

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität

München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Analysen von BRCA1 und BRMS1 in durch TWIST1 induzierbarem EMT-
Modell in HMLE-Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anna Bronner

aus

München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karl Sotlar
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Irene Schmid
Prof. Dr. med. Nadia Harbeck
Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2020

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Abkürzungsverzeichnis.....	6
2 Einleitung.....	9
2.1 <i>Epidemiologie des Mammakarzinoms</i>	9
2.2 <i>Klassifikation des Mammakarzinoms (WHO 2012)</i>	11
2.2.1 In-situ Karzinom.....	11
2.2.2 Invasives Karzinom	11
2.3 <i>EMT</i>	13
2.4 <i>Twist1</i>	14
2.5 <i>WNT5A</i>	14
2.6 <i>BRCA1</i>	15
2.7 <i>BRMS1</i>	16
2.8 <i>Fragestellung und Zielsetzung</i>	18
3 Material und Methodik	19
3.1 <i>Material</i>	19
3.1.1 Zellkulturmaterial	19
3.1.1.1 Flüssigkeiten und Feststoffe	19
3.1.1.2 Medien, Puffer und Lösungen.....	19
3.1.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte	20
3.1.1.4 Kits	20
3.1.1.5 HMLE-Twist-ER.....	21
3.1.2 Labormaterialien	21
3.1.2.1 Flüssigkeiten und Feststoffe	21
3.1.2.2 Puffer und Lösungen.....	22
3.1.2.3 Primer und Sonden	24
3.1.2.4 Kits und Sets.....	25
3.1.2.5 Antikörper	25
3.1.2.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte	25
3.2 <i>Methoden</i>	26
3.2.1 Zellkulturmethoden	26
3.2.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	26
3.2.1.2 Tamoxifenstimulation	27
3.2.1.3 RNA- und Proteinextraktion.....	28
3.2.1.4 Doppelstrangbruchassay.....	28

3.2.1.5	Auswertung des Doppelstrangbruchassays	29
3.2.2	Labormethoden	29
3.2.2.1	RNA-Isolation	29
3.2.2.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	30
3.2.2.3	cDNA-Synthese	30
3.2.2.4	Quantitative PCR (qPCR)	30
3.2.2.5	Western Blot	35
3.2.3	Statistische Auswertung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	<i>Kurzzeitstimulation</i>	42
4.1.1	Verhalten der Zellen in Kultur	42
4.1.2	WNT5A.....	42
4.1.3	BRCA1	43
4.1.4	BRMS1	45
4.2	<i>Langzeitstimulation</i>	47
4.2.1	Verhalten der Zellen in Kultur	47
4.2.2	Kontinuierliche Stimulation (15 Tage)	49
4.2.2.1	WNT5A.....	49
4.2.2.2	BRCA1.....	49
4.2.2.3	BRMS1.....	50
4.2.3	Transiente Stimulation (25 Tage).....	50
4.2.3.1	WNT5A.....	50
4.2.3.2	BRCA1.....	51
4.2.3.3	BRMS1.....	52
4.2.3.4	Doppelstrangbruchassay.....	54
5	Diskussion	56
5.1	<i>Überblick</i>	56
5.2	<i>Kurzzeitstimulation</i>	56
5.2.1	BRCA1-Suppression nach kontinuierlicher Twist1-Aktivierung	56
5.2.2	BRMS1-Suppression nach kontinuierlicher Twist1-Aktivierung	57
5.3	<i>Langzeitstimulation</i>	57
5.3.1	BRCA1-Anstieg nach transienter Twist1-Aktivierung	58
5.3.2	Wenig Effekt auf BRMS1 nach transienter Twist1-Aktivierung	59
5.4	<i>Fazit</i>	59
6	Zusammenfassung	61

7	Literaturverzeichnis.....	62
8	Abbildungsverzeichnis.....	66
9	Tabellenverzeichnis.....	70
10	Danksagung	71

1 Abkürzungsverzeichnis

°C. *Grad Celsius*

A. *Ampere*

AK. *Antikörper*

APS. *Ammoniumpersulfat*

BASC. *BRCA1-associated genome surveillance complex*

BCA. *Bicinchoninic acid*

BRMS1. *Breast cancer metastasis suppressor 1*

BSA. *Bovine serum albumine*

cDNA. *Komplementäre DNA*

CO₂. *Kohlenstoffdioxid*

CP. *Crossing point*

DDX24. *Dead box helicase 24*

DMSO. *Dimethylsulfoxid*

DNA. *Desoxyribonukleinsäure*

DSB. *Doppelstrangbruch*

DTT. *Dithiothreitol*

E-Cadherin. *Epitheliales Cadherin*

ECL. *Chemilumineszenz*

EDTA. *Ethylendiamintetraessigsäure*

EMT. *Epitheliale mesenchymale Transition*

ER. *Estrogen receptor*

F. *Vorwärts*

FCS. *Fetales Kalbsserum*

h. *Stunde*

HCl. *Chlorwasserstoff*

HMLE. *Immortalisierte HME-Zellen*

hTERT. *Human telomerase reverse transcriptase*

K₂HPO₄. *Dikaliumhydrogenphosphat*

kD. *Kilodalton*

KH_2PO_4 . *Kaliumdihydrogenphosphat*
KU. *Kurzzeit*
LNA. *Locked nucleic acid*
LA. *Langzeit*
MEGM. *Mammary epithelial cell growth medium*
MET. *Mesenchymale epitheliale Transition*
mg. *Milligramm*
min. *Minute*
ml. *Milliliter*
M-Per. *Mammalian protein extraction reagent*
mRNA. *Messenger RNA*
ms. *Millisekunden*
NaCl. *Natriumchlorid*
NaOH. *Natriumhydroxid*
N-Cadherin. *Neuronal Cadherin*
NF- κ B. *Nukleärer Faktor kappa-B*
nM. *Nanomol*
PBS. *Phosphat buffered saline*
PCR. *Polymerasekettenreaktion*
PS. *Penicillin Streptomycin*
PVDF. *Polyvinylidendifluorid*
R. *Rückwärts*
REEP5. *Receptor accessory protein 5*
RNA. *Ribonukleinsäure*
rpm. *Umdrehungen pro Minute*
RT. *Reverse Transkriptase*
SDS. *Sodium dodecyl sulfate*
SDS-Page. *SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese*
SV40. *Simian virus 40*
TAM. *Tamoxifen*
TBE. *Tris-Borat-EDTA-Puffer*

TBS. *Tris buffered saline*

UPL. *Universal Probe Library*

UV. *Ultraviolett*

V. *Volt*

WHO. *World Health Organisation*

WNT. *Wingless int-1*

µg. *Mikrogramm*

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Mit rund 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland (Robert Koch Institut, 2013) ist die bösartige Neubildung der Brustdrüse die häufigste Krebserkrankung der Frau. Insgesamt erkrankt jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (Robert Koch Institut, 2013), welches in 2010 31,3% aller Krebsneuerkrankungen bei der Frau ausmachte. Mit großem Abstand folgen Lungen- (12,7%) und Darmkrebs (9,6%) (Abbildung 1) (Robert Koch Institut, 2013).

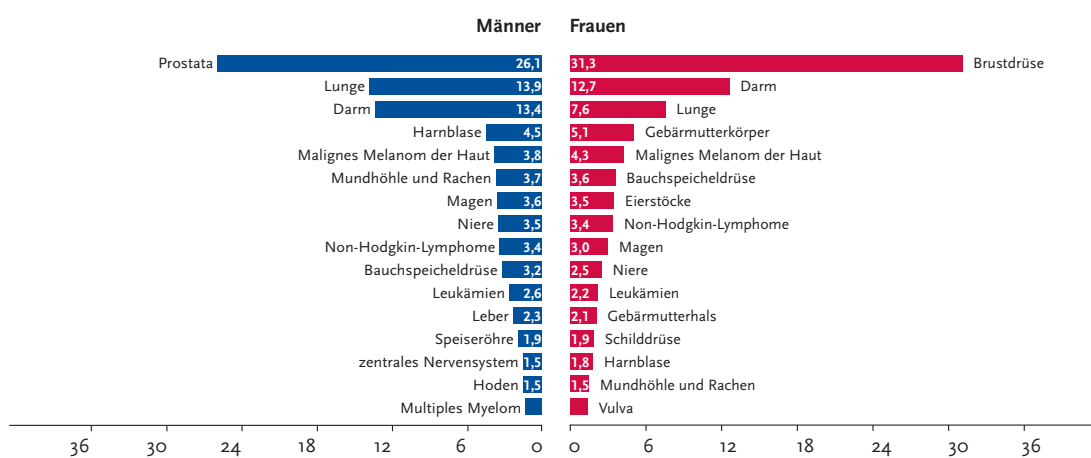


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Robert Koch Institut, 2013)

Das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen mit Mammakarzinom liegt bei 64 Jahren, jedoch ist bei der Erstdiagnose jede 4. Betroffene jünger als 55 Jahre und jede 10. betroffene Frau jünger als 45 Jahre (Robert Koch Institut, 2013).

Mit 17,4% sind Mammakarzinome die häufigste Todesursache unter allen bösartigen Neubildungen der Frau (Abbildung 2) (Robert Koch Institut, 2013).

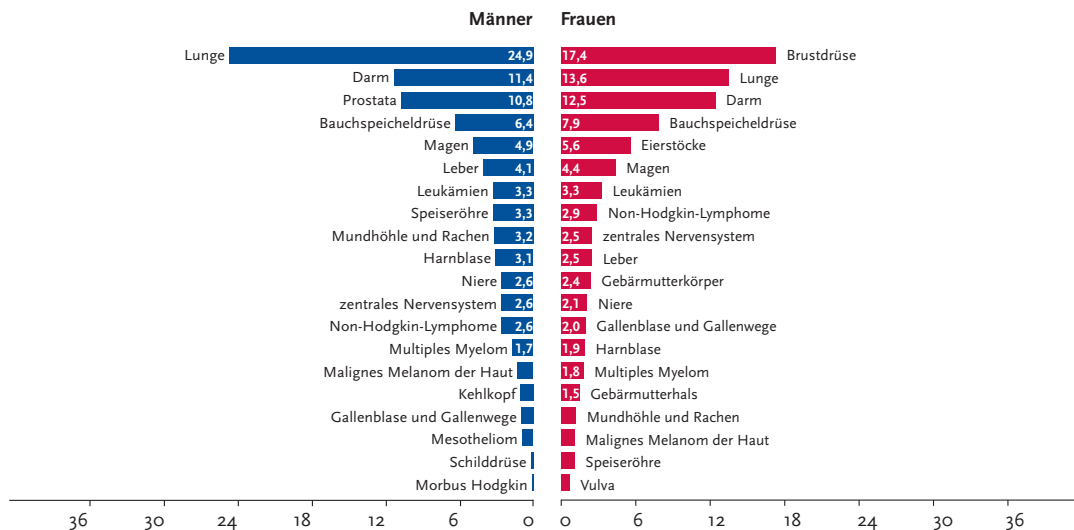


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010 (Robert Koch Institut, 2013)

Dank zahlreicher Maßnahmen, wie der Einführung des ausgedehnten Mammographie-Screenings zur Früherkennung und der individualisierten stadienabhängigen Therapie, beträgt die insgesamt relative 5-Jahres-Überlebensrate aktuell 87% (Robert Koch Institut, 2013). Im Vergleich zur relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 69% in den 1980-Jahren ist dies eine deutliche Verbesserung (Robert Koch Institut, 2010).

Liegen beim Mammakarzinom jedoch Fernmetastasen vor, einem Stadium IV entsprechend, sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf nur noch 22% (Edge et al., 2010). Im Gegensatz dazu liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium I bei nahezu 100% (siehe Abbildung 3) (Edge et al., 2010).

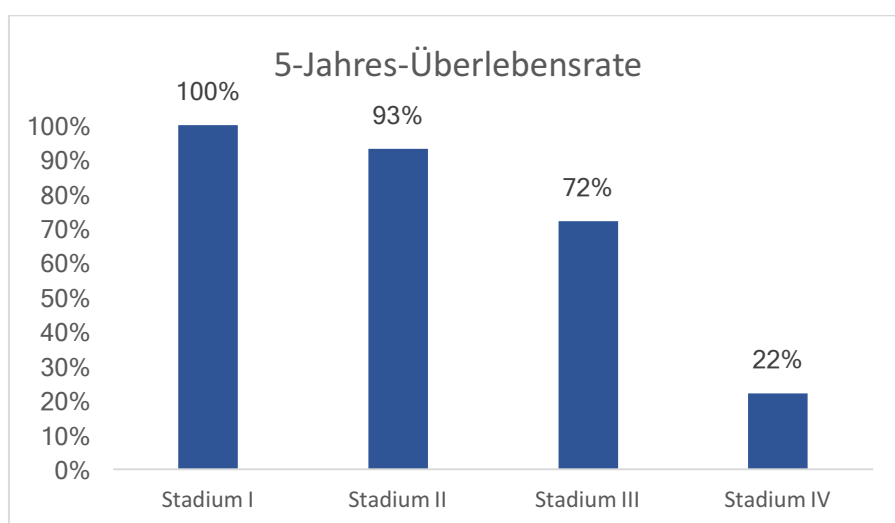


Abbildung 3: Stadienadaptierte 5-Jahres-Überlebensraten (Edge et al., 2010)

2.2 Klassifikation des Mammakarzinoms (WHO 2012)

Anhand der World Health Organisation (*WHO*)-Klassifikation von 2012 kann man das Mammakarzinom in verschiedene histopathologische Typen einteilen (Lakhani et al., 2012). Hier lässt sich das In-situ Karzinom vom invasiven Mammakarzinom abgrenzen (Tumorzentrum München, 2015).

2.2.1 In-situ Karzinom

Beim In-situ Karzinom findet sich im Gegensatz zum invasiven Karzinom eine intakte Myoepithelzellschicht, das heißt, noch keine Stromainvasion ins umliegende Gewebe und damit kein Risiko für eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung (Tumorzentrum München, 2015). Bei den nicht-invasiven In-situ Karzinomen wird zwischen dem duktalem Carcinoma in situ (*DCIS*) und dem lobulären Carcinoma in situ (*LCIS*) unterschieden, wobei das DCIS mit 90-95% den größeren Anteil der In-situ Karzinome ausmacht (Tumorzentrum München, 2015). Das DCIS wird mit ca. 20% im Mammographie-Screening-Programm unter allen erfassten Läsionen diagnostiziert (Kooperationsgemeinschaft Mammographie, 2015). Durch das flächendeckende Mammographie-Screening kann diese Form bereits in einem früheren Stadium diagnostiziert und dementsprechend behandelt werden (Kooperationsgemeinschaft Mammographie, 2015). Histologische Kriterien für ein DCIS sind eine erhöhte Epithelproliferation, ein Vorliegen von unterschiedlich ausgeprägten Zelltypen und die fakultative Tendenz zum Übergang in eine invasive Form (Tumorzentrum München, 2015).

Beim DCIS werden fünf Wachstumsmuster unterschieden: komedoform, kribriform, papillär, mikropapillär, solide und sich daraus ergebende Mischformen (Tumorzentrum München, 2015).

2.2.2 Invasives Karzinom

Im Gegensatz zum In-situ Karzinom zeichnet sich das invasive Karzinom durch die Fähigkeit zur Invasion aus, das heißt zur Penetration der Myoepithelschicht und der darunterliegenden Basalmembran. Diese Eigenschaft ist Voraussetzung für eine hämatogene bzw. lymphogene Metastasierung.

Mit 40-75% ist das ehemals als invasiv-duktral bezeichnete Karzinom, welches vom Epithel der Milchgänge ausgeht, der mit Abstand häufigste Typ. Da diese Form in keine andere, näher bezeichnete Kategorie passt, wird sie laut WHO seit 2012 auch als invasives Karzinom ohne speziellen Subtyp (no special type, NST) bezeichnet (Lakhani et al., 2012). Spezielle morphologische Subtypen sind mit 5-15% das invasiv-lobuläre (von Drüsenläppchenepithel ausgehend), mit 1-2% das tubuläre oder mit ebenfalls 1-2% das muzinöse (schleimproduzierende) Mammakarzinom (Tumorzentrum München, 2015). Aus all diesen Formen ergeben sich sowohl Mischtypen als auch verschiedene zytologische Wachstumsmuster, als Beispiele seien der klassische, der alveoläre, der solide, der siegelringzellige und der pleomorphe Subtyp genannt (Lakhani et al., 2012).

Die unterschiedlichen Typen mit ihren jeweiligen Wachstumsmustern unterscheiden sich neben ihrer Inzidenz auch in der Prognose und Therapie (Tumorzentrum München, 2015).

Abgesehen von der histopathologischen Form lässt sich das Mammakarzinom auch hinsichtlich seiner Größe und Ausbreitung in die TNM-Klassifikation (Edge et al., 2010) einteilen. Anhand dieser Klassifikation ergeben sich verschiedene Stadien, I-IV (Tabelle 1). Das Vorliegen von Fernmetastasen führt definitionsgemäß zur Einordnung in das Stadium IV und ist mit einem 5-Jahres-Überleben von nur 22% angegeben (siehe Abbildung 3) (Edge et al., 2010).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms, anhand TNM-Klassifikation (Edge et al., 2010)

UICC-Stadien	TNM
IA	T1 N0 M0
IB	T0-1 N1mi M0
IIA	T0-1 N1 M0, T2 N0 M0
IIB	T2 N1 M0, T3 N0 M0
IIIA	T0-2 N2 M0, T3 N1-2 M0
IIIB	T4 N0-2 M0
IIIC	T1-4 N3 M0
IV	T1-4 N0-3 M1

2.3 EMT

Die epitheliale-mesenchymale Transition (*EMT*) ist ein Prozess, bei dem eine epitheliale Zelle eine Konformationsänderung durchläuft, wobei sie einen mesenchymalen Phänotyp annimmt (Kalluri & Weinberg, 2009). Die spezifischen Eigenschaften der epithelialen Zelle, wie zum Beispiel die apikal-basale Polarität und die Zell-zu-Zell-Junktionen, gehen dabei verloren (Kalluri & Weinberg, 2009; Lamouille, Xu & Derynck, 2014). Als mesenchymale Zelle ist sie nun in der Lage zur Migration und Invasion und zeichnet sich außerdem durch eine verminderte Apoptoseinduktion aus (Kalluri & Weinberg, 2009). Aufgrund dieser Eigenschaften spielt die EMT eine große Rolle in den drei relevanten biologischen Prozessen, der Embryogenese, der Wundheilung und zuletzt in Neoplasien (Kalluri & Weinberg, 2009). Zentraler Effekt der EMT ist der Verlust von E-Cadherin (*Epitheliales Cadherin*), welches verantwortlich für die Adhärenz der Zell-zu-Zell-Kontakte ist, und die Steigerung der Transkription von N-Cadherin (*neuronales Cadherin*), Vimentin und Fibronectin. All diese mesenchymalen Marker machen ein Loslösen der Zelle aus einem Verband erst möglich.

Der umgekehrte Prozess wird als mesenchymale-epitheliale Transition (*MET*) bezeichnet (Kalluri & Weinberg, 2009). Dabei erfolgt die gesteigerte Ausbildung des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin und der Verlust der mesenchymalen Marker. Abbildung 4 zeigt die Veränderungen in der Zellmorphologie, die charakteristisch für die EMT bzw. MET sind.

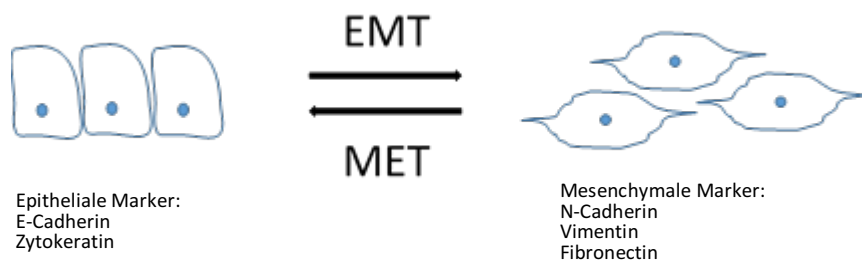


Abbildung 4: Morphologische Veränderungen der Zelle nach der EMT/MET mit Verlust der Polarität, Zell-zu-Zell-Junktionen und spindelförmigem Aussehen. Zusätzlich sind die typischen Marker für epitheliale bzw. mesenchymale Zellen angegeben.

Seit Langem weiß man, dass beide Prozesse, also EMT und MET, eine wichtige Rolle für die Entstehung und Ansiedlung von Fernmetastasen sind (Chaffer et al., 2006). Da Metastasen typischerweise wieder den epithelialen Phänotyp des Primärtumors annehmen, liegt es nahe, dass nach dem Prozess der EMT, der zu Beginn der Invasion stattfindet, am Ort der Metastase

der Prozess der MET abläuft, so dass die Bildung von Metastasen epithelial-glandulärer Morphologie möglich wird (Gunasinghe et al., 2012; Tran et al., 2014). Die genauen molekularen Mechanismen der Bildung und Ansiedlung von Metastasen in malignen Neubildungen sind sehr komplex und bei Weitem noch nicht verstanden.

2.4 Twist1

Eine zentrale Rolle in den Mechanismen der EMT und MET spielt der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor Twist1. Dieser inhibiert die Bildung von E-Cadherin und stimuliert die Bildung von N-Cadherin, wodurch ein Loslösen aus Zell-zu-Zell-Junktionen möglich wird. Daneben spielen auch die sogenannte Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Snail1, Snail2, Zeb1 und Zeb2 eine wichtige Rolle, die sich teilweise gegenseitig induzieren. Twist1 steigert die Expression von Snail2, welches seinerseits zur Förderung der EMT und damit zur Metastasenbildung führt (Casas et al., 2011).

Twist1 gilt als wichtiger Induktor der EMT in menschlichen Krebszellen. Im Mausmodell von Yang et al. konnte gezeigt werden, dass Twist1 über den Anstoß der EMT-Kaskade ein essentieller Faktor für die Bildung von Fernmetastasen in der Lunge ist (Yang et al., 2004).

Eine hohe Twist1-Expression steigert somit die Invasion und Metastasierung (Yang et al., 2004). Hohe Twist1-Level korrelieren außerdem mit dem Auftreten von invasiv-lobulären Mammakarzinomen, die über den Verlust von E-Cadherin zu einer hohen Invasivität tendieren (Yang et al., 2004).

Dabei ist der Ausprägungsgrad von Twist1 bei Tumorbeginn unabhängig von Tumorprogression und Metastasenbildung. Niedrige Twist1-Level scheinen relevant für die Tumorinitiation zu sein, während hohe Twist1-Level verantwortlich für Tumorprogression und Metastasierung sind (Jung & Yang, 2015).

2.5 WNT5A

Als Marker für die Twist1-Aktivität der Zelle kommt WNT5A zum Einsatz. WNT5A ist Teil der Wingless int-1-Familie (*WNT*) und spielt unabhängig von β -Catenin eine zentrale Rolle als Ligand im Signaltransduktionsweg der Zelle. Shi et al. konnten eine positive Korrelation der Twist- und WNT5A-Expression in Mammakarzinomen zeigen (Shi et al., 2014). Gleichzeitig führt

der Knockdown von Twist zu einer verringerten Expression von WNT5A und verstärkten Ausprägung eines epithelialen Phänotyps bei Verlust mesenchymaler Eigenschaften (Shi et al., 2014).

Die Hochregulierung von WNT5A ist mit aggressiveren Phänotypen von Tumoren der Mamma, aber auch der Lunge, Prostata und Haut assoziiert (Witze et al., 2008). Angelehnt an die Publikation von Schmidt et al. wurde in dieser Arbeit WNT5A als Marker für die Aktivität von TWIST1 herangezogen (Schmidt et al., 2015).

2.6 BRCA1

Das bekannte Tumorsuppressorgen Breast cancer 1 (*BRCA1*) spielt eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel der Brust, aber auch in anderem Gewebe. Es kodiert für ein Protein, welches für Reparaturmechanismen an geschädigter DNA verantwortlich ist. Bei einer Mutation dieses Genes gehen folglich die protektiven Eigenschaften verloren und es entsteht ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von malignen Tumoren (Tumorzentrum München, 2015).

Das Gen wurde erstmals im Jahre 1990 von Hall et al. beschrieben (Hall et al., 1990), woraufhin es schließlich vier Jahre später genauer identifiziert und zum ersten Mal geklont werden konnte (Miki et al., 1994).

BRCA1 befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 an Position 21 und kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein mit einer Länge von 1863 Aminosäuren (Yoshida & Miki, 2004). Zusammen mit einer Reihe von anderen Proteinen, z.B. BRCA2 und RAD51, geht es einen Komplex ein und ist damit in der Lage, DNA-Schäden zu detektieren und zu reparieren (Yoshida & Miki, 2004). Solche Schäden stellen beispielsweise Doppelstrangbrüche dar, welche durch ionisierende Strahlung oder durch Einwirkung verschiedener Toxine zustande gekommen sein können, aber auch durch Replikationsfehler in der Mitose. Mit diesen Funktionen spielt BRCA1 eine zentrale Rolle in einem Überwachungssystem, dem sogenannten BRCA1-associated genome surveillance complex (*BASC*) (Wang et al., 2000).

Schäden oder Deletionen am BRCA1 Gen führen demnach zu einem Funktionsverlust dieses Zellschutzsystems und damit zu einer größeren Entartungsgefahr. Dabei erkranken Trägerinnen von Keimbahnmutationen mit einem Lebenszeitrisiko von bis zu 80% an Brust- und bis zu 55% an Eierstockkrebs (Antoniou et al., 2003). Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit Mitte Vierzig

bis zu 20 Jahre früher als bei sporadisch auftretendem Brustkrebs (Antoniou et al., 2003). Es besteht zudem eine positive Korrelation zwischen Mutationsträgern und dem Auftreten von malignen Neubildungen des Pankreas und der Prostata (Yoshida & Miki, 2004).

Die Mehrheit der BRCA1-Mutations-assoziierten Mammakarzinome entwickeln sogenannte triple negative Karzinome (Mavaddat et al., 2012). Deren Zellen besitzen weder Östrogen-, Progesteron- noch Her2/Neu-Rezeptoren, weisen häufiger eine schlechte Differenzierung auf und sind aggressiver (Dent et al., 2007).

Durch Bai et al. konnte gezeigt werden, dass der Verlust von BRCA1 zur Aktivierung von Twist1 und folgender EMT-Kaskade führt, mit konsekutiver Steigerung des Potentials zur Tumorfornation. Dementsprechend korreliert die BRCA1-Expression invers mit der Expression von Twist1 (Bai et al., 2014).

Andererseits supprimiert BRCA1 durch Bindung an den Twist1-Promoter die Transkription von Twist1. Folglich hemmt das Tumorsuppressorgen BRCA1 über Supprimierung von Twist1 den Ablauf der EMT-Kaskade mit damit einhergehender Metastasierungstendenz (Bai et al., 2014). Die Interaktion wird in Abbildung 5 deutlich gemacht.

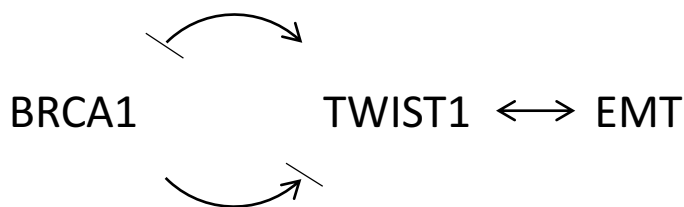


Abbildung 5: Knockdown von BRCA1 aktiviert TWIST1 und damit die EMT-Kaskade, gleichzeitig wird TWIST1 von BRCA1 supprimiert.

2.7 BRMS1

Der Breast cancer metastasis suppressor 1 (*BRMS1*) ist ein wichtiger Inhibitor der Metastasenbildung in malignen Neubildungen der Brust, Lunge, Leber, Ovarien und der Haut (Kong et al., 2015; Liu et al., 2014). Das Gen liegt auf Chromosom 11 und kodiert für ein hauptsächlich nukleäres Protein, bestehend aus 246 Aminosäuren. Es scheint verantwortlich für die Herunterregulierung des nukleären Faktors κ -B (*NF- κ B*) zu sein, einem wichtigen Transkriptionsfaktor der Zellproliferation (Cho et al., 2015).

Der Verlust von BRMS1 induziert somit die Bildung von mesenchymalen Phänotypen durch die NF- κ B-abhängige Expression von Twist1 (Liu et al., 2014) und steigert sowohl Invasion als auch Migration. BRMS1-Knockdown führt demnach zu Twist1-gesteuerter EMT-Progression und Metastasenbildung durch veränderte Genexpression von mesenchymalen Marken, wie N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin (Liu et al., 2014).

Andererseits inhibieren hohe BRMS1-Level die Expression von Twist1 mit der nachfolgenden EMT-Kaskade und Metastasierung (Liu et al., 2014). Neueste Studien zeigen eine Abschwächung der Progression maligner Zellen durch HIF-1 α gesteuerte Twist1-Inhibition, welche aus der BRMS1-induzierten Inhibition von NF- κ B und TGF- β 1 resultieren (Cho et al., 2015). Der Zusammenhang wird durch Abbildung 6 sichtbar.

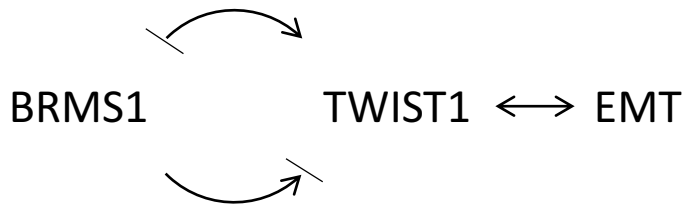


Abbildung 6: Verlust von BRMS1 aktiviert TWIST1 mit EMT-Kaskade, gleichzeitig supprimiert BRMS1 die Expression von TWIST1.

2.8 Fragestellung und Zielsetzung

Der Zusammenhang zwischen EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Twist1 in der Rolle als Tumorinitiator bzw. Progressionsfaktor ist nicht geklärt. Gerade für die Bildung der prognosebestimmenden Fernmetastasen, welche typischerweise einen epithelialen Phänotyp aufweisen, bleibt unklar, welche Prozesse sich genau abspielen. Aktuelle Studien zeigen, dass Twist1 sowohl für die EMT als auch MET eine wichtige Rolle spielt. Eine wichtige Voraussetzung für die Metastasenbildung scheint dabei eine dynamische Twist1-Aktivierung zu sein (Tsai et al., 2012).

Angelehnt an das transiente Twist1-Stimulationsmodell von HMLE-Zellen (Schmidt et al., 2015), werden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

- Kann in dem Modell durch alleinige Twist1-Stimulation die EMT-Kaskade ausgelöst werden?
- Wie verhalten sich BRCA1 und BRMS1 als wichtige Tumorsuppressor- bzw. Metastasensuppressorgene im Twist1-induzierten EMT-Programm?
- Wie wirken sich unterschiedliche Aktivitätszustände von Twist1 auf die BRCA1- bzw. BRMS1-Expression aus?
- Gibt es einen Unterschied zwischen kontinuierlicher und transientser Twist1-Stimulation?
- Was passiert nach Beendigung der Twist1-Stimulation auf zellulärer Ebene?
- Lassen sich daraus Rückschlüsse bezüglich Diagnostik, Prognostik und Therapie des Mammakarzinoms ziehen?

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Zellkulturmaterial

3.1.1.1 Flüssigkeiten und Feststoffe

Reagens	Produktnummer	Firma
4-Hydroxytamoxifen (<i>TAM</i>)	#H7904	Sigma-Aldrich
Benzonase	#1016540001	Merck
Blasticidin 10 mg/ml	#A1113903	Lifetechnologies
Bovine Serum Albumine	#A2153	Sigma
Dimethylsulfoxid (<i>DMSO</i>)	#D2650	Sigma-Aldrich
Ethanol 99%	#LC86572	Neolab
Fetal Calf Serum (<i>FCS</i>)	#S0115	Biochrom
Formaldehyd 3,7%	#27244	Fischar
Halt Protease Inhibitor Cocktail	#1862209	Thermo Scientific
HeLa-Zellen	#87110901	Sigma-Aldrich
Mammary Epithelial Cell Growth Medium (<i>MEGM</i>)	#C21010	Promocell
Methanol 100%	#46275	Roth
Mammalian Protein Extraktion Reagent (<i>M-Per</i>)	#78501	Thermo Scientific
Phosphat Buffered Saline (<i>PBS</i>)	#L1825	Biochrom
Penicillin Streptomycin (<i>PS</i>)	#15140122	Gibco
Trypanblau	#T8154	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA 1x (0,05%/0,02%)	#L2143	Biochrom
Trypsininhibitor 1x	#R007100	Gibco

3.1.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Einfrriermedium	9 ml FCS 1 ml DMSO

HMLE-Twist-ER-Medium	50 ml MEGM
	0,5 ml PS
	50 µl Blastocidin
Proteinlysispuffer	100 µl M-PER
	1 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail
TAM Stocklösung	0,2 mM in 99% Ethanol
Trypsininhibitor 0,1%	1 ml Trypsininhibitor
	9 ml PBS

3.1.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterial/Gerät	Produktnummer	Firma
96-Well Platte	#3598	Corning Incorporated
Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂		Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop		Zeiss
Hämazytometer		Bioanalytic
Hood		Thermo Scientific
Mikroskop		Zeiss
T25 Flasche Standard mit Belüftungskappe	#833910002	Sarstedt
T50 Flasche Standard mit Belüftungskappe	#833911002	Sarstedt
Testplatte	#92696	TPP
Wasserbad		Kottermann
Zellschaber	#541080	Greiner Bio-One
Zentrifuge	#CL3R	IEC

3.1.1.4 Kits

Kit	Produkt- nummer	Firma
OxiSelect DNA Double Strand Break (DSB) Staining Kit	#STA321T	Cell Biolabs

3.1.1.5 HMLE-Twist-ER

Die HMLE-Zelllinie, die bei folgenden Experimenten verwendet wurde, stammt ursprünglich aus normalem epithelialen Mammagewebe einer Brustreduktion, den HME (*Human mammary epithelial*) -Zellen (Elenbaas et al., 2001). Diese HME-Zellen wurden durch verschiedene molekulargenetische Methoden immortalisiert, welche von Elenbaas et al. beschrieben wurden (Elenbaas et al., 2001). Für die Immortalisierung wurden die Zellen durch retrovirale Genomintroduktion des SV40 (*Simian virus 40*) large T-Onkogens, von hTERT, einer Telomerase-Katalase, und des H-ras V12-Onkogens modifiziert (HMEC + SV40 LT + hTERT + H-ras V12 = HMLE). Als Modell für Experimente mit transduzierten Transkriptionsfaktoren, die eine große Rolle bei der EMT spielen, diente die zuvor beschriebene HMLE-Zelllinie (Elenbaas et al., 2001). Die immortalisierten HMLE-Zellen wurden mit einem Twist-Retrovirus transduziert, welcher zusammen mit einer modifizierten Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (*ER*) ein Fusionsprotein bildet (HMLE + TWIST + ER = HMLE-TWIST-ER) (Casas et al., 2011).

Dieses Fusionsprotein lässt sich durch Tamoxifen, einem Antiöstrogen induzieren (Casas et al., 2011). Bei den folgenden Versuchen wurde mit 4-Hydroxytamoxifen gearbeitet, einem potenteren Metaboliten von Tamoxifen (Cozy, Borgna & Rochefort, 1982).

Die HMLE-Twist-ER-Zellen wurden dankenswerterweise von einer kooperierenden Arbeitsgruppe um Dr. med. Christina Scheel bereitgestellt.

Zur Selektion der transduzierten Zellen wurde das Antibiotikum Blastocidin (10 µg/ml) verwendet. Dabei exprimieren die erfolgreich transduzierten Zellen neben dem Twistvektor ein Blastocidin-Resistenzgen. Zellen ohne den Vektor und damit ohne das Resistenzgen sterben unter der Blastocidinbehandlung ab, da Blastocidin die Proteinbiosynthese sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten inhibiert.

3.1.2 Labormaterialien

3.1.2.1 Flüssigkeiten und Feststoffe

Reagens	Produktnummer	Firma
Acrylamide, 30%	#1610158	Biorad

Agarose	#351020	Peqlab
Ammoniumpersulfat (APS)	#1610700	Biorad
Aqua Bidest	#21001	Kerndl
Beta-Mercaptoethanol	#M3148	Sigma
Borsäure	#20185260	VWR
Bovine Serum Albumine (BSA)	#A2153	Sigma
Bromphenolblau	#B0126	Sigma
DNA Sizer XIII, inkl. 6x Ladepuffer	#252170	Peqlab
Dithiothreitol (DTT)	#1610611	Biorad
EDTA, 0.5 M	#1861274	Thermo Scientific
Entwickler	#G150	Agfa
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	#22182	Roth
Fixierer	#G354	Agfa
Glycerin	#40431	Roth
HCl	#63311	Roth
K ₂ HPO ₄	#105104	Merck
KH ₂ PO ₄	#A1043	Appllichem
Light Cycler 480 Probes Master 2x	#4887301001	Roche
Marker/Protein Standard	#1610374	Biorad
Methanol 100%	#46275	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	#106404	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	#9913	Merck
Non-fat dry milk	#1706404	Biorad
Nukleasefreies Wasser	#AM9938	Ambion
Sodium dodecyl sulfalte (SDS)	#20765	Serva
Tris Borat EDTA-Puffer (TBE) 10x	#T44154L	Sigma
Tween 20	#8221840500	Merck

3.1.2.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<i>Proteinextraktion</i>	
Proteinlysispuffer	100 µl M-PER

	1 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail
<i>Gelelektrophorese</i>	
TBE 1x	1 ml 10x TBE 9 ml Aqua Bidest
<i>Western Blot</i>	
APS 10%	100 mg APS 1 ml Aqua Bidest
Blockierungslösung	5 g BSA/Non-fat dry milk 100 ml 1x TBS/PBS
DTT 10%	100 mg DTT 1 ml Aqua Bidest
Ladepuffer 4x	2 ml Tris-HCL 0,8 g SDS 4 ml Glycerin 4 ml Beta-Mercaptoethanol 1 ml EDTA 8 mg Bromphenolblau bis zu 10 ml Aqua Bidest
Laufpuffer	70 ml Tris-Glycin-SDS-Buffer 630 ml Aqua Bidest
LB-DTT	100 µl 4x Ladepuffer 10 µl DTT 10%
PBS 10x, pH 7,4	5,44 g KH ₂ PO ₄ 27,86 g K ₂ HPO ₄ 90 g NaCl Bis zu 1000 ml Aqua Bidest
Sammelgelpuffer 4x, pH 6,8	3,51 g Tris-HCl 0,335 g Tris-Base 0,2 g SDS 200 µl Temed bis zu 50 ml Aqua Bidest
TBS 10x, pH 7,5	87,8 g NaCl 68,5 g Tris-HCl

	9 g Tris-Base
	Bis zu 1000 ml Aqua Bidest
TBS/PBS 1x	100 ml 10x TBS/PBS
	900 ml Aqua Bidest
TBS/PBS-Tween	1 l 1x TBS/PBS
	1 ml Tween 20
Transferpuffer, pH 9	6,19 g Borsäure
	1600 ml Aqua Bidest
	400 ml Methanol 100%
	2 g SDS
Trenngelpuffer 4x, pH 8,8	3,69 g Tris-HCl
	15,39 g Tris-Base
	0,4 g SDS
	400 µl Temed

3.1.2.3 Primer und Sonden

Primer	Exon	UPL-Sonde	Basenfolge	Produktnummer	Firma
<i>Referenzgene</i>					
DDX24	Exon 2 F1	66	TCCGTGACAAACTGGACATC	NM_020414	TIB Molbiol
	Exon 3 R1		TGGCAAAGGCAAGAGTTTTTC		
REEP5	Exon 4 F1	4	TGCAGATGCCATCACTAAAGA	NM_005669.4	TIB Molbiol
	Exon 5 R1		CATCAAGCTCCAGTAGGAAGGT		
<i>Andere Gene</i>					
BRCA1	Exon 14 F1	25	AAGAGGAGCTCATTAAGGTTGTTG	NM_007294.3	TIB Molbiol
	Exon 15 R1		GATTCCAGGTAAGGGTTCC		
BRMS1	Exon 8 F1	65	GTACATGCTTCAAGAGATCGACA	NM_015399.3	TIB Molbiol
	Exon 10 R1		TGAACAGCAGGGTCAAGGT		
WNT5A	Exon 1 F1	Sybr Green	GCTCGGATTCTCGGCT	NM_003392.4	TIB Molbiol
	Exon 2 R1		CAAAGCAACTCCTGGGCTTA		

UPL-Sonde	Basenfolge	Produktnummer	Firma
#4	CTTCCTGC	#04685016001	Roche
#25	TGGAGGAG	#04686993001	Roche
#65	CTGGAGGA	#04688643001	Roche
#66	GGCTGCTG	#04688651001	Roche

3.1.2.4 Kits und Sets

Kit/Set	Produktnummer	Firma
BCA Protein Assay	#23225	Thermo Scientific
BSA Standard Set	#5000207	Biorad
ECL Western Blotting Analyse System	#RPN2108	Amersham, GE Healthcare
miScript RT Kit	#218161	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit	#218073	Qiagen
Rnase freies Dnase Set	#79254	Qiagen
Rneasy Mini Kit	#74104	Qiagen

3.1.2.5 Antikörper

Antikörper	Produktnummer	Firma
Beta-Aktin	#A5441	Sigma
BRCA1	#ab94/#ab131360	Abcam
BRMS1	#ab134968	Abcam

3.1.2.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterial/Gerät	Produktnummer	Firma
96-Well Platte	#04729692001	Roche
Elisa Reader		Varioskan
Filmkassette		Agfa

Filterpapier	#1703932	Biorad
Hyperfilm ECL	#28906835	Amersham, GE Healthcare
Light Cyclor 480		Roche
Mini Protean Tetra Cell	#1658003EDU	Biorad
Mini Trans Blot Cell	#1703930	Biorad
Perfect Blue Gelsystem Mini ExM	#PEQL400911	PeqLab
Perfect Blue Semi Dry Electro Blotter		Peqlab
Plattenzentrifuge		Hettich
PVDF Membran	#1620177	Biorad
Roller	#RM5	Cat
Schüttler		Labnet
Spectrophotometer Colibri		Titertek Berthold
Stromgerät		Biorad
Thermo Cyclor		Applied Biosystems
Tischzentrifuge		Eppendorf
UV-Transilluminator		Alpha Innotech

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

3.2.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

3.2.1.1.1 Zellzählung

Durch die Zellzählung wurde die genaue Einsaat einer bestimmten Zellzahl ermöglicht, welche die Voraussetzung für optimale Bedingungen für weitere Arbeitsschritte war.

Vor der Einsaat bzw. nach Kultivierung wurden die Zellen trypsinisiert, 5 Minuten (*min*) bei 300 Umdrehungen pro Minute (*rpm*) zentrifugiert und in 1 Milliliter (*ml*) Medium resuspendiert. Die Neubauer Zählkammer wurde nach der Reinigung mit einem Hämazytometer versehen. In eine Testplatte wurden 45 Mikroliter (μ l) Trypanblau vorgelegt und mit 5 μ l der Zellsuspension gemischt. Von dieser Trypanblau-Zellsuspension wurden 5 μ l zur Befüllung der Neubauer Zählkammer verwendet.

Unter dem Mikroskop konnte bei 10-facher Vergrößerung anschließend die Zellzahl folgendermaßen ermittelt werden:

Zellzahl/ml: Mittelwert aus den 4 großen Quadraten $\times 10^4 \times 10$ (Verdünnung durch Trypanblau)

3.2.1.1.2 Einfrieren und Kultivierung

Die zuvor trypsinisierte und zentrifugierte Zellsuspension aus einer T25-Flasche wurde mit 1 ml des Einfriermediums versehen und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. im Stickstoff gelagert.

Zur Kultivierung wurde die tiefgefrorene Zellampulle 2 min im Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut, anschließend mit 5 ml Medium gemischt, 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und in 5 ml neuem Medium in eine T25 Flasche überführt. Nach optischer Kontrolle konnte die Flasche in den Brutschrank (37°C , 5% CO_2) gestellt werden.

3.2.1.1.3 Trypsinierung

Die Trypsinierung in der Zellkultur diente zum Passagieren von adhärennten Zellen, wonach sie entweder rekultiviert oder geerntet werden konnten. Das Kulturmedium aus der Kulturflasche wurde komplett verworfen, wonach ein Waschschrift mit PBS folgte. Anschließend wurde Trypsin/EDTA (T25: 1ml, T75: 2ml) hinzugegeben und für 3-30 min im Brutschrank inkubiert. Nach optischer Kontrolle wurden die Zellen durch leichtes Abklopfen der Flasche vom Flaschenboden gelöst, mit 1 bzw. 2 ml (äquivalent zur Menge des Trypsins) Trypsininhibitor versetzt und 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte nun mit dem entsprechenden Medium gelöst und weiterverarbeitet werden.

3.2.1.2 Tamoxifenstimulation

Die Tamoxifenstimulation erfolgte in drei verschiedenen Ansätzen, angelehnt an das Stimulationsmodell von Schmidt et al. (Schmidt et al., 2015). Bei der Kurzzeitstimulation (*KU-Stimulation*) wurden die Zellen durch eine tägliche Tamoxifenzugabe von einer Endkonzentration von 20 nM (*Nanomol*) insgesamt 72 Stunden (*h*) lang mit Tamoxifen behandelt. Die Langzeitstimulation (*LA-Stimulation*) beinhaltete zum einen die kontinuierliche Tamoxifenbehandlung über 15 Tage, zum anderen erfolgte nach kontinuierlicher Tamoxifenstimulation eine anschließende Tamoxifenabstinenz von 10 Tagen, ebenfalls mit einer Tamoxifenendkonzentration von 20nM. Beide Ansätze wurden in Triplikaten mit entsprechenden Kontrollen, die mit PBS versetzt wurden, hergestellt. Abbildung 7 zeigt einen Überblick über die Ansätze der Tamoxifenstimulation.

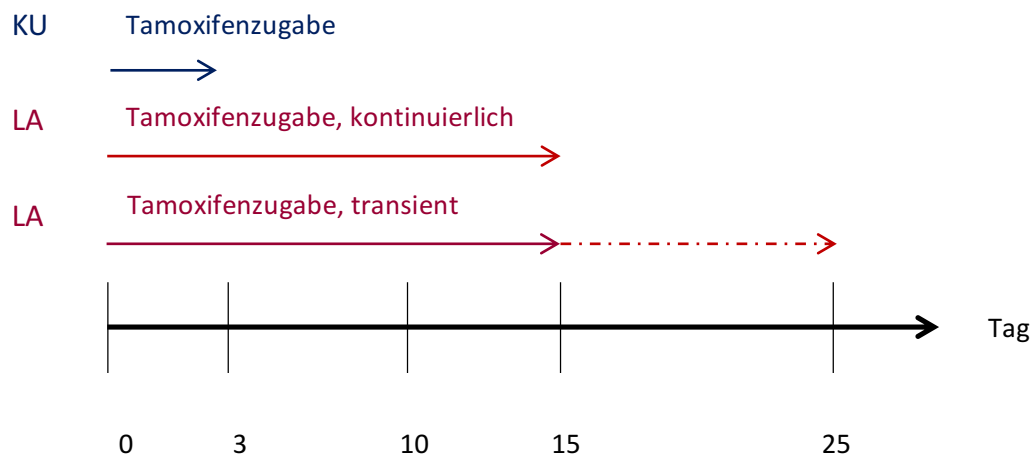


Abbildung 7: Ansätze zur Tamoxifenstimulation. Kurzzeitstimulation mit dreitägiger Stimulation. Langzeitstimulation mit kontinuierlicher Stimulation über 15 Tage und LA-Stimulation mit transienter Stimulation.

3.2.1.3 RNA- und Proteinextraktion

Für die Ribonukleinsäuren (*RNA*)-Extraktion aus Zellkulturmaterial wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS trypsiniert, zentrifugiert und standen danach bereit für weitere Schritte (RNA-Isolation siehe 3.2.2.1).

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen gewaschen, mit Proteinlysispuffer versetzt (70 μ l für eine T25-Flasche, 200 μ l für eine T75-Flasche) und mit einem Zellschaber abgekratzt. Nachdem sie in ein 1,5 ml Gefäß überführt wurden, erfolgte die Mischung bei 4 °C auf einem Schüttler für 30 min. Im Anschluss wurde Benzonase hinzugefügt (0,024 x Volumen in μ l der Probe = Benzonase in ml) und für weitere 15 min bei 4°C gemischt. Zuletzt wurden die Proben 15 min bei 4°C mit 16000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss standen sie bereit für die Proteinkonzentrationsbestimmung.

3.2.1.4 Doppelstrangbruchassay

Auf Desoxyribonukleinsäuren (*DNA*)-Schädigungen, die zu Doppelstrangbrüchen führen, folgt die Phosphorylierung des Histons H2AX, eine Form aus dem Histonkomplex der H2A-Familie. Dieses phosphorylierte Histon γ -H2AX induziert sämtliche weitere Schritte, welche zur DNA-Reparatur führen (Kuo & Yang, 2008). Durch Antikörper-Markierung von γ -H2AX lässt sich auf

verschiedene Aktivierungszustände von γ -H2AX rückschließen und damit auf die Reaktionen der Zelle auf Doppelstrangbrüche.

100 μ l einer Zellpopulation von 5×10^5 Zellen wurden in eine 96-Well-Platte eingesät und über Nacht inkubiert. Dabei wurden jeweils Duplikate von drei Kontrollgruppen und Duplikate von drei LA-tamoxifenbehandelten Zellpopulationen verwendet.

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen eine Stunde mit Etoposid (20nM in Methanol, verdünnt zu 1:200 in HMLE-Twist-ER-Medium) inkubiert. Etoposid (enthalten im Oxiselect DNA DSB Staining Kit) ist ein Zytostatikum, welches durch Hemmung der Topoisomerase und durch Herbeiführen von DNA-Doppelstrangbrüchen die Zytokinese supprimiert. Anschließend wurden die Zellen laut Herstellerprotokoll fixiert, lysiert, gewaschen und mit einem Anti-H2AX-Antikörper (enthalten im Oxiselect DNA DSB Staining Kit) versetzt. Nach weiteren Waschschrritten erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Fluoreszin-Antikörper (FITC-konjugierter AK, enthalten im Oxiselect DNA DSB Staining Kit).

Die Zellen wurden hinterher bei 1000 Millisekunden (*ms*) Belichtungszeit mit dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

3.2.1.5 Auswertung des Doppelstrangbruchassays

Die Zellfluoreszenz wurde mit Hilfe des Programmes Image J, Version 1.51, gemessen. Dabei erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz der gesamten Bildfläche. Anhand drei biologischer Replikate wurde der Mittelwert der behandelten Gruppen mit dem der Kontrollen verglichen.

3.2.2 Labormethoden

3.2.2.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA-Isolation von Zellkulturmaterial erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit. Dabei wurden die Zellproben mit einem RNA-Lysepuffer (Rneasy Mini Kit, Qiagen) und β -Mercaptoethanol gelöst. β -Mercaptoethanol verhindert die Zersetzung der RNA durch RNasen. Anschließend wurden die Proben gewaschen und mit einem DNase-Mix (10 μ l DNase I + 70 μ l Puffer RDD, aus RNase free DNase Set) behandelt, um eine Verunreinigung durch DNA zu vermeiden. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde die RNA mit 30-50 μ l nukleasefreiem Wasser gelöst. Im Anschluss konnte die finale RNA-Konzentration gemessen werden.

3.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsmessung der zuvor isolierten RNA erfolgte mit einem Spektrophotometer. Dabei wurden 1,2 µl der RNA auf den Messbereich pipettiert. Der Nullabgleich erfolgte zuvor mit der gleichen Menge an nukleasefreiem Wasser. Mit Bestimmung der Ratio aus der Wellenlänge von RNA und DNA (260nm/280nm) wurde eine Verunreinigung durch zu viel DNA ausgeschlossen. Dabei sollte die Ratio um den Wert 2 (1,9-2,1) liegen.

3.2.2.3 cDNA-Synthese

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) ließ sich anhand einer Vorlage von RNA komplementäre DNA (cDNA) herstellen. Für diese Reaktion wurde das miScript RT Kit verwendet. Die Reaktion fand dabei mit einer Menge von 500 ng Gesamt-RNA statt. Pro Einzelreaktion benötigte man nun 500ng der RNA, die mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl angepasst wurde, 4 µl des 5x HiFlex Buffers, 2 µl des 10x Nucleis Mixes und 2 µl des Reverse Transcriptase Mixes (enthalten im miScript RT Kit). Mit einer Gesamtmenge von 20 µl lief im Thermo Cycler folgendes Programm ab:

Tabelle 2: Programm der RT-PCR im Thermo Cycler

	Temperatur (in °C)	Zeit
Stadium I	37	60 min
Stadium II	95	5 min

Die Reaktionslösung wurde im Anschluss mit 180 µl nukleasefreiem Wasser auf den Faktor 1:10 verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.4 Quantitative PCR (qPCR)

Mit Hilfe von cDNA, Primern, Sonden, Nukleotiden und einer hitzestabilen DNA-Polymerase ließen sich Replikate eines bestimmten Ausgangsdoppelstrangs herstellen.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte grundsätzlich in 3 Schritten. Nach der Denaturierung folgte die Hybridisierung, in Folge derer es zur Kettenelongation kam.

Während der Denaturierung wurden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei DNA-Strängen durch Hitzeeinwirkung getrennt. Danach erfolgte durch schnelles Abkühlen eine Anlagerung der spezifischen Vorwärts (*F*)- und Rückwärts (*R*)-Primer an einen DNA-Einzelstrang mit übereinstimmender Basenfolge. Im Anschluss fand die Kettenelongation statt, bei der die DNA-Polymerase von den Primern aus beginnend die passenden Nukleotide analog zum gegenläufigen Einzelstrang verband. Nach entsprechend vielen Zyklen entstand ein Vielfaches des zu analysierenden Zielgens. Ursprünglich konnten mit der qPCR lediglich die entstandenen Endprodukte durch die Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Durch neueste Techniken lässt sich mittlerweile mit Hilfe von Fluoreszenz die Produktionsphase nachvollziehen. Dafür wurden in vorliegender Arbeit zwei Methoden verwendet.

Fluoreszenzmessung mit UPL-Sonden

Eine Quantifizierung wurde durch das Hinzugeben von Sonden aus der UPL-Datenbank (*Universal Probe Library, Roche*) möglich gemacht. Diese Sonden sind farbstoffbeladene LNA-Moleküle (*Locked nucleic acid*), welche mit einer kurzen Sequenz von 8-9 Nukleotiden sehr stark an die entsprechende Basenfolge eines Einzelstranges des durch die Primer begrenzten Amplifikats binden. Durch Fluoreszenzzunahme können sie vom Light Cycler 480 registriert werden.

Zu einer quantitativ messbaren Polymerasen Kettenreaktion benötigte man nun 5 µl des 2x Light Cycler 480 Probes Masters, jeweils einen F- und R-Primer, die spezifische UPL-Sonde (0,15 µM) und bis zu einem Volumen von 8 µl entsprechend nukleasefreies Wasser. Durch Zugabe von 2 µl cDNA erhielt man ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Well. Eine Negativkontrolle in Triplikaten diente dabei zum Ausschluss von Verunreinigungen.

Das entsprechende Programm am Light Cycler 480 ist in Tabelle 3 gezeigt:

Tabelle 3: Programm der qPCR mit UPL-Quantifizierung

	Zyklen	Temperatur (in °C)	Zeit
Denaturierung	1	95	10 min
Hybridisierung	45	95	10 s
		60	15 s
		72	1 s
Elongation	1	40	1 s

Sowohl die Durchführung der qPCR als auch die Auswertung der Ergebnisse erfolgte gemäß der MIQE Guidelines (Bustin et al., 2009; Hellemanns et al., 2007). Dabei wurden die CP (*crossing point*) -Werte in folgende Formel eingetragen:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}}^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}{\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}}^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}} \quad (\text{Pfaffl, 2001})$$

Fluoreszenzmessung mit Sybr Green

Analog dem Grundprinzip einer qPCR (siehe 3.2.2.4) konnte die Expression von bestimmten Genen auch auf eine andere Weise gemessen werden. Hierfür kam der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zum Einsatz. Dieser bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und wird durch seine Fluoreszenzzunahme vom Light Cycler 480 registriert. Jedoch kann eine Bindung an PCR-Produkte aber auch an unspezifische Verunreinigungen erfolgen. Um Letzteres auszuschließen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Doppelsträngige, spezifische PCR-Produkte resultieren dabei in einem einzelnen definierten Peak in der Schmelzkurve. Im Gegensatz dazu zeigen unspezifische DNA-Fragmente hiervon abweichende Schmelzpunkte. Bei sichtbaren Verunreinigungen wurde die RNA-Extraktion wiederholt.

Mit Hilfe des SYBR Green Sets von Roche ließ sich das Zielgen WNT5A quantifizieren. Dabei wurden 5 µl des SYBR Green Mix mit der jeweils bestimmten Konzentration des F- und R-Primers und mit bis zu 8 µl entsprechend nukleasefreiem Wasser versetzt. Das entsprechende Programm am Light Cycler 480 war folgendermaßen zusammengesetzt:

Tabelle 4: Programm der qPCR mit SYBR Green-Quantifizierung

	Zyklen	Temperatur (in °C)	Zeit
Denaturierung	1	95	15 min
Hybridisierung	40	94	15 s
		55	30 s
		70	30 s
Elongation	1	40	1 s

Primersuche und -auswahl

Die Primersuche und -auswahl wurde laborintern von Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter mit Hilfe der Profinder Software im Assay Design Center (<https://lifescience.roche.com>) übernommen.

Dort wurde sichtbar, für welche Gene geeignete Primer mit entsprechender Sonde verfügbar sind. Falls dies nicht der Fall war, wie z.B. für das Gen WNT5A, konnte ein alternatives Design über die Sybr Green- Quantifizierung mithilfe der Primer3 Software (<http://primer3.ut.ee>) und des qPrimerdepots (<https://primerdepot.nci.nih.gov>) vorgenommen werden.

Eine wichtige Eigenschaft beim Design der Primer war das Vorhandensein des sogenannten Intronspanning. Dabei liegen die Primer in benachbarten Exonen und schließen ein Intron mit ein. In der mRNA wird dieses Intron herausgespliced und es entsteht ein, im Vergleich zur genomischen DNA, deutlich kürzeres PCR-Produkt.

Referenzgene

Die Referenzgene dienen zur Normalisierung einer qPCR, da sie in allen untersuchten Zellen unabhängig von deren Behandlung relativ stabil sind. Dadurch ergab sich eine Bezugsgröße zum Abgleich der analysierten Zielgene, welche im Vergleich zum Referenzgen erhöht, erniedrigt oder unverändert sein konnte. Referenzgene sind typischerweise für die Aufrechterhaltung des grundlegenden Zellstoffwechsels verantwortlich (Eisenberg & Levanon, 2013).

Als Referenzgene wurden bei allen qPCR-Analysen REEP5 (*Receptor accessory protein 5*) und DDX24 (*Dead Box Helicase 24*) benutzt, da sich ihre Expression als stabil erwies. Die Auswahl der Referenzgene erfolgte laborintern anhand der von Eisenberg und Levanon publizierten Liste und des NormFinder Algorithmus (Andersen, Jensen & Orntoft, 2004; Eisenberg & Levanon, 2013).

Primertestung

Für quantitative Analysen verschiedener Referenz- und Zielgene war die Austestung der Konzentration, Effizienz und Spezifität der entsprechenden Primer die entscheidende Voraussetzung, um optimale Bedingungen für den Ablauf einer qPCR zu gewährleisten.

Konzentration

Die optimale Primerkonzentration wurde mit Hilfe der qPCR bestimmt.

Zur Austestung der Primer wurden verschiedene Kombinationen aus den möglichen Primerkonzentrationen gegeneinander aufgetragen, jeweils 0,3, 0,5, 0,75 und 1 μ l pro F- und R-Primer. Je 96-Well Platte war es demnach möglich, 6 verschiedenen Gene zu testen.

Entscheidend für die optimale Konzentration war nun der niedrigste CP-Wert, da dieser anzeigte, wie geeignet die Bedingungen für den Ablauf der qPCR waren. Je besser die Bedingungen waren, desto früher konnte die Amplifikation starten. Bei gleicher Ausgangs-cDNA-Konzentration wurden so die optimalen Bedingungen, also die Konzentration der jeweiligen Primer, für den Ablauf der qPCR erprobt.

Effizienz

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wurden die Primer mit ihrer optimalen Konzentration in Duplikaten auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Als cDNA Probe diente eine Reihe aus 6 Verdünnungen mit den Faktoren 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ und $\frac{1}{32}$. Die verwendete cDNA sollte dabei eine Mischung aus möglichst vielen verschiedenen Mamma-Zellproben sein, um zu gewährleisten, dass dieses Gemisch auch das Zielgen enthält. Pro 96-Well Platte ließ sich so die Effizienz von 8 Genen testen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve am Light Cycler 480. Deren Steigung wurde in folgende Formel eingesetzt: Effizienz $E = (10^{-1/\text{Steigung}} - 1) \times 100$

Daraus ließ sich die Effizienz E und der Fehler (Error) berechnen. Eine optimale Effizienz sollte um den Faktor 2 (1,9-2,1) liegen, da dieser den Anstieg des PCR- Produktes mit jedem Zyklus beschreibt. Bei optimaler Effizienz stiegen die Produkte demnach pro Zyklus um das Doppelte an.

Spezifität: Agarose- Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose- Gelelektrophorese ließ sich die Spezifität der Primer testen. Durch diese Methode wurden DNA-Fragmente mittels eines elektrisch angelegten Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht. So sollte bei einem spezifischen Primerpaar nur eine Bande auf dem Gel sichtbar sein. Bei unspezifischen Primern wurde die RNA-Extraktion wiederholt.

Für ein 2% Agarosegel wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TBE gelöst, aufgeköcht, mit 3 µl Ethidiumbromid (Stocklösung 10 µg/µl) versetzt und in eine vorgefertigte Gießapparatur gegossen. Zur Aussparung von Taschen wurde ein Kamm eingesetzt und anschließend mindestens 30 Minuten gewartet, bis die Agarose auspolymerisiert war. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer, mit 1x TBE gefüllt, positioniert. Die PCR-Produkte der Primerkonzentrationstestung wurden mit 6x Ladepuffer (enthalten im DNA Sizer XIII Set) versetzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt (V) für 30-60 Minuten durchgeführt. Abschließend wurde das Gel mit einem UV-Transilluminator dokumentiert.

3.2.2.5 Western Blot

Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Expression bestimmter Gene auf Proteinebene zu analysieren, bedarf es einer Konzentrationsbestimmung der zuvor in der Zellkultur herangezüchteten und extrahierten Proteine. Für das kolorimetrische Verfahren wurde mit Hilfe des BCA Protein Assays (Smith et al., 1987) und des BSA Standard Sets eine Eichkurve (Standards in Duplikaten) erstellt. 10 µl eines Standards bzw. des Proteinlysates wurden mit 200 µl der Working Reagent Lösung (Reagenz A und Reagenz B, Verhältnis 50:1) versetzt, gemischt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Konzentration der Proteinlysate wurde danach unter Erstellung einer Standardkurve mit Steigung und Achsenabschnitt berechnet.

SDS-Page

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (*SDS-Page*) wurde zur Analyse von Proteinen eingesetzt (Lämmli, 1970). Dabei kam als Trennmedium ein Gel aus Acrylamid und SDS zum Einsatz. Durch das SDS wurde die bilaterale Ladung der Proteine überdeckt und einheitlich negativ. Der Prozess des Aufkochens und damit der Denaturierung der Proteine sorgte zusammen mit der negativen Ladung zu einer Linearisierung, durch welche anschließend eine Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld erfolgte.

Das SDS-Page Gel bestand aus zwei Komponenten:

Trenngel: für ein 10%-iges Acrylamid-Gel wurden 4,1 ml Aqua Bidest, 2,5 ml Trenngelpuffer SP und 3,3 ml Acrylamid gemischt, entgast und anschließend mit 100 µl APS 10% versetzt. Je nach Proteingröße wurde der Anteil des Acrylamids variiert (für folgende Experimente zwischen 8 und 16%). Für größere Proteine eignete sich ein niedrigprozentiges Gel (8%), wie zB. für BRCA1 mit 220 kD, für kleinere Proteine, zB. BRMS1 mit 28 kD, ein höherprozentiges (16%). Je größer der Acrylamidanteil, desto kleiner die Poren, also desto besser erfolgte die Auftrennung der kleinen Proteine.

Das Trenngel wurde zwischen zwei gereinigten und getrockneten Glasplatten blasenfrei pipetiert (enthalten im Mini Protean Tetra Cell, 1mm Abstand), mit Aqua Bidest überlagert und ca. 45 min polymerisiert. Das Wasser wurde anschließend abgekippt und die Reste mit Filterpapier vorsichtig entfernt.

Sammelgel: für ein 4,5%-iges Sammelgel wurden 3,05 ml Aqua Bidest, 1,25 ml Sammelgelpuffer und 0,66 ml Acrylamid gemischt, entgast und mit 25 µl APS 10% versetzt.

Auf das feste Trenngel wurde im Anschluss zwischen die zwei Glasplatten das Sammelgel pipetiert, in welches rasch der Probenkamm eingesetzt werden musste. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min konnte das Gel weiterverwendet werden bzw. bei 4°C für wenige Tage im Kühlschrank gelagert werden.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinextrakte durch Mischung mit LB-DTT auf eine einheitliche Konzentration von 25 ng gebracht, um einen Vergleich anstellen zu können. Anschließend wurden die Proteine zentrifugiert und 5 min bei 100°C im Thermocycler denaturiert. Als Positivkontrolle dienten in allen Experimenten Proteinextrakte aus HeLa-Zellen¹, einer unsterblichen Zelllinie, die ursprünglich aus dem Gewebe eines Zervixkarzinoms stammt (Skloot, 2010). Durch die Positivkontrolle wurde sichergestellt, dass das Experiment sachgemäß abläuft, also bei positiver Kontrolle auch negative Ergebnisse richtig gewertet werden konnten.

Das Gel wurde in den Tank (enthalten im Mini Trans-Blot Cell) eingespannt, mit 700 ml Laufpuffer gefüllt, und mit einem Rührfisch und Kühlakkus auf einem Rotor positioniert.

Daraufhin wurden sowohl die Proben als auch 8 µl des Markers vorsichtig in die, durch den Kamm geformten, Geltaschen pipetiert. Bei einer konstanten Stromstärke von 0,04 A für eine

¹ HeLa: Abkürzung für Henrietta Lacks (Skloot, 2010)

Stunde fand die Gelelektrophorese statt, wobei die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wanderten. Kleine Proteine wanderten weiter, größere Proteine wurden zurückgehalten.

Semi Dry

Das Semi Dry Blotting Verfahren wurde für Proteine bis zu einer Größe von ca. 180 kD verwendet. Dabei wurden die Proteine von dem Gel auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert, also „geblottet“. Der Transfer erfolgt hierbei durch Anlegen einer elektrischen Spannung mit einem halbtrockenen Verfahren (semi-dry). Durch die negative Ladung der Membran hafteten die ebenso negativ geladenen Proteine an der Membranoberfläche und konnten anschließend sichtbar gemacht werden.

Das Blotting Papier diente als Filter und wurde in sechsfacher Ausführung für ca. 30 min in Transferpuffer auf einem Schüttler angefeuchtet. Die stark hydrophobe PVDF- Membran (Bio-rad) wurde zunächst mit einem Bleistift markiert, danach für 5-10 min in 100% Methanol aktiviert und hinterher ebenso für ca. 20 min in Transferpuffer inkubiert, um einen optimalen Transfer zu gewährleisten.

Das SDS-Page-Gel wurde im Anschluss vorsichtig aus den Glasplatten herausgenommen und das Stacking Gel entfernt.

Zwischen jeweils 3 Filterpapiere oben und unten wurde das Gel auf der Membran positioniert, die Markierung auf der Membran diente dabei als Orientierung (siehe Abbildung 8).

Nachdem sämtliche Luftblasen zwischen den Schichten sorgfältig ausgestrichen wurden, konnte der Transfer gestartet werden.

Mit dem Perfect Blue Semi-Dry Electro Blotter und dem Stromgerät wurde ein elektrisches Feld mit niedriger Spannung angelegt. Für ein Gel wurde die Stromstärke konstant bei 0,1 A gehalten. Abhängig von der Größe des entsprechenden Proteins lief der Transfer zwischen 30 min (Proteine bis zu 60kD) und einer Stunde (größer als 60kD).

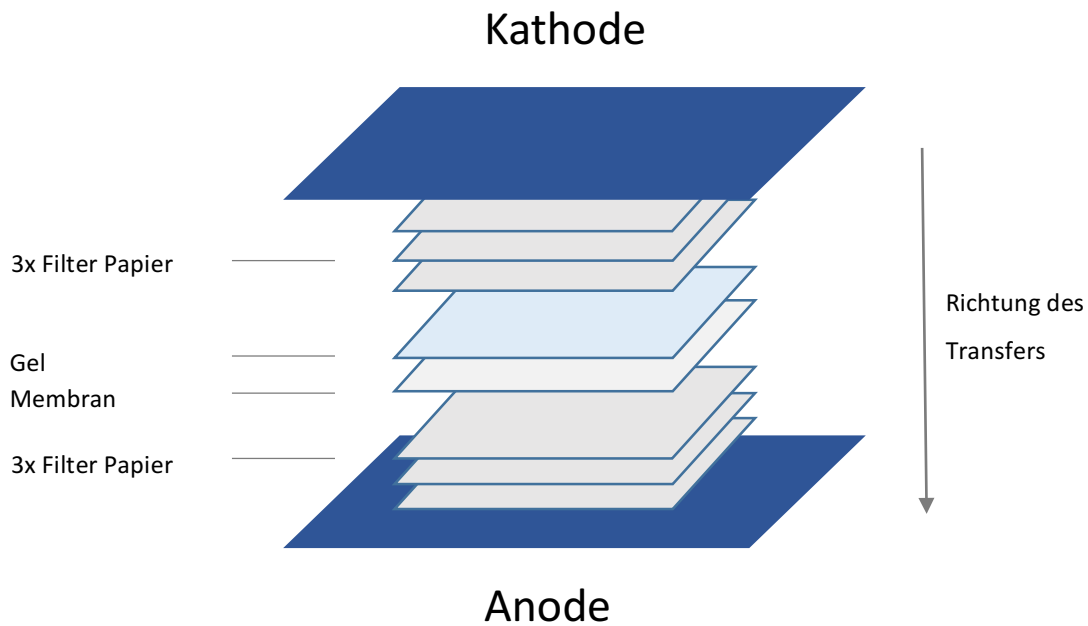


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Semi-Dry-Blots.

Tank Blot

Das Tank Blot Verfahren kam bei Proteinen zum Einsatz, welche größer als 180 kD waren. Analog zum Prinzip des Semi-Dry Blots wurden dabei auch Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Membran transferiert, im Gegensatz zur halbtrockenen Methode jedoch in einem mit Transferpuffer gefüllten Tank.

Die Vorbereitung des Filterpapiers (für den Tankblot wurden 4 Stück benötigt) und der PVDF-Membran erfolgte entsprechend der des Semi-Dry Blots. Zusätzlich wurde das SDS-Page Gel für 15 min in Transferpuffer äquilibriert.

Anschließend wurden Membran und Gel zwischen jeweils zwei Filterpapiere und ein Faserpolster positioniert und in der Tank Blot Kassette eingespannt (beides enthalten im Mini Trans-Blot Cell). In das Modul wurde die Kassette mit der Membranseite in Richtung Anode eingesetzt, mit Transferpuffer, Kühlakkus und Rührfisch aufgefüllt und in einer Eiswanne auf den Rotor platziert. Das Modul wurde über Kabel mit dem Stromgerät konnektiert. Für ca. 1 Stunde wurde eine konstante Spannung von 100 V eingestellt. Alternativ konnte der Transfer auch über Nacht bei konstanten 10-30 V in der Kühlkammer bei 4°C erfolgen.

Antikörperinkubation und -detektion

Nach dem erfolgreichen Transfer der Proteine vom SDS-Page Gel auf die PVDF-Membran fand anschließend die Antikörperinkubation und -detektion statt.

Die Proteinbanden auf der Membran wurden mit spezifischen Antikörpern identifiziert und sichtbar gemacht. Zuerst banden die spezifischen Primärantikörper an die entsprechende Region des Proteins. Nach Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper erfolgte die Visualisierung durch eine Chemilumineszenzreaktion (*ECL*). Die Konzentration der Antikörper ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Vor der Antikörperinkubation wurde die Membran zunächst dreimal jeweils 10 min in PBS/TBS-Tween auf einem Schüttler gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 h in 5 ml 5%-Blockierungslösung auf dem Schüttler inkubiert, um das Auftreten von unspezifischen Proteinbanden zu verringern. Nach 3 weiteren Waschschritten für jeweils 10 min in PBS/TBS-Tween wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper, gelöst in 5 ml 5%-Blockierungslösung, über Nacht bei 4°C auf einem Roller inkubiert.

Zuvor wurde die Membran an der entsprechenden Abzeichnung des Markers für das Molekulargewicht geschnitten, abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine (siehe Abbildung 9). Dabei kam als Ladekontrolle bei allen Analysen Beta-Aktin zum Einsatz. Beta-Aktin ist ein nicht muskuläres Protein der Aktin-Familie, welches eine wichtige Rolle für zahlreiche zelluläre Abläufe spielt und in allen eukaryoten Zellen vorkommt (Gunning et al., 2015). Die Ladekontrolle diente zum Nachweis dafür, dass alle Proben in der gleichen Menge aufgetragen sind. Deshalb sollten zur korrekten Interpretation eines Western Blots bei der Ladekontrolle gleichmäßige Banden sichtbar sein, um sichtbare unterschiedliche Proteinexpressionen richtig zu beurteilen.

Bestandteile folgender Analysen waren BRCA1 mit 220 kD, BRMS1 mit 28 kD und als Ladekontrolle Beta-Aktin mit 42 kD (siehe Abbildung 9).

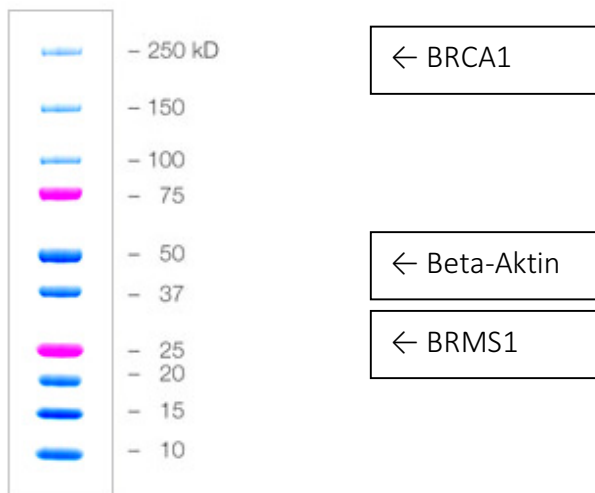


Abbildung 9: Proteinmarker zur Abschätzung des Molekulargewichts (BioRad) BRCA1 – 220 kD; Beta-Aktin – 48 kD, BRMS1 – 28 kD.

Tabelle 5: Konzentrationen der Primär-und Sekundärantikörper für den WB

Antikörper			
Primär-AK	Konzentration	Sekundär-AK	Konzentration
Beta-Aktin	1/10000	anti-mouse	1/25000
BRCA1	1/1000	anti-mouse	1/2000
BRMS1	1/1000	anti-rabbit	1/2000

Nach der Inkubation des Primär-Antikörpers (AK) über Nacht wurde die Membran in 3 Waschzyklen von jeweils 10 min mit PBS/TBS-Tween von unspezifisch gebundenen Banden gereinigt. Der sekundäre AK (enthalten im ECL Western Blotting Analyse System) wurde in 5 ml 5%-Blockierungslösung gelöst und mit dem entsprechenden Membranabschnitt für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h und 3 weiteren Waschzyklen von jeweils 10 min fand die Antikörperdetektion statt.

Hierfür wurden jeweils raumtemperierte 500 µl von Reagenz 1 und 2 (enthalten im ECL Western Blotting Analyse System) vermengt und auf die abgetropfte Membran gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 1 min wurde die überschüssige Flüssigkeit von der Membran ent-

fernt. Die Membran wurde in einer transparenten Folie in einer Ecke der Filmkassette mit Klebestreifen befestigt. Anschließend liefen Belichtung, Entwicklung und Fixierung bei Rotlicht in der Dunkelkammer ab.

Die bei 4°C gekühlten Autoradiographie Filme wurden zwischen 2 min und 2 h auf die reagenzgetränkte Membran gelegt. Entwicklung und Fixierung erfolgten im Anschluss im Entwicklungssystem. Danach wurden die Filme mit Aqua Bidest abgespült und an der Luft getrocknet.

Auswertung der Western Blots

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit Hilfe des Programmes Image Studio Lite, Version 5.2.5. Dabei wurde die Signalstärke der Banden bestimmt, in Abhängigkeit der entsprechenden Ladekontrolle. Anhand der Fluoreszenzunterschiede wurde die relative Dichte bestimmt.

3.2.3 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in drei Ansätzen wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Ein-Stichproben-t-Test nach Student bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ analysiert. Diese war jedoch aufgrund der geringen Versuchsanzahl nur bedingt aussagekräftig. Daher werden im Folgenden nur die teilweise klaren Trends angegeben. Die statistische Beratung erfolgte durch Herr Dr. med. Alexander Crispin vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU München.

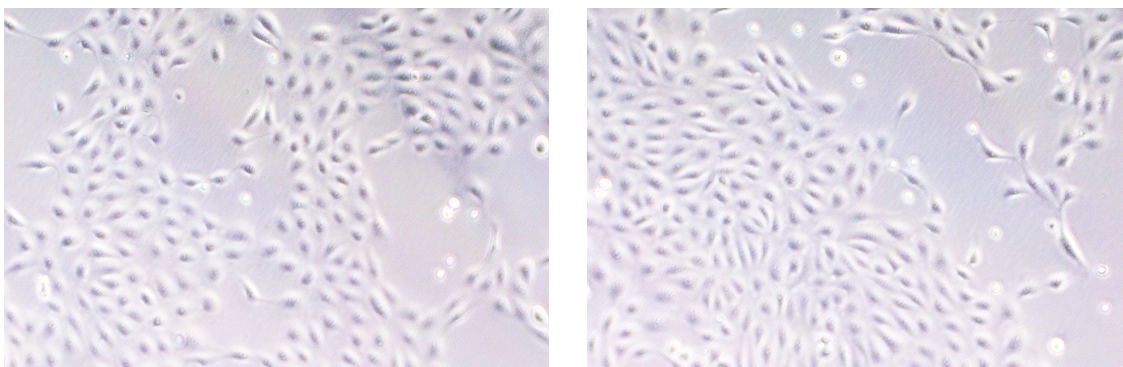
4 Ergebnisse

4.1 Kurzzeitstimulation

4.1.1 Verhalten der Zellen in Kultur

Die HMLE-Twist1-ER Zellen wurden in entsprechendem Medium in Kultur genommen und analog dem Schema für die KU-Stimulation (siehe Abbildung 7) mit Tamoxifen behandelt. Zellmorphologisch zeigten sich in allen biologischen Replikaten nach drei Tagen konfluente, adhärente epitheliale Zellverbände, sowohl in den tamoxifenstimulierten Zellen als auch in den nicht-stimulierten Kontrollen (Abbildung 10).

Die Zellen ließen sich nach 72 h problemlos ernten und weiterverarbeiten.



HMLE-Twist1-ER Kontrolle, Tag 3 HMLE-Twist1-ER KU, Tag 3

Abbildung 10: Zellmorphologie der KU-stimulierten HMLE-Twist1-ER Zellen (rechts) und entsprechender Kontrolle (links).

4.1.2 WNT5A

Um die Aktivität von Twist1 nachzuweisen, wurde der mRNA-Spiegel von WNT5A, einem positiv korrelierenden Marker für die Twist1-Aktivität, quantifiziert. Dabei zeigte sich nach der KU-Stimulation eine deutlich erhöhte WNT5A-Aktivität auf mRNA-Ebene im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildung 11).

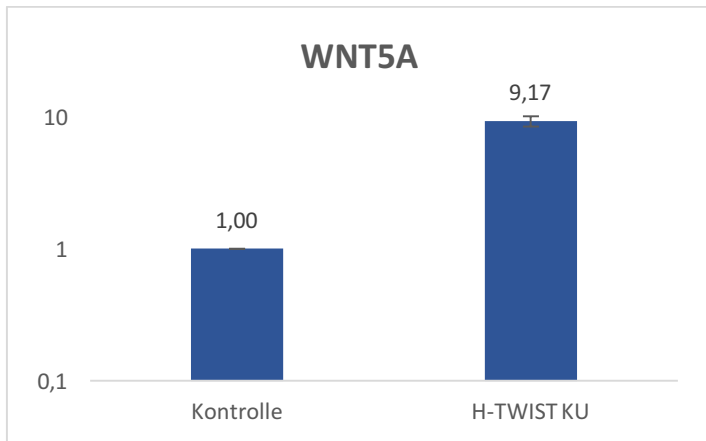


Abbildung 11: mRNA-Spiegel von WNT5A als Marker für die Twist1-Aktivität, deutlich erhöht in den KU-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links).

4.1.3 BRCA1

Für das Tumorsuppressorgen BRCA1 zeigte sich in den KU-stimulierten Zellen mit aktivem Transkriptionsfaktor Twist1 eine leicht geringere Aktivität auf mRNA-Ebene (Abbildung 12).

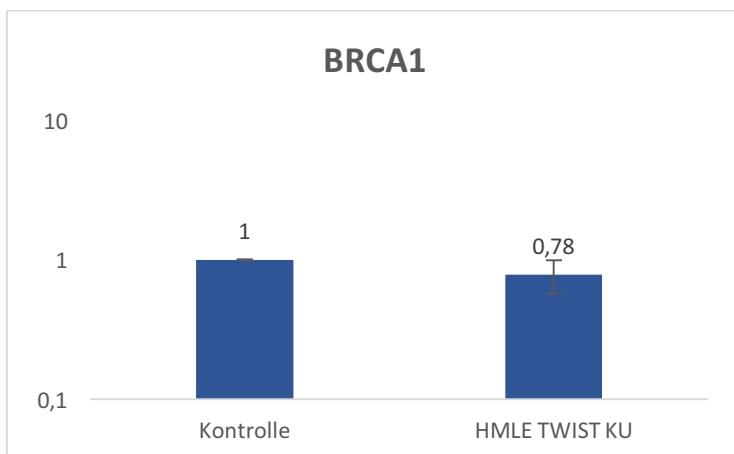


Abbildung 12: mRNA-Spiegel von Tumorsuppressor BRCA1, leicht erniedrigt in den KU-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links).

Neben dem Effekt auf die BRCA1-mRNA wurde laborintern zusätzlich die Auswirkung der KU-Stimulation auf den Proteingehalt von BRCA1 analysiert. Durch optische Auswertung zeigte sich in allen drei Proben eine geringere Signalstärke der KU-stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 13).

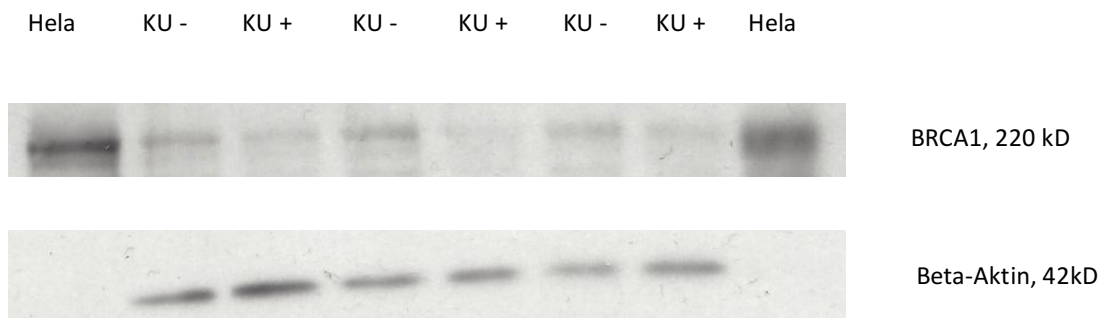


Abbildung 13: Western Blot von H-TWIST KU auf BRCA1. KU + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, KU – die unstimulierten Kontrollen.

Neben der optischen Auswertung wurde die Signalstärke der Proteinbanden mittels Densitometrie analysiert. In Probe 1 zeigte sich eine 2-fache, in Probe 2 eine 4-fache und in Probe 3 eine 2-fach geringere Signalstärke im Vergleich zu den Kontrollen, wie in Abbildung 14 dargestellt.

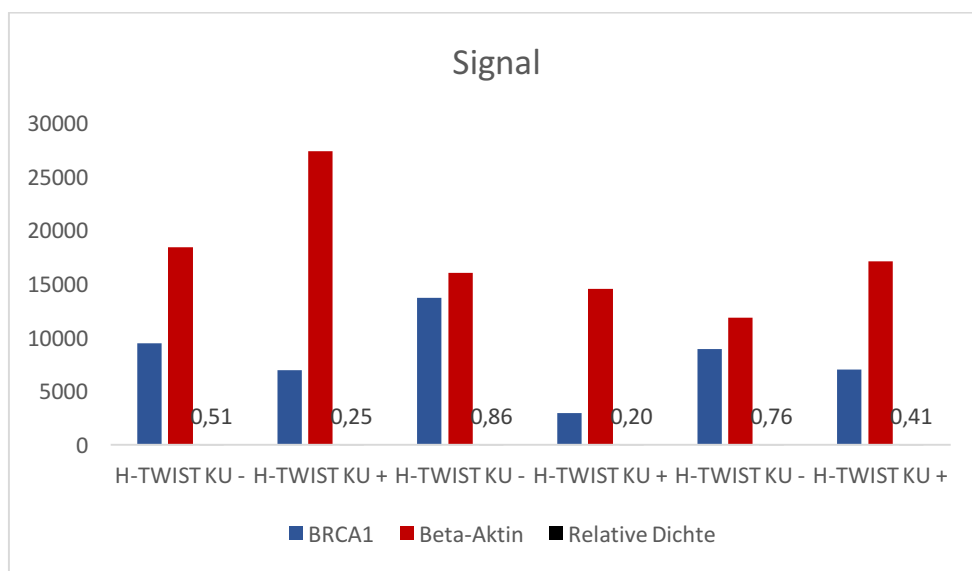


Abbildung 14: Signalstärke des Proteins von BRCA1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST-KU.

Insgesamt konnte eine verringerte Aktivität des BRCA1-Proteins in den KU-stimulierten HMLE-Twist-1-ER-Zellen nachgewiesen (Abbildung 15).

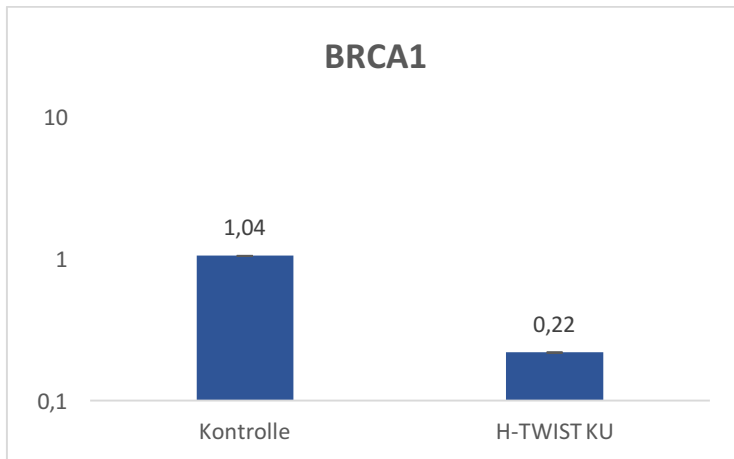


Abbildung 15: Mittelwerte der relativen Dichte von BRCA1-Protein in den H-TWIST KU-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.

4.1.4 BRMS1

Das Metastasensuppressorgen BRMS1 wurde analog zu den Versuchen mit BRCA1 analysiert. Es zeigte sich in den KU-stimulierten HMLE-Twist1-Zellen eine deutlich erniedrigte mRNA-Aktivität von BRMS1 (Abbildung 16).

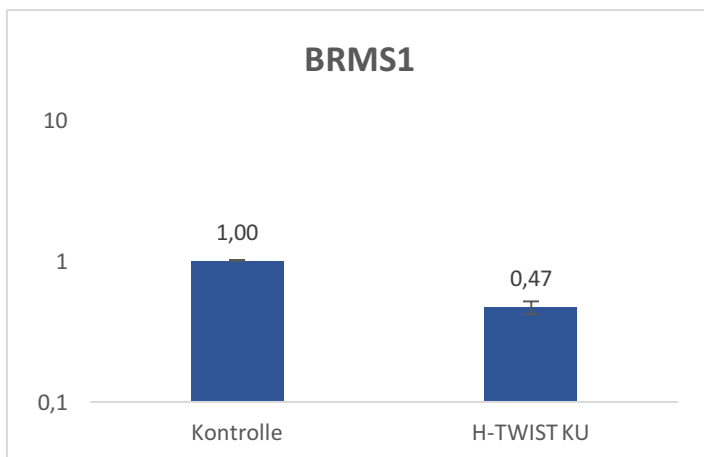


Abbildung 16: mRNA-Spiegel von Metastasensuppressor BRMS1, deutlich erniedrigt in den KU-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links).

Neben dem Effekt auf die mRNA von BRMS1 wurde zusätzlich die Auswirkung der KU-Stimulation auf den Proteingehalt von BRMS1 analysiert. Optisch zeigte sich in Probe 2 eine schwächere Proteinbande in den stimulierten Zellen (Abbildung 17).

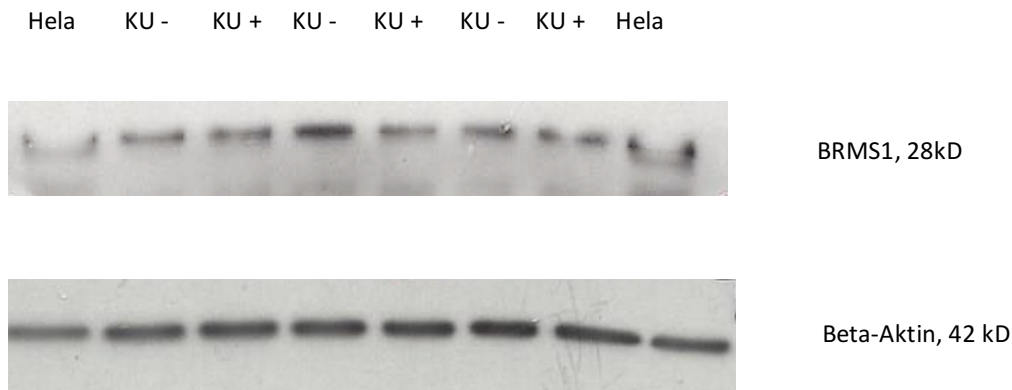


Abbildung 17: Western Blot von H-TWIST KU auf BRMS1. KU + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, KU – die unstimulierten Kontrollen.

In der densitometrischen Auswertung zeigte sich lediglich in Probe 2 eine 2-fach verringerte Aktivität, jedoch insgesamt kein deutlicher Effekt auf die Aktivität des BRMS1-Proteins in den KU-stimulierten HMLE-Twist-1-ER-Zellen (Abbildung 18, Abbildung 19).

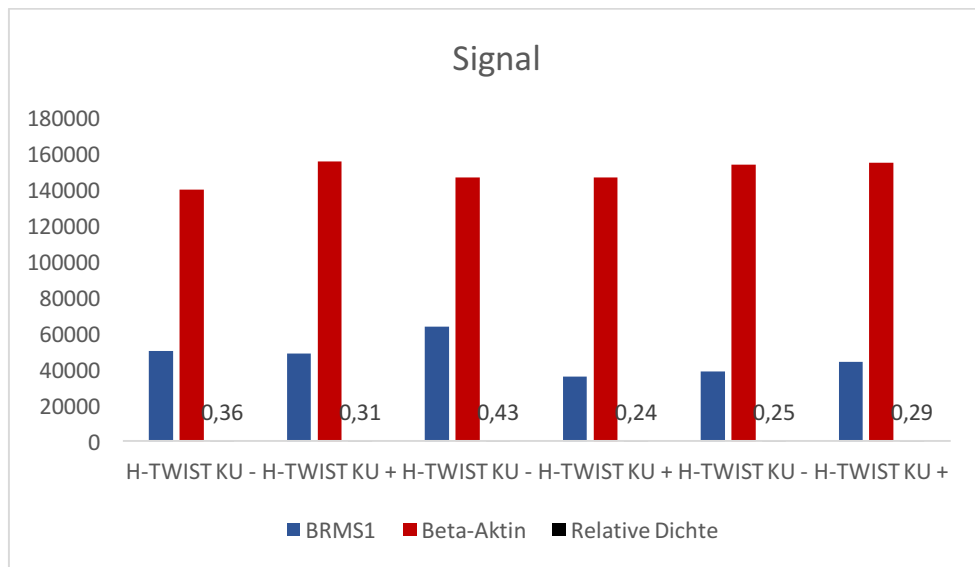


Abbildung 18: Signalstärke des Proteins von BRMS1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST KU.

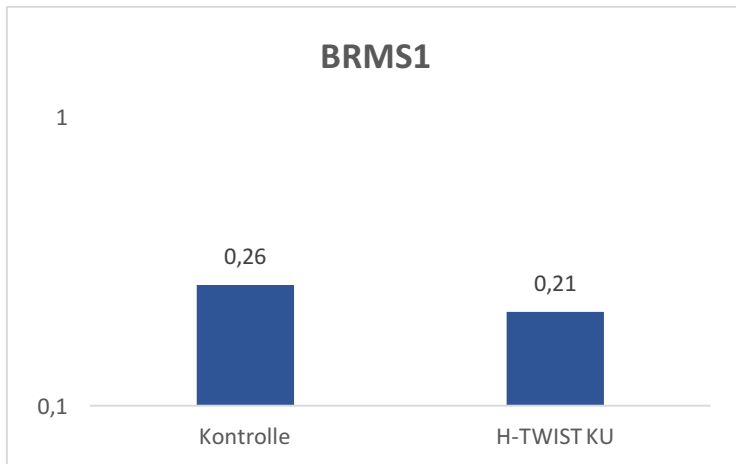


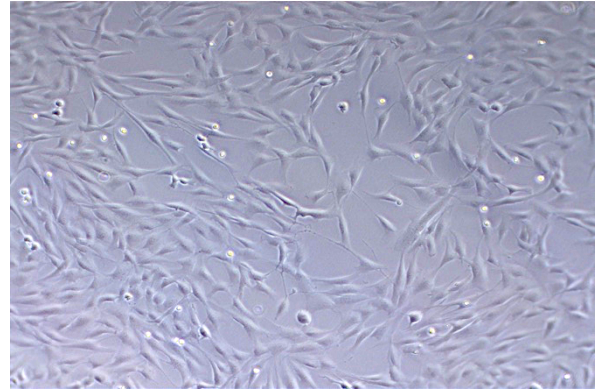
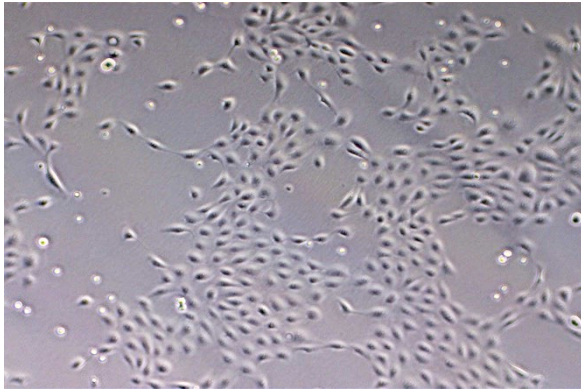
Abbildung 19: Mittelwerte der relativen Dichte von BRMS1-Protein in den H-TWIST KU-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.

4.2 Langzeitstimulation

4.2.1 Verhalten der Zellen in Kultur

Die HMLE-Twist1-ER Zellen wurden für die LA-Stimulation in entsprechendem Medium in Kultur genommen und analog dem Schema für die LA-Stimulation (siehe Abbildung 7) 15 Tage lang mit Tamoxifen behandelt. Zellmorphologisch zeigten sich wie in der KU-Stimulation nach 3 Tagen konfluente, adhärenente epitheliale Zellverbände, sowohl in den tamoxifenstimulierten Zellen als auch in den nicht-stimulierten Kontrollen (Abbildung 10).

Schon nach einer Woche zeigte sich eine Dynamik in der Zellmorphologie der stimulierten Zellpopulationen in Richtung mesenchymalen Phänotyp. Nach 15 Tagen täglicher Tamoxifenstimulation erschienen die HMLE-Twist-1-ER Zellen deutlich mesenchymaler, mit spindelförmigen Ausläufern (Abbildung 20). Die stimulierten Zellen zeichneten sich außerdem durch eine schnellere Zellteilungsrate aus, im Vergleich zu den Kontrollen. Dies machte sich semiquantitativ durch eine deutlich gesteigerte Dichtezunahme in den Kulturflaschen bemerkbar. Zudem fiel eine deutlich erhöhte Trypsinresistenz der tamoxifenstimulierten Gruppen auf.

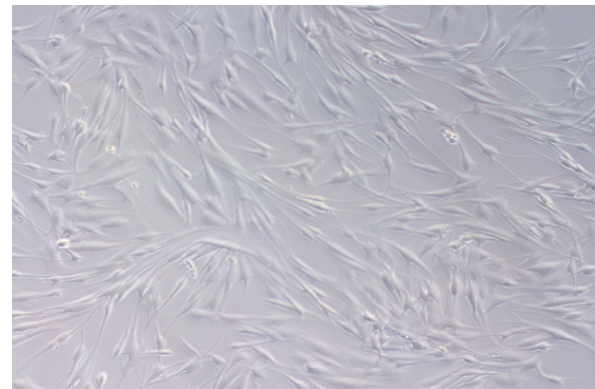
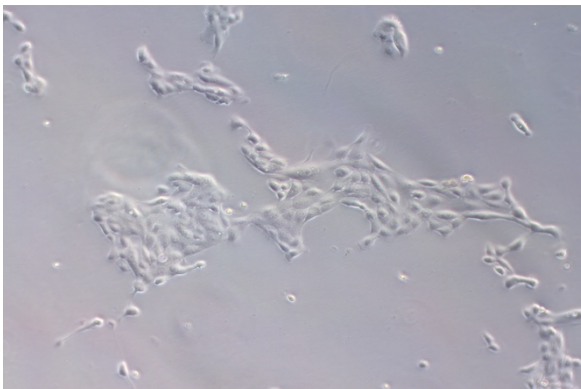


HMLE-Twist1-ER Kontrolle, Tag 15 **HMLE-Twist1-ER LA, Tag 15**

Abbildung 20: Zellmorphologie der kontinuierlich LA-stimulierten HMLE-Twist1-ER Zellen an Tag 15 (rechts) und entsprechender Kontrolle (links).

Nach 15 Tagen Stimulation wurden die Zellen für weitere 10 Tage ohne weitere Tamoxifenzugabe in Kultur behalten (transiente Stimulation). In dieser Zeit ließ sich zellmorphologisch eine fortschreitende Tendenz des mesenchymalen Phänotyps feststellen. Die stimulierten Gruppen zeigten an Tag 25 im Vergleich zu Tag 15 deutlich ausgeprägtere spindelförmige Ausläufer, eine höhere Konfluenz und Adhärenz (Abbildung 21). Darüber hinaus fiel an Tag 25 eine nochmals verstärkte Trypsinresistenz als an Tag 15 auf. Die Zellen wurden bis zu 30 Minuten mit Trypsin inkubiert, um ein adäquates Loslösen vom Flaschenboden zu erreichen.

Die Kontrollpopulationen zeigten nach 25 Tagen eine träge Zellteilungszeit und vermehrte Apoptoseinduktion.



HMLE-Twist1-ER Kontrolle, Tag 25 **HMLE-Twist1-ER LA, Tag 25**

Abbildung 21: Zellmorphologie der transienten LA-stimulierten HMLE-Twist1-ER Zellen an Tag 25 (rechts) und entsprechender Kontrolle (links).

4.2.2 Kontinuierliche Stimulation (15 Tage)

4.2.2.1 WNT5A

Als Verlaufskontrolle für die Twist1-Aktivität erfolgte die Bestimmung der mRNA von WNT5A an Tag 15, vor der 10-tägigen Tamoxifenabstinenz. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Aktivität in den stimulierten Zellen als in den Kontrollen (Abbildung 22).

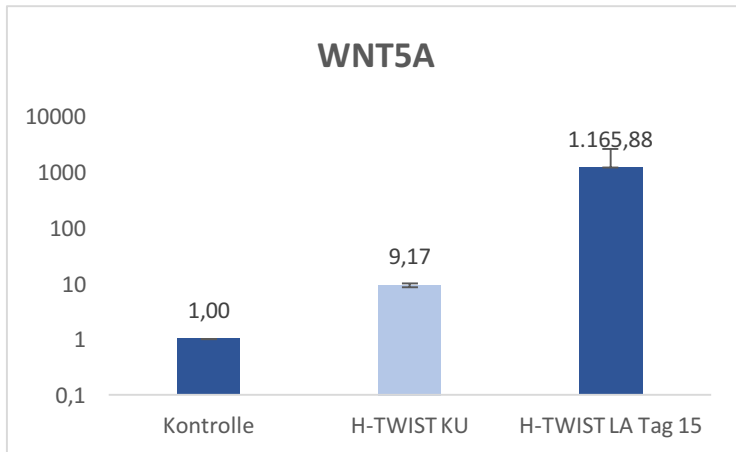


Abbildung 22: mRNA-Spiegel von WNT5A an Tag 15 als Marker für die Twist1-Aktivität, deutlich erhöht in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). In der Mitte ist zum Vergleich die WNT5A-Aktivität nach 3 Tagen (KU) dargestellt.

4.2.2.2 BRCA1

Für die mRNA von BRCA1 ließ sich an Tag 15 kein aussagekräftiger Effekt feststellen (Abbildung 23).

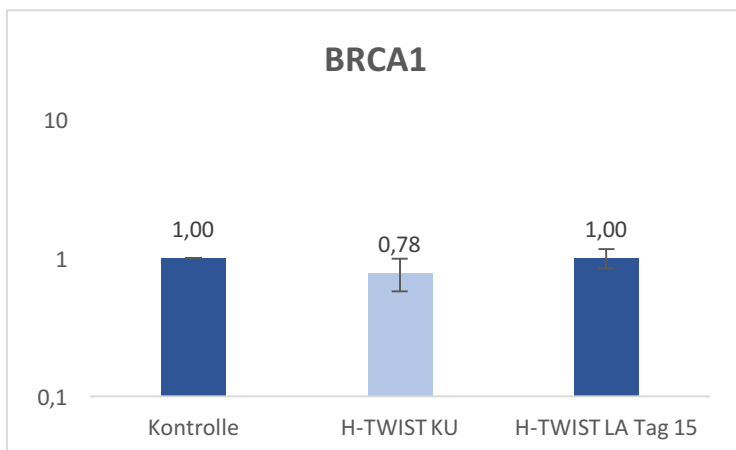


Abbildung 23: mRNA-Spiegel von Tumorsuppressor BRCA1 an Tag 15, kein Effekt in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Zusätzlich ist die Suppression von BRCA1 an Tag 3 dargestellt (KU).

4.2.2.3 BRMS1

Die BRMS1-mRNA zeigte an Tag 15 eine leicht verringerte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 24).

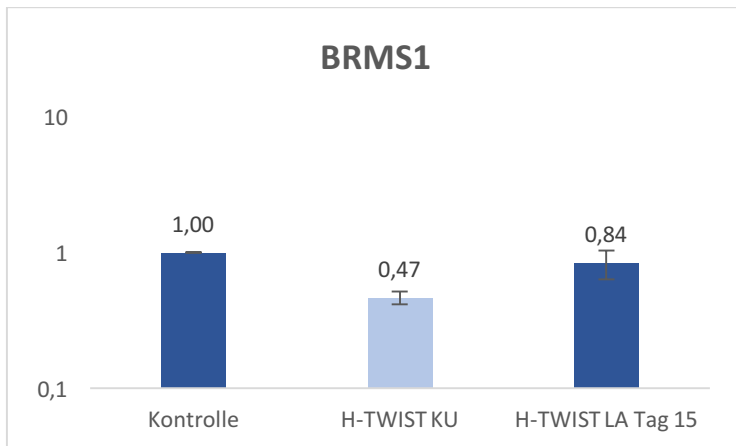


Abbildung 24: mRNA-Spiegel von Metastasensuppressor BRMS1 an Tag 15, kein Effekt in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). In der Mitte ist zum Vergleich die verringerte Aktivität von BRMS1 nach der KU-Stimulation aufgetragen.

4.2.3 Transiente Stimulation (25 Tage)

4.2.3.1 WNT5A

Nach 15 Tagen Tamoxifenstimulation und anschließend 10-tägiger Abstinenz wurde wiederum die mRNA von WNT5A, als Marker für die endogene Twist1-Aktivität, bestimmt. Dieses zeigte sich an nach der transienten Stimulation an Tag 25 deutlich erhöht (Abbildung 25).

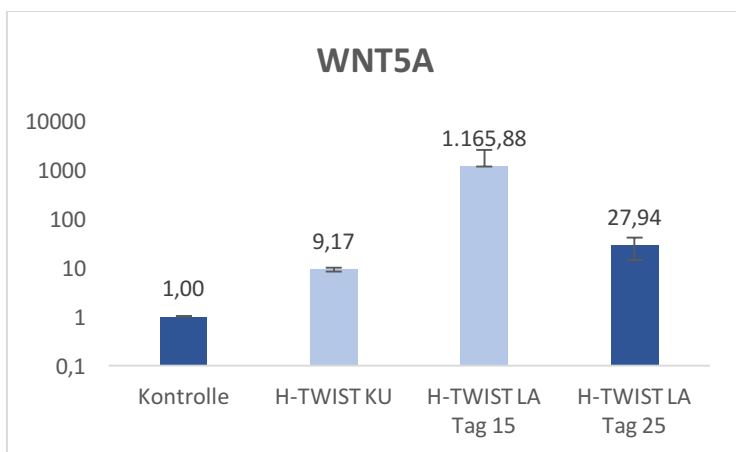


Abbildung 25: mRNA-Spiegel von WNT5A an Tag 25 als Marker für die Twist1-Aktivität, deutlich erhöht in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Im Verlauf zeigt sich eine Zunahme der WNT5A-Aktivität nach 3 Tagen Tx-Stimulation (Mitte links) bis zum Peak nach 15 Tagen (Mitte rechts). Nach 10 Tagen ohne weitere Stimulation kam es zu einem deutlichen Abfall der zuvor hochaktiven WNT5A-mRNA.

4.2.3.2 BRCA1

Für die BRCA1-mRNA konnte nach transientser Stimulation an Tag 25 eine deutlich erhöhte Aktivität in der stimulierten Population festgestellt werden (Abbildung 26). Der Tumorsuppressor BRCA1 zeigte sich dabei 5-fach überexprimiert im Vergleich zur Kontrolle. In Anbetracht des Verlaufes der BRCA1-mRNA zeigte sich eine fortschreitende Aktivitätszunahme. Nach anfänglicher Supprimierung in der KU-Stimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg an Tag 25 der LA-Stimulation.

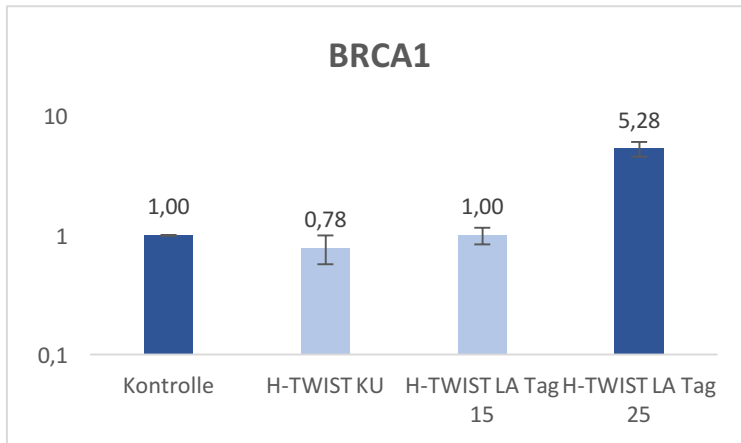


Abbildung 26: mRNA-Spiegel von Tumorsuppressor BRCA1 an Tag 25, deutlich erhöht in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Im Verlauf zeigt sich nach initialer Suppression von BRCA1 nach 3 Tagen (Mittel links) ein signifikanter Anstieg nach transientser Stimulation.

Neben dem Effekt auf die mRNA wurde der Proteingehalt mittels Western Blot bestimmt. Dabei zeigte sich optisch in den Proben 1 und 2 eine erhöhte Signalstärke von BRCA1 in den LA-stimulierten Zellen (Abbildung 27).

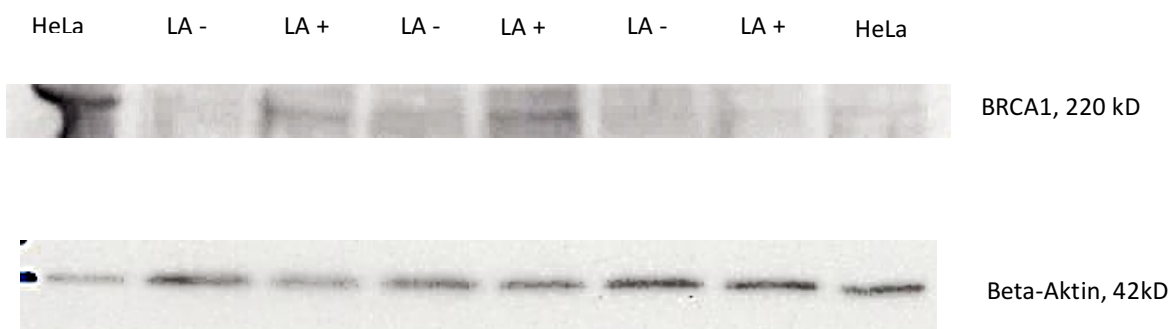


Abbildung 27: Western Blot von H-TWIST LA (transiente Stimulation über 25 Tage) auf BRCA1. LA + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, LA – die unstimulierten Kontrollen.

Die optische Auswertung wurde wiederum durch das densitometrische Messverfahren kontrolliert. Dabei konnte ein 6-facher Anstieg des BRCA1-Proteins in Probe 1 und ein 4-facher Anstieg

in Probe 2 festgestellt werden (Abbildung 28). Insgesamt zeigte sich im Mittelwert aller drei Proben eine zunehmende Tendenz der BRCA1-Aktivität in den LA-stimulierten Zellpopulationen (Abbildung 29).

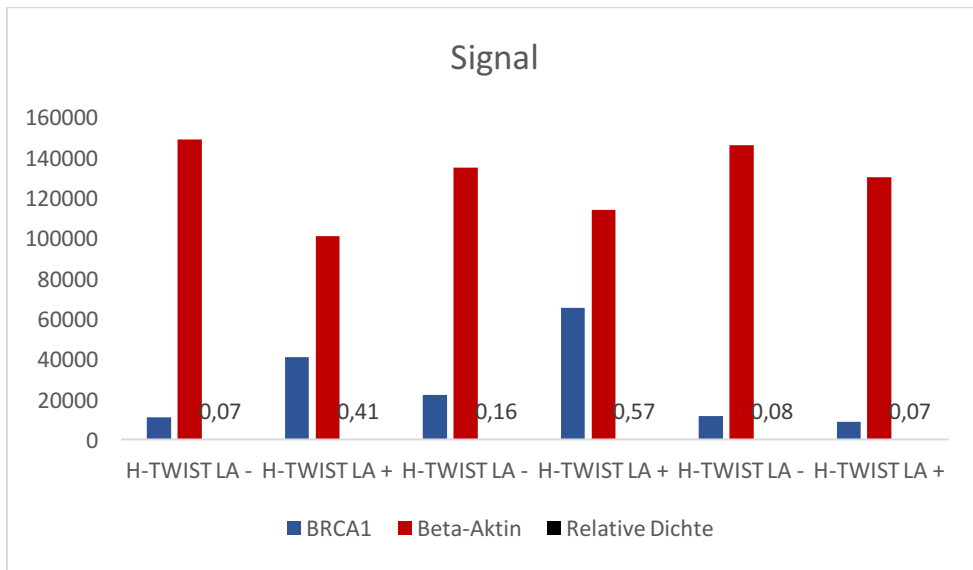


Abbildung 28: Signalstärke des Proteins von BRCA1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST-LA (transiente Stimulation).

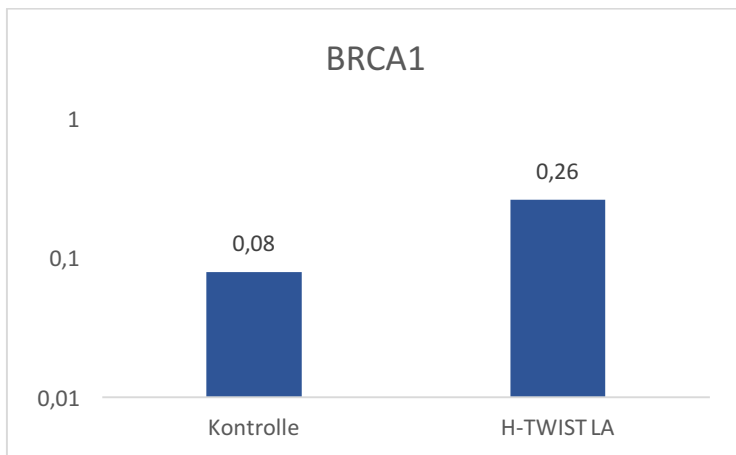


Abbildung 29: Mittelwerte der relativen Dichte von BRCA1-Protein in den H-TWIST-LA-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.

4.2.3.3 BRMS1

Für die mRNA von BRMS1 zeigte sich nach 25 Tagen kontinuierlicher Stimulation ein verringerter Effekt (Abbildung 30). Im Verlauf konnte ein Anstieg der mRNA von BRMS1 im Vergleich der KU-Stimulation zur LA-Stimulation verzeichnet werden. Zwischen kontinuierlicher 15-tägigen Stimulation und transienten Stimulation ließ sich kein relevanter Unterschied feststellen.

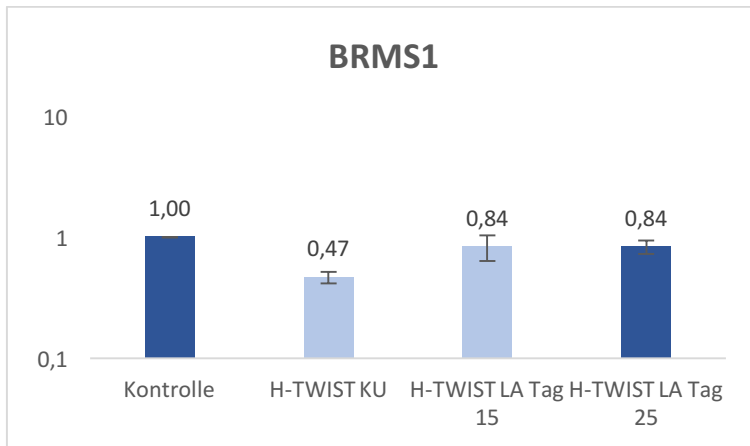


Abbildung 30: mRNA-Spiegel von Metastasensuppressor BRMS1 an Tag 25, kein Effekt in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Vergleichsweise dazu der initiale Knockdown nach dreitägiger Tamoxifenexposition (KU) (Mitte links). Es ließ sich jedoch keine Dynamik zwischen kontinuierlicher und transientser Stimulation erkennen.

Im Western Blot ließ sich optisch in den Proben 1 und 2 eine Abnahme der Bandenstärke beobachten.

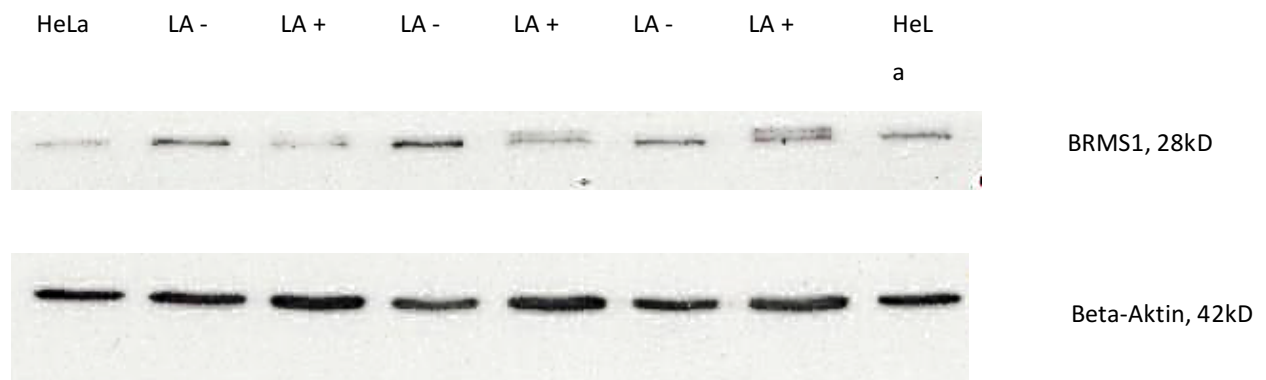


Abbildung 31: Western Blot von H-TWIST LA (transiente Stimulation über 25 Tage) auf BRMS1. LA + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, LA – die unstimulierten Kontrollen.

Mittels densitometrischer Auswertung konnte in Probe 1 eine 2-fache Abnahme und in Probe 2 eine 6-fache Abnahme der Signalstärke der BRMS1-Bande gezeigt werden.

Zusammengefasst zeigte sich im Mittelwert der 3 Proben eine leichte Supprimierung des Proteingehalt von BRMS1.

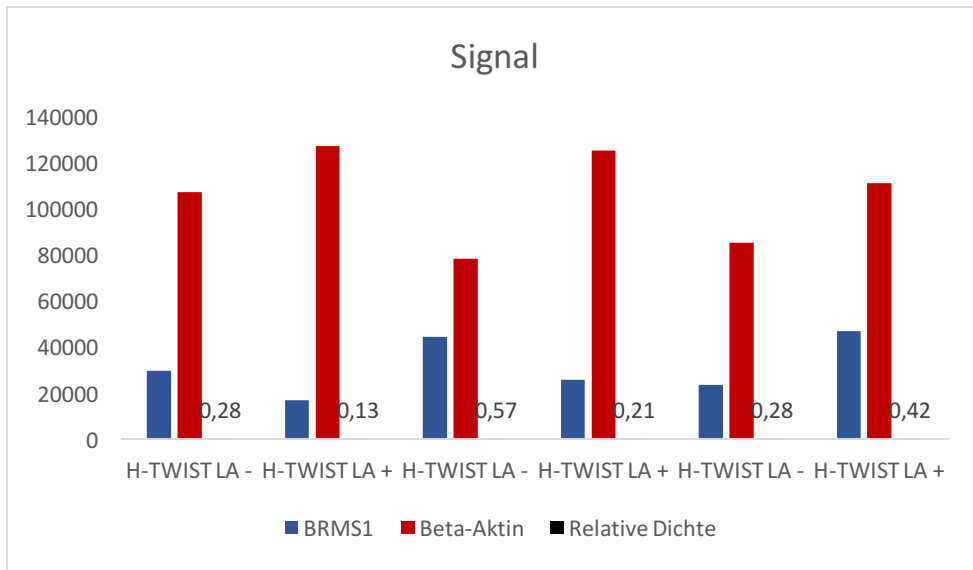


Abbildung 32: Signalstärke des Proteins von BRMS1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST-LA.

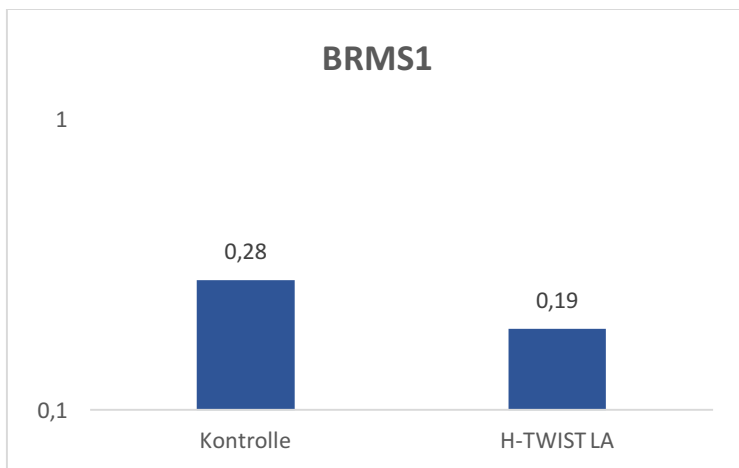


Abbildung 33: Mittelwerte der relativen Dichte von BRMS1-Protein in den H-TWIST-LA-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.

4.2.3.4 Doppelstrangbruchassay

Um die Aktivität von BRCA1 nach der transienten LA-Stimulation auf eine weitere Weise zu untersuchen, erfolgte die Analyse mittels DSB-Assay. Dafür wurde die Zellstruktur der LA-Populationen mit Etoposid zerstört, was eine Aktivierung der Signalkaskade zur Reparatur der DSB nach sich zieht. Ein Substrat des Reparatursystems, γ -H2AX, wurde durch einen Antikörper markiert und konnte somit sichtbar gemacht werden. Anhand der dokumentierten Zellfluoreszenz lassen sich daher Rückschlüsse auf die Aktivität von BRCA1 ziehen.

Optisch ließ sich in den LA-stimulierten Zellen eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollpopulationen feststellen (Abbildung 34).

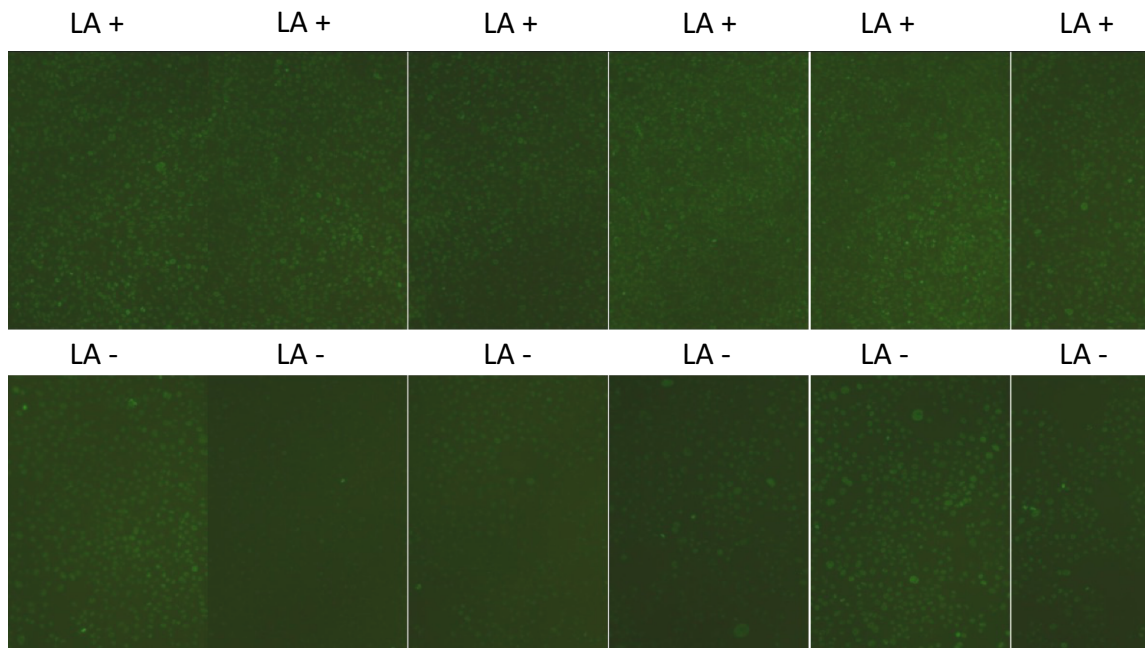


Abbildung 34: DSB-Assay bei 1000 ms Belichtung mit dem Fluoreszenzmikroskop, H-Twist1-LA-stimulierte Zellen (LA +, oben) im Vergleich zu Kontrollen (LA-, unten) in 6 biologischen Replikaten.

Um die Zellfluoreszenz zu objektivieren, wurde jeweils die Gesamtfluoreszenz des gesamten Bildes analysiert.

Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Fluoreszenz in der Tx-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 35).

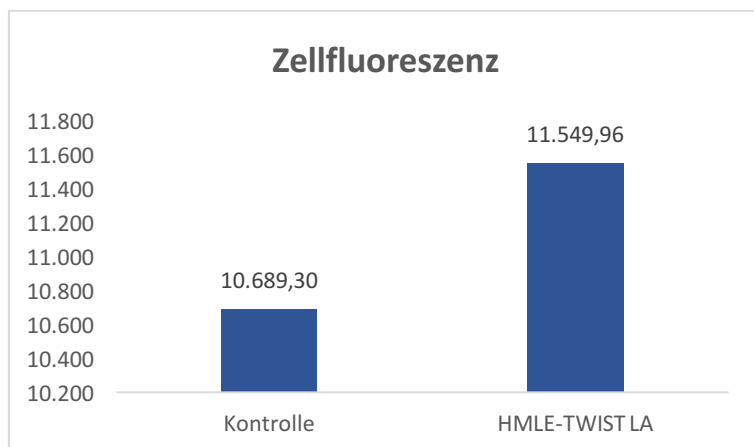


Abbildung 35: Mittelwerte der Zellfluoreszenz von γ -H2AX, einem Akteur im BRCA1-enthaltenem Zellreparatursystem, von H-Twist1-LA im Vergleich zu Kontrollen.

5 Diskussion

5.1 Überblick

In den beschriebenen Untersuchungen erfolgte die Erstellung von drei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen. Zum einen wurden HMLE-TWIST1-ER-Zellen in der Kurzzeitstimulation 3 Tage lang dem Antiöstrogen Tamoxifen exponiert. Zum anderen wurden die entsprechenden Zellen in der Langzeitstimulation einerseits kontinuierlich über 15 Tage und andererseits transient über 25 Tage mit Tamoxifen stimuliert. Anhand der gewonnenen mRNA und Proteine wurde die Aktivität der Tumor- und Metastasensuppressorgene BRCA1 und BRMS1 analysiert. Dabei gaben verschiedene Aktivierungszustände von WNT5A als direktes Twist1-Target Hinweise auf die Aktivität von Twist1, welches eine zentrale Rolle im Entwicklungsprozess von Tumorformationen und deren Metastasierung spielt.

5.2 Kurzzeitstimulation

In der KU-Stimulation wurden HMLE-Twist1-ER-Zellen über insgesamt 72 h Tamoxifen exponiert. Zellmorphologisch ergab sich nach diesem Zeitraum noch kein Hinweis auf eine mesenchymale Transformation. Die Zellen zeigten sich epithelial-konfluent, sowohl in der stimulierten Population als in den Kontrollen.

Jedoch war auf transkriptionaler Ebene bereits eine Dynamik erkennbar. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte WNT5A-mRNA-Aktivität im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle, was auf ein aktives Twist1-Gen schließen lässt (Schmidt et al., 2015; Shi et al., 2014).

Mit Twist1 als wichtigem Induktor der epithelialen-mesenchymalen Transition lässt sich eine Aktivierung der EMT-Kaskade vermuten.

5.2.1 BRCA1-Suppression nach kontinuierlicher Twist1-Aktivierung

Für BRCA1 konnte nach der KU-Stimulation mit Tamoxifen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine verringerte Expression in den HMLE-Twist1-ER-Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der zuvor gezeigten WNT5A-mRNA-Erhöhung könnte diese Suppression Twist1-vermittelt sein.

Der Tumorsuppressor BRCA1 könnte demnach in seiner zellulären Schutzfunktion beeinträchtigt sein.

Da der Verlust von BRCA1 wiederum selbst zu einer Twist1- und EMT-Aktivierung führt (Bai et al., 2014), liegt ein sich selbst verstärkender Effekt vor.

5.2.2 BRMS1-Suppression nach kontinuierlicher Twist1-Aktivierung

Für den Metastasensuppressor BRMS1 konnte nach der KU-Stimulation von Twist1 eine deutlich verminderte BRMS1-mRNA-Expression gezeigt werden. Es kam folglich durch die Twist1-induzierte EMT-Aktivierung zu einer Verminderung der BRMS1-Funktion, wodurch ebenfalls die Invasivität und Tumorprogression gesteigert sein könnte. Auf Proteinebene konnte optisch lediglich in einer Probe eine Abnahme der Proteinkonzentration gezeigt werden, insgesamt jedoch keine eindeutigen Effekte.

Insgesamt konnte durch die kontinuierliche dreitägige Twist1-Stimulation in menschlichen Brustzellen eine Aktivierung der EMT, durch den Spiegel von WNT5A überwacht, mit konsekutiver Suppression der Tumor- bzw. Metastasensuppressoren BRCA1 und BRMS1 gezeigt werden. Der EMT-Regulator Twist1 scheint somit direkten Einfluss auf Tumorgenese und –progression, gezeigt durch Suppression von BRCA1 und BRMS1, in primär nicht tumorbildenden HMLE-Zellen zu haben. Diese Eigenschaften sind trotz fehlendem mesenchymalen Phänotyp vorhanden.

Diese Analysen decken sich mit aktuellen Forschungsarbeiten (Bai et al., 2014; Liu et al., 2014).

5.3 Langzeitstimulation

Die Zellpopulationen zeigten in der LA-Stimulation bereits nach 15 Tagen kontinuierlicher Stimulation eine deutliche Tendenz in Richtung mesenchymalem Phänotyp. Dabei änderte sich die Morphologie von epithelialen Zellverbänden zu mesenchymalen Zellen, mit spindelförmigen Zytoplasmaausläufern. Daneben zeichneten sich die stimulierten Zellen durch eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate und Trypsinresistenz aus. All diese Eigenschaften lassen auf einen Shift von epithelialelem zu mesenchymalem Phänotyp der Zellen schließen.

Es ließ sich zudem nach 15 Tagen kontinuierlicher Stimulation eine deutliche Überexpression von WNT5A nachweisen, was auch hier zu einer Aktivierung der EMT-Kaskade schließen lässt und zur Änderung der Morphologie von epithelialelem zu mesenchymalem Phänotyp passt.

Der Tumorsuppressor BRCA1 zeigte sich nach der 15-tägigen kontinuierlichen Twist1-Stimulation unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Verglichen mit den Analysen nach der KU-Stimulation kam zu einer Abnahme der BRCA1-Suppression.

Auch der Metastasensuppressor BRMS1 zeigte sich nach 15 Tagen kontinuierlicher Stimulation nur kaum beeinflusst, ebenfalls deutlich rückläufig im Vergleich zur vorherigen Supprimierung nach der KU-Stimulation.

Nach weiteren 10 Tagen Inkubation ohne Tamoxifenstimulation (transiente Stimulation) schritten morphologische Veränderungen in der stimulierten Gruppe noch weiter, im Sinne einer mesenchymalen Differenzierung, fort, mit nochmals erhöhter Zellteilungsrate und verstärkter Trypsinresistenz.

Nach der transienten Stimulation konnte WNT5A als Marker für die Twist1-Aktivität 28-fach überexprimiert gemessen werden, was im Vergleich zu Tag 15 jedoch eine deutliche Reduktion darstellte.

5.3.1 BRCA1-Anstieg nach transienter Twist1-Aktivierung

Für BRCA1 ließ sich nach der transienten Twist1-Aktivierung, also nach 15 Tagen Twist1-Stimulation durch Tamoxifen gefolgt von 10-tägiger Tamoxifenabstinenz, ein 5-facher Anstieg der BRCA1-mRNA-Expression beobachten.

Unter der Annahme, dass die Expression von BRCA1 invers mit der Aktivität von Twist1 (Bai et al., 2014) und damit der EMT korreliert, ließe sich schließen, dass durch die BRCA1-Überexpression die Twist1-getriebene EMT abgeschwächt wird. WNT5A als Indikator der Twist1-Aktivität ist zu diesem Zeitpunkt (Tag 25) 9-fach überexprimiert, was auf eine Restaktivität von Twist1 schließen lässt. Im Vergleich zu Tag 15 mit einer über 1000-fachen Überexpression entspricht dies jedoch einer deutlich rückläufigen WNT5A-Expression.

Mittels DSB-Assay konnte eine deutlich erhöhte Aktivität von Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden. Da BRCA1 eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden, insbesondere DSB, spielt, könnte auch dies, durch die nachgewiesene erhöhte BRCA1-Expression, mittels qPCR und Western Blot gezeigt, hinweisen.

5.3.2 Wenig Effekt auf BRMS1 nach transienter Twist1-Aktivierung

Die BRMS1-mRNA-Expression zeigte sich nach 25 Tagen leicht verringert, im Vergleich zu Tag 15 im Wesentlichen jedoch unverändert. Für das BRMS1-Protein konnte in 2 von 3 Versuchen eine verminderte Konzentration nachgewiesen werden, insgesamt jedoch kein deutlicher Effekt.

5.4 Fazit

In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine deutlich zunehmende BRCA1-Expression nach transienter Twist1-Aktivierung in HMLE-Zellen gezeigt werden. Die Überexpression von BRCA1 lässt vermuten, dass das Gen als Twist- und EMT-Inhibitor aktiv ist. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass WNT5A nach transienter Twist1-Aktivierung weiterhin überexprimiert ist, was eine Restaktivität von Twist1 zeigt. Ferner konnte eine weiterhin bestehende Suppression von BRMS1 gezeigt werden, was sich auf die restliche Twist1-Expression zurückführen lässt. Die EMT scheint nach der transienten Stimulation immer noch aktiv zu sein, im Vergleich zu 15 Tagen kontinuierlicher Twist1-Stimulation jedoch verringert. Für BRCA1 zeigte sich nach 15 Tagen dauerhafter Twist1-Aktivierung kein Effekt im Vergleich zur Kontrollpopulation. Im Gegensatz zur dreitägigen kontinuierlichen Twist1-Stimulation scheint es nach der deutlich längeren Stimulationszeit zu einem Wandel der epithelialen-mesenchymalen Transition zu kommen. Trotz mesenchyalem Phänotyp und hoher WNT5A-Expression reicht die Ausprägung der EMT offensichtlich nicht mehr aus, um eine Suppression von BRCA1 und BRMS1 herbeizuführen. Dies könnte ein Hinweis für einen Umschwung der EMT zur MET sein. Die deutliche Überexpression von BRCA1 nach 25 Tagen bekräftigt diese Überlegungen. Die transiente Twist1-Aktivierung scheint dabei Voraussetzung für den Ablauf dieses Prozesses zu sein. Diese Beobachtungen decken sich mit den Analysen in aktuelleren Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die entstandenen genetischen Modifikationen nach transienter Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Twist1 und Snail1 Voraussetzung für Metastasierung ist (Tran et al., 2014; Tsai et al., 2012).

Insgesamt ließ sich nach der transienten Twist1-Stimulation das gleichzeitige Vorliegen von epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften nachweisen. Beide Aspekte spielen eine zentrale Rolle im Fortschreiten von invasivem Wachstum und der Entstehung von Metastasen. In

aktuellen Studien wurde das gleichzeitige Auftreten beider Eigenschaften in Metastasen als Hybrid-Phänotyp beschrieben (Grosse-Wilde et al., 2015; Jolly et al., 2015). Dabei wird diesem Phänotyp erhöhte Apoptoseresistenz, gesteigerte Tumorinitiation und erhöhtes Metastasierungspotential zugeschrieben. Zusätzlich konnte für die EMT/MET-Koexpression ein schlechteres Gesamtüberleben von Brustkrebspatienten im Vergleich zu singulärer Expression von epithelialen bzw. mesenchymalen Markern gezeigt werden (Grosse-Wilde et al., 2015).

Ausgehend von der transienten Twist1-Aktivierung als Modell für die Entstehung von Metastasen stellt sich nun die Frage, welche Rolle der Tumorsuppressor BRCA1 in diesem Prozess spielt. Jüngere Studien konnten eine positive Korrelation zwischen zytosolischer BRCA1-Expression und Metastasierungsfähigkeit zeigen (Santivasi et al., 2015). Da BRCA1 normalerweise als nukleäres Protein vorliegt, scheint es bei Akkumulation im Zytosol zu einem Funktionsverlust der Reparaturmechanismen zu kommen. Dabei zeigte sich die erhöhte zytoplasmatische Expression von BRCA1 sowohl in den Metastasen als auch in den Primärtumoren (Santivasi et al., 2015). Diese Beobachtungen könnten als Erklärung für die in den durchgeführten Untersuchungen gezeigte BRCA1-Überexpression nach transientser Twist1-Aktivierung dienen. Jedoch bleibt unklar, ob es sich hierbei um zytoplasmatisch oder nukleär vorliegendes BRCA1-Protein handelt. BRCA1 könnte demnach als neue Zielstruktur in der Therapie von metastasierten Mammakarzinomen dienen.

Da Metastasen für ca. 90% der krebsbedingten Todesfälle verantwortlich sind (Fidler, 2002), liegt in der weiteren Erforschung dieser Prozesse große Relevanz.

6 Zusammenfassung

Metastasen sind für den Großteil der krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich. Aktueller Stand der Forschung ist, dass die durch Twist1 induzierte epitheliale-mesenchymale Transition eine zentrale Rolle in der Entstehung von Invasivität und Metastasierung spielt. Der Tumorsuppressor BRCA1 und der Metastasensuppressor BRMS1 stehen dabei in direkter Interaktion mit Twist1. Da Metastasen jedoch vorwiegend epithelialer Natur sind, kann alleine durch die EMT der Entstehungsprozess nicht ausreichend erklärt werden.

Um diesen Prozess besser zu verstehen, wurde in vorliegender Arbeit ein Zellkulturmodell aus immortalisierten, primär nicht tumorbildenden menschlichen HMLE-Zellen verwendet. Durch retrovirale Transduktion von Twist1, gekoppelt an einen Östrogenrezeptor, erfolgte die Twist1-Stimulation durch Tamoxifen in drei verschiedenen Ansätzen. Zum einen fand eine kontinuierliche Twist1-Aktivierung über drei Tage, zum anderen eine kontinuierliche Stimulation über 15 Tage und schließlich eine transiente Twist1-Aktivierung über insgesamt 25 Tage statt.

Nach kontinuierlicher dreitägiger Twist1-Stimulation konnte, wie erwartet, eine EMT-Aktivierung mit entsprechender Suppression von BRCA1 und BRMS1 nachgewiesen werden. Die Twist1-induzierte EMT zeigt somit direkten Einfluss auf die in-vitro Tumorgenese und -progression in menschlichen Brustzellen. Nach transienter Twist1-Aktivierung fiel eine deutliche Überexpression von BRCA1 auf, trotz mesenchymalem Phänotyp und Restaktivität von Twist1. Durch die transiente Stimulation wird folglich das gleichzeitige Vorliegen von epithelialen und mesenchymalen Merkmalen ermöglicht. Beide Prozesse spielen eine wichtige Rolle in der Genese von Metastasen und sind bei gleichzeitigem Vorliegen mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Nach gezeigter EMT-Aktivierung mit entsprechender BRCA1-Suppression im Rahmen der Kurzzeitstimulation scheint sich nach transienter Stimulation ein gegenläufiger Prozess abzuspielen zu haben. In jüngsten Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der zytosolischen Überexpression von BRCA1 und dem Metastasierungsrisiko nachgewiesen werden. Für das eigentlich als nukleäre Tumorsuppressorgen bekannte BRCA1 ergibt sich somit ein komplett neues Potential als Zielstruktur in Diagnostik, Prognose von Tumor- und Metastasenprogression und Therapieansätzen von Brustkrebs.

7 Literaturverzeichnis

- Andersen, C., Jensen, J. & Orntoft, T. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64, S. 5245-5250.
- Antoniou, A. et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72(5), S. 1117-1130.
- Bai, F. et al. (2014). BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development. *Cancer Research*, 74(21), S. 6161-6172.
- Bustin, S. et al. (2009). The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), S. 611-622 .
- Casas, E. et al. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Research*, 71(1), S. 245-254.
- Chaffer, C. et al. (2006). Mesenchymal to epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Research*, 66, S. 11271-11278.
- Cho, K. et al. (2015). BRMS1 attenuates TGF- β 1-induced breast cancer cell aggressiveness through downregulating HIF-1 α expression. *BMC Cancer*, 15(829).
- Coezy, E., Borgna, J.-L. & Rochefort, H. (1982). Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Research*, 42, S. 317-323.
- Dent, R. et al. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 13(15), S. 4429-4434.
- Edge, S. et al. (2010). AJCC cancer staging manual. In *American Joint Committee on Cancer. Breast*. (Bd. 7, S. 347–369). New York: Springer.
- Eisenberg, E. & Levanon, E. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10), S. 569-574.

- Elenbaas, B. et al. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenetic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & Development*, 15, S. 50-65.
- Fidler, I. (2002). Critical determinants of metastasis. *Seminars in cancer biology*, 12(2), S. 89-96.
- Grosse-Wilde, A. et al. (2015). Stemness of the hybrid epithelial/mesenchymal state in breast cancer and its association with poor survival. *PLoS ONE*, 10(5).
- Gunasinghe, N. et al. (2012). MET as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), S. 469-478.
- Gunning, P. et al. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Science*, 128(11), S. 2009-2019.
- Hall, J. et al. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250, S. 1684-1689.
- Helleman, J. et al. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2).
- Jolly, M. K. et al. (2015). Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Front. Oncol.*, 5(155).
- Jung, H.-Y. & Yang, J. (2015). Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness. *Cell Stem Cell*, 16, S. 1-2.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, 119(6), S. 1420-1428.
- Kong, B. et al. (2015). Down-regulation of BRMS1 by DNMT hypermethylation and its association with metastatic progression in triple-negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.*, 8(9), S. 11076-11083.
- Kooperationsgemeinschaft Mammographie (2015). *Jahresbericht Evaluation 2012. Deutsches Mammographie-Screening-Programm*. Kooperationsgemeinschaft Mammographie, Berlin.
- Kuo, L. & Yang, L.-X. (2008). γ -H2AX - a novel Biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*, 22, S. 305-310.

- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, S. 680-685.
- Lakhani, S. et al. (2012). WHO classification of tumors of the breast. *Der Pathologe*, 4(1).
- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 15(3), S. 178-196.
- Liu, Y. et al. (2014). Loss of BRMS1 promotes a mesenchymal phenotype through NK-kB-dependent regulation of Twist1. *Mol. Cell. Biol.*, 35(1), S. 303-317.
- Mavaddat, N. et al. (2012). Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the consortium of investigator of modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 21(1), S. 134-147.
- Miki, Y. et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), S. 66-71.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), S. 2002-2007.
- Robert Koch Institut. (2010). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. (R. K. Institut, Hrsg.) Berlin.
- Robert Koch Institut. (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. (9). (R. K. Institut, & G. d. Krebsregister, Hrsg.) Berlin.
- Santivasi, W. et al. (2015). Association between cytosolic expression of BRCA1 and metastatic risk in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 113, S. 453-459.
- Schmidt, J. et al. (2015). Stem-cell-like properties and epithelial plasticity arise as stable traits after transient Twist1 activation. *Cell Reports*, 10, S. 131-139.
- Shi, J. et al. (2014). Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell*, 25, S. 210-225.
- Skloot, R. (2010). *Die Unsterblichkeit der Henrietta Lacks*. Irisiana-Verlag.
- Smith, P. et al. (1987). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1), S. 76-85.
- Tran, H. et al. (2014). Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Research*, 74(21), S. 6330-6340.

- Tsai, J. H. et al. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, 22(6), S. 725-736.
- Tumorzentrum München. (2015). *Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (Bd. 15). (I. Bauerfeind, Hrsg.) München: W. Zuckschwerdt Verlag.
- Wang, Y. et al. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & Development*, 14, S. 927-939.
- Witze, E. et al. (2008). Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science*, 320(5874), S. 365-369.
- Yang, J. et al. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117, S. 927-939.
- Yoshida, K. & Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*, 95(11), S. 866-871.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Robert Koch Institut, 2013)	9
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010 (Robert Koch Institut, 2013).....	10
Abbildung 3: Stadienadaptierte 5-Jahres-Überlebensraten (Edge et al., 2010)	10
Abbildung 4: Morphologische Veränderungen der Zelle nach der EMT/MET mit Verlust der Polarität, Zell-zu-Zell-Junktionen und spindelförmigem Aussehen. Zusätzlich sind die typischen Marker für epitheliale bzw. mesenchymale Zellen angegeben.....	13
Abbildung 5: Knockdown von BRCA1 aktiviert TWIST1 und damit die EMT-Kaskade, gleichzeitig wird TWIST1 von BRCA1 supprimiert.....	16
Abbildung 6: Verlust von BRMS1 aktiviert TWIST1 mit EMT-Kaskade, gleichzeitig supprimiert BRMS1 die Expression von TWIST1.....	17
Abbildung 7: Ansätze zur Tamoxifenstimulation. Kurzzeitstimulation mit dreitägiger Stimulation. Langzeitstimulation mit kontinuierlicher Stimulation über 15 Tage und LA-Stimulation mit transienter Stimulation.	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Semi-Dry-Blots.....	38
Abbildung 9: Proteinmarker zur Abschätzung des Molekulargewichts (BioRad) BRCA1 – 220 kD; Beta-Aktin – 48 kD, BRMS1 – 28 kD.....	40
Abbildung 10: Zellmorphologie der KU-stimulierten HMLE-Twist1-ER Zellen (rechts) und entsprechender Kontrolle (links).....	42
Abbildung 11: mRNA-Spiegel von WNT5A als Marker für die Twist1-Aktivität, deutlich erhöht in den KU-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links).	43
Abbildung 12: mRNA-Spiegel von Tumorsuppressor BRCA1, leicht erniedrigt in den KU-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links).	43
Abbildung 13: Western Blot von H-TWIST KU auf BRCA1. KU + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, KU – die unstimulierten Kontrollen.	44

Abbildung 14: Signalstärke des Proteins von BRCA1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST-KU.	44
Abbildung 15: Mittelwerte der relativen Dichte von BRCA1-Protein in den H-TWIST KU-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.	45
Abbildung 16: mRNA-Spiegel von Metastasensuppressor BRMS1, deutlich erniedrigt in den KU-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links).	45
Abbildung 17: Western Blot von H-TWIST KU auf BRMS1. KU + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, KU – die unstimulierten Kontrollen.	46
Abbildung 18: Signalstärke des Proteins von BRMS1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST KU.....	46
Abbildung 19: Mittelwerte der relativen Dichte von BRMS1-Protein in den H-TWIST KU-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.	47
Abbildung 20: Zellmorphologie der kontinuierlich LA-stimulierten HMLE-Twist1-ER Zellen an Tag 15 (rechts) und entsprechender Kontrolle (links).	48
Abbildung 21: Zellmorphologie der transienten LA-stimulierten HMLE-Twist1-ER Zellen an Tag 25 (rechts) und entsprechender Kontrolle (links).	48
Abbildung 22: mRNA-Spiegel von WNT5A an Tag 15 als Marker für die Twist1-Aktivität, deutlich erhöht in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). In der Mitte ist zum Vergleich die WNT5A-Aktivität nach 3 Tagen (KU) dargestellt.	49
Abbildung 23: mRNA-Spiegel von Tumorsuppressor BRCA1 an Tag 15, kein Effekt in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Zusätzlich ist die Suppression von BRCA1 an Tag 3 dargestellt (KU).	49
Abbildung 24: mRNA-Spiegel von Metastasensuppressor BRMS1 an Tag 15, kein Effekt in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). In der Mitte ist zum Vergleich die verringerte Aktivität von BRMS1 nach der KU-Stimulation aufgetragen.	50

Abbildung 25: mRNA-Spiegel von WNT5A an Tag 25 als Marker für die Twist1-Aktivität, deutlich erhöht in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Im Verlauf zeigt sich eine Zunahme der WNT5A-Aktivität nach 3 Tagen Tx-Stimulation (Mitte links) bis zum Peak nach 15 Tagen (Mitte rechts). Nach 10 Tagen ohne weitere Stimulation kam es zu einem deutlichen Abfall der zuvor hochaktiven WNT5A-mRNA.50

Abbildung 26: mRNA-Spiegel von Tumorsuppressor BRCA1 an Tag 25, deutlich erhöht in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Im Verlauf zeigt sich nach initialer Suppression von BRCA1 nach 3 Tagen (Mittel links) ein signifikanter Anstieg nach transienter Stimulation.51

Abbildung 27: Western Blot von H-TWIST LA (transiente Stimulation über 25 Tage) auf BRCA1. LA + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, LA – die unstimulierten Kontrollen.51

Abbildung 28: Signalstärke des Proteins von BRCA1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST-LA (transiente Stimulation).52

Abbildung 29: Mittelwerte der relativen Dichte von BRCA1-Protein in den H-TWIST-LA-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.52

Abbildung 30: mRNA-Spiegel von Metastasensuppressor BRMS1 an Tag 25, kein Effekt in den LA-stimulierten H-Twist1-ER-Zellen (rechts) im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (links). Vergleichsweise dazu der initiale Knockdown nach dreitägiger Tamoxifenexposition (KU) (Mitte links). Es ließ sich jedoch keine Dynamik zwischen kontinuierlicher und transienter Stimulation erkennen.53

Abbildung 31: Western Blot von H-TWIST LA (transiente Stimulation über 25 Tage) auf BRMS1. LA + stellen die mit Tamoxifen stimulierten Replikate dar, LA – die unstimulierten Kontrollen.53

Abbildung 32: Signalstärke des Proteins von BRMS1, Beta-Aktin und relative Dichte der beiden in H-TWIST-LA.54

Abbildung 33: Mittelwerte der relativen Dichte von BRMS1-Protein in den H-TWIST-LA-stimulierten Zellen und entsprechenden nicht-stimulierten Kontrollen.54

Abbildung 34: DSB-Assay bei 1000 ms Belichtung mit dem Fluoreszenzmikroskop, H-Twist1-LA-stimulierte Zellen (LA +, oben) im Vergleich zu Kontrollen (LA-, unten) in 6 biologischen Replikaten.55

Abbildung 35: Mittelwerte der Zellfluoreszenz von γ -H2AX, einem Akteur im BRCA1-enthaltenem Zellreparatursystem, von H-Twist1-LA im Vergleich zu Kontrollen.....55

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms, anhand TNM-Klassifikation (American Joint Committee on Cancer (AJCC), 2010)	12
Tabelle 2: Programm der RT-PCR im Thermo Cycler	30
Tabelle 3: Programm der qPCR mit UPL-Quantifizierung	31
Tabelle 4: Programm der qPCR mit SYBR Green-Quantifizierung	32
Tabelle 5: Konzentrationen der Primär-und Sekundärantikörper für den WB	40

10 Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei der gesamten AG Sotlar. Prof. Dr. med. Karl Sotlar danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Auswertung und Korrektur. Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter und Dr. med. Harald Bartsch danke ich für die Betreuung, Simone Wehner danke ich für die Erklärungen und Hilfestellungen bei den Experimenten. Ebenfalls danke ich der kooperierenden Arbeitsgruppe um Dr. med. Christina Scheel vom Helmholtz Zentrum München für die Bereitstellung der Zelllinien sowie Dr. med. Alexander Crispin vom Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie der LMU für die statistische Beratung.

Ein besonderer Dank geht an Daniel Hofmann, der mich über die gesamte Zeit meiner Dissertation mit viel Geduld unterstützt hat.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mir, seitdem ich denken kann, in allen Lebenslagen beisteht und mich bei Allem unterstützt.

Eidesstattliche Versicherung

Bronner, Anna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Analysen von BRCA1 und BRMS1 in durch TWIST1 induzierbarem EMT-Modell in HMLE-Zellen

selbstständig erfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 16.10.2020

Ort, Datum

Anna Bronner

Unterschrift Doktorandin/Doktorand