Functions of cell surface heparin sulphate proteoglycans. *Annual review of biochemistry, 68*: 729-777
- Bouchard G, Bouvette G, Therriault H, Bujold R, Saucier C, Paquette B (2013). Pre-irradiation of mouse mammary gland stimulates cancer cell migration and development of lung metastases. *British Journal of Cancer 109*: 1829–1838
- Brösicke N, van Landeghem FKH, Scheffler B, Faissner A (2013) Tenascin-C is expressed by human glioma in vivo and shows a strong association with tumor blood vessels. *Cell Tissue Res 354*: 409–430

- Brooks SC, Locke ER, Soule HD (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248: 6251-6253.
- Cailleau R, Olive M, Cruciger QV (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14(11):911-915
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53: 661-674
- Carl D, Kemper B, Wernicke G, von Bally G (2004). Parameter-optimized digital holographic microscope for high resolution living-cell analysis. *Appl Opt* 34: 6536-6544
- Dokmanovic M, Hirsch DS, Shen Y, Wu WJ (2009). Rac1 contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells: Rac1 as a potential therapeutic target for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 8(6): 1557–69
- Engel LW, Young NA (1978). Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38: 4327-4339
- Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G (1990). Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65: 2121 – 2128
- Götte M, Adammek M, Kässens N, Kiesel L (2011). MikroRNAs als neue therapeutische Zielstrukturen der Endometriose - Regulation der Motilität und Proliferation von Endometriosezellen durch miR-145 und miR-10b. *Geburtsh Frauenheilk*, 71: 463-464
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 100: 57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5): 646–674

- Hassan H, Greve B, Pavao MSG, Kiesel L, Ibrahim SA, Götte M (2013). Syndecan-1 modulates β -integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast cancer cell adhesion, migration and resistance to irradiation. *FEBS Journal* 280: 2216-2227
- Herold-Mende C, Müller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002). Clinical impact and functional aspects of tenascin-c expression during glioma progression. *Int. J. Cancer* 98: 362-369
- Hehlgans S, Eki I, Cordes N (2012). Targeting FAK radiosensitizes 3-dimensional grown human HNSCC cells through reduced Akt1 and MEK1/2 signaling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83: e669-e676
- Holtzhauer M (2009). Biochemische Labormethoden, 3. Aufl. Berlin: Springer Verlag: 10
- Horstmann E, Dabelow A (1957). Haut und Sinnesorgane. Vol. 3 Springer Berlin Heidelberg: 460
- Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon JM, Irwig L, Brennan ME, Solin LJ (2010). Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer* 46(18): 3219-3232
- Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, Evans DG, Garcia-Closas M, Gescher AJ, Key TJ, Saxton JM, Harvie MN (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 16(5): 446
- Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, 166(3906): 747-9
- Ibrahim SA, Yip GW, Stock C, Pan JW, Neubauer C, Poeter M, Pujalis D, Koo CY, Kelsch R, Schüle R, Rescher U, Kiesel L, Götte M (2012). 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: 131*: E884-E896

Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V (2010) Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Human genomics Vol. 4 No. 3*: 194-201

Jahkola T, Toivonen T, Virtane I, von Smitten K, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C, Nevanlinna H, Blomqvist C (1998) Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence. *Br J Cancer. ; 78(11)*: 1507–151

Jordan VC (2014). Tamoxifen as the First Targeted Long Term Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *Endocr Relat Cancer 21(3)*: R235-R246

Kaufmann M, Morrow M, von Minckwitz G, Harris JR (2010). Locoregional treatment of primary breast cancer: consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer 116(5)*: 1184- 1191

Kemper B, Carl D, Höink A, von Bally G, Bredebusch I, Schnekenburger J (2006a). Modular digital holographic microscopy system for marker free quantitative phase contrast imaging of living cells. *Proc. SPIE 6191, 61910T*

Kemper B, Carl D, Schnekenburger J, Bredebusch I, Schäfer M, Domschke W, et al. (2006b). Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *J Biomed Opt 11*: 34005

Kemper B, Bauwens A, Vollmer A, Ketelhut S, Langehanenberg P, Müthing J, Karch H, von Bally G (2010). Label-free Quantitative Cell Division Monitoring of Endothelial Cells by Digital Holographic Microscopy. *J. Biomed. Opt. 15*: 036009

Kemper B, Langehanenberg P, Kosmeier S, Schlichthaber F, Remmersmann C, von Bally G, Rommel C, Dierker C, Schnekenburger J (2013): Quantitative phase imaging with digital holographic microscopy and applications in live cell

analysis, *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods*, Tuchin (Ed.), Springer: 215-257

Kemper B, Vollmer A, Rommel C, Schnekenburger J, von Bally G (2011): Simplified approach for quantitative digital holographic quantitative phase contrast imaging of living cells, *J. Biomed. Opt.* 16, 026014

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol., Bd. 56*: 341–361

Kuehn T, Bembenek A, Decker T, Munz DL, Sautter-Bihl ML, Untch M, Wallwiener D (2005). A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 103(3): 451-461

Lacroix M, Leclercq G (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83: 249-289

Langehanenberg P, Kemper B, Dirksen D, von Bally G (2008). Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging. *Appl. Opt.* 47: D176-D182

Lendorf ME, Manon-Jensen T, Kronqvist P, Multhaupt HAB, Couchman JR (2011). Syndecan-1 and Syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59(6): 615–629

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997). Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* 69: 581-593

Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, Sun S, Ling C, Xu Z (2008). Melittin Prevents Liver Cancer Cell Metastasis Through Inhibition of the Rac1-Dependent Pathway. *HEPATOLOGY* 47: 1964-1973

- Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P (2013). Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology* 25: 578-585
- Lüllmann-Rauch R (2006). *Histologie, 2. Aufl. Stuttgart: Thieme: 546*
- Mali M, Jaakkola P, Arvilommi AM, Jalkanen M (1990). Sequence of Human Syndecan Indicates a Novel Gene Family of Integral Membrane Proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 265, No. 12: 6884-6889
- Maskos U, Southern EM (1992). Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Research, Vol. 20, No. 7: 1679-1684*
- McDermott SP, Ranheim EA, Leatherberry VS, Khwaja SS, Klos KS, Alexander CM (2007). Juvenile syndecan-1 null mice are protected from carcinogen-induced tumor development. *Oncogene* 26, 1407–1416
- NICE (National Institute for Health and Care Excellence) (2009). Early and locally advanced breast cancer. Diagnosis and treatment.
- Nies DE, Hemesath TJ, Kim JH, Gulcher JR, Stefansson K (1991). The complete cDNA sequence of human hexabrachion (Tenascin). *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 266, No. 5: 2816-2823
- Nothacker M, Duda V, Hahn M, Warm M, Deghardt F, Madjar H, Weinbrenner S, Albert US (2009). Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. A systematic review. *BMC Cancer*, 9: 335-43
- NZGG. New Zealand Guidelines Group: Management of early breast cancer (2009)

- Paquette B, Baptiste C, Therriault H, Arguin G, Plouffe B, Lemay R (2007). In vitro irradiation of basement membrane enhances the invasiveness of breast cancer cells. *British Journal of Cancer* 97: 1505 – 1512
- Parri M, Chiarugi P (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling* 8: 23
- Pfaffl MW (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*: 92-95
- Radbruch A (2000). Immunofluorescence: Basic Considerations; Flow Cytometry and Cell Sorting, Second Edition, *Springer Verlag*
- Ramani VC, Purushothaman A, Stewart MD, Thompson CA, Vlodavsky I, Au JLS, Sanderson RD (2013). The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *FEBS J.* 280(10): 2294-2306
- Rapraeger AC, Ell BJ, Roy M, Li X, Morrison OR, Thomas GM, Beauvais DLM (2013). VE-cadherin stimulates Syndecan-1-coupled IGF1R and cross-talk between alphaVbeta3 integrin and VEGFR2 during the onset of endothelial cell dissemination in angiogenesis. *FEBS J.* 280(10): 2194–2206
- Ridley AJ (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16(10): 522–9
- Schiavon G, Smith IE (2014). Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Research* 16: 206-223
- Schünke M, Schule E, Schuhmacher U (2011). Prometheus LernAtlas der Anatomie Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem, 3. Aufl. Stuttgart: Thieme: 208
- Siri A, Carnemolla B, Saginati M, Leprini A, Casari G, Baralle F, Zardi L (1991). Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 3*: 525-531

- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409-1416
- Sridharan S, Mir M, Popescu G (2011). Simultaneous optical measurements of cell motility and growth. *Biomed. Opt. Express* 2816, 2: 2815-2820
- Summers DF, Maizel JV Jr, Darnel JE Jr. (1965), Evidence for virus-specific noncapsid proteins in poliovirus-infected HeLa cells. *Proc. N. A. S. USA* 54(2): 505-513
- Swenberg JA, Lu K, Moeller BC, Gao L, Upton PB, Nakamura J, Starr TB (2011). Endogenous versus Exogenous DNA Adducts: Their Role in Carcinogenesis, Epidemiology, and Risk Assessment. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 120(S1): S130-S145
- Temble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z (1994). The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell Vol. 5*: 439-453
- Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, Nielsen TO, Foulkes WD (2007). Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 7: 134
- Tokes AM, Szasz AM, Farkas A, Toth AI, Dank M, Harsanyi L, Molnar BA, Molnar IA, Laszlo Z, Rusz Z, Kulka J (2009). Stromal Matrix Protein Expression Following Preoperative Systemic Therapy in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 15(2): 731-39
- Van Erp PE, Brons PP, Boezeman JB, de Jongh GJ, Bauer FW (1988). A Rapid Flow Cytometric Method for Bivariate Bromodeoxyuridine AINA Analysis Using Simultaneous Proteolytic Enzyme Digestion and Acid Denaturation. *Cytometry* 9: 627-30
- Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, de Fendi LI, Soares FV (2007). Adjuvant trastuzumab in the treatment of her2-positive early breast cancer: a meta analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*, 7: 153-163

- Voogd AC, Nielsen M, Peterse JL, Blichert-Toft M, Bartelink H, Overgaard M, van Tienhoven G, Andersen KW, Sylvester RJ, van Dongen JA (2001). Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin Oncol* 19(6): 1688-1697
- Webb CMB, Zaman G, Mosley JR, Tucker RP, Lanyon LE, Mackie EJ (1997). Expression of Tenascin-C in bones responding to mechanical load. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* Vol. 12, Nr. 1: 52-58
- Wells A, Grahovac J, Wheeler S, Ma B, Lauffenburger D (2013). Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends Pharmacol Sci.* 34(5): 283–289
- Wiese S, Karus M, Faissner A (2012). Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Frontiers in pharmacology* Vol. 3 Articl 120
- Zhang RD, Fidler IJ, Price JE (1991). Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis* 11(4):204-215

Internetverweise

Internetverweis 1 (Stand 12.03.2015). Brustkrebs (Mammakarzinom), *Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten*

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html

Internetverweis 2 (Stand 28.03.2015). Maligne Tumoren der Mamma *Springer International Publishing AG*

http://static-content.springer.com/image/chp%3A10.1007%2F978-3-662-43469-7_1/MediaObjects/83304_4_De_1_Fig1_HTML.gif

Internetverweis 3 (Stand 27.03.2015). ONKO Internetportal *Deutschen Krebsgesellschaft e. V.*

<http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/ursachen-und-risikofaktoren.html>

Internetverweis 4 (Stand 29.03.2015). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.*

http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_k_S3__Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf

Internetverweis 5 (Stand 30.03.2015) Mammographie Screening Programm *KOOPERATIONSGEMEINSCHAFT MAMMOGRAPHIE GBR*

<http://www.mammo-programm.de/>

Internetverweis 6 (Stand 18.03.2015). *Applied Biosystems, TaqMan Gene Expression Assays*

<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-genex-as.ays/index.html>

Danksagung

Lebenslauf

