

Aus dem
Pathologischen Institut
Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Frederick Klauschen

**Interaktion von Twist1 und BRCA1 während der
epithelial-mesenchymalen Transition und Progression des
Mammakarzinoms unter Berücksichtigung spezifischer microRNAs**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Irmgard Kreil

aus
Braunau am Inn

Jahr
2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karl Sotlar
Mitberichterstatter: PD Dr. Mirjana Kessler
PD Dr. Dorit Di Gioia
PD Dr. Dr. Ulrich Andergassen

Mitbetreuung durch den Dr. Harald Sebastian Bartsch
promovierten Mitarbeiter:
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2026

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung	8
1.1 Mammakarzinom	8
1.1.1 Epidemiologie.....	8
1.1.2 Ätiologie	10
1.1.3 Klassifikation.....	10
1.1.4 Therapie	11
1.1.5 Pathogenese.....	12
1.1.6 Duktales Carcinoma in situ (DCIS)	12
1.1.7 Invasives Mammakarzinom.....	13
1.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition.....	14
1.2.1 Einführung in die EMT	15
1.2.2 EMT und Tumorprogression.....	16
1.2.3 Schlüsselfaktoren bei der EMT	16
1.3 Twist1	17
1.4 microRNAs	19
1.4.1 Biogenese von miRNAs.....	19
1.5 BRCA1 (BRest CAncer1).....	22
2 Zielsetzung der Arbeit.....	25
3 Methoden und Material	26
3.1 Zellkulturbioologische Methoden und Material	26
3.1.1 Verwendete Zelllinien und Kulturmedium	26
3.1.2 Zellkultur	28
3.1.3 Passagieren der Zellen.....	29
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	30
3.1.5 Stabile Transduktion mittels lentiviraler Vektoren	30
3.1.6 Proteinextraktion von adhärenenten Zellen	31
3.1.7 Proteinkonzentrationsbestimmung	32
3.1.8 Überprüfung der Proteinexpression mittels Western Blot	33
3.1.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.1.10 Blotten.....	36
3.2 Molekularbiologische Methoden und Material	41
3.2.1 RNA-Isolierung aus Zellpellets.....	41
3.2.2 Reverse Transkription.....	42
3.2.3 mRNA-Quantifizierung	43
3.2.4 microRNA-Quantifizierung	49
3.3 Bioinformatische Analysen	50

3.4	Verifizierung eines möglichen Einflusses der hsa-miR-199a-5p mittels Luciferase-Reporter-Assay	51
3.4.1	Klonierung der regulatorischen Teilsequenz in den Vektor	51
3.4.2	Transfektion, Signalentwicklung und Detektion	53
3.5	Auswertung	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Primereffizienz	56
4.2	Untersuchungen an HMLE-Twist1-ER Zellen mit induzierbarem Twist1-Konstrukt	58
4.2.1	Quantifizierung des BRCA1-mRNA-Levels im zeitlichen Verlauf	58
4.2.2	Western Blot Analyse von BRCA1 in HMLE-Twist1-ER Zellen	59
4.2.3	miRNA Expression in HMLE-Twist1-ER Zellen	61
4.2.4	Wnt5a Expression in HMLE-Twist1-ER Zellen	62
4.3	Untersuchungen an der stabil transduzierten Zelllinie MCF-7	62
4.3.1	Expressionsanalyse der beiden miRNAs hsa-miR199a-5p und hsa-miR-214 in stabil transduzierten MCF-7-Zellen	63
4.3.2	mRNA Quantifizierung von BRCA1 in der miRNA-überexprimierenden MCF-7-Zelllinie	64
4.3.3	Western Blot-Analyse von BRCA1 in stabil transduzierten MCF-7-Zellen	65
4.4	Untersuchungen an der stabil transduzierten Zelllinie HMT-3522-S1	68
4.4.1	Expressionsanalyse der beiden miRNAs hsa-miR199a-5p und hsa-miR-214 in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen	69
4.4.2	mRNA Quantifizierung von BRCA1 in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen	69
4.4.3	Western Blot-Analyse von BRCA1 in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen	70
4.5	Datenbankrecherche über komplementäre Bindungsstellen der miRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 in der 3'UTR-Region von BRCA1	72
4.6	Einfluss der miRNA-Expression von hsa-miR-199a-5p auf BRCA1 im Luciferase-Assay	74
5	Diskussion	76
5.1	EMT als Erklärungsmodell für die Tumor- und Metastasenbildung	77
5.2	Twist1: Ein EMT induzierender Transkriptionsfaktor	77
5.3	microRNAs im Zusammenhang einer EMT	78
5.3.1	Transiente Twist1 Aktivierung führt zur Überexpression der microRNAs und zum Absenken des BRCA1 Spiegels in HMLE-Twist1-ER-Zellen	79
5.4	Überexpression von miR-199a-5p und miR-214 führt zur Reprimierung von BRCA1 in geringinvasiven Zellen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene	80
5.5	miR-199a ein mögliches direktes Target von BRCA1	81
5.6	Material und Methodenauswahl	82
5.6.1	Auswahl und aktuelle Studien der beiden microRNAs	82
5.6.2	Auswahl der Zelllinien für die Überexpression der miRNAs	84
5.6.3	Methodenauswahl	85

6	Zusammenfassung und Ausblick	86
	Literaturverzeichnis.....	87
	Abbildungsverzeichnis	102
	Tabellenverzeichnis	104
	Danksagung.....	105
	Eidesstattliche Versicherung	106
	Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung	107

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADH	atypische duktale Hyperplasie
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>Basenpaare</i>
BRCA1	<i>BReast CAncer 1, early-onset</i>
BRCA2	<i>BReast CAncer 2, early-onset</i>
<i>BRCT</i>	<i>BRCA1 C-Terminale Domäne</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
cDNA	komplementäre DNA
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DDX24	<i>DEAD-box helicase 24</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>dots per inch</i>
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HMLE	<i>human mammary epithelial cells</i>
HPV	Humanes Papilloma Virus
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>
ICD-10 C50	bösartige Neubildung der Mamma
IDC	invasiv duktales Mammakarzinom
kDa	Kilodalton
Ki67	Proliferationsmarker Ki67 Antigen
LB	<i>Loading Buffer</i>
<i>loss of heterozygosity</i>	Verlust der Heterozygotie
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation 7</i>
MET	Mesenchymale-Epitheliale-Transition

miR	microRNA
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PR	Progesteronrezeptor
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
REEP5	<i>receptor accessory protein 5</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
Silencing	Stilllegung
SNAIL	<i>Zinc finger Protein</i>
SVR	<i>Support Vector Regression</i>
TDLE	Terminale duktulo-lobuläre Einheit
Template	engl. Vorlage, Schablone
<i>Twist1</i>	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor1</i>
UPL	<i>Universal ProbeLibrary</i>
UTR	untranslatierte Region
ZEB	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit betrachtet ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung und krebsbedingte Todesursache der Frau (Kamangar, Dores, & Anderson, 2006).

Deutschlandweit erkrankten 2016 rund 69.000 Frauen an einem Mammakarzinom. Mit Stand 2016 zählt die Brustdrüse der Frau zu den häufigsten Tumorlokalisationen, was den prozentuellen Anteil aller Krebsneuerkrankungen (29,5 %) (Abb. 1) und krebsbedingten Todesursachen (17,6 %) betrifft. Die Inzidenz der Neuerkrankungen nimmt seit 1980 stetig zu, wobei die Mortalitätsrate annähernd konstant bleibt (Abb. 2). Allein in Deutschland starben 2016 über 18.000 Frauen an den Folgen eines Mammakarzinoms (Robert Koch-Institut, 2019). Die Krebssterblichkeit ist hierbei zumeist auf die metastatische Verbreitung zurückzuführen (Wang & Zhou, 2011), vor allem in Lunge, Leber und im Skelettsystem (Cummings et al., 2014).

Nach den aktuellen Inzidenzraten des Zentrums für Krebsregisterdaten erkrankt etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Ungefähr 30 % der Patientinnen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre. In Deutschland gab es nach Einführung des Mammographiescreenings im Jahr 2005 bis 2009 einen zusätzlichen Anstieg der Neuerkrankungsrate, welche auf eine Überdiagnose zurückzuführen ist. Seit 2005 werden nun alle Frauen im Alter von 50 bis 69 alle zwei Jahre schriftlich zur Teilnahme an einem Screening-Programm eingeladen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt aktuell bei 87 %, wohingegen die relative 10-Jahres Überlebensrate bei 82 % liegt (Robert Koch-Institut, 2019).

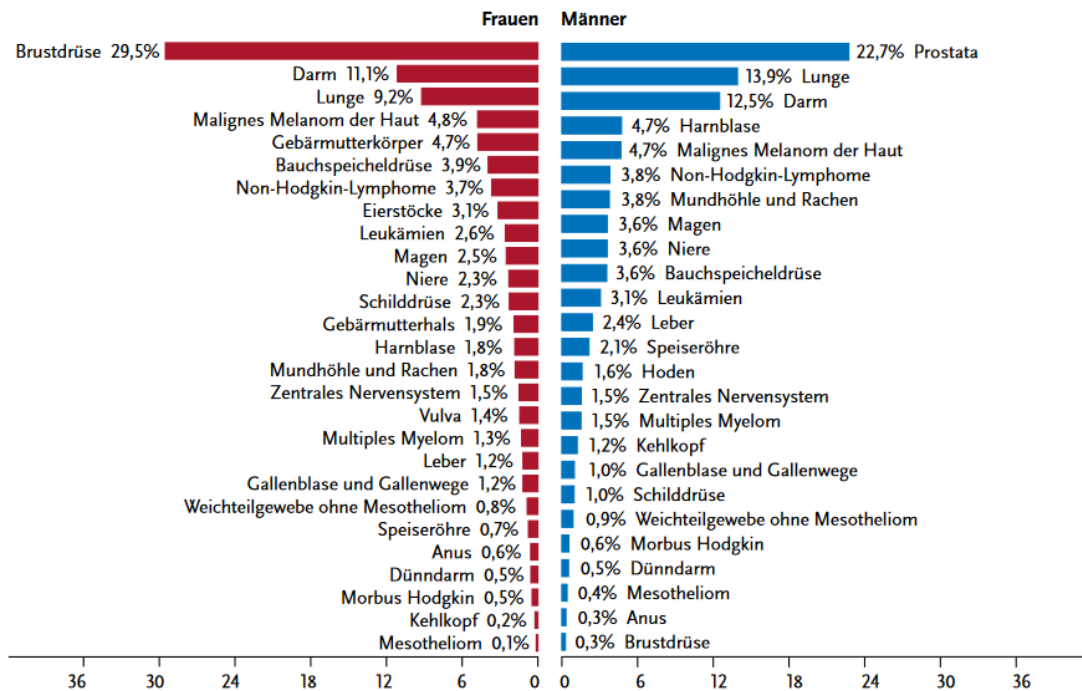


Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Robert Koch-Institut, 2019)

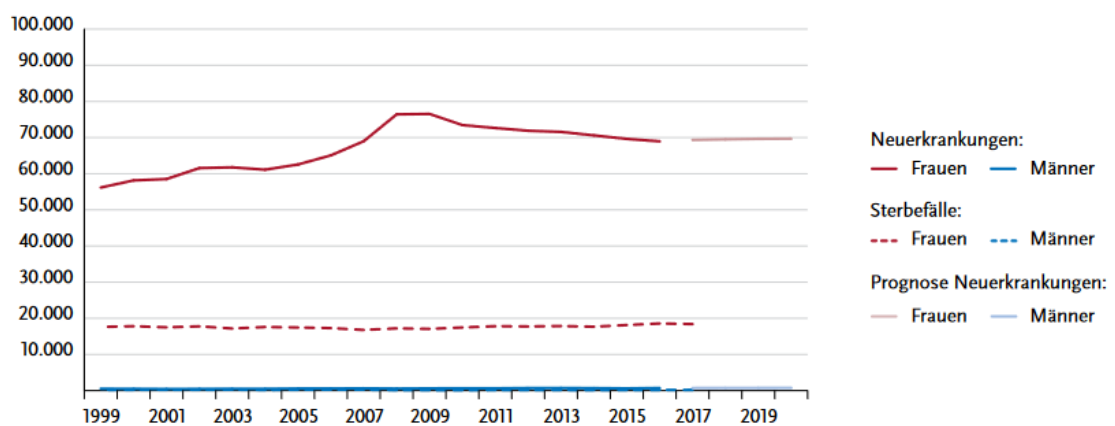


Abb. 2 : Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C50, Deutschland 1999–2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020 (Robert Koch-Institut, 2019)

1.1.2 Ätiologie

Die Gründe für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind multifaktoriell (Lakhani, Ellis, Schnitt, Tan, & van de Vijver, 2012), so dass lediglich beobachtbare Risikofaktoren benannt werden können. Hierzu zählen zum Beispiel eine positive Familienanamnese, hormonelle Einflüsse, Hormonersatztherapie mittels Östrogen-Gestagen-Therapie, Kontrazeptiva, Alter, Adipositas, Schlafmangel, Nikotin- und Alkoholabusus, ionisierende Strahlen oder bestimmte fibrosierende oder prämaligne beziehungsweise frühinvasive Läsionen der Mamma (fibrozystische Mastopathie, duktale Hyperplasie, sklerosierende Adenose, radiäre Narbe, atypische duktale oder lobuläre Hyperplasie, lobuläres Carcinoma in situ, duktales Carcinoma in situ) (AGO, 2019; Hiddemann W. & Bartram C.R. , 2010; Klöppel, Kreipe, Remmele, & Dietel, 2013; Rhiem & Schmutzler, 2015; Tavassoli & Devilee, 2003).

In rund 5 % aller diagnostizierten Mammakarzinome liegt die Ursache in Mutationen in einem der beiden Tumorsuppressorgene *BRCA1* (*BReast CAncer 1*) und *BRCA2* (*BReast CAncer 2*). Beim hereditären Mammakarzinom beträgt der Anteil solcher Mutationen sogar 25 % (Meindl, Ditsch, Kast, Rhiem, & Schmutzler, 2011). Bei Frauen mit einer genetischen Veränderung von *BRCA1* liegt das lebenslange Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken bei 40 – 87 % (C. Engel, Zachariae, & Fischer, 2015).

1.1.3 Klassifikation

Nach der WHO-Klassifikation (WHO, engl. *World Health Organization*) aus dem Jahr 2012 lassen sich Mammakarzinome und Präkanzerosen nach ihrem vorherrschenden histologischen Phänotyp klassifizieren (Tabelle 1) (Lakhani et al., 2012).

Nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) erfolgt zur Prognosebestimmung eine Einteilung in Tumorstadien auf Basis der TNM-Kriterien (Tumorgröße des Primärtumors, Lymphknotenstatus, Fernmetastasen) (Sobin, Gospodarowicz, & Wittekind, 2011).

Hinzu kommt ebenfalls für jedes Mammakarzinom, die immunhistochemische Expressionsbestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors (ER und PR), des HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)-Rezeptors zur Therapieprädiktion und des Proliferationsmarkers Ki-67. Nach deren Expressionsstatus erfolgt die Einteilung in vier

sogenannte intrinsische bzw. molekulare Subtypen Luminal A, Luminal B, Basal-like und HER2 (Abb. 3)(Harbeck, 2013).

1.1.4 Therapie

Aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren, wie beispielsweise dem Kernmalignitätsgrad, histologischem Phänotyp und molekularem Subtyp handelt es sich beim Mammakarzinom um eine ausgesprochen heterogene Erkrankung. Je nach Alter, Familienanamnese, Menopausenstatus, Tumorgröße, Tumorgrading, Proliferationsfaktoren (Ki67), Lymphknotenbefall, Metastasen, histologischem Typ, Hormonrezeptorstatus und HER2-Status wird in der Regel im Rahmen eines Tumorboards für die Patientin ein individuelles Risikoprofil erstellt und entsprechend etablierter (S3-)Leitlinien eine Therapieempfehlung abgegeben (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, & AWMF).

Tabelle 1: WHO Klassifikation modifizierter Auszug aus (Lakhani et al., 2012)

Vorläuferläsionen
Duktales Carcinoma in situ (DCIS)
Lobuläre Neoplasie
Lobuläres Carcinoma in situ
Klassisches lobuläres Carcinoma in situ
Pleomorphes lobuläres Carcinoma in situ
Atypische lobuläre Hyperplasie
Invasive Mammakarzinome
Invasives Mammakarzinom, kein spezieller Typ ("no special Type", NST)
Invasives lobuläres Karzinom
Tubuläres Karzinom
Kribriiformes Karzinom
Muzinöses Karzinom
Karzinom mit medullären Eigenschaften
Karzinom mit apokriner Differenzierung
Karzinom mit siegelringzelliger Differenzierung
Invasives mikropapilläres Karzinom
Metaplastisches Karzinom, kein spezieller Typ

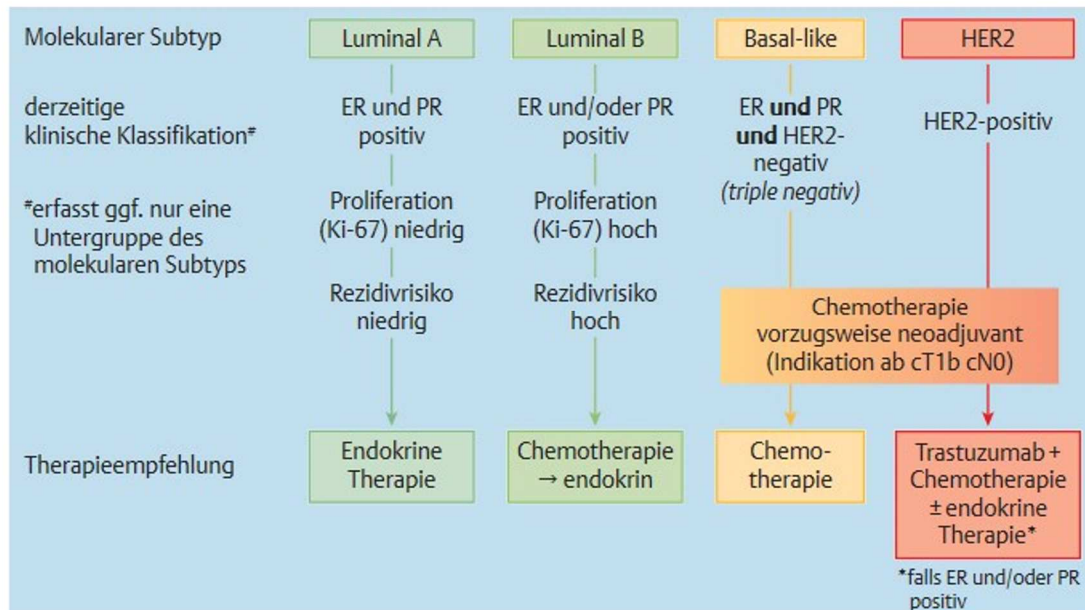


Abb. 3: Molekulare Subtypen und Therapieempfehlung

nach Univ.-Prof. Dr. med. Nadia Harbeck (Abb. entnommen aus: (Harbeck, 2013))

Legende: ER - Östrogenrezeptor, PR – Progesteronrezeptor, HER2 – „Human Epidermal Growth Factor Receptor 2“, Ki67-Proliferationsmarker

1.1.5 Pathogenese

Das wohl bekannteste Modell der Mammakarzinomentstehung geht von einer „linearen Progression“ aus. Wellings et al. publizierten 1975, dass die meisten invasiven Mammakarzinome ihren Ursprung in den Milchdrüsengängen, in den sogenannten terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLEs) haben. Eine terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLE) besteht aus einem Lobulus und dem Ductus terminalis, welche eine sekretorische Einheit der Brustdrüse bilden. Hier entwickeln sich in den TDLEs die verschiedenen Krebsvorstufen: Aus einer epithelialen Proliferation eine atypische duktales Hyperplasie (ADH) und daraus ein duktales Carcinoma in situ (DCIS). Dieses kann in ein invasives Mammakarzinom übergehen (Bombonati & Sgroi, 2011; Wellings, 1980; Wellings & Jensen, 1973; Wellings, Jensen, & Marcum, 1975).

1.1.6 Duktales Carcinoma in situ (DCIS)

Das duktales Carcinoma in situ (DCIS) entsteht innerhalb des duktulo-lobulären Systems und ist eine intraduktales neoplastische Proliferation von Epithelzellen, die durch eine intakte Basalmembran und Myoepithelzellschicht vom Bruststroma getrennt ist. Es wird als obligate Präkanzerose angesehen. Unbehandelt entwickelt sich in 40 % der Fälle ein

invasives Karzinom. Daher besteht bei der Diagnose „DCIS“ eine (chirurgische) Behandlungsindikation (Cowell et al., 2013; Kamińska, Ciszewski, Łopacka-Szatan, Miotła, & Starosławska, 2015; Lakhani et al., 2012; Sinn & Kreipe, 2013). Zur Abgrenzung zu lobulären Karzinomen lässt sich bei DCIS immunhistochemisch E-Cadherin nachweisen (Böcker & Decker, 2008a). Ohne systematisches Screening beträgt der Anteil der diagnostizierten DCIS nur 5 %. Seit dessen Einführung ist der prozentuelle Anteil nun auf 20 % gestiegen (Pinder, 2010). Dieser Prozentsatz zeigt, wie wichtig dieses Screening für die Betroffenen ist, da ansonsten solche Diagnosen übersehen werden und sich daraus invasive Mammakarzinome entwickeln könnten. Meist sind tumorassoziierte Mikrokalzifizierungen bei der Mammographie zu erkennen (Klöppel et al., 2013).

Zur besseren prognostischen Vorhersagbarkeit bezüglich einer Entwicklung eines Mammakarzinoms zählt nicht nur die Feststellung eines DCIS, sondern auch die Größe des Tumors, der Kernmalignitätsgrad, das Auftreten von (Komedo-)Nekrosen und der Abstand vom Resektionsrand (Pinder, 2010).

Der Kernmalignitätsgrad steht in einem engen Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit zur Progression zum invasiven Karzinom (Pinder, 2010). Das DCIS wird daher nach dem Kernmalignitätsgrad in niedrig-, intermediär- und hochmaligne unterteilt. Beispielsweise ist das DCIS mit hochmalignem Kerngrad meist größer als 5 mm und zeigt mikroskopisch eine hochgradig atypische Zellenpopulation und oft multiple prominente Nukleolen. Komedonekrosen sind ebenfalls häufiger nachweisbar (Lakhani et al., 2012).

1.1.7 Invasives Mammakarzinom

Seit der 4. Auflage der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2012 wird das vormals „invasiv duktales Mammakarzinom - nicht anders spezifiziert“ (IDC) als invasives Mammakarzinom (NST, „*no special type*“, nicht spezieller Typ) bezeichnet, da es keine speziellen histo-logischen Differenzierungsmerkmale aufweist, die anderen Kategorien von Mammakarzinomen zuzuordnen wären (Sinn & Kreipe, 2013). Die Tumorzellen können clusterartig, trabekelartig angeordnet sein, aber auch überwiegend solide und syncytial infiltrative Muster aufweisen. Tumorzellen variieren stark in ihrem Aussehen, das Zytoplasma kann reichlich und eosinophil sein. Die Morphologie der Zellkerne variiert von regulär und uniform bis pleomorph mit prominenten Nukleolen (Lakhani et al., 2012). Die Größe des Tumors variiert von wenigen Millimetern bis zu über 100 mm und ist

palpatorisch von derber Konsistenz. Makroskopisch weisen diese Tumoren teilweise eine radiäre, irreguläre Morphologie auf (Böcker & Decker, 2008b; Lakhani et al., 2012). Die Schnittfläche präsentiert sich meist grauweiß mit gelber Streifung. In bis zu 80 % der Fälle liegt neben dem invasiven Mammakarzinom ein duktales Carcinoma in situ (DCIS) vor. Ein invasives Mammakarzinom vom NST-Typ kann dann diagnostiziert werden, wenn mehr als 50 % des Gesamttumors keinem der spezifischen Muster anderer Mammakarzinome entspricht (Klöppel et al., 2013; Lakhani et al., 2012). Mit 75 % macht das invasive Mammakarzinom vom NST-Typ den größten Teil der Mammakarzinome aus (Böcker & Decker, 2008a; Yerushalmi, Hayes, & Gelmon, 2009).

1.1.7.1 Invasives lobuläres Mammakarzinom

Das invasive lobuläre Mammakarzinom macht 5-15 % aller invasiven Mammakarzinome aus und stellt den zweithäufigsten Subtyp der invasiven Mammakarzinome dar (Böcker & Decker, 2008a; Lakhani et al., 2012; Yerushalmi et al., 2009).

Immunhistochemisch lässt sich in über 80 % der Fälle der Verlust der membranösen E-Cadherin-Expression nachweisen (Klöppel et al., 2013), wodurch es zur fehlenden Adhäsion zwischen den Tumorzellen kommt, was die besondere diskohäsive Morphologie ausmacht. Zumeist sind die Tumorzellen in einreihigen Ketten bzw. zeilenförmig („gänsemarschartig“) angeordnet. Ebenso findet man keine desmoplastische Stromareaktion. Dementsprechend weisen 8-16 % solcher Karzinome keinen mammographischen Befund auf (Böcker & Decker, 2008b).

1.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition

Charakteristisch für Tumorzellen eines invasiven Mammakarzinoms ist die Fähigkeit zur Invasion in das umgebende Gewebe. Hierbei kommt es zum Überschreiten der Myoepithelschicht und der Basalmembran mit der Möglichkeit zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung.

Ein Modell für die Fähigkeit zur Invasion und Ausbildung von Metastasen ist die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT). Hier spielen Transkriptionsfaktoren wie Twist1 und Snail1, die auch während der Embryonalentwicklung aktiv sind, eine wichtige Rolle (Ansieau, 2013; Choi et al., 2013; Knudsen et al., 2012).

1.2.1 Einführung in die EMT

Im Wesentlichen ist die EMT ein evolutionärer Transdifferenzierungsprozess (J. P. Thiery, 2002; Jean Paul Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009), welcher an der Embryogenese und Wundheilung beteiligt ist (Drasin, Robin, & Ford, 2011; Kalluri & Weinberg, 2009; Y. Kang & Massague, 2004; Jean Paul Thiery et al., 2009; J. P. Thiery & Sleeman, 2006; J. H. Tsai & Yang, 2013; Ye & Weinberg, 2015).

Auch in der Tumorinitiation und Progression wird in der Literatur die EMT als zentraler Mechanismus diskutiert (Kalluri & Weinberg, 2009). Hinweisend darauf zeigen Studien, dass in über 95 % der Mammakarzinome innerhalb des Primärtumors Epithelzellen mesenchymale Eigenschaften annehmen (Tomaskovic-Crook, Thompson, & Thiery, 2009).

Grundsätzlich lässt sich die EMT in drei Subtypen unterteilen (Kalluri & Weinberg, 2009; Riede & Werner, 2017):

Typ 1: Die klassische Form der EMT wird während der Embryogenese beobachtet und ist essentiell, da dieser Prozess zur Ausbildung der drei Keimblätter (Ekto-, Endo- und Mesoderm) während der Gastrulation führt. Der Prozess ermöglicht die Migration von Zellen und Ausbildung der Neuralleiste. Später, bei der Organbildung, kommt es zur Umkehr der EMT – der MET (Mesenchymale-Epitheliale-Transition). Mittels Transdifferenzierung werden Mesenchymzellen, mit der Fähigkeit der Migration, zu ortsständigen Epithelzellen (Kalluri & Weinberg, 2009).

Typ 2: Dieser Typ der EMT findet während der Wundheilung, Geweberegeneration und Organfibrose statt und ist entzündungsassoziiert. Fibroblasten wandern in den Gewebedefekt ein und es erfolgt eine Reepithelialisierung. Bei fortbestehendem Entzündungsreiz kommt es zur Organfibrose, da die EMT nicht unterdrückt wird. Der Prozess kann zur Organdestruktion führen (Kalluri, 2009).

Typ 3 (onkogene EMT):

Der letzte Schritt zu einer malignen Entartung ist die Invasion und Metastasierung und beschreibt den dritten Typ der EMT, welcher bei der Tumorprogression reaktiviert wird (Drasin et al., 2011; Kalluri & Weinberg, 2009; Kim et al., 2017; X. Liu & Fan, 2015; Son & Moon, 2010; Jean Paul Thiery et al., 2009; Ye & Weinberg, 2015).

1.2.2 EMT und Tumorprogression

Über bisher noch nicht abschließend geklärte Regelmechanismen wandeln sich Zellen mit epithelialen Eigenschaften (Ausbildung von Zellverbänden, apikal-basale Polarisation, Basalmembran, Verbindung über *Tight Junctions*, *Adherens Junctions*, *Desmosomen* und *Gap Junctions*) (Jean Paul Thiery et al., 2009; Welsch & Sobotta, 2006), zu solchen mit mesenchymalen (Drasin et al., 2011) beziehungsweise auch stammzellartigen Eigenschaften um (Ansieau, 2013). Zellen mesenchymalen Phänotyps weisen keine organisierte Zellschicht auf, besitzen keine apikale-basale Polarisation und besitzen die Fähigkeit zum Abbau der *Tight Junctions* und der extrazellulären Matrix. Durch diese erlangten Fähigkeiten können sie die Basalmembran penetrieren, in entfernte Gewebe gelangen und sich dort auch wieder zu Epithelzellen transformieren (Yang et al., 2004). Dieser Vorgang wird als „Mesenchymale-Epitheliale Transition“ bezeichnet (MET) (Tauben et al., 2010). Jene Zellen, die diese Entwicklung vollzogen haben, zeigen außerdem erhöhte Apoptoseresistenz. Hier weisen Karzinomzellen beide Zelleigenschaften auf (Kalluri & Weinberg, 2009; Kim et al., 2017; Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Durch diese Transformation kommt es zur Bildung von Metastasen über lymphogene und hämatogene Streuung in lebenswichtige Organe (Mathew et al., 2017).

1.2.3 Schlüsselfaktoren bei der EMT

Zur Initiierung einer EMT bedarf es einer Aktivierung verschiedener embryonischer Proteine, wie die Transkriptionsfaktoren ZEB1, SNAIL und Twist1. Diese steuern sowohl die Expression als auch die Repression zahlreicher Proteine, die an der Zellpolarität, Zell-Zell-Kontakt, Zytoskelettstruktur und an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Ansieau, 2013; Lamouille et al., 2014; Peinado, Olmeda, & Cano, 2007; Jean Paul Thiery et al., 2009).

Diese embryonalen Proteine sind in den adulten Zellen gewöhnlich inaktiv, können aber in Tumoren reaktiviert werden. Durch die Reaktivierung dieser Transkriptionsfaktoren erlangen die Tumorzellen einen Selektionsvorteil und sind gegenüber einer Apoptose immun, da sie auch den protektiven *p53*-Signalweg inhibieren können (Ansieau, 2013). Zudem zeigen sich Tumorzellen gegenüber einer Chemotherapie resistenter (A. Singh & Settleman, 2010).

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass EMT nicht als alleiniges Metastasierungsmodell erachtet wird (López-Soto, Gonzalez, Smyth, & Galluzzi, 2017).

1.3 Twist1

Das *Twist1* Gen (*Twist Family BHLH Transcription Factor 1*) ist auf dem Chromosom 7p21 lokalisiert und besteht aus zwei Exons und einem Intron, wobei nur das erste Exon für ein Protein codiert (Zhu, Ma, Wang, Song, & Lv, 2016).

Schon im Jahr 1987 konnte an *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) durch Thisse et al. die Bedeutung von Twist1 während der Gastrulation aufgezeigt werden. Durch Aktivierung dieses Faktors kommt es zur Migration der Zellen aus der Ventraleinfurchung und zur Bildung der Mesodermanlage in der Embryogenese (Thisse, El Messal, & Perrin-Schmitt, 1987).

Twist1 hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Zellplastizität (Schmidt et al., 2015), die insbesondere während der Embryonalentwicklung eine essentielle Rolle spielt (Kim et al., 2017; Zhu et al., 2016). Mutationen des *Twist1*-Gens sind verantwortlich für das autosomal-dominante vererbte Saethre-Chotzen-Syndrom (Kress et al., 2006).

Yang et al. beschrieben 2004, dass *Twist1* ein Hauptregulator-Gen ist, welches in invasiven lobulären Mammakarzinomen überexprimiert ist. Eine hohe Twist1-Expression geht mit einer hohen Tumorinvasion- und Metastasierungsrate einher. Unter dem Einfluss einer Hochregulation des Transkriptionsrepressors Twist1 kommt es zu einer veränderten Genexpression. Solche EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren binden an die E-Box Elemente des Promotors von Genen welche für E-Cadherin codieren (Yang et al., 2004). Weitere Studien belegen, dass *Twist1* über die Repression des E-Cadherins wesentlich zur Metastasierung beiträgt (Peinado et al., 2007; J. H. Tsai, Donaher, Murphy, Chau, & Yang, 2012; Yang et al., 2004). Eine neuere Studie von Shamir et al. zeigte, dass sich bereits eine erhöhte Twist1-Expression auf Gene auswirkt, welche die Zell-Matrix-Adhäsion regulieren (Shamir et al., 2014).

Die Verminderung der E-Cadherin-Expression führt zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion. Tumorzellen werden motil und transformieren zu mesenchymalen Zellen, was zur Metastasenbildung führen kann (Y. Kang & Massague, 2004; Yang et al., 2004). Auch

während der Tumoruminitiation soll *Twist1* eine bedeutende Rolle spielen, da auch im DCIS bereits *Twist1*-Expressionen detektiert wurden (Ansieau, 2013; Pang et al., 2014).

Insgesamt wird die Bedeutung der *Twist1*-Expressionslevel konträr diskutiert. Zum einen wird eine starke nukleäre *Twist1*-Expression in Mammakarzinomen mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert (Soini et al., 2011), und zum anderen wird postuliert, dass *Twist1*-negative Mammakarzinome ebenso mit einer schlechten Prognose einhergehen können (Drasin et al., 2011; Montserrat et al., 2011). In der Metastase ist die MET abgeschlossen und man hat wieder den vollen epithelialen Phänotyp. Daher wird in ihr kein *Twist1*, kein Vimentin, jedoch E-Cadherin exprimiert (J. H. Tsai et al., 2012). Einen möglichen Erklärungsversuch bietet die Arbeit von Schmidt et al. Sie konnten in ihrer Arbeit aufzeigen, dass ein Teil der immortalisierten humanen Mammaepithelzellen mit induzierbarem *Twist1*-Konstrukt (HMLE-*Twist1*-ER-Zellen), durch eine transiente *Twist1*-Aktivierung persistierende stammzellähnliche Eigenschaften erwerben, nachdem sie einen mesenchymalen-epithelialen Transformationsprozess durchlaufen haben. Durch den Erwerb von epithelialen und zugleich mesenchymalen Eigenschaften erklären sie auch das invasive Wachstumsverhalten. Die anschließende *Twist1*-Inaktivierung überprüften sie mittels der Wnt5a-Expression. Die erfolgreiche *Twist1*-Deaktivierung korrelierte mit einem niedrigen Wnt5a-Spiegel (Schmidt et al., 2015). Shi et al. zeigten im Jahr 2014 eine mögliche Interaktion eines Komplexes von *Twist1* (*Twist*/BRD4/P-TEFb und RNA-Pol II) am Enhancer/Promotor von Wnt5a, wodurch es hier durch die Induktion von *Twist1* zur erhöhten Wnt5a Expression kommt, welche während der EMT die Tumorigenität von Mammakarzinomzellen vorantreibt (Shi et al., 2014).

Wie allerdings *Twist1* während der Tumorgenese aktiviert wird, bleibt weiterhin unklar (Y. Kang & Massague, 2004).

Ungeachtet davon können die genannten Transkriptionsfaktoren auch zu einer veränderten Expression spezifischer microRNAs (miRNAs) führen, welche wiederum zu einer veränderten Genexpression führen (Kalluri & Weinberg, 2009), daher befasst sich folgender Abschnitt mit der Biogenese und Funktion der microRNAs.

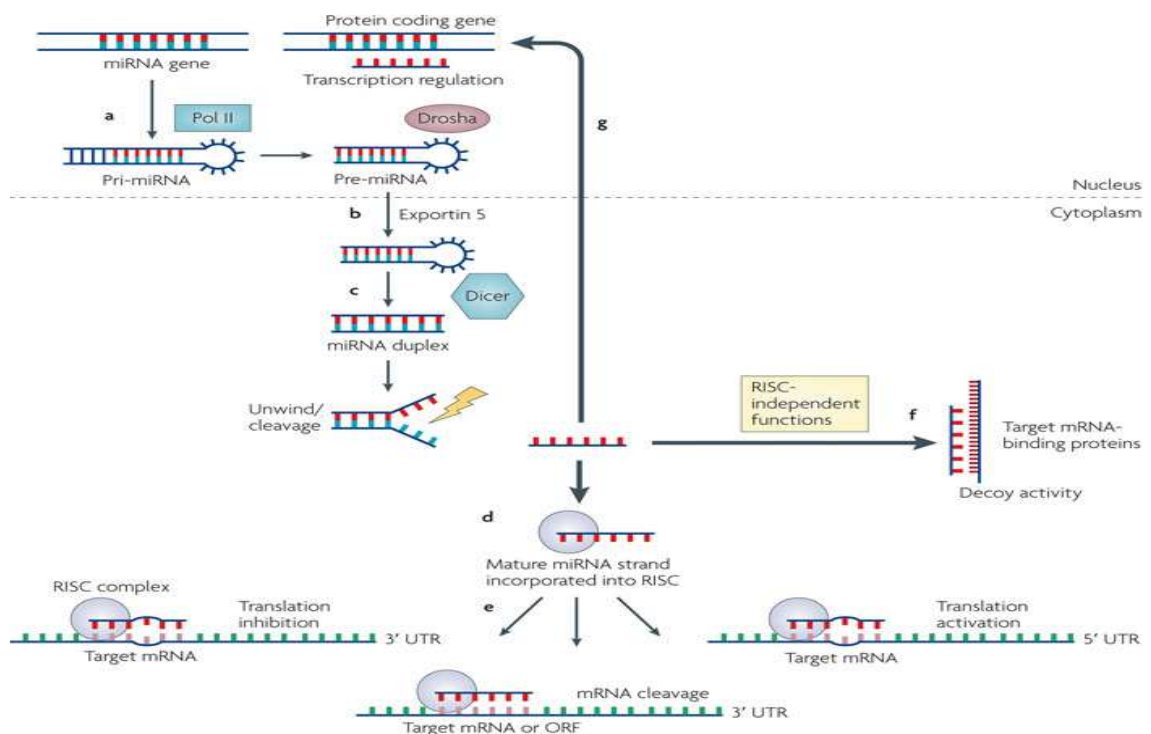
1.4 microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, endogene, einzelsträngige, nicht-kodierende Ribonukleinsäuremoleküle mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden (Ambros, 2004).

Die erste kleine regulatorische RNA, lin-4, wurde im Jahr 1993 bei der Erforschung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt, die einen negativen Einfluss auf das Gen lin-14 ausübt (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993).

1.4.1 Biogenese von miRNAs

In folgender Abbildung ist die Synthese der miRNAs dargestellt.



Nature Reviews | Drug Discovery

Abb. 4: Biogenese von miRNAs (Bildquelle: (Garzon, Marcucci, & Croce, 2010))
Dargestellt ist der mehrstufige Reifungsprozess einer microRNA.

Der Reifungsprozess einer miRNA erfordert mehrere Schritte (Garzon et al., 2010):

- Im Zellkern werden miRNAs vorerst durch die RNA-Polymerase II in eine lange *primary precursor miRNA* (*pri-miRNA*, Primärtranskript) transkribiert.
- Ebenso wie bei der mRNA findet hier eine Prozessierung statt, dadurch weisen *pri-miRNAs* sowohl eine Cap-Struktur am 5' Ende als auch einen Poly-A-Schwanz am 3' Ende auf. Introns werden herausgeschnitten (Splicing). Sie bilden unvollständige

Haarnadelstrukturen (Stemloops). Diese werden von einem Proteinkomplex, dem Microprozessor, bestehend aus Drosha und DGCR8/Pasha erkannt und gebunden. Die Ribonuklease Drosha schneidet diese Haarnadelstruktur heraus, sodass eine *precursor-miRNA (pre-miRNA)* entsteht, welche sich aus 60-80 Nukleotiden zusammensetzt.

- c) Diese *pre-miRNA* wird mittels Exportin5 aus dem Nucleus ins Zytoplasma transportiert.
- d) Hier erkennt das RNase Enzym Dicer1 die doppelsträngige RNA-Struktur und wird aktiv. Es schneidet sie so, dass eine doppelsträngige miRNA-Sequenz (miRNA-Duplex) entsteht. Die einzelsträngige miRNA (*mature miRNA*) entsteht dadurch, dass die nicht benötigte Sequenz von dem miRNA-Duplex abgetrennt wird.
- e) An diese einzelsträngige *mature miRNA* kann nun der *RNA-induced silencing complex* (RISC) binden.
- f) Dieser RISC-Komplex reguliert nun über zwei Mechanismen die Expression der *messenger RNA* (mRNA). Die mRNA ist eine einzelsträngige RNA, welche später als Matrice der Proteinbiosynthese dient.
- g) Bei einer hohen Komplementarität der miRNA in der 3' untranslatierten Region der Ziel-mRNA leitet der RISC-Komplex eine Degradation der mRNA ein.
- h) Bei einer partiellen komplementären Bindung der Basensequenz der miRNA und mRNA wird die Translation und somit die Proteinbildung gehemmt.

Im Vergleich zu gewöhnlichen RNA-Strängen, codieren miRNAs nicht für ein Protein, können aber durch ihre hohe Basenpaarung vor allem in der 3'UTR (untranslatierte Region) einer mRNA des betroffenen Gens die Expression des Proteins posttranskriptionell steuern. Sie können die Genexpression unterdrücken und verhindern dadurch deren Translation (Bartel, 2009; Y. B. Lee et al., 2009; Lin & Gregory, 2015; Wienholds & Plasterk, 2005). In anderen Studien ist auch bekannt, dass miRNAs ebenso in der 5'UTR binden können (Grey et al., 2010; I. Lee et al., 2009).

Durch ihr Bindungsmuster in der 3'UTR können miRNAs als negative Regulatoren in der Proteinexpression agieren (Bushati & Cohen, 2007). Weiters belegen zahlreiche Studien,

dass miRNAs eine regulatorische Funktion auf die EMT ausüben können (Chan & Wang, 2015; Zou, Liu, Gong, Hu, & Zhang, 2017).

So spielen miRNAs, wie hsa-miR-199a und hsa-miR-214, welche in dieser Doktorarbeit untersucht wurden, auch eine mögliche Rolle in der Tumورprogression (Y. B. Lee et al., 2009). Bereits 2009 zeigten Lee et al. in ihren Studien, dass während der Embryogenese *Twist1* diese beiden miRNAs steuern kann. Die Gene der beiden miRNAs liegen innerhalb des Introns des *Dynamin-3* Gens. *Twist1* kann durch die Bindung an die E-Box dieser Region die Expression des Transkripts steuern aus dem diese beiden miRNAs resultieren. Durch eine *Twist1*-Inhibierung kam es zu erniedrigten Expressionen von miR-199a und miR-214. Die Studie zeigt, dass *Twist1* unter physiologischen Bedingungen das miR-199a/214 Cluster steuern kann (Y. B. Lee et al., 2009).

Im Jahr 2013 konnten weitere Studien, wie die von Baumgarten et al. zeigen, dass *Twist1*- und hsa-miR-199a- und hsa-miR-214-Expression korrelieren. In dilatativen Kardiomyopathien war sowohl die *Twist1* Expression (43 %) wie auch die Expression von hsa-miR-199 (rund 38 %) und hsa-miR-214 (rund 41%) reduziert (Baumgarten et al., 2013).

Die miRNAs hsa-miR-199 und hsa-miR-214 spielen auch bei der Progression des Mammakarzinoms eine Rolle und werden in DCIS und Karzinomen vom NST-Typ differenziell exprimiert (Schultz et al., 2013; Schultz et al., 2010). Beide miRNAs sind im NST im Vergleich zum DCIS überexprimiert (Schultz, Bartsch, Sotlar, Petat-Dutter, et al., 2011). Zusätzlich konnte im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Harald Bartsch gezeigt werden, dass es durch eine Inhibition beider miRNAs zu einer markanten Reduktion der Invasivität der aggressiven Mammakarzinomzellen, wie MDA-MB-231 (Chavez, Garimella, & Lipkowitz, 2010) und TMX2-28, führte (Bartsch, 2016). Andererseits können andere miRNAs auch als Tumorsuppressoren agieren (Pal & Pal, 2013).

1.5 **BRCA1** (*BReast CAncer1*)

1990 wurde von Hall et al. erstmals das *BRCA1*-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 17q21 lokalisiert (Hall et al., 1990). Vier Jahre später wurde es von Miki et al. kloniert. Es setzt sich aus 24 Exons zusammen von denen 22 für ein Protein mit einem Molekulargewicht von rund 220 kDa codieren, welches aus 1863 Aminosäuren besteht (Miki et al., 1994).

BRCA1 ist ein nukleäres Phosphoprotein, welches eine bedeutsame Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität spielt und als Tumorsuppressor fungiert. Es ist an der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt, verhindert ein unkontrolliertes Zellwachstum, leitet die Apoptose ein und reguliert Transkriptionsfaktoren (Arizti et al., 2000; Boulton, 2006; Kreienberg, Moebus, Jonat, & Kühn, 2011; Miki et al., 1994; Wu, Koike, Takeshita, & Ohta, 2008).

Das BRCA1-Protein hat mehrere funktionelle Domänen (Abb. 5 B)(S. L. Clark, A. M. Rodriguez, R. R. Snyder, G. D. Hankins, & D. Boehning, 2012), welche mit zahlreichen Proteinen, die selbst wiederum Tumorsuppressoren sind, interagieren und Komplexe bilden (Silver & Livingston, 2012), um geschädigte DNA zu reparieren (C.-X. Deng, 2006; Jhanwar-Uniyal, 2003).

Im N-terminalen Bereich (Exone 2-7) liegt eine Zink-Finger Domäne, die für die E3-Ubiquitin-Ligasen Aktivität von BRCA1 zuständig ist. Dieser Bereich interagiert mit weiteren Proteinen, wie BARD1 (*BRCA1-Associated RING Domain*), BAP1 und E2F1 (C. X. Deng & Brodie, 2000).

Am C-terminalen Ende in den Exons 16-24, liegt die zweifach besetzte BRCT(BRCA1-C-Terminal)-Domäne. Sie ist eine Phosphoprotein-bindende Domäne, welche direkt mit weiteren Tumorsuppressorgenen wie *p53*, *BRCA2* und RNA Pol II interagiert (S. L. Clark, A. M. Rodriguez, R. R. Snyder, G. D. V. Hankins, & D. Boehning, 2012).

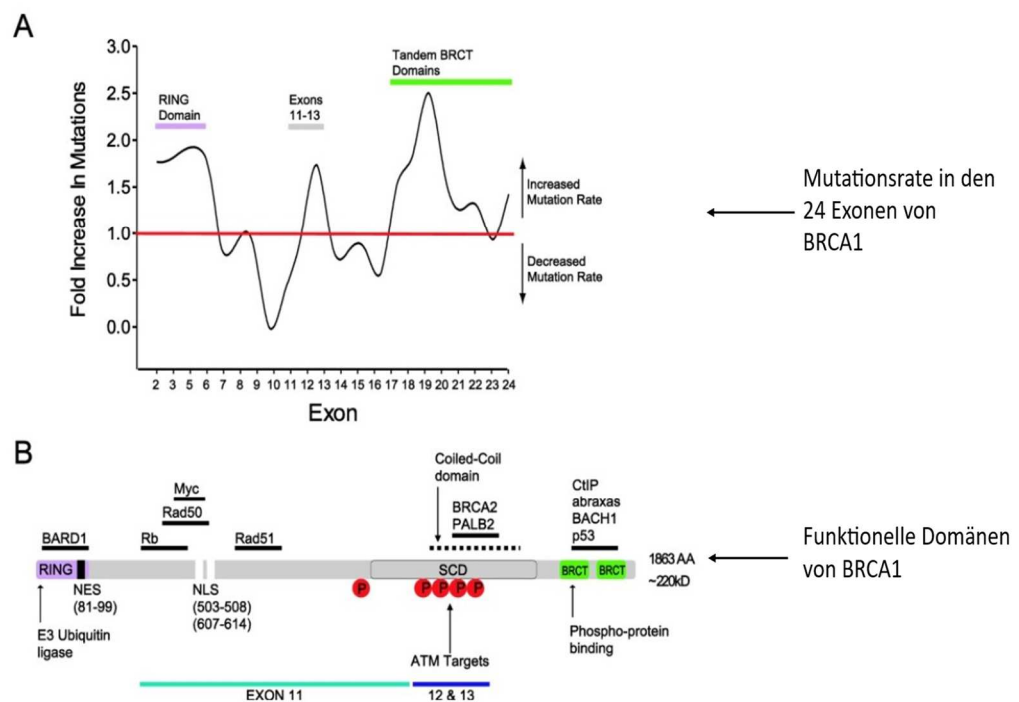


Abb. 5 A und B: Mutationsrate (A) und funktionelle Domänen (B) von BRCA1 (modifizierte Abbildung aus (Serena L. Clark et al., 2012))

Mit 3426 bp macht das Exon 11 den größten Anteil (60 %) von BRCA1 aus (El Khachibi et al., 2015). Dieser Bereich interagiert mit RAD51. RAD51 ist ein Reparaturprotein, das ebenso an DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (Scully et al., 1997). In den Exons 2 bis 7, 11 bis 13 und 16 bis 24 sind die häufigsten Mutationen zu beobachten (Abb. 5 A) (Serena L. Clark et al., 2012). Solche Mutationen können Folgen von Insertionen, Deletionen, Rasterverschiebungen oder Basensubstitutionen sein (Jhanwar-Uniyal, 2003).

Keimbahnmutationen im *BRCA1*-Gen erhöhen das Risiko einer genetischen Instabilität. Ein einziger (funktioneller) Allelverlust muss nicht obligat zur Tumorentstehung führen, sondern erhöht lediglich das Erkrankungsrisiko. Bei einer zusätzlichen Mutation des zweiten Allels (*Loss of Heterozygosity*, LOH) führt dies laut der Knudsons-Zweischritt-Hypothese zur kompletten Inaktivierung des Gens und somit zur Entwicklung eines Mammakarzinoms (Knudson, 1971).

Ein alternativer Mechanismus einer Inaktivierung dieses Gens wird auch der Hypermethylierung des *BRCA1*-Promotors zugesprochen. Hier kommt es folglich zur

verminderten Expression dieses Gens. Darunter fällt die Gruppe der sporadisch auftretenden Mammakarzinome (Esteller et al., 2000).

Annähernd 5 % aller Mammakarzinome sind auf eine Keimbahnmutation des *BRCA1* und *BRCA2* Gens zurückzuführen (ACOG Committee on Practice Bulletins, 2009; Apostolou, 2013; Schlehe & Schmutzler, 2008).

BRCA1-Mutationsträgerinnen wird eine frühzeitige (prämenopausale) Ovariectomie empfohlen. Dies würde das Brustkrebsrisiko auf beinahe 50 % reduzieren (Domchek & Rebbeck, 2007; Eisen et al., 2005; Gorski, Kennedy, Hosey, & Harkin, 2009). *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gehen mit einer schlechten Prognose und hoher Metastasierungsrate einher. Rund 85 % davon erkranken höchstwahrscheinlich an einem Mammakarzinom und bis zu 50 % an einem Ovarialkarzinom (Meindl et al., 2011). Charakteristisch ist ein frühes Erkrankungsalter. Bei diesen genetisch bedingten Mammakarzinomen handelt es sich auch häufig um tripel-negative Mammakarzinome (engl.: *triple negative breast cancer, TNBC*). TNBC exprimieren weder die Hormonrezeptoren Estrogen (ER) und Progesteron (PR) noch *Human Epidermal Growth factor-2* (HER2) (Kreienberg et al., 2011).

Tumorsuppressoren, wie das *BRCA1*, können die Aktivierung des EMT-Programms (siehe Kapitel 1.2.1, Typ 3) unterdrücken und somit auch die Entstehung eines Mammakarzinoms. In den Untersuchungen von Bai et al. konnte gezeigt werden, dass durch heterozygote Keimbahnmutationen von *BRCA1* die Transkriptionsfaktoren der EMT und dadurch die EMT aktiviert wird. Weiters stellten sie fest, dass in Keimbahnmutationsträgerinnen die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren in den Epithelzellen der Mamma bereits vor der Tumorinitiation stattfindet. Zusammenfassend erklärten sie, dass es über die Bindung von *BRCA1* an die Promotorregion von *Twist1* zur Inhibierung der *Twist1*-Transkription kommt. Dies belegten auch ihre qPCRs (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) in denen der mRNA-Spiegel von *BRCA1* invers mit der *Twist1*-Expression korrelierte (Bai et al., 2014).

2 Zielsetzung der Arbeit

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine transiente *Twist1*-Aktivierung in Zelllinien zu einer Suppression von *BRCA1* führt.

Diese Doktorarbeit untersucht einen möglichen Mechanismus (Abb. 6), wie es durch *Twist1* induzierte, microRNA-vermittelte Suppression von *BRCA1* zu einer Induktion der epithel-mesenchymalen Transition (EMT) kommen kann. Hierbei wurde der Einfluss der microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 auf *BRCA1* analysiert.

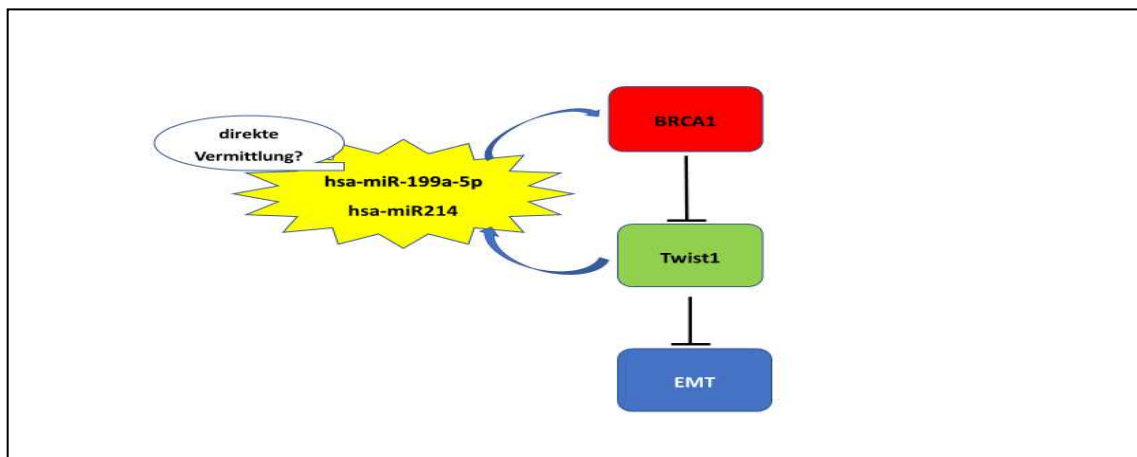


Abb. 6: Mögliche Interaktion von *BRCA1*, *Twist1* und der beiden microRNAs hsa-miR199a-5p und hsa-miR214

Fragestellung und Abfolge des Vorhabens:

1. Mögliche Einflussnahme einer transienten *Twist1*-Aktivierung auf *BRCA1*?
Überprüfung der Expressionslevel der beiden microRNAs (hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214) in HMLE-Twist1-ER-Zellen mittels qPCR und Verifizierung des BRCA1-Proteinlevels mittels Western Blot.
2. Mögliche Einflussnahme einer Überexpression der beiden microRNAs (hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214) auf *BRCA1*-Expression in unterschiedlichen Zelllinien (MCF-7, HMT-3522-S1)?
Überprüfung mittels qPCR und Verifizierung des BRCA1- Proteinlevels mittels Western Blot.
3. Mögliche direkte Interaktionen der microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 auf die 3'UTR von *BRCA1*?
Überprüfung mittels eines Luciferase Assays.

3 Methoden und Material

3.1 Zellkulturbioologische Methoden und Material

3.1.1 Verwendete Zelllinien und Kulturmedium

3.1.1.1 MCF-7 Zelllinie

Die humane MCF-7-Brustkrebs-Zelllinie (= *Michigan Cancer Foundation 7*) wurde 1970 an der *Michigan Cancer Foundation* aus einem malignen Pleuraerguss einer neunundsechzig Jahre alten Kaukasierin gewonnen, welche an einem Adenokarzinom der Mamma erkrankt war (Soule, Vazquez, Long, Albert, & Brennan, 1973). Die MCF-7 Zelllinie wurde als nicht-invasives Mammakarzinom klassifiziert (Soule et al., 1973) und ist in vitro durch die gute epitheliale Differenzierung, die E-Cadherin-Expression und der Östrogenrezeptor-Expression ein gutes Modell für die Mammakarzinomforschung. Zugabe von Östrogen zum Zellmedium bewirkt eine Proliferation der Zellen und kann als Modell für Frühstadien von Mammakarzinomen herangezogen werden (Sommers, Byers, Thompson, Torri, & Gelmann, 1994).

Gemäß der Einteilung nach ihrem Genexpressionsprofil zählt diese Zelllinie zum molekularen luminal-A Subtyp und ist zu den niedrig invasiven Mammakarzinomzelllinien zuzuordnen (Lacroix & Leclercq, 2004). Nach dieser Zuordnung ist sie Östrogenrezeptor (ER) positiv (Holliday & Speirs, 2011) und Progesteronrezeptor (PR) positiv (Dai, Cheng, Bai, & Li, 2017; L. W. Engel & Young, 1978). Ebenso wurden bereits einige Studien mit dieser Zelllinie im Zusammenhang einer *Twist1*-Überexpression durchgeführt, wodurch eine EMT induziert werden konnte (Mironchik et al., 2005; Wang, Liu, Ying, Lin, & Zhou, 2016). Eine vorübergehende Überexpression des Transkriptionsfaktors *Twist1* führt zur morphologischen Veränderung des luminalen Typs zu einem basal-ähnlichem Phänotyp (Wang et al., 2016).

Auf Grund der genannten Eigenschaften, wurde diese Zelllinie von uns als Analogie zum DCIS für die Untersuchung verwendet.

Die MCF-7 Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer (Heinrich-Heine-Universität, Frauenklinik, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640 ohne Phenolrot (Biochrom, #F1275), 10 % Fetal Calf Serum (Biochrom, #S0115), 25 mM Hepes (Sigma-Aldrich, #H0887) und 1% (v/v) Penicillin – Streptomycin (Biochrom, #L2143)

3.1.1.2 HeLa Zelllinie

Als Positiv-Kontrolle bei Western Blots und qPCRs wurde die HPVTyp 18 positive HeLa – Zelllinie (Henrietta Lacks) verwendet (Skloot, 2010). Ihren Namen erhielt diese Zelllinie von einer 1951 verstorbenen Frau mit einem zervikalen Adenokarzinom namens Henrietta Lacks. Aus dieser Zervixbiopsie wurde schließlich von Dr. Gey die erste menschliche immortalisierte Zelllinie etabliert (Lucey, Nelson-Rees, & Hutchins, 2009).

Diese Zelllinie wurde von American Type Culture Collection (ATCC) CCL 2, Rockville, Maryland, USA bezogen und nach dessen Protokoll in Kultur genommen.

Kulturmedium: RPMI 1640 mit Phenolrot (Biochrom, #F1275), 10% *Fetal Calf Serum* (Biochrom, #S0115)

3.1.1.3 HMT-3522-S1

Als eine weitere nicht-maligne humane Mammaepithelzelllinie wurde die HMT-3522-S1 Zelllinie verwendet. Sie ist im Gegensatz zur MCF-7 Zelllinie, eine östrogenrezeptorfremde und somit auch nicht durch Östradiol stimulierbare, nicht-tumorigene benigne Mammaepithelzelllinie, welche aus einem fibrozystischem Mammagewebe gewonnen wurde. Sie ist von einem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) abhängig. Eine Mutation am Codon 179 für p53 konnte ebenso nachgewiesen werden (Briand, Petersen, & Van Deurs, 1987; Vidi, J Bissell, & A Lelièvre, 2013). Sie zählt durch ihr Genexpressionsprofil zum basalähnlichem Subtyp und ist demnach ER und HER2 negativ (Rizki et al., 2008)

Diese Zellen wurden von ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, #98102210, lot 08J002) bezogen und nach dessen Protokoll in Kultur genommen.

Kulturmedium: DMEM/Ham's F12 (1/1) + 2 mM Glutamine (Biochrom, #FG4815), 250 ng/ml Insulin (Sigma, #I0516), 10 µg/ml Transferrin (Sigma, #T8158), 10E-8M *sodium selenite* (Sigma, #S5261), 10E-10M 17 *beta-estradiol* (Sigma, #E2758), 1 mg/ml *hydrocortisone* (Biochrom, #K3520), 5 µg/ml *ovine prolactin* (Sigma, #L6520-250°IU) und 20 µg/ml EGF (Sigma, #E5036)

3.1.1.4 HMLE-Twist1-ER-Zelllinie (Humane immortalisierte Mammaepithelzelllinie)

Die HMLE-Twist1-ER Zelllinie ist eine hormonrezeptornegative immortalisierte Zelllinie (Elenbaas et al., 2001), welche retroviral mit einem Twist1-Konstrukt (pWZL-Twist-ER-

Vektor) transduziert (Casas et al., 2011) wurde. Hierbei ist Twist1 an einen mutierten Östrogenrezeptor gebunden und kann zur Induktion einer EMT durch 4-Hydroxytamoxifen aktiviert werden (Casas et al., 2011; Mani et al., 2008; C. Scheel et al., 2011).

Diese, bereits mit dem Expressionsvektor transduzierte HMLE-Twist1-ER Zelllinie, wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Christina Scheel vom Institut für Stammzellforschung, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: *Mammary Epithelial Cell Growth Medium* (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland #C-21010), Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA, Biochrom, #L2143), Trypsininhibitor (1%) (Biochrom, #L2181) (1/10 in PBS = 0,1% (Biochrom, #L1825) und Penicillin Streptomycin (Biochrom, #A2113)

Tamoxifenstimulation:

Mittels Tamoxifenzugabe lässt sich *Twist1* in HMLE-Twist1-ER Zellen aktivieren. Hierzu wurde je einmalig die 4-Hydroxytamoxifen-Stocklösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) von 0,2 mM auf eine 20 nM Konzentration (1:10000) mit Ethanol verdünnt und 0,5 µl davon zu 5 ml zum Arbeitsmedium hinzugefügt um das ER-induzierbare Twist1-Konstrukt zu aktivieren (Schmidt et al., 2015).

Die Versuche mit den unterschiedlichen Zeiten der Tamoxifenstimulation (24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden) wurden in Triplets in biologischen Replikaten durchgeführt. Die „Ernte“ der kultivierten Zellen erfolgte nach 24-stündiger, 48-stündiger oder nach 72-stündiger Tamoxifenbehandlung. Da der größte Effekt nach 72 Stunden zu erwarten war, wurde ein weiteres biologisches Replikat angelegt. Für die weitere Verwendung wurde jeweils zu den genannten Zeiten zum einen RNA (siehe 3.2.1) und zum anderen Proteine (siehe 3.1.6) isoliert.

3.1.1.5 H1299 Zelllinie

Die H1299-Zelllinie (ATCC® CRL-5803™) ist eine adhärente humane, p53-negative Lungenkarzinomzelllinie. Sie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte analog der MCF-7-Zelllinie.

3.1.2 Zellkultur

Kryokonservierte Zellen (aus dem Stickstofflager (-80 °C)) wurden für 2 min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Diese wurden dann in ein mit 5 ml vorgewärmten Medium

gefülltes Falcon überführt und anschließend für 5 min bei 1100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet mit 5 ml jeweiligem Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Überführung in eine T25 Zellkulturflasche, wurde diese in den Brutschrank gestellt.

Die Inkubation aller Zellkulturen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂.

Es wurden hierzu Zellkulturflaschen (T25 Firma Sarstedt) verwendet.

3.1.3 Passagieren der Zellen

Um die Kulturzellen nicht an ihrem Wachstum zu hindern, müssen die Zellen, sobald sie eine gewisse Konfluenz erreicht haben, passagiert werden, da nach gewisser Zeit die Nährstoffe des Mediums aufgebraucht sind und Stoffwechselprodukte entstehen, die toxisch wirken können. Außerdem würden sie in die G₀-Phase geraten und sich nicht weiter vermehren (Gstraunthaler & Lindl, 2013a). Die Passagierung erfolgte, sobald circa 80 % des Flaschenbodens bedeckt waren. Sie erfolgte nach 2 bis 3 Tagen und der Mediumwechsel nach ungefähr 7 Tagen.

Die Arbeit erfolgte wieder in Zellkulturflaschen (T25) der Firma Sarstedt.

Zuerst wurden 5 ml des Mediums aus der Flasche abgenommen. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit je 1 ml PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Biochrom, #L1825), welches wieder abgenommen wurde. Durch diese phosphatgepufferte Salzlösung werden noch Reste des Mediums von den Zellen abgespült, damit die nachfolgende Trypsinlösung besser einwirken konnte (Gstraunthaler & Lindl, 2013b).

Die Trypsinierung (Boxberger, 2013) ist eine weit verbreitete Methode um adhärenente Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Hierfür wurde 1 ml Trypsin (0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung, Biochrom, #L2143) hinzugeführt, geschwenkt und für nur 3 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch die kurze Einwirkzeit von Trypsin werden nur extrazelluläre Proteine gespalten, sodass die Zellen erhalten bleiben. EDTA, ein Ca²⁺ Chelator löst hierbei die Zell-Zell-Verbindungen. Die abgekugelten Zellen sitzen danach nur mehr punktförmig am Flaschenboden auf. Daher konnten die zuvor adhärenenten Zellen, durch vorsichtiges Abklopfen der Flasche, vom Flaschenboden gelöst werden. Die Trypsinierung wurde durch 1 ml FCS-haltiges Medium/Trypsininhibitor (Biochrom, #L2181) inhibiert beziehungsweise die Proteolyse gestoppt. In weiterer Folge wurden die Zellen in ein

15 ml Falcon überführt und bei 5 Minuten und 1100 Umdrehungen pro Minute in die Zentrifuge gestellt. Durch diesen Vorgang setzten sich die Zellen (Pellet) am Boden fest und der Überstand konnte abgekippt werden. Das Pellet wurde vorsichtig mit dem Medium wieder resuspendiert, in eine Kulturflasche überführt und wieder zurück in den Brutschrank gestellt.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer, einem optischen Präzisionsgerät, welche mit einem Häemocytometer versehen ist. Die Zählung vor jeder Einsaat ist insofern wichtig, um eine definierte Zellzahl einzusetzen und so die Wachstumsgeschwindigkeit und weitere Arbeitsschritte genauer kontrollieren zu können.

Da ausschließlich vitale Zellen gezählt werden, wurde zum Anfärben Trypanblau (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Tote Zellen erscheinen dabei unter dem Mikroskop tiefblau, während vitale Zellen heller erscheinen.

Zuvor mussten die adhärenenten Zellen einer Trypsinierung unterzogen werden. Dazu wurden die überführten Zellen für 5 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 500 μ l Zellmedium resuspendiert.

45 μ l Trypanblau wurde hierfür in einer Wellplatte vorgelegt und anschließend 5 μ l der Zellsuspension zugegeben (1:10). 5 μ l Trypanblau-Zellsuspension wurde für die Befüllung der Zählkammer verwendet. Die Kammer, bestehend aus neun großen Quadraten, wurde unter das Mikroskop mit 10-fach-Objektiv gelegt. Aus den vier großen Quadraten, die je 0,1 μ l fassen, werden jeweils die vitalen Zellen gezählt und daraus der Mittelwert errechnet. Aus der Summe der 4 Großquadrate $\times 10^5$ errechnet sich die Zellzahl pro ml. Die Multiplikation mit 10^4 ergibt die Zellkonzentration pro ml.

3.1.5 Stabile Transduktion mittels lentiviraler Vektoren

Über die virale Transduktion werden unter Verwendung von Lentiviren Nukleinsäuren in die Zellen transferiert.

Die stabile lentivirale Transduktion von MCF-7 und HMT-3522-S1 Zellen mit hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 wurde in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter (AG Sotlar) durchgeführt, da es sich um gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 (S2) handelt.

Für die jeweilige Überexpression oder *Knock-Down* der beiden miRNA hsa-miR199a-5p und hsa-miR214 wurde ein lentiviraler Plasmidvektor im gebrauchsfertigen viralen Partikelformat von abmGood (<http://www.abmgood.com>) bezogen. Die lentiviralen microRNA-*Precursor*-Vektoren exprimieren humane microRNA-Vorläufer in ihrem nativen Sequenzkontext, was eine korrekte Verarbeitung zu reifen microRNAs sicherstellt. Das hemmende miRNA-Lentivirus wirkt durch Expression von anti-sense-microRNAs (in siRNA-Form). Die verwendeten Vektoren sind aus der folgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Vektoren, welche von Firma abmGood bezogen wurden

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • GFP hsa-mir-199a-1 5p only lentivirus (benutzerdefiniertes Konstrukt) • Inhibitor hsa-miR-199a-5p Lentivirus (#mh35296) • GFP hsa-mir-214 Lentivirus (#mh15286) • Inhibitor hsa-miR-214 Lentivirus (#mh35340) • pLenti-III-mir-GFP-Blank (Control) (#m002) • pLenti-III-mir-Off-Blank (Control) (#m008) |
|--|

Die Transduktion erfolgte nach Angaben des Herstellers von abm® unter Verwendung von Polybrene (Hexadimethrine bromide, Sigma-Aldrich, # H9268) in einer Endkonzentration von 2 µl/ ml.

Eine 30%ige Konfluenz der Zellen waren ausreichend für eine erfolgreiche Transduktion. Unter Konfluenz ist die Zelldichte, beziehungsweise inwieweit die Oberfläche des Zellkulturgefäßes von den adhärenen Zellen bedeckt ist, zu verstehen.

Die Inkubation erfolgte für maximal 12 Stunden bei 37 °C und in einer Atmosphäre mit 5%igem CO₂-Anteil.

Zur Selektion der stabil transduzierten Zellen wurde Puromycin (Sigma P8833-10 mg) unter folgender Konzentration verwendet:

MCF-7: 1,5 - 2,0 µg/ ml

HMT-3522-S1: 1,0 µg/ ml

3.1.6 Proteinextraktion von adhärenen Zellen

Um die Proteinexpression von *BRCA1* analysieren zu können, müssen zuvor die Proteine aus den Zellen isoliert werden. Die Proteinextraktion erfolgte nach einem hausinternen Protokoll: Das Kulturmedium wurde vorsichtig unter sterilen Bedingungen unter der Zellkultur-Hood abpipettiert. Anschließend dreimal mit je 1 ml warmen 0,89%igen NaCl gewaschen und wieder abgenommen. Nach Zugabe von 70 µl Lysispuffer zu den T25

Flaschen konnten die Zellen mit einem Zellschaber gelöst werden und zusammen mit dem Lysispuffer in ein 1,5 ml großes Eppendorfgefäß überführt werden. Der Lysis-Puffer wurde zuvor im Verhältnis von 1:100 aus ProteoBlock (*Protease Inhibitor cocktail*, Fermentas, #R1321) und ProteoJet (Fermentas, #K0311) vorbereitet.

Anschließend wurden die Eppendorfgefäße für 30 Minuten bei 4°C im Kühlraum im Karussellmischer (Fa neoLab, Heidelberg, Deutschland) gemischt.

Weiters erfolgte die Zugabe der Benzonase (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, #1.01654.0001) (0,025 x Volumen (µl), hierbei wurden die Proben wieder für 15 Minuten lang gemischt. Danach wurden die Eppendorfgefäße bei 16000 x *g* für 15 Minuten bei 4°C (Eppendorf Centrifuge 5415 R) zentrifugiert. Der Überstand mit den herausgelösten Proteinen wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Die Proteinlysate wurden immer bei -80°C bis zur Weiterverwendung zwischengelagert.

3.1.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Damit später im Western Blot immer äquivalente Proteinmengen aufgetragen werden, muss zuvor von den gewonnenen Lysaten die Konzentration bestimmt werden.

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde die photometrische Methode nach Lowry verwendet (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). Sie beruht auf zwei Reaktionen. Die erste Reaktion ist die Biuret-Reaktion, hier bildet sich ein blauvioletter Komplex zwischen den Peptidbindungen und Kupferionen in alkalischer Lösung. Diese unterstützt die Reduktion der gelben Folin-Ciocalteau Reagenz zu Molybdänblau. Diese Blaufärbung wird schließlich zur quantitativen Proteinkonzentration genutzt.

Das BSA-Proteinstandard-Set (Bio-Rad, #500-0207) wurde auf Raumtemperatur gebracht und gemischt. Währenddessen wurden die Proteinlysate auf Eis aufgetaut und zart gemischt.

Zuerst wurde Reagenz A' bestehend aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S (DC Protein Assay, Bio-Rad, #500-0116) vermischt. Danach wurde in einer ELISA Platte (TPP, #92696) jeweils 25 µl der Reagenz A' pro Probe vorgelegt. Danach wurde jeweils 5 µl des Proteinlysats und 5 µl des Standards vorgelegt.

Anschließend wurden 200 µl vom Reagenz B (DC Protein Assay, Bio-Rad, #500-0116) je Well zugefügt und nachher leicht geschüttelt. Die Inkubationszeit betrug circa 30

Minuten bei 37 °C in der Dunkelheit auf der Wärmeplatte (Meday Nagel GmbH, Kiel). Im Anschluss wurde die Platte auf Raumtemperatur gebracht. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen sowohl der Proben als auch der Standards durchgeführt. Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte am Elisa Reader (Varioskan) mit der Thermo Scientific SkanIt® Software for Varioskan® Version 2.4.3 bei 750 nm. Die Konzentration wurde nach der Formel (Konzentration = (Steigung x OD) + Achsenabschnitt) im Excelprogramm unter der Verwendung einer Eichkurve der Proteinstandards (Abb. 7) berechnet.

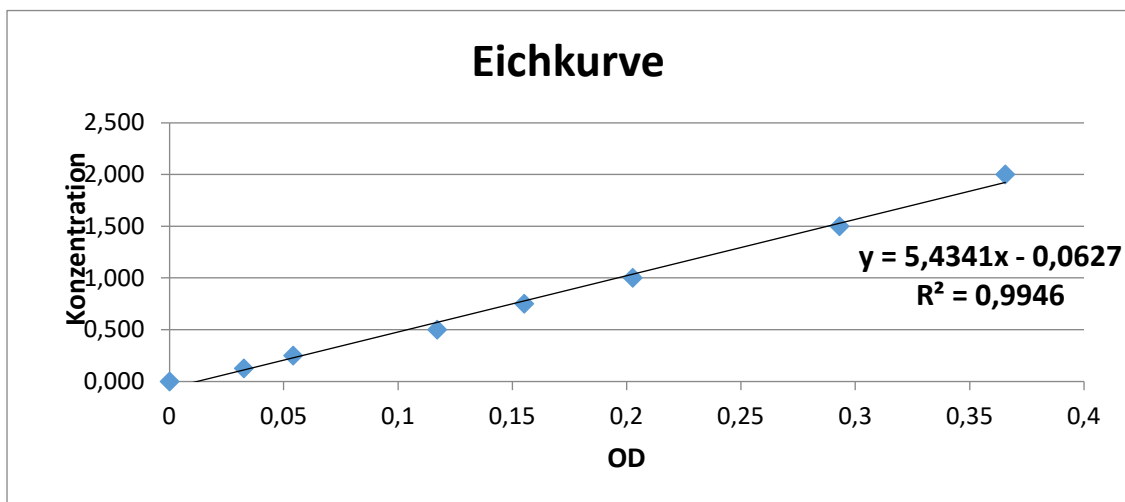


Abb. 7: Beispiel einer Eichkurve

OD = optische Dichte

Zur Erklärung: Beispielsweise bei einer OD von 0,2 hat man die Konzentration von 1 µg/ml.

3.1.8 Überprüfung der Proteinexpression mittels Western Blot

Der Western Blot dient zum immunologischen Nachweis von Proteinen. Dieses Verfahren wurde verwendet um den Gehalt und Veränderungen des Proteins BRCA1 zu visualisieren. Auf Grund des großen Molekulargewichts des zu untersuchenden Proteins von BRCA1 (220 kDa) wurde das Tankblot-Verfahren (Nass-Blot-Verfahren) verwendet.

Als Ladekontrolle und zugleich „Housekeeping“-Gen wurde β -Aktin verwendet, welches ubiquitär in Zellen exprimiert wird. Diese Ladekontrolle veranschaulicht außerdem die gleichmäßige Beladung der Geltaschen und später die korrekte Übertragung der Proteine auf die Membran. So wurde sichergestellt, dass der Blot funktioniert hat. Weiters wurde als Positivkontrolle des gesamten Blots die HeLa-Zelllinie verwendet. Verwendet wurde ein 8%iges Gel mit jeweiligem Zell-Lysat-Auftrag von 20 µg pro Laufbahn.

Zuvor wurde das Proteingemisch nach ihrer Größe über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung auf eine Trägermembran und zuletzt werden diese Proteinbanden durch spezifische primäre Antikörper inkubiert und mit sekundären Antikörpern visualisiert (Mahmood & Yang, 2012; Schrödel, 2010).

Sämtliche verwendete Reagenzien und Puffer sind aus Tabelle 3 sowie die dazugehörige Firmenliste aus Tabelle 4 zu entnehmen.

3.1.8.1 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Die Proteinproben wurden durch Mischung mit dem LB-DTT auf eine einheitliche Konzentration von 20 µg gebracht und anschließend für 5 Minuten bei 98 °C im Thermocycler (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems) inkubiert.

3.1.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Wie bereits erwähnt, muss das Proteingemisch zuvor nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Hierfür wurde das SDS-PAGE-System nach Laemmli verwendet. Dieses ist ein diskontinuierliches Gel, bestehend aus einem Sammelgel (siehe 3.1.9.2) mit Taschen für die Proben und einem Trenngel (siehe 3.1.9.1). Diese unterscheiden sich durch ihren pH-Wert, ihrer Ionenstärke und durch ihre Porengröße. Die Proteinlysate werden zunächst im Sammelgel konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Dieses führt zu schärferen Banden und erlaubt größere Probenvolumina als in Gelen ohne Sammelgel. Über ein Detergens wie SDS werden alle zu bestimmenden Proteine negativ geladen und können anschließend nach ihrem Molekulargewicht separiert werden (Laemmli, 1970).

3.1.9.1 Herstellung eines 8%igen Trenngels

Für die Proteingröße von 220 kDa für BRCA1 empfiehlt sich laut der technischen Abteilung der Firma abcam (<https://docs.abcam.com/pdf/events/German-WB-Webinar-15-Jan.pdf>) (Cathrin Zeeck, 22. Januar 2013) (abgerufen am 15.01.2015)) ein 8%iges Gel.

Es wurden für zwei Gele 4,8 ml Aqua bidest, 2,5 ml Separations Buffer und 2,6 ml 30%iges Acrylamide miteinander vermischt, entgast und mit 100 µl 10%iges APS versetzt. Dieses wurde sodann zwischen zwei Glasplatten (Abstand 1 mm) (Abb. 8) blasenfrei pipettiert und sofort mit etwas Aqua bidest überdeckt, um eine gerade Ebene des Gels zu erhalten. Dies wurde nach ca. 20 min mit Filterpapier wieder abgenommen.

3.1.9.2 Herstellung eines 4,5%igen Sammelgels

3,05 ml Aqua bidest wurden mit 1,25 ml Stacking Gel-Puffer und 0,66 ml 30%igem Acrylamide verrührt, ebenso entgast und anschließend wurde wieder 25 µl APS hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde über das Trenngel ebenso wieder blasenfrei pipettiert. Sogleich wurde dann der Kamm für die Taschen eingesetzt. Nach einer Wartezeit von einer halben Stunde war dieses Gel zur Weiterverwendung einsatzbereit.

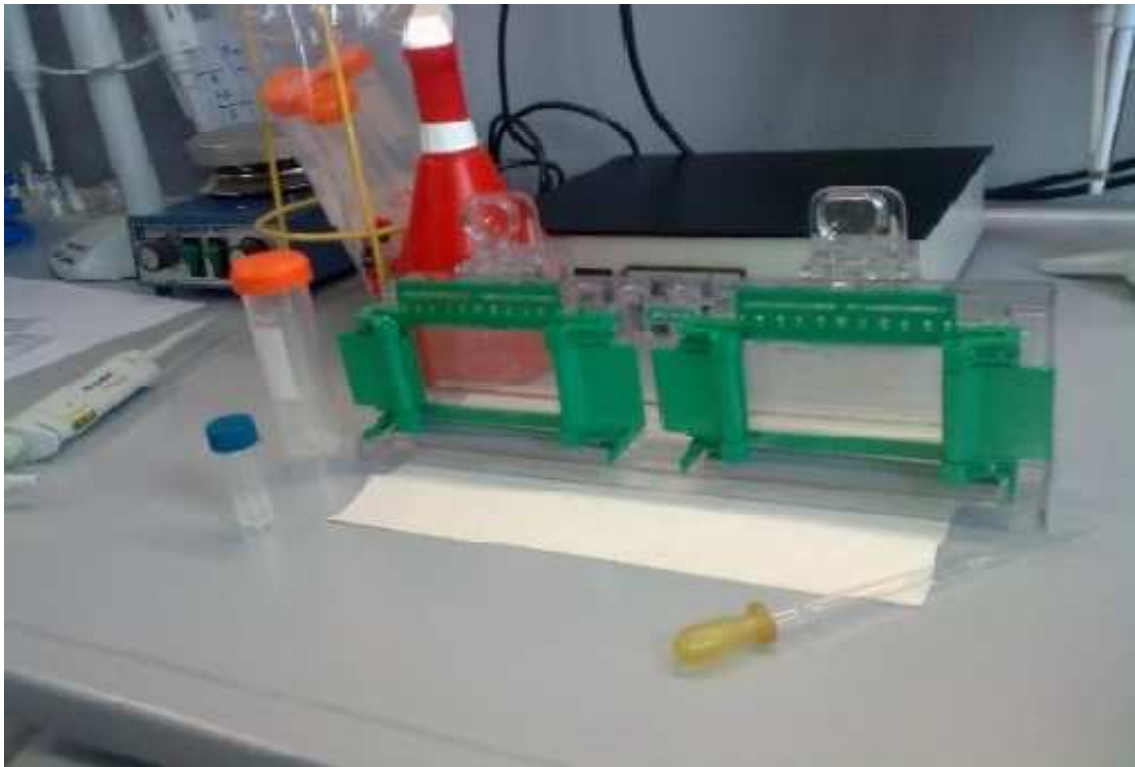


Abb. 8: Mini-PROTEAN® Casting Stand der Firma Bio-Rad

Die Gele mit den Ladetaschen wurden in die Elektrophoresekammer des Mini-PROTEAN® *Tetra cell tank* (Bio-Rad, #1703989) eingespannt, mit 700 ml *Running buffer* befüllt und am Ende wurden die Proben in die Ladetaschen vorsichtig hinein pipettiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde in die erste Tasche ein Marker (#161-0374, Bio-Rad) gegeben. Die Auftrennung erfolgte danach unter einer konstanten Spannung von 40 mA für zwei Gele für ca. 1,5 Stunden mit der *Basic Power Supply* von Bio-Rad) (Abb. 9).



Abb. 9: Gelelektrophorese im Mini-PROTEAN Tetra Cell System der Firma Bio-Rad

3.1.10 Blotten

Die zuvor aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) mittels Nass-Blot-Verfahren transferiert.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten im Transferpuffer (Boratpuffer) äquilibriert. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine bei 100 Volt über Nacht, jedoch für mindestens 2 Stunden, auf eine PVDF-Membran, welche zuvor mit Methanol und destilliertem Wasser vorbehandelt wurde, über das Tank-Blot-Verfahren im Kühlhaus transferiert. Danach wurde die Membran mit PBS-Tween für je 10 Minuten dreimal gewaschen und im Anschluss wurden die noch freien Proteinbindungsstellen der Membran mit Proteinen abgesättigt. Hierzu wurde die PVDF-Membran für 1 Stunde in 5%iger Blockierungsmilch inkubiert.

Hinterher wurde die Membran in die jeweiligen Bereiche, der zu vermutenden Proteine, wie BRCA1 (ca. 220 kDa) und β -Aktin (ca. 42 kDa) mit einer sterilen Schere getrennt. Die jeweiligen Membranabschnitte wurden in 50 ml großen Zentrifugenröhrchen (Firma Sarsted) mit der jeweiligen Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Der Antigen-spezifische Antikörper (Primärantikörper) für BRCA1 wurde im Verhältnis 1:1000 und der für β -Aktin 1:10000 mit der Blockierungsmilch verdünnt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Membranabschnitte für drei jeweils zehnminütigen Waschschritten in Waschpuffer (PBS-T) gewaschen um die eventuell ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher an Peroxidase gekoppelt ist erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer. Dadurch wird eine Substratumwandlung katalysiert, bei der eine Chemilumineszenz entsteht.

Sekundärantikörper für BRCA1 wurden im Verhältnis von 1:1000 und für β -Aktin im Verhältnis von 1:25000 (je anti-mouse) ebenso in 5%iger Blockierungsmilch verdünnt. Danach wurden die ungebundenen Antikörper wieder durch dreimaliges Waschen zu je 10 Minuten entfernt.

Zur Detektion wurden die Reagenzien 1 und 2 (ECL-System) kurz vorher vermischt und anschließend wurde diese auf die Membran aufgetragen und für 1 Minute zwischen 2 klaren Folien inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde vorsichtig herausgewischt. Danach wurde dieses „Sandwich“ in die Belichtungskassette eingelegt und in der Dunkelkammer ein Film aufgelegt. Nach 2 bis 10-minütiger Expositionszeit wurde der Film solange in die Entwicklerlösung gelegt, bis die zu erwartenden Banden in den Bereichen sichtbar waren. Nach kurzem Schwenken im Wasser wurde der Film in Fixierlösung gelegt und Reste der Fixierlösung mit Wasser entfernt. Unter Verwendung der Software von ImageJ 1.48 wurde die Farbtiefe der Proteinbanden bei 250 kDa für BRCA1 und bei 42 kDa für β -Aktin berechnet. Zuvor wurden die belichteten Filme bei 600 dpi eingescannt. Die gewonnenen Messwerte wurden in eine EXCEL-Datei übertragen. Vom invertierten Wert wurde der invertierte Hintergrundwert abgezogen und ins Verhältnis der Beladungskontrolle (β -Aktin – *house-keeping Protein*) gestellt.

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Puffer, welche für den Western Blot verwendet wurden

4x Separation Puffer (SP), pH 8,8	4x Stacking Gel Puffer (SGP), pH 6,8
3,69 g Tris HCL 15,39 g Tris Base 100 ml Aqua bidest 0,4 g SDS 400 µl Temed mit HCl auf pH 8,8	3,51 g Tris HCL 0,335 g Tris Base 50 ml Aqua bidest 0,2 g SDS 200 µl Temed mit 5 N HCl auf pH 6,8
10x TBS, pH 7,5	10x PBS
87,8 g NaCl 68,5 g Tris HCL 9,0 g Tris-Base 1000 ml Aqua bidest	5,44 g KH ₂ PO ₄ 27,86 g K ₂ HPO ₄ 90 g NaCl 1000 ml Aqua bidest Mit 5 M NaOH auf pH 7,4
PBS-0,1% Tween	1x PBS
1000 ml PBS (1x) 1 ml Tween 20	100 ml PBS (10x) 900 ml Aqua bidest
Transferpuffer, pH 9,0	LB-DTT
6,18 g Borsäure 1600 ml Aqua bidest 400 ml 100% Methanol 2 g SDS Mit 5 M NaOH auf pH 9	100 µl Ladepuffer (4x) 10 µl DTT
DTT 10%	APS 10%
100 mg DTT 1 ml Aqua bidest	100 mg APS 1 ml Aqua bidest
8% Separationsgel (10ml) für 2 Gele – 1mm dick	4x Ladepuffer(10ml)
4,8 ml Aqua bidest 2,5 ml Separationspuffer (SP) 2,6 ml 30% Acrylamide 100 µl 10% APS	2 ml 1M Tris HCL 0,8 g SDS 4 ml 100% Glycerol 0,4 ml 14,7M Beta-Mercaptoethanol 1 ml 0,5M EDTA 8 mg Bromophenolblau 2,6 ml Aqua bidest

4,5 % Sammelgel (5 ml)		1x Laufpuffer
3,05 ml Aqua bidest 1,25 ml SGP 0,66 ml 30% Acrylamide 25 µl 10% APS		70 ml 10x Tris-Glycerin-SDS-Buffer 630 ml Aqua bidest
5% Blocking Puffer		
2,5 g Non-fat dried milk 50 ml PBS-Tween		
Antikörper für Western Blot		
Bezeichnung des Antikörpers	Verdünnung	Firma, Bestellnummer
Primärantikörper: BRCA1 Sekundärantikörper: <i>anti-mouse</i>	1/1000 1/2000	Abcam #Ab94 GE Healthcare, München, # RPN2108
Primärantikörper: β-Aktin Sekundärantikörper: <i>anti-mouse</i>	1/10 000 1/25 000	Sigma Aldrich, #A5441 GE Healthcare, München, # RPN2108

Tabelle 4: Firmenliste der Materialien und Reagenzien die für den Western Blot bezogen wurden

Reagenz	Firma, Bestellnummer
Acrylamide/Bis solution 30% 37,5:1	Bio-Rad, # 161-0158
Ammonium Persulfat (APS)	Bio-Rad, # 161-0700
Aqua bidest	Kerndl, Weissenfeld
Beta-Mercaptoethanol 14,7M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borsäure (BH ₃ O ₃)	VWR, # 20185.260
Bromophenol blau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
di-Potassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	Merck, # 1.05104
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
EDTA, 0,5M	Thermo Scientific
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth, # 4043.1
Hydrochloric acid (HCl)	Roth, # 6331.1
Methanol (CH ₄ O)	Roth, # 4627.5
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, # 1.06404
Non-fat dry milk	Bio-Rad, # 170-6404
Potassium di-hydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Applichem, # A1043
Precision plus Protein Dual Color Standards (Marker)	Bio-Rad, # 161-0374
Running Buffer Tris-Glycine-SDS Buffer (TBS) 10x	Sigma-Aldrich, # T7777
Dulbecco (PBS)	Biochrom, # L1825
Sodium Dodecyl Sulfate, C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S·Na (SDS)	Serva, # 20765
Sodium Hydroxide Solution (Combi-Titrisol) (NaOH)	Merck, # 9913
TEMED N,N,N',N'-tetra-methylethylenediamine	Bio-Rad, # 161-0801
Trizma base, (Tris-Base) C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma-Aldrich, # T1503
Trizma-Hydrochloride (Tris-HCl), C ₄ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck
Entwickler: Agfa G150 Developer Replenisher 1 l	Ultra Medical GmbH, Saarbrücken
Fixierer: Agfa	Ultra Medical GmbH, #G354
Mini Trans-Blot module	Bio-Rad, # 170-3935
Blotting membrane (PVDF)	Bio-Rad, # 162-0177
Blotting Paper	3MM Chr Whatman, # 3030-917
Amersham ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München, # RPN2108
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München

3.2 Molekularbiologische Methoden und Material

Zur Analyse der zu untersuchenden miRNAs und mRNA-Expression von *BRCA1* musste zunächst die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Erst danach konnte die Quantifizierung erfolgen. Diese Schritte werden im Folgenden nun näher erläutert.

3.2.1 RNA-Isolierung aus Zellpellets

Die Extraktion, sowohl der mRNA als auch der miRNA, wurde mit dem *RNeasy® Mini Kit* von Qiagen (Qiagen, Hildenstein, Deutschland, # 74104) durchgeführt und erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll (*RNeasy® Mini Handbook* von Qiagen® (www.qiagen.com/handbooks)) mit einem DNase I Verdauungsschritt mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hildenstein, Deutschland, # 79254). Der *RNeasy® Mini Kit* von Qiagen beinhaltet einen *RLT-Buffer*, *RPE-Buffer* und einen *RW1-Buffer*, deren Abkürzungen und Zusammensetzung von der Firma Qiagen vertraulich ist.

Der DNase-Verdau war notwendig, um die DNA zu degradieren und somit den Reinheitsgrad der RNA zu erhöhen.

Zu Beginn wurde 10 ml *RLT-Buffer* und 100 µl β-Mercapthoethanol (=Mix1) angemischt. β-Mercapthoethanol musste laut Herstellerangaben vor Zugabe des *RLT-Buffers* hinzugefügt werden, um die intrazelluläre RNase zu inaktivieren. Die Zusammensetzung des *RLT Buffers* ist ein Lysepuffer, welcher Guanidiniumisothiocyanat enthält, dessen genaue Zusammensetzung von der Firma Qiagen allerdings nicht preisgegeben wird.

Anschließend wurden 600 µl vom Mix1 und 600 µl 70%iger Ethanol zum Zellpellet (max. 10⁷ Zellen) gegeben. Nach Durchmischung wurden davon 700 µl in ein *RNeasy Mini spin colum*, welches in einem 2 ml *Collection Tube* integriert ist, überführt und für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen.

Für den DNasen Verdau wurden 350 µl *RW1-Buffer* hinzu pipettiert, wieder bei 8000 x g 15 Sekunden lang zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Ebenso wie der *RLT Buffer*, ist die genaue Zusammensetzung des *RW1-Buffers* streng vertraulich. Der *RW1 Buffer* wird als Waschpuffer verwendet, welcher Guanidinsalz und Ethanol enthält.

Danach wurde ein DNase Mix aus 10 µl DNase I und 70 µl *RDD-Buffer* in das *Spin Colum* hinzugefügt. Kurz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder 350 µl *RW1-Buffer* dazugegeben um anschließend nach 15 Sekunden und 8000 x g Zentrifugation den Durchfluss wegzukippen. Danach wurde mit 500 µl *RPE-Buffer* gewaschen und 15 Sekunden lang bei 8000 x g die Probe zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und diesmal aber 2 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils danach verworfen. Im Anschluss daran wurde das ganze nun in ein

neues 2 ml *Collection Tube* überführt und nochmalig 1 Minute bei maximaler Zentrifugationsleistung zentrifugiert. Nun wurde zum letzten Mal der Durchfluss verworfen. Das *Mini Spin column* wurde in ein neues 1,5 ml Tube gegeben. Hier wurde dann 30-50 µl RNase freies Wasser dazugegeben. Noch einmal 1 Minute und bei 8000 g zentrifugiert um die RNA herauszulösen. Das Eluat wurde schließlich in ein verschraubbares Tube überführt.

Die Messung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrads erfolgte über das Colibri-Spektrophotometer (Titertek- Berthold, Pforzheim, Deutschland) bei 260 nm gemessen. 1,2 µl der extrahierten RNA wurden in den Messbereich vorgelegt. Als Nullabgleich wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Aus dem Verhältnis beider Wellenlängen von A260/A280 kann eine Aussage über die Reinheit der Proben getroffen werden. Dieser Wert sollte zwischen 1,8-2,0 liegen. Ein Wert bis 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung. Ein Wert von 2,0 würde für reine RNA-Isolierung stehen. 500 ng wurden für die nachfolgende Reverse Transkription verwendet.

3.2.2 Reverse Transkription

Um später Genexpressionsanalysen durchführen zu können, musste zuvor die extrahierte RNA in cDNA-Sequenzen (engl.: *complementary DNA*) umgeschrieben werden, da die RNA nur in Einzelsträngen vorliegt (M. S. Lee et al., 1989).

Hierzu wurde jeweils ein Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt. Die cDNA wurde mit dem *miScript® II Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hildenstein, Deutschland, # 218160) nach Angaben im Herstellerhandbuch von Qiagen durchgeführt. Durch die Verwendung des inkludierten HiFlex-Buffers konnte in den nachfolgenden PCRs sowohl die microRNA als auch die mRNA quantifiziert werden.

Hierfür wurden einheitlich 12 µl RNA, welche zuvor auf Eis aufgetaut wurde, mit einer Masse von 500 ng eingesetzt. Dazu wurde das gewonnene Lysat mit RNase-freiem Wasser verdünnt und in 0,2 ml PCR Tubes überführt. Zusätzlich in jedes Röhrchen wurde ein Mastermix aus 4 µl 5x *miScript HiFlex-Buffer*, 2 µl 10x *miScript Nucleics Mix* und 2 µl *miScript Reverse Transcriptase Mix* hinzu pipettiert, leicht gemixt, kurz anzentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach erfolgte der Transkriptionsvorgang im Thermocycler (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems) bei 37 °C für 60 min und anschließend für 5 min bei 95 °C um den Vorgang wieder zu inaktivieren, hierbei wird die Reverse

Transkriptase denaturiert. Nach kurzer Kühlung der Proben auf 4 °C wurden diese im Verhältnis 1:10 mit 180 µl RNase-freiem AquaDest verdünnt und anschließend wurden die cDNA-Präamplifikate bei -20 °C eingefroren.

Es kamen für nachfolgende PCRs jeweils 2 µl (entspricht 20 ng) der generierten cDNA als Template zum Einsatz.

3.2.3 mRNA-Quantifizierung

Die quantitative Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) oder auch kurz qPCR genannt, beruht auf dem Grundprinzip einer herkömmlichen PCR. Mit ihr kann spezifisch die relative Expression der mRNA analysiert werden kann. Sie wurde unter Berücksichtigung der MIQE Guidelines (Bustin et al., 2009) durchgeführt. Mit der PCR ist es möglich kleine DNA-Fragmente in kurzer Zeit so oft zu amplifizieren, so dass diese mit üblichen Labormethoden untersucht werden können (Mullis & Faloona, 1987).

Zur Normalisierung wurden in dieser Arbeit zwei Referenzgene (Tabelle 7) verwendet, um somit die Varianz der Expressionsergebnisse stark zu reduzieren. Das Referenzgen oder auch *Houskeeping*-Gen (siehe 3.2.3.6) genannt, ist ein nicht regulierbares Gen, da sowohl die Expression im malignen und nicht-malignen Gewebe gleich ist (Holzapfel & Wickert, 2007; Michael Walter Pfaffl, 2004; Vandesompele et al., 2002).

Zur Auswertung der Daten wurde die deltadelta ct-Methode modifiziert. Hierbei können mehrere Referenzgene, Effizienzen und Fehler berücksichtigt werden (Hellemans, Mortier, De Paepe, Speleman, & Vandesompele, 2007).

Für die Quantifizierung der mRNA von *BRCA1* wurde folgender Reaktionsansatz (Tabelle 5) unter Verwendung des *LightCycler®480 Probes Master* (# 04707494001, Roche) und unter Anwendung spezifischer Primer und UPL-Sonden verwendet (Tabelle 7). (Näheres zu UPL-Sonden siehe 3.2.3.5.)

Tabelle 5: Komponenten für Reaktionsansatz für die qPCR

Komponente	Volumen
LightCycler®480 Probes Master Mix von Roche	5 µl
Primer „vorwärts“ von TIB Molbiol	variabel
Primer „rückwärts“ von TIB Molbiol	variabel
Spezifische UPL-Sonde von Roche	0,15 µl
RNase freies Wasser von Roche	variabel
Template	2 µl
Kompletter Reaktionsansatz	10 µl

Die Primermenge war für die jeweiligen Primer unterschiedlich, da sie je nach vorheriger Konzentrationsbestimmung und Effizienztestung variierte (siehe auch 3.2.3.1).

Die qPCR wurde in Triplikaten nach dem Temperaturprotokoll, wie in Tabelle 6 dargestellt, in einer 96-Well Platte (White LightCycler®480 Multiwell Platten 96) durchgeführt.

Tabelle 6: Ablauf der qPCR

Schritte	Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
Präinkubation	1	10 Minuten	95 °C
Amplifikation	45 Zyklen jeweils		
	Denaturierung (Trennen der Stränge)	10 Sekunden	95 °C
	Hybridisierung (Annealing)	15 Sekunden	60 °C
	Elongation (Kettenverlängerung)	1 Sekunde	72 °C

Die Assays wurden mit der LightCycler®480 Software, Version 1.5.0 analysiert.

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit dem *Relative expression software tool for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR* (REST) (Michael W. Pfaffl, Horgan, & Dempfle, 2002). Hier erfolgt die Auswertung nach der folgenden Formel:

$$R \text{ (relative Expression)} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

unter Berücksichtigung der Effizienzkorrektur und Normalisierung der Referenzgene (Tabelle 7) nach MIQE-Anforderungen (Michael Walter Pfaffl, 2004).

3.2.3.1 Primerdesign und Primereffizienzüberprüfung

Die Primer (Tabelle 7) wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter designt. Die dazugehörigen UPL-Sonden, welche in Kapitel 3.2.3.5 näher erläutert werden, wurden von der Firma Roche, Mannheim bezogen.

Alle Oligonukleotide wurden unter Verwendung der kostenlosen webbasierten Probenfinder-Software im Assay Design Center entworfen, die über die Roche-Homepage unter www.roche-applied-science.com zugänglich ist. Alle Oligonukleotide wurden von der TIB-Molbiol GmbH, Berlin, synthetisiert.

Das Primerdesign wurde dabei so gestaltet, dass die Schmelztemperatur von über 80 °C nicht überschritten wird, da sonst die Polymerasen denaturieren würden. Da die Länge der Primersequenz mit der Schmelztemperatur linear steigt, wurde die Länge unter 25 Nukleotiden gehalten. Somit liegt die Schmelztemperatur dieser Primer bei 59 – 60 °C. Ebenso wurde darauf geachtet, dass die Primer eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen, da sonst keine spezifische Hybridisierung möglich wäre. Weiters wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Primer nicht komplementär zueinander waren, da es sonst zu einer Dimerenbildung kommen würde. Bevor diese Primer zum Einsatz kamen, wurden sie vorher hinsichtlich ihrer optimalen Konzentration, Spezifität und Effizienz getestet.

Tabelle 7: Primerdesign der Referenzgene und dem Zielgen mit zugehörigen UPL-Sonden.

Diese Tabelle zeigt die verwendeten Vorwärts-(F1) und Rückwärtsprimer (R1) mit den dazugehörigen UPL Sonden. Sämtliche Primer aus dieser Tabelle wurden von der Firma TIB Molbiol, Berlin bezogen.

Referenzgen 1			
Primer	Sequenz	Position	Amplicon
REEP5 X4 F1	5' TGCAGATGCCATCACTAAAGA 3'	642 - 662	129 bp
REEP5 X5 R1	5' CATCAAGCTCCAGTAGGAAGGT 3'	749 - 770	
UPL #4	5'CTTCCTGC 3'		
Referenzgen 2			
Primer	Sequenz	Position	Amplicon
DDX24 X2 F1	5' TCCGTGACAACTGGACATC 3'	779 - 798	66 bp
DDX24 X3 R1	5' TGGCAAAGGCAAGAGTTTC 3'	825 - 844	
UPL # 66	5' GGCTGCTG 3'		
Zielgen			
Primer	Sequenz	Position	Amplicon
BRCA1 X14 F1	5'AAGAGGAGCTCATTAAGGTTGTTG 3'	4806 - 4829	124 bp
BRCA1 X15 R1	5' GATTCCAGGTAAGGGGTTCC 3'	4910 - 4929	
UPL # 25	5' TGGAGGAG 3'		
Amplicon	AAGAGGAGCTCATTAAGGTTGTTGATGTGGAGGAGCAACAGCTG-GAAGAGTCTGGGCCACACGATTTGACGGAAACATCTTACTTGCCAAGGCAAGATCTAGAGGGAACCCCTTACCTGGAATC		

3.2.3.2 Optimale Primerkonzentrationsbestimmung

Hier wurde auf einer weißen 6-Well-Platte (Roche) jeweils senkrecht der Rückwärts-Primer beziehungsweise horizontal der Vorwärts-Primer in einer Konzentration von jeweils 0,3 µM, 0,5 µM, 0,75 µM und 1,0 µM aufgetragen. Hinzu kam noch ein *LightCycler®480 Probes Master Mix* von der Firma Roche sowie die jeweilige UPL-Sonde und Template. Diese Platte wurde wieder mit einer Folie versiegelt, zentrifugiert und zur Analyse in den *LightCycler®480* gestellt. Der niedrigste cp(*crossing point*)-Wert bestimmte die optimale Primerkonzentration.

3.2.3.3 Primerspezifität

20 µl dieser PCR-Amplifikate wurden auf ein 2,5%iges Agarosegel aufgetragen. Als spezifisch wurde ein Primer erst dann gewertet, wenn nur eine Bande unter ultraviolettem Licht zu sehen war.

Für ein 2,5%iges Agarosegel wurden 2,5 g Agarose (pegGOLD Universalagarose von PeqLab, #35-1020) und 97,5 g TBE(Tris-Borsäure-EDTA)-Buffer (Sigma, #T4415-4L) verwendet. Dies wurde in einem Eppendorf-Gefäß gemischt. Kurz für 2 mal 1 Minute in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurden 3 µl Ethidiumbromidlösung dazugegeben.

Ethidiumbromid ist ein interkalierender roter fluoreszierender Phenanthridinfarbstoff zum Nachweis der Nukleinsäuren. Die Moleküle lagern sich dabei zwischen die einzelnen Basen und fluoreszieren unter ultraviolettem Licht. Die Lichtintensität steigt dabei direkt proportional zur vorliegenden DNA.

Dies wurde dann in den Gelträger (*PerfectBlue*- Gelsystem Mini ExM von PeqLab, #40-1410) gegossen. Anschließend wurden 2 Kämme platziert. Nach dem Festwerden des Gels wurden die Kämme rausgezogen. Die zu analysierenden Proben werden vor dem Auftragen mit einem Bromophenolblau Ladepuffer vermischt. Der Ladepuffer enthält Farbstoffe zur Sichtbarmachung. In die erste Geltasche kam ein Marker (peqGOLD DNA-Sizer XIII (72 – 1353 bp), PeqLab, #25-2170) von 7 µl. Zu den Proben kam ein 10x Loading Buffer von 2 µl dazu. Das Gerät (Power Supply, Bio-Rad Model 200/2.0) wurde auf 120 Volt und auf 45 Minuten eingestellt. Beim Anlegen der Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle in Richtung des Pluspols.

Danach wurde die Gelplatte entnommen und unter dem UV-Tisch angesehen oder fotografiert.

3.2.3.4 Primereffizienz

Zur Bestimmung der Effizienz wurde eine Standardkurve in Duplikaten auf einer 96-Wellplatte (Firma Roche) erstellt. Die Effizienz (E) berechnet sich aus der Steigung der Standardkurve nach der Formel: $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$

Die Effizienzbestimmung erfolgte sowohl für das Targetgen als auch für die Referenzgene.

Die Primer wurden mit der zuvor optimal bestimmten Konzentration, der zugehörigen UPL-Sonde, einem LightCycler Master-Mix und einer cDNA-Probe aufgetragen. Die cDNA egal welcher Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe angelegt (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32).

Mit Steigung ist hier der Anstieg der Kurve der nachweisbaren dsDNA im Laufe der PCR gemeint. Der Wert für die Effizienz sollte nach Möglichkeit 2,00 erreichen. Dies würde bedeuten, dass sich die Menge der dsDNA (doppelsträngige DNA) pro Zyklus verdoppelt. In diesem Fall würde die PCR optimal arbeiten. Das heißt aber auch, dass rein theoretisch keine Effizienz über 2,00 existieren kann. Auf Grund von Messungenauigkeiten kann dies aber vorkommen. Es wurde demzufolge ein Wert von 2,00 ($\pm 0,1$) angestrebt.

3.2.3.5 Universal-ProbeLibrary (UPL)-Sonden

UPL-Sonden der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) sind acht bis neun Basen lange Sonden, sogenannte bindungsstarke LNA(*Locked Nucleic Acids*)-Basen (Ugozzoli, Latorra, Pucket, Arar, & Hamby, 2004). Durch spezielle modifizierte Konformationsänderung sind sie unflexibel und können daher die Zielspezifität erhöhen. Für jede Zielsequenz gibt es verschiedene Sonden. Diese spezifischen Sonden besitzen am 5' Ende einen fluoreszenzmarkierten Reporter (FAM) und am 3' Ende einen Quencher (*dark quencher dye*), welcher das Fluoreszenzsignal des Reporters zunächst unterdrückt. Zunächst findet eine Hybridisierung mit der komplementären Zielsequenz (hier dem Amplicon von *BRCA1* laut Tabelle 7) statt. Bei der Elongation der Taq-Polymerase wird die Sonde abgebaut. Der abgespaltene Reporter gibt so dann seine Fluoreszenz frei. Diese Fluoreszenz wird im LightCycler® gemessen.

3.2.3.6 Housekeeping-Gene

Housekeeping-Gene dienen der Aufrechterhaltung von Zellfunktionen und werden in ihrer Aktivität nicht reguliert und sind expressionsstabil. Daher werden diese zur Normalisierung der zu analysierenden Proben eingesetzt um dadurch die relative cDNA-Menge pro Probe genauer zu bestimmen. Zur Testung der mRNA-Expression wurden Referenzgene wie *REEP5* (*Receptor accessory protein*) und *DDX24* (*Dead Box Helicase 24*) verwendet (Andersen, Jensen, & Orntoft, 2004). Diese wurden aus einer von Eisenberg und Levanon veröffentlichten Liste ausgewählt (Eisenberg & Levanon, 2013), da es sogar bei *Housekeeping*-Genen zu unterschiedlichen Expressionsunterschieden kommen kann (Thellin et al., 1999; Tricarico et al., 2002).

3.2.4 microRNA-Quantifizierung

Die Bestimmung der microRNA Expression von hsa-mir-199a-5p und hsa-mir-214 erfolgte nach dem Protokoll des *miScript PCR System Handbook* 10/2011 von Qiagen. Hierzu wurde das *miScript SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen, 218073) und der *miScript Primer Assay* (Tabelle 9) nach Angaben des Herstellers von Qiagen verwendet.

SYBR® Green I ist ein fluoreszierender Farbstoff, der zum Nachweis doppelsträngiger DNA (dsDNA) dient, der sich in die Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu. Der Ct-Wert (engl. *cycle threshold*) bezeichnet den Beginn des exponentiellen Kurvenverlaufs.

Als Template wurden je 2 µl zu 25 ng verwendet. Die jeweiligen Proben wurden immer in Triplets zu 8 µl Mix und 2 µl Template in eine 96-Well-Platte (LightCycler®480 Multiwell Plate 96 white, Roche) pipettiert. Der Reaktionsansatz ist aus Tabelle 8 zu entnehmen. Als Negativkontrolle wurde der Mix ohne Template verwendet.

Diese Wellplatte wurde anschließend mit einer Folie (LightCycler®480 Sealing Foil, Roche) versiegelt und für 1 min bei 1000 g im Plattenzentrifuge zentrifugiert, bevor sie anschließend in den LightCycler®480 Roche kam. Um die Hot-Star-Taq-Polymerase im 2x QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix zu aktivieren wurde der Ansatz wie aus Tabelle 10 für 15 Minuten vorinkubiert. Weitere Schritte sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 8: Reaktionsansatz mit SYBR Green zur Validierung der miRNAs

Komponente	Volumen
2x QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix	5 µl
10x miScript Universal Primer (enthält „Vorwärtsprimer“)	1 µl
10x miScript Primer Assay (Hs_RNU6-2_11, Hs_miR-214_2, Hs_miR-199a_1) (enthält „Rückwärtsprimer“)	1 µl
RNase freies Wasser von Roche	1 µl
Template (cDNA) (25ng)	2 µl
Kompletter Reaktionsansatz	10 µl

Tabelle 9: miScript Primer Assays der Firma Qiagen

Target	Primer Assay	Bestellnummer
snRNA RNU6-2	Hs_RNU6-2_11	MS00033740 (=Referenzgen)
hsa-miR-199a-5p	Hs_miR199a_1	MS00006741
hsa-miR-214-3p	Hs_miR214_2	MS00031605

Für die miRNA Expressionsstudien wurde zur Normalisierung ein Referenzgen verwendet, welches immer stabil und gleichmäßig exprimiert wird. Hierfür wurde die snRNA RNU6-2 ausgewählt, da es schon erfolgreich in zahlreichen Studien verwendet wurde (Gordanpour, Nam, Sugar, Bacopulos, & Seth, 2012; K. Kang, Peng, Luo, & Gou, 2012; Schaefer et al., 2010).

Tabelle 10: Programmverlauf der qPCR mittels SYBR Green

Programmverlauf	Zeit	Temperatur
Initiale Aktivierung	15 Minuten	95 °C
Immer wiederkehrende 40 Zyklen von:		
1. Denaturierung (lösen der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den DNA-Doppelsträngen)	15 Sekunden	94 °C
2. Annealing (Anlagerung der Primer)	30 Sekunden	55 °C
3. Elongation (Aufbau des Komplementärstranges)	30 Sekunden	70 °C

Die Daten wurden mit der LightCycler®480 Software, Version 1.5.0 „*relative quantification with calibrator normalization*“ analysiert.

3.2.4.1 Wnt5a-Quantifizierung

Die qPCR für die Wnt5a-Expression erfolgte ähnlich der microRNA-Quantifizierung. Der Reaktionsansatz bestand aus je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Tabelle 11), 5 µl SYBR Green PCR Master Mix (aus dem miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, 218073), 2 µl RNase freies Wasser (Roche) und 2 µl Template. Als Referenzgen wurde REEP5 verwendet.

Tabelle 11: Primer für Wnt5a-Expression

Primer	Sequenz	Amplicon
WNT5A F	5'CGGGCCACAGTTGAGTAGTG 3'	127 bp
WNT5A R	5' CGGTAATTAGGGCTTTCCAA 3'	

3.3 Bioinformatische Analysen

Zur Vorhersage von möglichen potentiellen Bindungsstellen der beiden microRNAs (hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-214) in der 3'UTR der mRNA von *BRCA1* wurde die „microRNA.org“ Datenbank (<http://www.microrna.org>) verwendet, welche auf einem miRanda-Algorithmus basiert (Betel, Wilson, Gabow, Marks, & Sander, 2008).

3.4 Verifizierung eines möglichen Einflusses der hsa-miR-199a-5p mittels Luciferase-Reporter-Assay

Der Luciferase-Reporter-Assay wird verwendet um die Genexpression beziehungsweise die Genregulation auf Transkriptionsebene zu untersuchen.

In unserm Fall wurde mit diesem überprüft inwieweit das Gen *BRCA1* von der miRNA (hsa-miR199a-5p) reguliert werden könnte.

Hierfür wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega (# E1910) verwendet. Hier kann Aktivität von Glühwürmchen- und Renilla-Luciferasen in einer Probe gemessen werden. Es wurde das Reporter Plasmid psiCHECK™-2 von Promega verwendet (# C8021, Promega, Madison, USA). Der psiCHECK™-2 Vektor enthält als Reportenzyme die beiden Luciferasen Renilla und Firefly (Takahashi et al., 2015; Yao & Lin, 2012). Bei der Firefly-Luciferase reagiert Luciferol, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht. Die Renilla-Luciferase benötigt zur Reaktion kein ATP (Greer & Szalay, 2002). Die bei der Reaktion entstandene Lichtemission wird über die Biolumineszenz gemessen.

Für diese Untersuchung waren drei Schritte notwendig: 1. Klonierung, 2. Transfektion und Kultivierung, 3. Signalentwicklung und Detektion. Die Vorarbeiten, wie Klonierung und Transfektion für den Luciferase-Assay wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter durchgeführt.

3.4.1 Klonierung der regulatorischen Teilsequenz in den Vektor

Für die Klonierung verwendeten wir ein Standardprotokoll nach Ronald P. van Rij verwendet (Van Rij, 2011).

Ein Teil der regulatorischen *BCRA1* 3'-UTR-Region (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_007294.3), ((Position 6431-7207) siehe Tabelle 13), die die beiden interessanten Bindungsstellen für miR-199a-5p (Positionen 6444-6466 und 7156-7181) enthält, wurde in den psiCHECK2 Reporter-Vektor kloniert.

Für die Untersuchung wurden zwei Vektoren vorbereitet: Ein Vektor enthielt die Wildtypsequenz und der andere Vektor trug Mutationen an den beiden miR-199a-5p-Seed-Sequenzen. Als Insert für die Wildtyp- und Mutationssequenzen wurden von IDT (Integrated DNA Technologie, Inc) gBlocks® Genfragmente gekauft.

Die jeweiligen Sequenzen wurden in die *multiple cloning region* (MCR) des Vektors eingebaut. Die MCR hat Erkennungssequenzen für die beiden Restriktionsenzyme NotI und XhoI (Abb. 10).

Für die Amplifikation wurden Primer aus Tabelle 12 verwendet, welche auch die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen (XhoI und NotI) enthielten.

Tabelle 12: Verwendete Primer für die Amplifikation der jeweiligen Inserts

BCRA1 3'UTR XhoI F
5' ccg CTC GAG gat caa gaa ttc agc 3' length: 24 Tm: 63,83°C gc%: 54,17
Bemerkung: Dieser Vorwärtsprimer (F) BCRA1 3'UTR XhoI F enthält die XhoI Erkennungsstelle, die durch Großbuchstaben gekennzeichnet ist.)
BCRA1 3'UTR NotI R
5' ttt a GC GGC CGC gga agt gtt tg 3' Länge: 23 Tm: 66,60°C gc%: 56,52 Amplicon: 809 bp
(Hinweis: Dieser Rückwärtsprimer (R) BRCA1 3'UTR NotI R enthält die NotI Erkennungsstelle, welche durch Großbuchstaben gekennzeichnet ist.)
Die Kleinbuchstaben für die Restriktionsstelle zeigen zusätzliche Nukleotide zur effizienten Restriktion der am Ende des PCR-Fragments befindlichen Stelle. Die Basen, die Teil der 3'UTR-Zielsequenz sind, sind als blaue Buchstaben angegeben (Tabelle 13)

3.4.1.1 Vorbereitung des psiCHECK™-2 Vektors und Ligation

Als Reporter-Plasmid wurde der psiCHECK™-2 Vektor von Promega verwendet. Die modifizierten BRCA1-3'UTR -Sequenzen wurden in die multiple Klonierungsregion (MCR) stromabwärts des Translations-Stopcodons SV40 der synthetischen Renilla-Luciferase (hRLuc) des Vektors kloniert. Die Renilla-Luciferase-Aktivität wurde dann als Indikator für die Wirkung der künstlichen 3'UTR (modifizierte 3'UTR) auf die Transkriptionsstabilität und die Translationseffizienz verwendet. Der psiCHECK™-2 Vektor enthält auch ein konstitutiv exprimiertes Glühwürmchen-Luciferase-Gen, das als interne Kontrolle zur Normalisierung der Transfektionseffizienz diente.

Der psiCHECK™-2 Vektor wurde ebenso in gleicher Weise mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI geschnitten. Durch die so entstandenen „sticky ends“ konnte das Insert kohäsiv in den psiCHECK™-2-Vektor ligiert werden. Dies erfolgte jeweils unter Verwendung von Standardprotokollen.

Die Plasmidkonstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung von der Sequiserve GmbH München auf Korrektheit überprüft.

Für die Sequenzierung verwendete Primer:

- psiCHECK2 SeqF: GAGTTCGTGAAGGTGAAGGG
- psiCHECK2 SeqR: CCGAAGACTCATTTAGATCCTCA

Da Versuche mit MCF7- und HMLE-Zellen mehrmals fehlschlagen wurden H1299 Zellen verwendet. Diese wurden von Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Transfektion, Signalentwicklung und Detektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 24-Well-Kulturplatten ausgesät. Pro Well wurden $0,4 \times 10^5$ H1299-Zellen (ATCC, NCI-H1299, CRL-5803™) verwendet. Diese wurden mit RPMI 1640 (Biochrom, # 1275) und 10%igem FCS (Biochrom, #S0115) kultiviert. Das Medium wurde am nächsten Tag eine halbe Stunde vor der Transfektion nochmals gewechselt.

Die Transfektion wurde in einem Endvolumen von 500 µl pro Well durchgeführt.

- 50 ng empty psiCHECK2
oder psiCHECK2-3'UTR/BRCA1wt
oder psiCHECK2-3'UTR/BRCA1mut
- 10 nM oligo (hsa miR-199a-5p oder Negative control #1)
- 2,3 µl HiPerFect reagent (Qiagen #301704)

Diese Zellen wurden mit dem Transfektionsmedium für 48 Stunden inkubiert.

Anschließend wurde die enzymatische Luciferase-Aktivität mit dem Dual-Luciferase Reporter (DLR™) Assay (Promega, #E1910) in dem Orion II Mikroplatten-Luminometer-Gerät (Titertek-Berthold GmbH, Pforzheim, Deutschland) mit dem *Set up* der *Simplicity Software*, Version 4.10 ausgewertet. Die Transfektion wurde in Triplikaten durchgeführt. Im DLR™ Assay können die Aktivitäten der Firefly- und der Renilla- Luciferase in einer einzelnen Probe gemessen werden. Die Firefly-Luciferase Aktivität wird zuerst durch Zugabe des Luciferase-Assayreagenz II (LAR II) bestimmt. Nach Quantifizierung der Firefly-Aktivität wird die Reaktion durch Zugabe des Stop & Glo® Reagenz gestoppt und gleichzeitig die Renilla-Luciferase- Reaktion initiiert.

Die Luciferase-Aktivität korreliert hierbei direkt mit der Aktivität des Reportergens.

Tabelle 13: Oligonukleotide – Teilsequenz der 3'UTR-Region von *BRCA1*

gblock 1 (Wild Typ) (BCRA1 3'-UTR Region (Position 6431-7207))

gatcaagaattcagcactttgggaggccaaggtgggcagatcactggagggtcaggagttcgaaaccagcctggccaacatggtgaaaccccat
 ctctactaaaaatacagaaatttagccggtcatggtggtggacacctgtaatcccagctactcagggtgtaaggcaggagaatcacttcagcccg
 ggaggtggaggttgagtgagccaagatcataccacggcactccagcctgggtgacagtgagactgtggctcaaaaaaaaaaiaaaaaag
 gaaatgaaactagaagagatttctaaaagtctgagatatattgctagatttctaaagaatgtgttctaaaacagcagaagattttcaagaacc
 ggtttcaaagacagctcttctaattcctcattagtaataagtaaaatgtttattgttagctctggtatataatccattcctcttaaaataagacc
 tctggcatgaatatttcataatctataaaatgacagatcccaccaggaaggaagctgttgccttcttgagggtgatttttcttctgctccctgttgctg
 aaaccatacagcttcataaataattttgcttgctgaaggaagaaaaagtgttttcataaaccattatccaggactgtttatagctgttgaagg
 actaggtcttccctagccccccagtggtgcaagggcagtggaagacttgattgtacaaaatacgtttgtaaatgttgctgttaacactgcaaa
 taaacttggtagcaaacacttcc

gblock mut (BCRA1 3'-UTR Region (Position 6431-7207))

gatcaagaattcagcactttgggaggccaaggtgggcagatgagtcagggtcaggagttcgaaaccagcctggccaacatggtgaaaccccat
 ctctactaaaaatacagaaatttagccggtcatggtggtggacacctgtaatcccagctactcagggtgtaaggcaggagaatcacttcagcccg
 ggaggtggaggttgagtgagccaagatcataccacggcactccagcctgggtgacagtgagactgtggctcaaaaaaaaaaiaaaaaag
 gaaatgaaactagaagagatttctaaaagtctgagatatattgctagatttctaaagaatgtgttctaaaacagcagaagattttcaagaacc
 ggtttcaaagacagctcttctaattcctcattagtaataagtaaaatgtttattgttagctctggtatataatccattcctcttaaaataagacc
 tctggcatgaatatttcataatctataaaatgacagatcccaccaggaaggaagctgttgccttcttgagggtgatttttcttctgctccctgttgctg
 aaaccatacagcttcataaataattttgcttgctgaaggaagaaaaagtgttttcataaaccattatccaggactgtttatagctgttgaagg
 actaggtcttccctagccccccagtggtgcaagggcagtggaagacttgattgtacaaaatacgtttgtaaatgttgctgttcaagactgcaaa
 taaacttggtagcaaacacttcc

Anmerkung:

Mutationen sind rot markiert.

Vorhergesagte putative Bindungsstellen für die hsa miR-199a-5p sind gelb markiert und umrandet.

Verwendete Oligonukleotide:

hsa miR-199a-5p von Ambion Cat. # AM17100

Negative control #1 von Ambion Cat. # AM 171100

psiCHECK2 (empty) von Promega

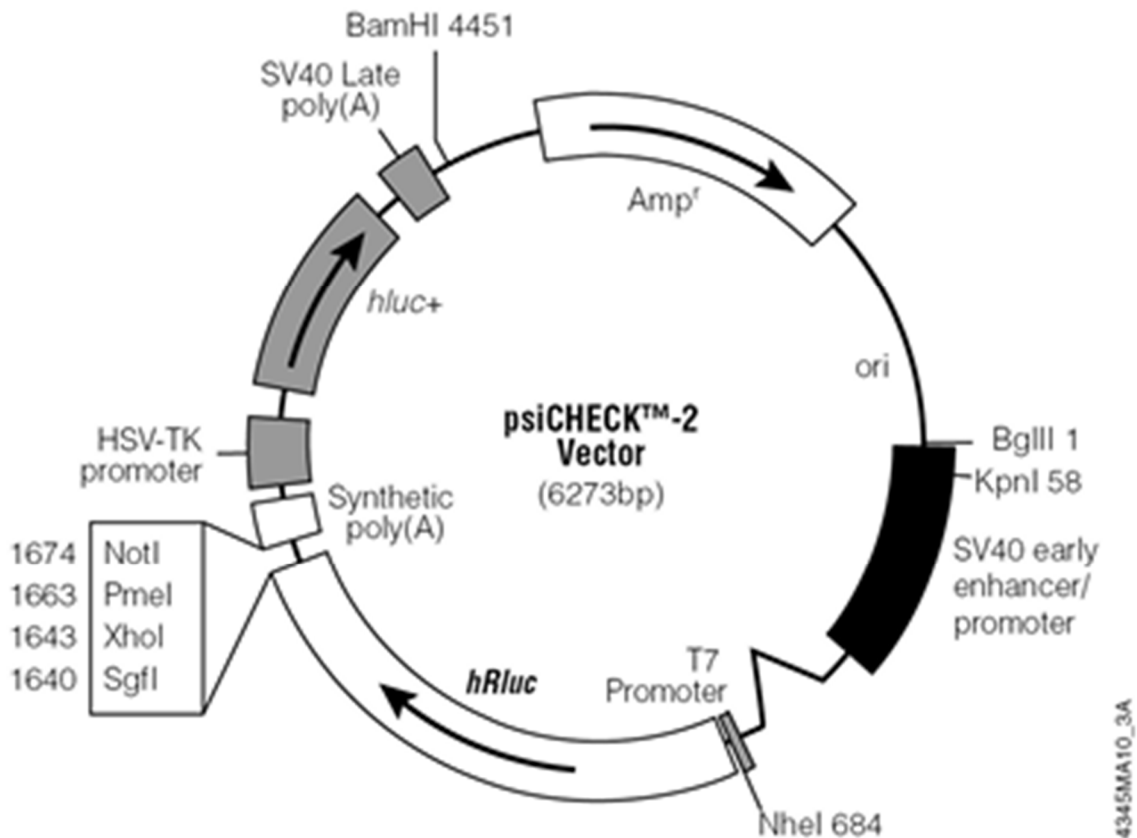


Abb. 10: Schematische Darstellung des psiCHECK™2 Vektors der Firma Promega)

(Abbildung aus: <http://www.promega.de/products/rna-purification-and-analysis/rna-interference/psicheck-1-and-psicheck-2-vectors/>) (abgerufen am: 15.07.2015)

hRluc: Renilla-Reporter-Luciferase (Ihre Aktivität ist abhängig von der Regulation der miR-199a auf *BRCA1*.)

hLuc+: Firefly-Luciferase (Sie dient als interne Kontrolle, da sie konstant exprimiert wird.)

Vektorsequenz siehe unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY535007.1> (abgerufen am 15.07.2015).

3.5 Auswertung

Statistische Analysen wurden mit der Software von Microsoft® EXCEL® 2016 durchgeführt. Die gezeigten Daten wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem *Student t-Test* durchgeführt. P-Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Primereffizienz

Wie unter Punkt 3.2.3.1 bereits erklärt wurde, war eine Bestimmung der optimalen Primerkonzentration, Effizienz und Spezifität der verwendeten Primer zu Beginn an unabdingbar, um die mRNA-Expression von *BRCA1* möglichst genau quantifizieren zu können.

Für alle drei Primerpaare (*REEP5*, *DDX24*, *BRCA1*) war die ausgewählte Primersequenz spezifisch. Dies zeigte sich dadurch, indem nur eine einzige Bande unter ultraviolettem Licht im Agarosegel fluoreszierte. In Abb. 12 zeigt sich in der Region für das DNA-Fragment von *BRCA1* nur eine einzige Bande.

Das Primerpaar von *BRCA1* zeigte die beste Effizienz (2,089), da es den erforderlichen Wert von 2 erreichte. Eine minimale Abweichung von 0,089 war akzeptabel (Screenshot, Abb. 11). Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler®480 Software, Version 1.5.0. Bei den Primern *REEP5* und *DDX24* wurde ebenso gleiches Procedere durchgeführt. Diese beiden Primer lieferten eine Primereffizienz von annähernd 2. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der Primertestung hinsichtlich der optimalen Primerkonzentration der jeweilig verwendeten Primer, sowohl für Vor- als auch Rückwärtsprimer, mit denen sämtliche qPCRs durchgeführt wurden. Das Primerpaar für *BRCA1* zeigte die beste Effizienz (2,089) da es nach jedem Zyklus zur Verdopplung der DNA kommt.

Tabelle 14: Optimale Primerkonzentration mit bester Effizienz

Primerart	Niedrigster cp-Wert	Primerkonzentration		Effizienz	Messungenauigkeit	Spezifität
		vorwärts	rückwärts			
<i>REEP5</i>	20,95	0,30 µl	1,00 µl	1,880	0,0151	ja
<i>DDX24</i>	23,74	0,75 µl	0,30 µl	1,853	0,0136	ja
<i>BRCA1</i>	24,49	1,00 µl	1,00 µl	2,089	0,0030	ja

Niedrigster CP-Wert:
bei 24,49

Messungenauigkeit: 0,003
Effizienz: 2.089

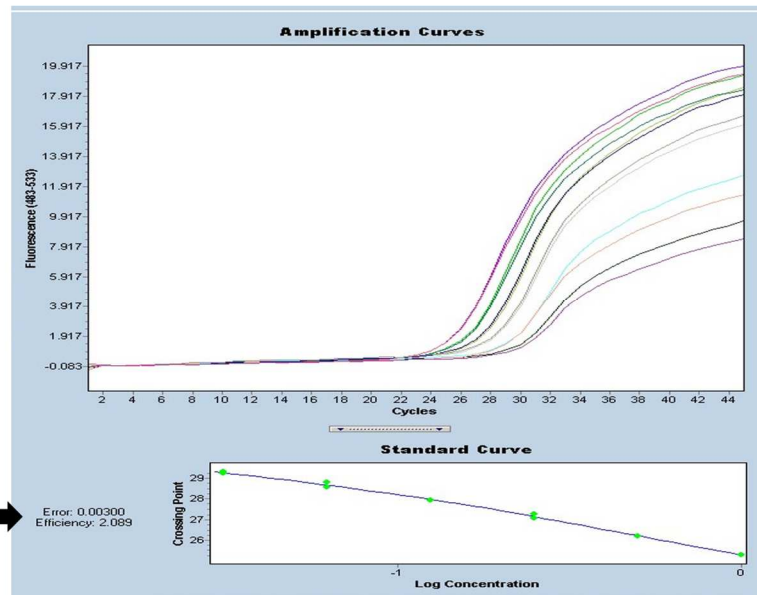


Abb. 11: Effizienztestung des Primerpaares von *BRCA1* mit dem LightCycler®480 II (Firma Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) Screenshot

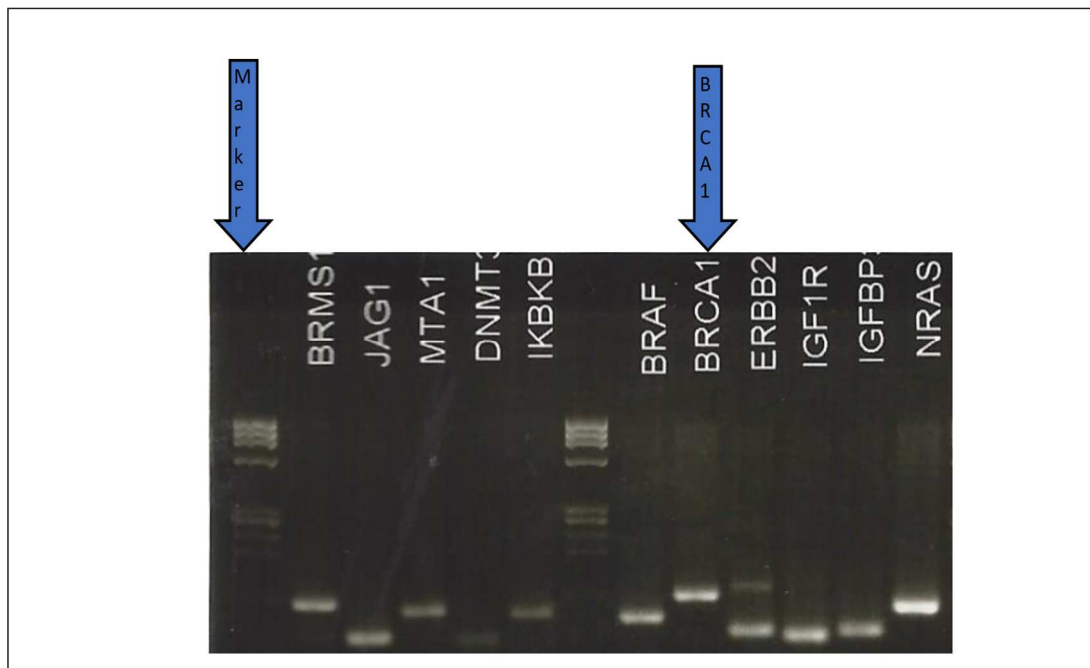


Abb. 12: *BRCA1* Primerspezifität

Gezeigt ist die Spezifität des Primerpaares von *BRCA1*. Im Agarosegel zeigt sich unter ultraviolettem Licht nur eine einzige Bande. Somit ist dieser Primer spezifisch für *BRCA1*.

4.2 Untersuchungen an HMLE-Twist1-ER Zellen mit induzierbarem Twist1-Konstrukt

4.2.1 Quantifizierung des BRCA1-mRNA-Levels im zeitlichen Verlauf

Mittels Kurzzeitstimulation wurde der zeitliche Effekt einer transienten *Twist1*-Aktivierung auf BRCA1-mRNA-Level überprüft. Hierzu wurde nach *Twist1*-Aktivierung nach 24, 48 und 72 Stunden der jeweilige Effekt auf *BRCA1* ermittelt.

Die Untersuchung wurde in technischen Triplikaten (siehe 3.2.3) durchgeführt. Als Abgleich wurde eine „Kontrolle“ (blaues Säulendiagramm) ohne Stimulation mit Tamoxifen verwendet. Nach 48-stündiger Tamoxifenbehandlung („48h“: grünes Säulendiagramm) kam es zu einer Herunterregulierung von *BRCA1* um bis zu 40 % und nach weiteren 24 Stunden („72h“: grünes Säulendiagramm) um weitere 20 %. Die Ergebnisse dieser Zelllinie sind in Abb. 13 bildlich dargestellt.

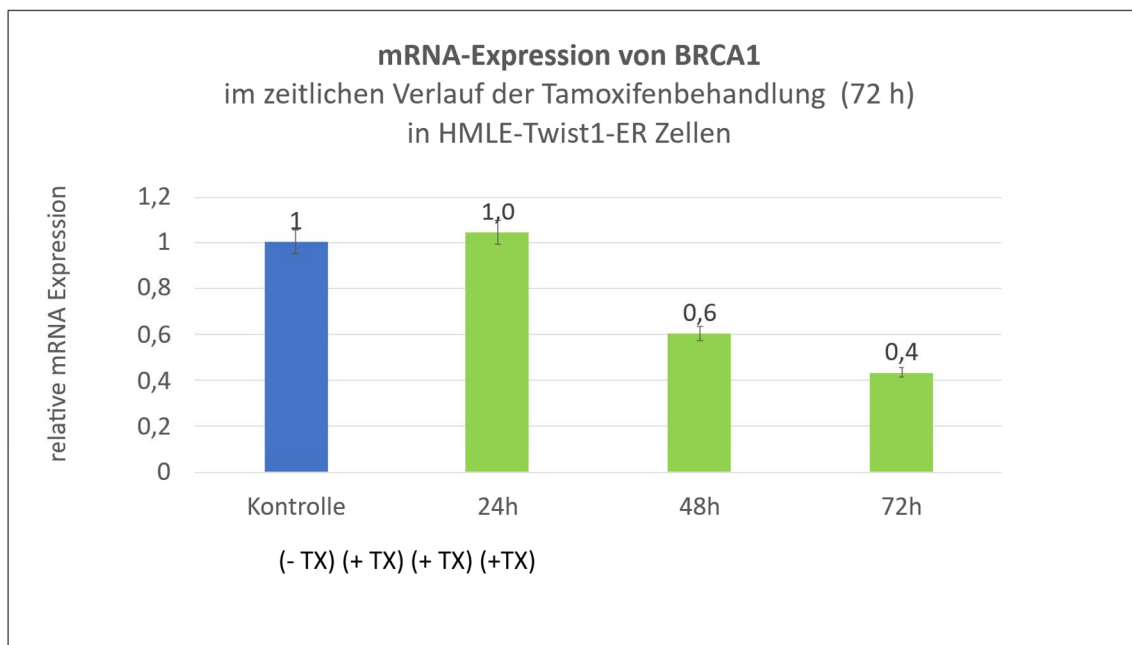


Abb. 13: Relative mRNA-Expression von *BRCA1* der *Twist1* induzierbaren HMLE-Twist1-ER Zelllinie im zeitlichen Verlauf einer 24-, 48-, und 72-stündigen Tamoxifenbehandlung

„Kontrolle“ (ohne vorherige *Twist1*-Induktion mit Tamoxifen)

„24h-48h-72h“ (Ernte und Analyse nach den angegebenen Stunden der Tamoxifenbehandlung)

Die Ergebnisse zeigen je drei technische Triplikate mit Angabe der Standardabweichung.

Da sich der Haupteffekt der transienten *Twist1*-Aktivierung nach 72 Stunden zeigte, wurden biologische Replikate für diesen Zeitpunkt durchgeführt. Die biologischen Replikate bestätigen das Ergebnis einer statistisch signifikanten *BRCA1*-Suppression durch *Twist1*-Aktivierung um gemittelt 50 % ($p = 0,012$) (Abb. 14).

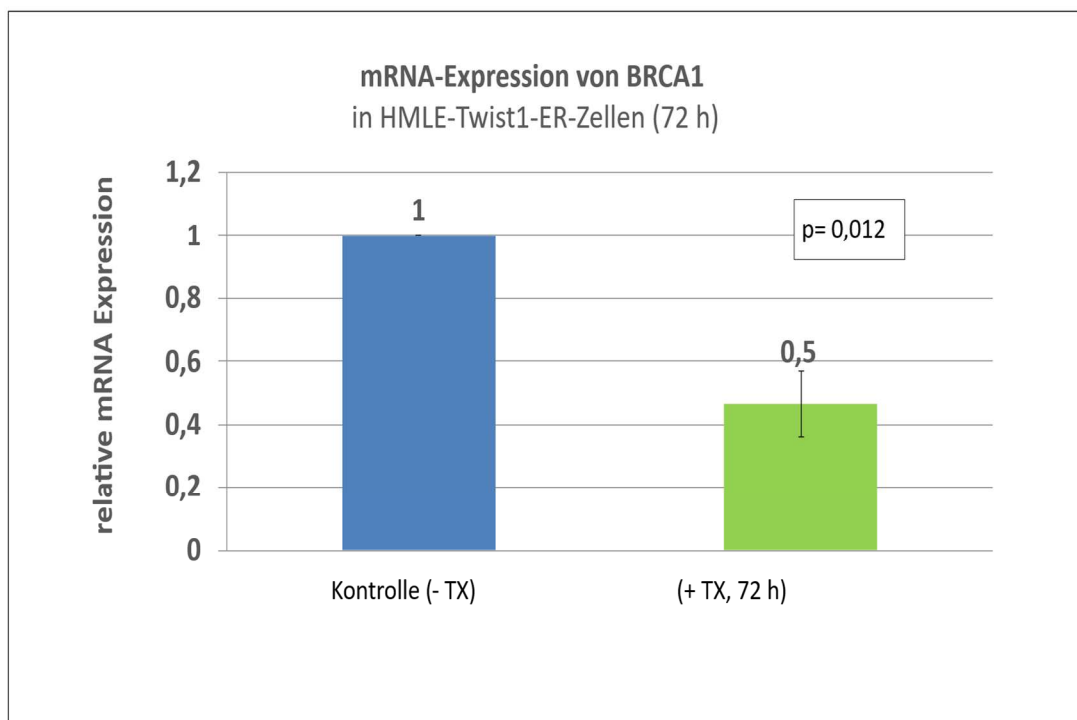


Abb. 14: Relative mRNA-Expression von *BRCA1* in HMLE-Twist-ER-Zellen

Gezeigt ist die relative mRNA-Expression vor (Kontrolle (-TX, 72 h), blaue Säule) und nach *Twist1*-Induktion (+TX, 72 h, grüne Säule) durch Tamoxifen nach 72 Stunden mit Angabe der Standardabweichung der jeweils drei biologischen Replikate.

4.2.2 Western Blot Analyse von *BRCA1* in HMLE-Twist1-ER Zellen

Neben der relativen mRNA-Expression von *BRCA1* wurde der Effekt auf die *BRCA1*-Proteinexpression mittels Western Blot untersucht.

Auch diese Untersuchung erfolgte nach 72-stündiger Tamoxifen-Stimulation.

Im Vergleich zur Kontrolle (ohne Stimulation (-TX)) zeigte sich das *BRCA1*-Protein in einer schwächeren Bande (+TX), entsprechend einem Knockdown. Als Referenz- bzw. „House-keeping“-Gen wurde β -Aktin verwendet (siehe Abb. 15). Die densitometrische Auswertung ergab einen 30%igen Abfall des Proteingehalts von *BRCA1* (siehe Abb. 16).

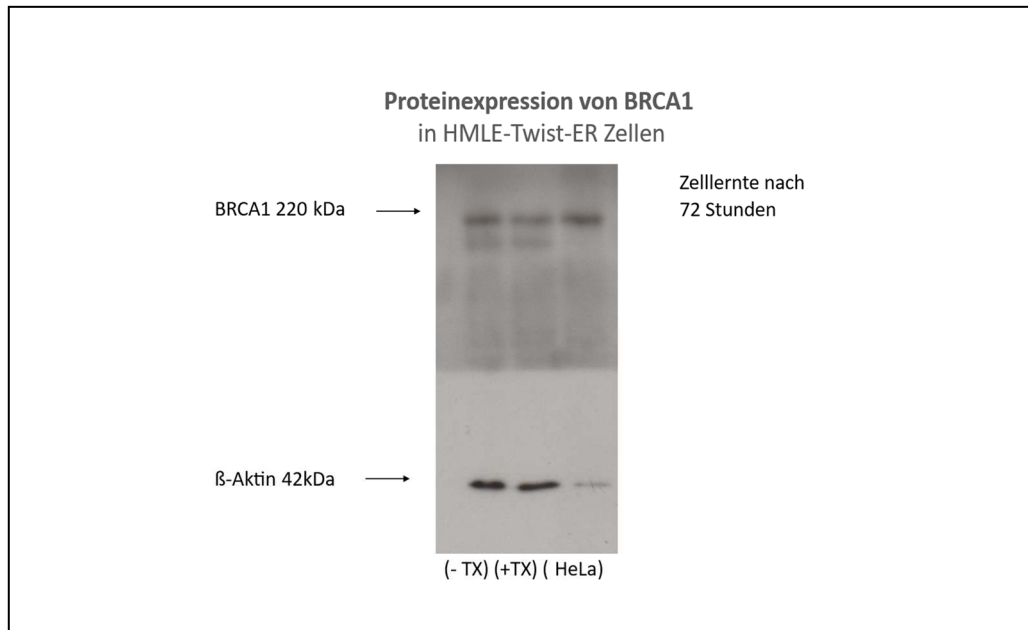


Abb. 15: Nachweis der BRCA1-Proteinexpression in HMLE-Twist1-ER Zellen mittels Western Blot

(- TX): ohne vorherige Twist1-Induktion;

(+ TX): nach Twist1-Induktion durch Tamoxifen nach 72 Stunden

Ladekontrolle: β-Aktin

eingesetzte Proteinmenge: 20µg/ Laufbahn

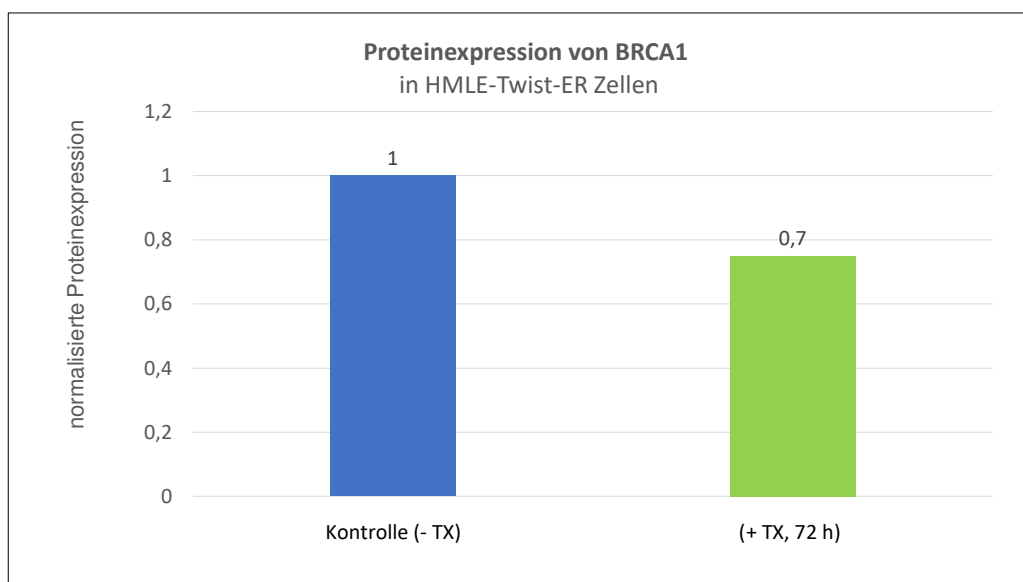


Abb. 16: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung aus Abb. 15) der HMLE-Twist1-ER Zellen

Kontrolle (-TX): ohne *Twist1*-Induktion mit Tamoxifen

(+ TX, 72 h): *Twist1*-Induktion nach 72-stündiger Tamoxifen-Stimulation

Normalisierung auf das "Housekeeping"-Gen β-Aktin

4.2.3 miRNA Expression in HMLE-Twist1-ER Zellen

Um die Hypothese zu erhärten, dass der Cluster der microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 (Y. B. Lee et al., 2009; Yin et al., 2010), einen Einfluss auf mRNA- und Proteinlevel von *BRCA1* nimmt, wurde an den drei biologischen Replikaten nach 72 h eine Expressionsanalyse dieser miRNAs mittels qPCR durchgeführt.

Wie in Abb. 17 dargestellt, zeigte sich nach 72 Stunden ein relativ ca. 2-facher Anstieg (x 2,1) der Expression von hsa-miR-199a-5p in den HMLE-Twist1-ER Zellen nach *Twist1*-Induktion (rote Säule) im Vergleich zur „Kontrolle“ (ohne Tamoxifenstimulation (-TX) - blaue Säule). Die hsa-miR-214 (grüne Säule) zeigte eine um das ca. 4-fach (x 4,1) höhere Expressionsrate in den HMLE-Twist1-ER-Zellen nach *Twist1*-Induktion im Vergleich zur Kontrolle (ohne Tamoxifenstimulation - blaue Säule). Die Auswertung ergibt sich aus drei biologischen Replikaten mit Angabe der Standardabweichung, welche jeweils in Triplets erstellt wurden.

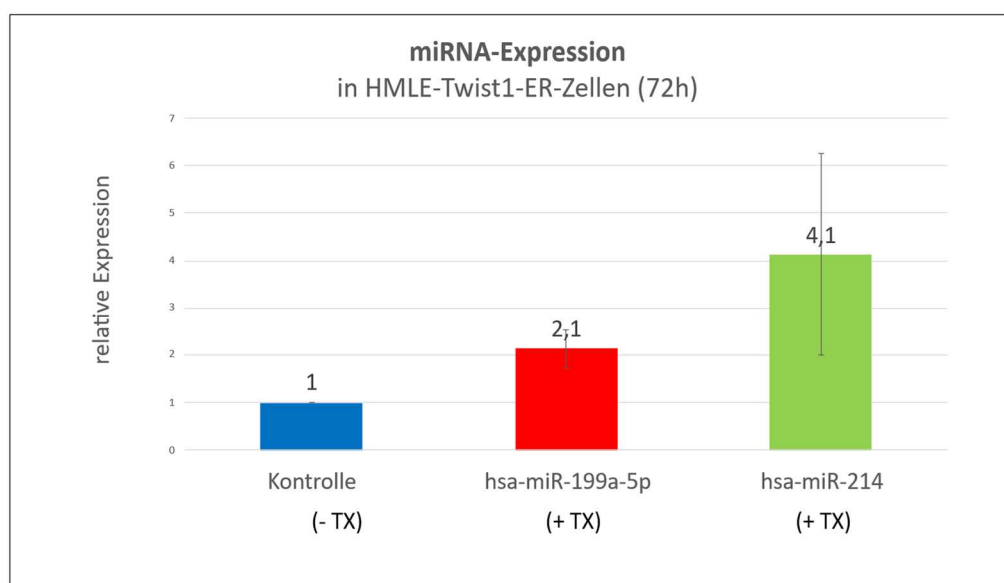


Abb. 17: Relative miRNA-Expression in HMLE-Twist1-ER Zellen

Gezeigt ist die relative miRNA-Expression von „hsa-miR-199a-5p“ und „hsa-miR-214“ (grüne Säulen) nach 72-stündiger Stimulation mit 20 nM Tamoxifen (+TX) im Vergleich zur „Kontrolle“ ohne Tamoxifenstimulation ((-TX) blaue Säule) in HMLE-Twist1-ER-Zellen mit Angabe der Standardabweichung der drei biologischen Replikate.

4.2.4 Wnt5a Expression in HMLE-Twist1-ER Zellen

Eine erfolgreiche Aktivierung von *Twist1* lässt sich indirekt über die Bestimmung des mRNA-Levels des *Twist1*-Targets *Wnt5a* nachweisen. Die relative *Wnt5a* Expression zeigte einen 2,5-fachen Anstieg in den mit Tamoxifen (72 h) stimulierten HMLE-Twist1-ER Zellen (grüne Säule) im Vergleich zur Kontrolle (blaue Säule), der nicht mit Tamoxifen stimuliert HMLE-Twist1-ER Zellen (Abb. 18).

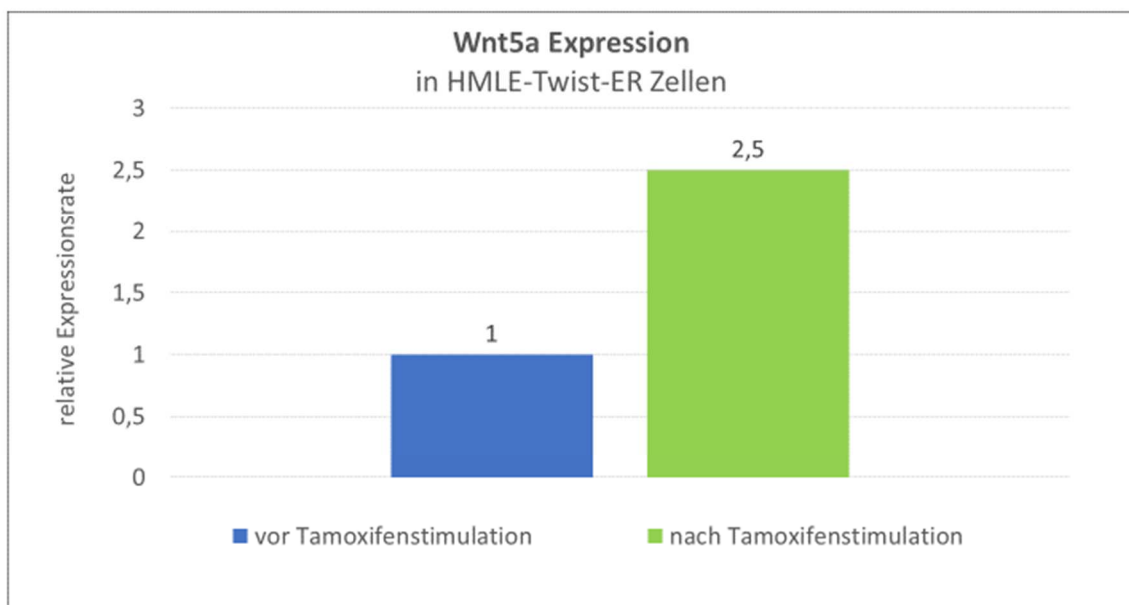


Abb. 18: Wnt-5a Expression in den HMLE-Twist1-ER Zellen (vor und nach Stimulation mit Tamoxifen)

Gezeigt sind die Mittelwerte der technischen Triplikate. Nach 72-stündiger Tamoxifenbehandlung – welches gleichzusetzen ist mit einer *Twist1*-Aktivierung, zeigt sich ein 2,5-facher Anstieg der *Wnt5a*-Expression.

4.3 Untersuchungen an der stabil transduzierten Zelllinie MCF-7

Um den Einfluss der beiden microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 auf *BRCA1* in einer gering invasiven Zelllinie, wie MCF-7 (siehe 3.1.1.1) untersuchen zu können, erfolgte zuvor über eine lentivirale Transduktion (siehe auch 3.1.53.1.4) die Überexpression dieser beiden microRNAs in den MCF-7 Zellen.

Eine erfolgreiche Transduktion mit diesen Vektoren war an der Fluoreszenz der Zellen zu erkennen (Abb. 19).

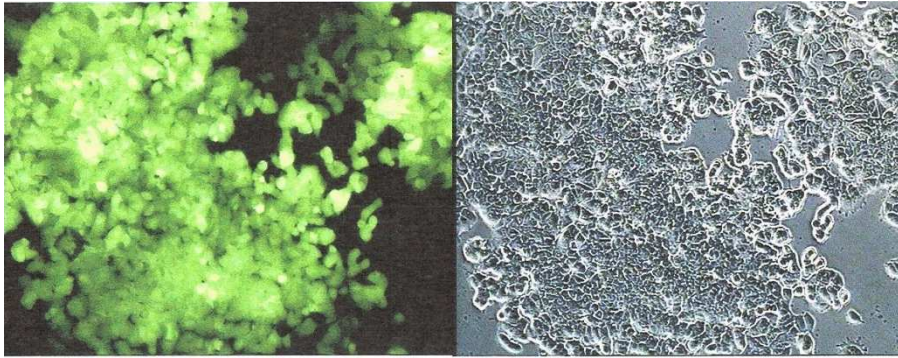


Abb. 19: Überprüfung der lentiviralen Transduktion von MCF-7 mit pre-miRNA (mir-199a), fluoreszierende Zellen im linken Bild, Zellen im Phasenkontrast im rechten Bild

4.3.1 Expressionsanalyse der beiden miRNAs hsa-miR199a-5p und hsa-miR-214 in stabil transduzierten MCF-7-Zellen

Im weiteren Verlauf wurde die mögliche Auswirkung der Überexpression der beiden microRNAs auf *BRCA1* untersucht. Hierzu wurde mit einer qPCR eine Transduktionskontrolle beziehungsweise Expressionskontrolle dieser stabil transduzierten MCF-7 Zellen durchgeführt.

Die Abb. 20A und 20B veranschaulichen die Transduktionskontrolle der die beiden microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 überexprimierenden MCF-7-Zellen mittels einer RT-qPCR nach der SYBR-Green-Methode. Die Analyse zweier biologischen Replicate wurde jeweils in technischen Triplikaten nach vierzehntägiger Zellkultur durchgeführt. Die MCF-7 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-199a-5p (rote Säule) zeigen im Vergleich zu den Zellen mit dem Kontrollvektor (blaue Säule) eine über 40-fach (x 45,6) gesteigerte Expression (Abb. 20A). Die relative Expressionsrate von hsa-miR-214 (grüne Säule) zeigt im Vergleich zu den Zellen mit dem Kontrollvektor einen geringeren Anstieg um das ca. 5-fache (x 5,4) (Abb. 20B).

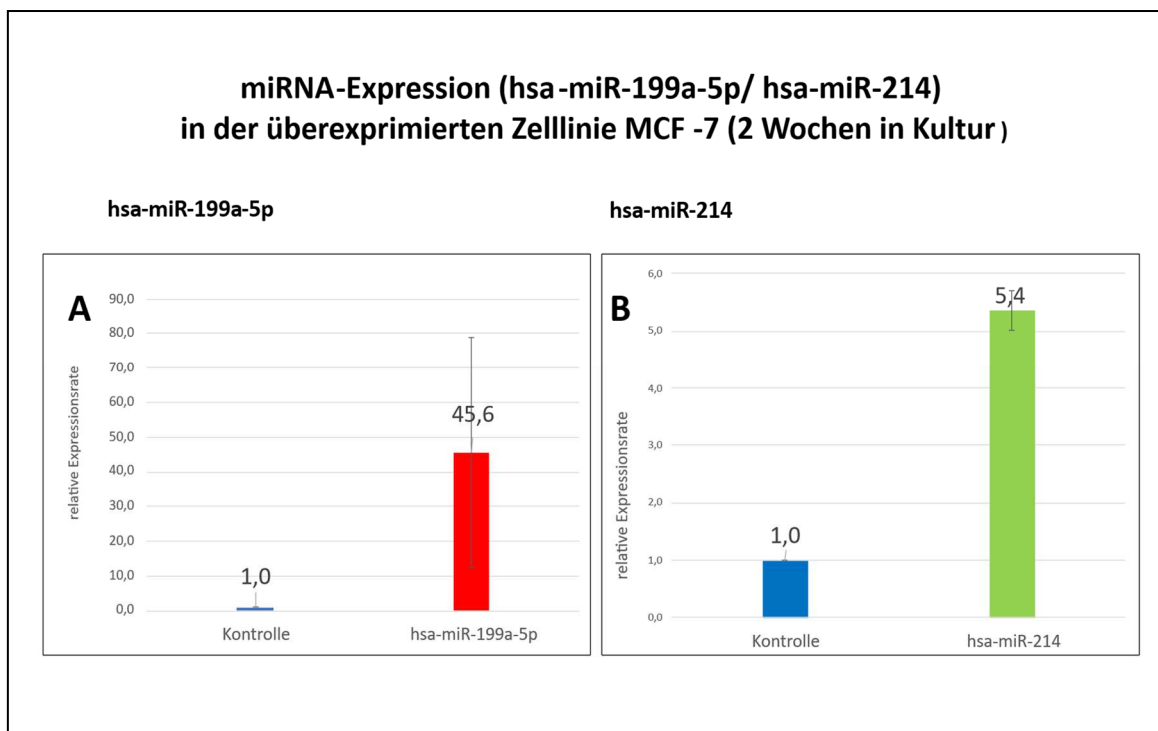


Abb. 20 A und B: Transduktionskontrolle in der Zelllinie MCF-7

(gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 2 biologischen Replikaten)

Kontrolle: MCF-7 Zellen mit integriertem Kontrollvektor

miR-199on: MCF-7 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-199a-5p

miR-214on: MCF-7 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-214

4.3.2 mRNA Quantifizierung von BRCA1 in der miRNA-überexprimierenden MCF-7-Zelllinie

Mittels qPCR wurde die mRNA-Expression von *BRCA1* in den miRNA-überexprimierenden Zellen gemessen. Die Analyse erfolgte in technischen Triplikaten. Wie in Abb. 21 dargestellt, zeigen diese stabil transduzierten MCF-7 Zellen, mit den jeweilig integrierten Vektoren hsa-miR199a-5p (rote Säule) und hsa-miR214 (grüne Säule), im Vergleich zur Kontrolle (blaue Säule) eine um 70 % niedrigere mRNA-Expression von *BRCA1*.

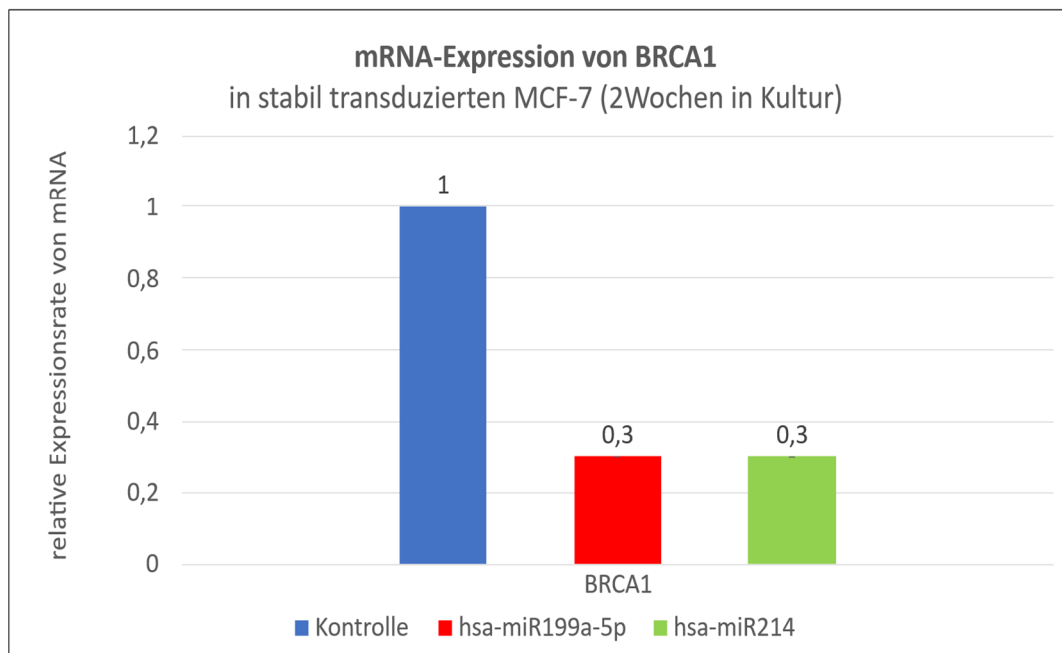


Abb. 21: Relative mRNA-Expression von *BRCA1* in stabil transduzierten MCF-7 Zellen

Kontrolle: MCF-7 Zellen mit integriertem Kontrollvektor

hsa-miR-199-5p: MCF-7 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-199a-5p

hsa-miR-214: MCF-7 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-214

4.3.3 Western Blot-Analyse von *BRCA1* in stabil transduzierten MCF-7-Zellen

Neben der mRNA und microRNA Expression wurde die entsprechende *BRCA1*-Proteinmenge mit einem Western Blot untersucht. Für die Analyse wurden zwei biologische Replikate verwendet

Abbildung 22 zeigt den *Knock-down* vom *BRCA1*-Protein in hsa-miR-214 und hsa-miR-199a-5p überexprimierenden MCF-7 Zellen. Die densitometrische Auswertung (Abb. 23) zeigt eine 60 bis 70 % niedrigere Proteinexpression von *BRCA1* in den stabil transduzierten MCF-7 Zellen „hsa-miR-199a-5p“ und „hsa-miR214“ im Vergleich zur Kontrolle (ohne Überexprimierung). Die Normalisierung erfolgte auf β -Aktin.

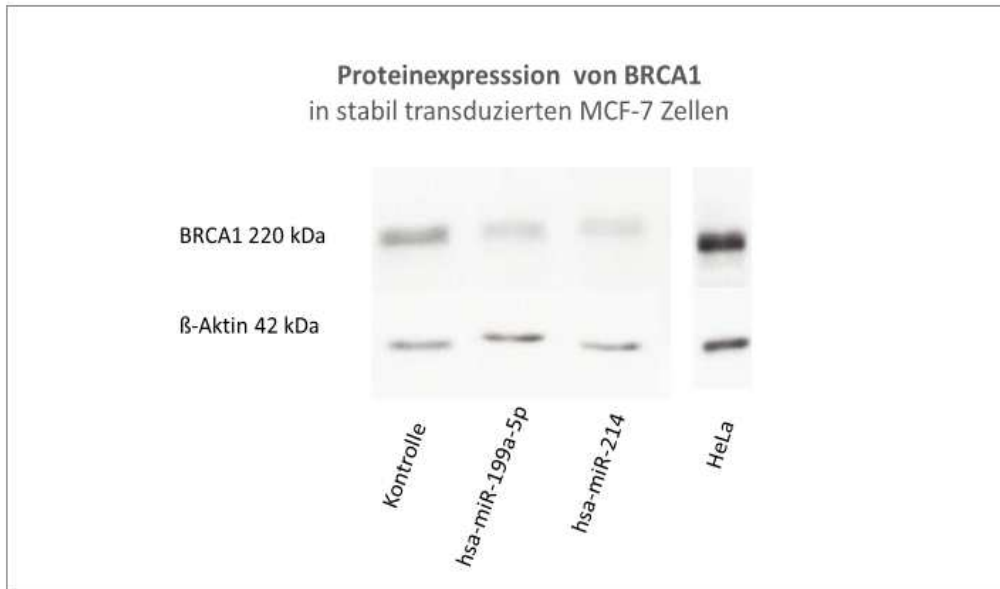


Abb. 22: Nachweis der BRCA1 Proteinexpression in transduzierten MCF-7 Zellen mittels Western Blot

„Kontrolle“: MCF-7 Zellen mit einem Kontrollvektor

„hsa-miR-199a-5p“: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem microRNA-199a-5p Vektor

„hsa-miR-214“: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem microRNA-214 Vektor

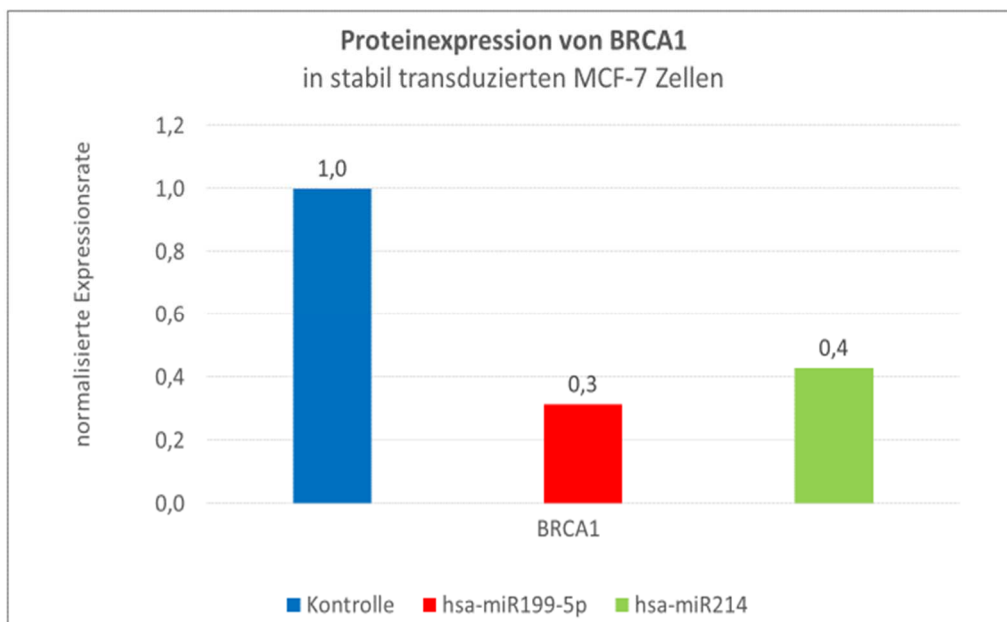


Abb. 23: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung von Abb. 22) der stabil transduzierten MCF-7 Zellen nach 2-wöchiger Kultur

Im biologischen Replikat zeigt sich an den „hsa-miR-199a-5p“ transduzierten MCF-7 Zellen ein *Knock-down* von BRCA1 von 60 % im Vergleich zur „Kontrolle“ ohne Überexprimierung. Die „hsa-miR-214“ transduzierten MCF-7 Zellen zeigen einen *Knock-down* von BRCA1 von 20 % im Vergleich zur „Kontrolle“ ohne Überexprimierung.

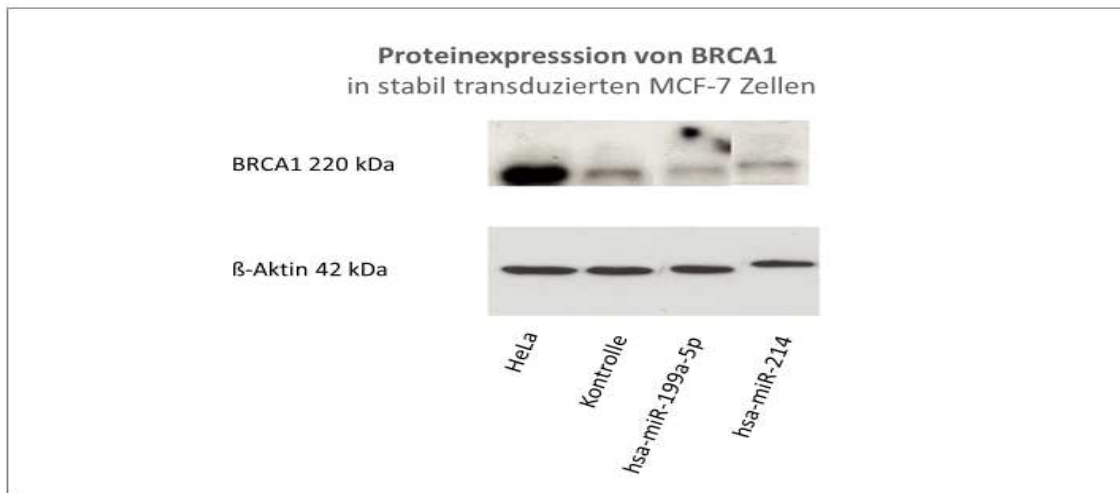


Abb. 24: Nachweis der BRCA1 Proteinexpression in stabil transduzierten MCF-7 Zellen (biologisches Replikat) mittels Western Blot

Kontrolle: MCF-7 Zellen mit einem Kontrollvektor

hsa-miR-199a-5p: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-199 Vektor

hsa-miR-214: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-214 Vektor

HeLa: Positivkontrolle

eingesetzte Proteinmenge: 20 µg/ Laufbahn

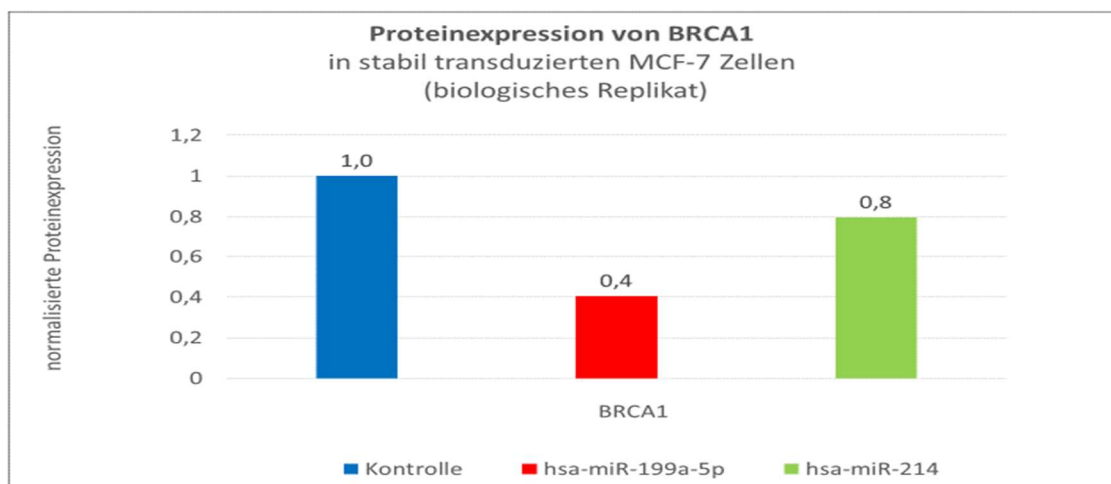


Abb. 25: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung) der stabil transduzierten MCF-7 Zellen (biologisches Replikat) aus Abb. 24

Kontrolle: MCF-7 Zellen mit einem Kontrollvektor

hsa-miR-199a-5p: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-199 Vektor

hsa-miR-214: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-214 Vektor

Diese beiden Blots zusammengenommen und statistisch ausgewertet (Abb. 26) zeigen einen signifikanten Knock-down ($p = 0,02$) von BRCA1 um 60 % in den „hsa-miR-199a-5p“ stabil transduzierten MCF-7 Zellen im Vergleich zur „Kontrolle“ ohne einer miR-Überexpression. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf $p < 0,05$ gesetzt. Bei den „hsa-miR-214“ stabil transduzierten MCF-7 Zellen ist kein signifikanter *Knock-down* von BRCA1 zu verzeichnen ($p = 0,1$).

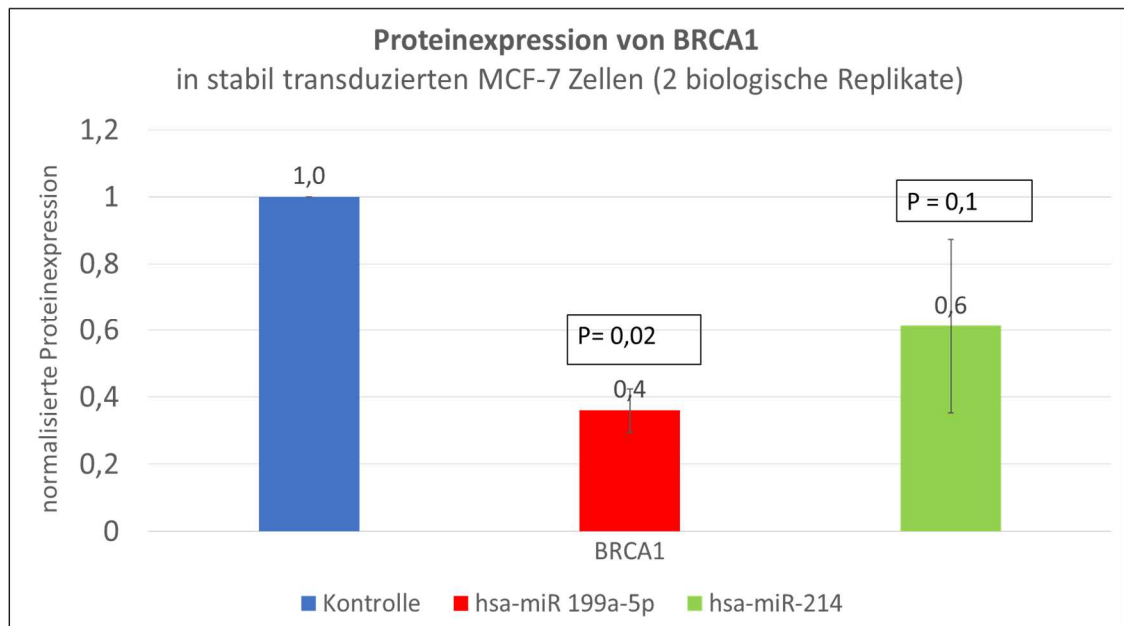


Abb. 26: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung) in stabil transduzierten MCF-7 Zellen (2 Replikate)

Kontrolle: MCF-7 Zellen mit einem dem jeweiligen integrierten Kontrollvektor
 hsa-miR-199a-5p: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-199 Vektor
 hsa-miR-214: MCF-7 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-214 Vektor
 gezeigt sind die Mittelwerte mit Angabe der Standardabweichung und Signifikanz

4.4 Untersuchungen an der stabil transduzierten Zelllinie HMT-3522-S1

Als Progressionsmodell zur Entstehung eines Mammakarzinoms wurde die HMT-3522-S1 Zelllinie (siehe 3.1.1.3) ausgewählt um auch hier den etwaigen Einfluss der beiden microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 auf die *BRCA1* Expression zu überprüfen.

4.4.1 Expressionsanalyse der beiden miRNAs hsa-miR199a-5p und hsa-miR-214 in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen

Abbildung 27 zeigt die Transduktionskontrolle, der überexprimierten HMT-3522-S1 Zellen. Die Analyse erfolgte nach zweiwöchiger Kultur. Die Expression wurde jeweils in technischen Triplikaten durchgeführt. Als Referenzgene wurden *REEP5* und *DDX24* eingesetzt. Die HMT-3522-S1 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-199a-5p (rote Säule) zeigen eine über 5,7-fache Expression im Vergleich zu den Zellen mit dem Kontrollvektor (blaue Säule). Die relative Expressionsrate von hsa-miR-214 (grüne Säule) zeigt einen Abfall um 70 % im Vergleich zu den Zellen mit dem Kontrollvektor (blaue Säule).

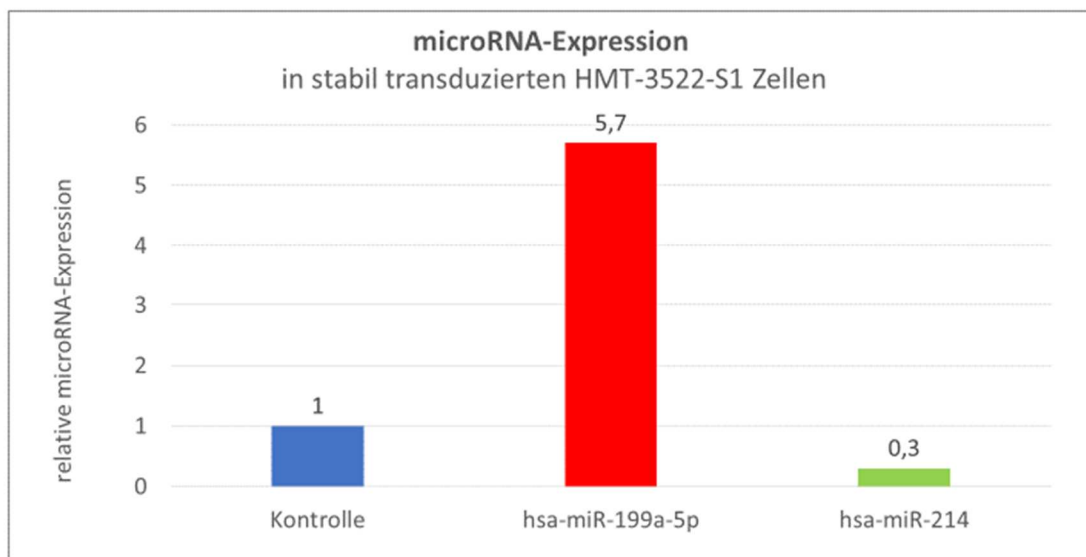


Abb. 27: Transduktionskontrolle in der HMT-3522-S1 Zelllinie

Kontrolle: HMT-3522-S1 Zellen mit dem jeweiligen integrierten Kontrollvektor

hsa-miR-199a-5p: HMT-3522-S1 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-199a-5p

hsa-miR-214: HMT-3522-S1 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-214

4.4.2 mRNA Quantifizierung von BRCA1 in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen

Abbildung 28 zeigt die relative mRNA Expression von *BRCA1* in der Zelllinie von HMT-3522-S1 nachdem sie 2 Wochen in Kultur waren. Die qPCR zeigt, dass das mRNA-Expressionlevel von *BRCA1* in den stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen „hsa-miR-199a-5p“ (rote Säule) um 60 % geringer ausfällt, als im Vergleich zur Kontrolle (blaue Säule). Der *BRCA1* Spiegel in den „hsa-miR-214“ stabil transduzierten Zellen (grüne Säule) zeigt sogar einen *Knock-down* von 90 %, obwohl die hsa-miR-214-Expression nur 30 % der Kontrolle beträgt.

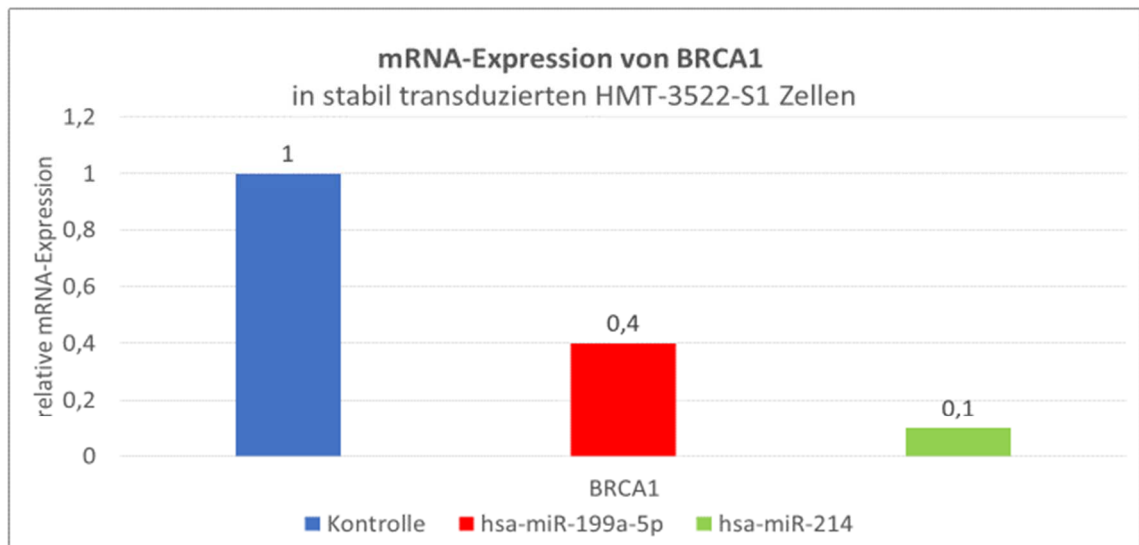


Abb. 28: Relative mRNA Expression von *BRCA1* in der überexprimierenden Zelllinie HMT-3522-S1 (nach 2-wöchiger Kultur)

Kontrolle: HMT-3522 S1 Zellen mit dem jeweiligen integrierten Kontrollvektor

miR-199on: HMT-3522 S1 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-199a.

miR-214on: HMT-3522 S1 Zellen mit integriertem Vektor von hsa-miR-214-5p

4.4.3 Western Blot-Analyse von *BRCA1* in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen

Neben der mRNA und microRNA Expression wurde analog der vorangegangenen Untersuchungen, die *BRCA1*-Proteinmenge in den stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen mittels Western Blot untersucht. Die Ladekontrolle β -Aktin wurde gleichmäßig aufgetragen. Dies zeigen die Banden in der Region von 42 kDa. Die Detektion von *BRCA1* in der Region von 220 kDa zeigen verschiedene Bandenintensitäten. Die Bande in der Region „Kontrolle“ scheint etwas stärker zu sein im Vergleich zu „hsa-miR-199a-5p“. Die Bande „hsa-miR-214“ scheint gleichstark zu sein, wie „Kontrolle“. Somit wird in den Zellen mit der überexprimierten microRNA von hsa-miR-199a-5p *BRCA1* im Vergleich zu den Zellen mit dem Kontrollvektor in geringerem Ausmaß synthetisiert. Jene HMT-3522 S1 Zellen mit den überexprimierten miRNAs von hsa-mir-214 zeigen hier keinen optischen *Knock-down* von *BRCA1* (Abb. 29). In der densitometrischen Auswertung (Abb. 30) ist dagegen ein *Knock-down* von *BRCA1* in beiden stabil transduzierten Zellen („hsa-miR-199a-5p“ und „hsa-miR214“) im Vergleich zu den Zellen mit integriertem Kontrollvektor zu erkennen.

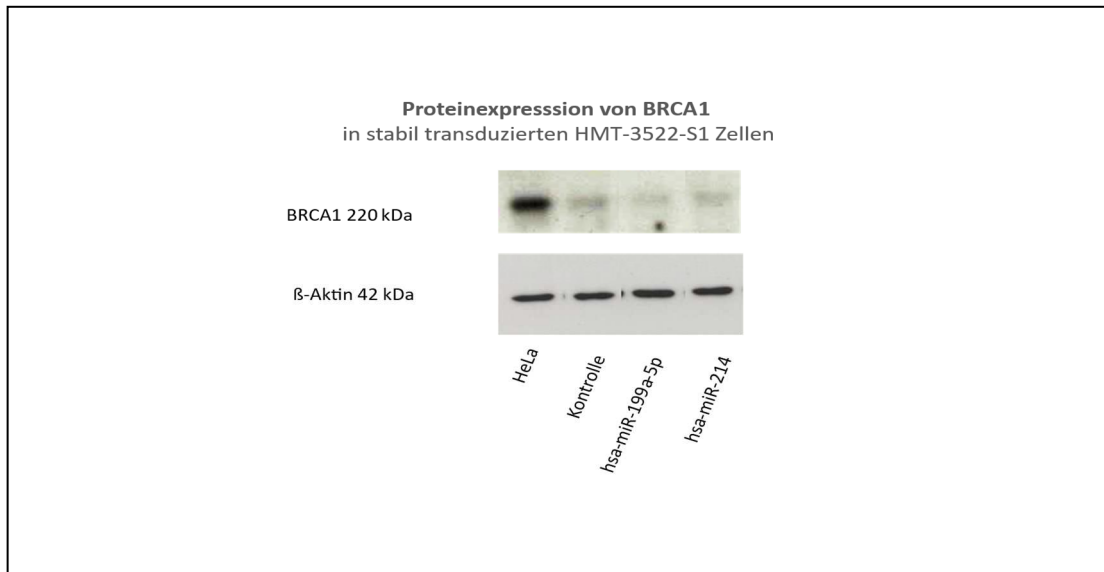


Abb. 29: Nachweis der BRCA1 Proteinexpression in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen mittels Western Blot

Kontrolle: HMT-3522 S1 Zellen mit einem Kontrollvektor

hsa-miR-199a-5p: HMT-3522 S1 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-199 Vektor

hsa-miR-214: HMT-3522 S1 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-214 Vektor

Eingesetzte Proteinmenge: 20 µg/ Laufbahn

Positivkontrolle: β-Aktin

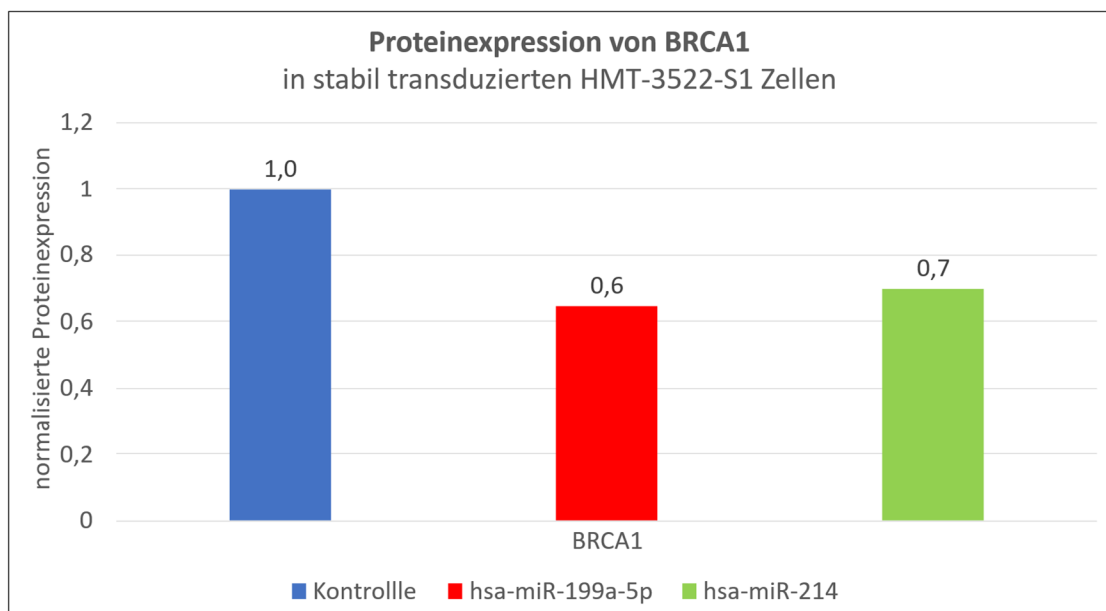


Abb. 30: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung) der stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen (2-wöchige Kultur) aus Abb. 29)

Kontrolle: HMT-3522 S1 Zellen mit einem Kontrollvektor

hsa-miR-199a-5p: HMT-3522 S1 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-199 Vektor

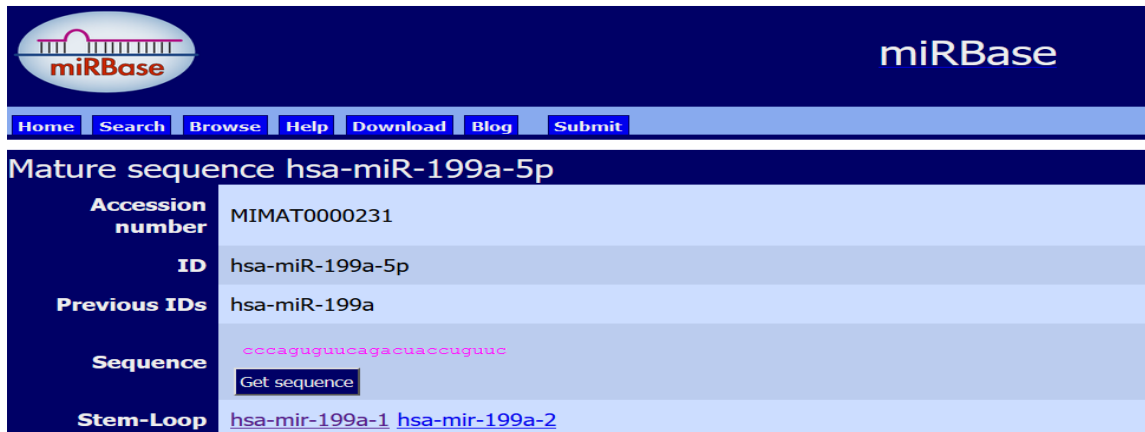
hsa-miR-214: HMT-3522 S1 Zellen mit aktivierten integriertem miRNA-214 Vektor

4.5 Datenbankrecherche über komplementäre Bindungsstellen der miRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 in der 3'UTR-Region von *BRCA1*

Aus der Literatur ist bekannt, dass *Twist1* den miR199/214 Cluster induzieren kann (Y. B. Lee et al., 2009). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, kann eine Überexpression dieser microRNAs zur Repression von *BRCA1* führen. Mittels Datenbankrecherche wurden mögliche Bindungsstellen der microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 in der 3'UTR-Region von *BRCA1* analysiert.

Nach der Datenbank [mirrna.org](http://www.mirbase.org) konnten in der 1382 bp langen 3'UTR-Region von *BRCA1* für die hsa-miR-199a-5p (Sequenz siehe Abb. 31) zwei Bindungsstellen (Abb. 32) mit einem guten mirSVR-Score ($<-0,12$) identifiziert werden. Über den SVR-Score (Betel, Koppal, Agius, Sander, & Leslie, 2010) kann eine gewisse Vorhersage getroffen werden, inwieweit microRNAs an diese Region binden können.

Für hsa-miR-214 konnten in der 3'UTR-Region von *BRCA1* keine Bindungsstellen gefunden werden.



The screenshot shows the miRBase website interface. At the top, there is a navigation bar with links: Home, Search, Browse, Help, Download, Blog, and Submit. Below this, the title 'Mature sequence hsa-miR-199a-5p' is displayed. The main content area is a table with the following information:

Accession number	MIMAT0000231
ID	hsa-miR-199a-5p
Previous IDs	hsa-miR-199a
Sequence	cccaguguucagacuaccuguuc Get sequence
Stem-Loop	hsa-mir-199a-1 hsa-mir-199a-2

Abb. 31: Sequenz von hsa-miR-199a

(Screenshot: Quelle: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000231) (abgerufen am: 15.06.2015) (Griffiths-Jones, Grocock, van Dongen, Bateman, & Enright, 2006)

Um zu überprüfen, ob hsa-miR-199a-5p die Expression von *BRCA1* (NM_007294.3 *Homo sapiens breast cancer 1, early onset (BRCA1), transcript variant 1, mRNA*) reguliert, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt.

4.6 Einfluss der miRNA-Expression von hsa-miR-199a-5p auf *BRCA1* im Luciferase-Assay

Im Luciferase-Assay wurde der direkte Einfluss der microRNA hsa-miR-199a-5p auf das *BRCA1*-Gen gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Messung der Lumineszenz.

Für dieses Experiment wurde die H1299 Zelllinie verwendet, da die Transfektion der HMLE-Zelllinie auch in Wiederholungen nicht gelang.

Die Transfektion erfolgte in technischen Replikaten (Triplikaten). Der Einfluss der hsa-miR-199a-5p (rote Säule) auf die drei verschiedenen Plasmide (leer, Wildtyp (WT), mutiert (Mut)) wurde auf eine *pre-miR* negative Kontrolle (blaue Säule) normalisiert. Unter dem Einfluss von hsa-miR-199a-5p zeigte die Luciferase die niedrigste relative Leuchtkraft mit dem Wildtyp (0,7), als mit der mutierten Sequenz (0,9) (Abb. 33). Dies ist durch eine Bindung von hsa-miR-199a-5p auf die *BRCA1*-3'UTR unmutierten (WT) Bindungsstellen und folglich auf die Regulation von *BRCA1* durch hsa-miR-199a-5p zu erklären.

Im Wildtyp von *BRCA1* kann normalerweise die microRNA hsa-miR199a-5p an die 3'UTR binden. Der *RNA-induced silencing complex* (Risc-Komplex) erkennt diese Bindung und degradiert daher das Plasmid. Es kommt zu **keinem** Leuchtsignal.

An eine mutierte Sequenz hingegen kann diese microRNA nicht binden. Der Risc-Komplex erkennt dies nicht und wird daher auch nicht aktiv. Das Plasmid degradiert nicht und es kommt zu **einem** Leuchtsignal.

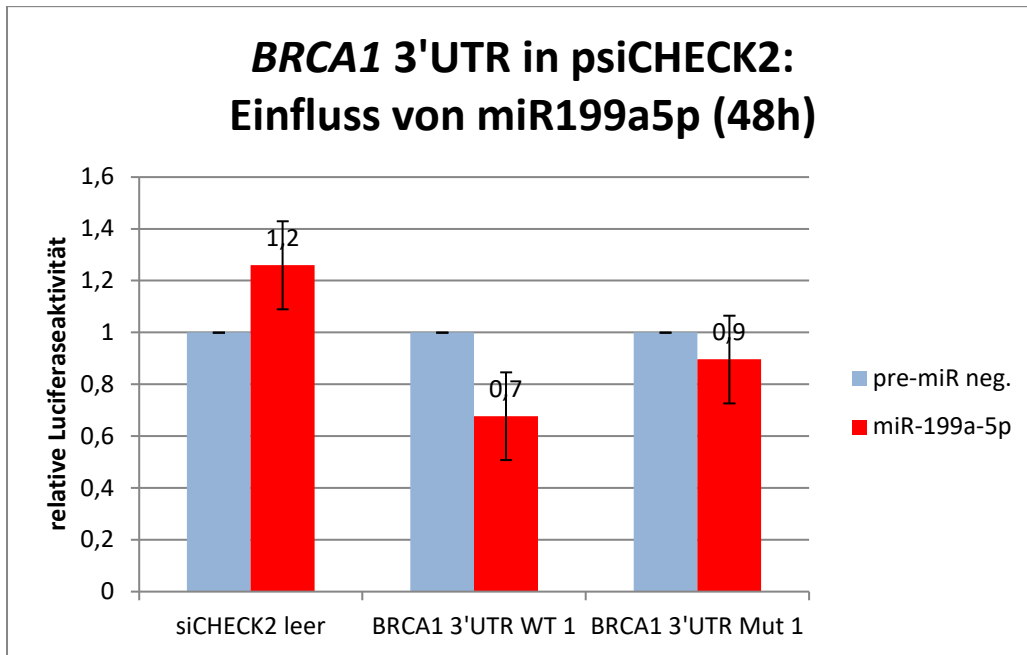


Abb. 33: Einfluss von miR-199a-5p auf *BRCA1* in der 3'UTR-Region

Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität.

Angegeben sind die Mittelwerte mit Angabe der Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen.

5 Diskussion

Das Mammakarzinom der Frau ist mit 25,2 % (1,6 Millionen) die am häufigsten diagnostizierte maligne Tumorerkrankung weltweit. Zugleich ist das Mammakarzinom die häufigste krebbsbedingte Todesursache (14,7 %, 522.000) der Frau (Stand: 2012) (Ferlay et al., 2015). Vor allem die Fernmetastasierung in lebenswichtige Organe (Yang et al., 2004) ist hauptverantwortlich für die hohe Mortalitätsrate (siehe 1.1.1).

Eines der Hauptprobleme bei der Behandlung von Mammakarzinomen liegt in der Heterogenität dieser Tumoren. Sie werden zum einen nach histopathologischen Merkmalen klassifiziert und zum Zwecke der Therapieentscheidung in molekulare Subtypen unterteilt (Degenhardt, Harbeck, & Würtlein, 2015) und schließlich nach den aktuellen S3-Leitlinien (<https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>) (abgerufen am: 11.07.2018) der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der Deutschen Krebshilfe therapiert (Deutsche Krebsgesellschaft et al.).

Genexpressionsanalysen, wie beispielsweise der Prosigna®-Test von NanoString (Ettl, 2015), welcher auch am Pathologischen Institut der Ludwig Maximilians-Universität München durchgeführt wird, geben einen noch besseren Aufschluss über die molekularen Subtypen als immunhistochemische Untersuchungen. Diese Analysen geben Auskunft über das Prognoserisiko und Rückfallrisiko (Ettl, 2015; Würtlein et al., 2016).

Aufgrund der Häufigkeit des Mammakarzinoms und der daraus resultierenden hohen Anzahl brustkrebsbedingter Todesfälle ist es wünschenswert pathophysiologische Mechanismen aufzudecken, die zur Entwicklung eines invasiven Mammakarzinoms führen. Nur so lassen sich mögliche prognostische und prädiktive Biomarker identifizieren um anschließend mögliche Therapien entwickeln zu können.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, mögliche Zusammenhänge zwischen dem Tumorsuppressor *BRCA1* und dem Transkriptionsfaktor *Twist1* unter dem Einfluss von zwei ausgewählten microRNAs, hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214, im Rahmen der EMT, dem vermutlich wichtigsten Schritt in der Metastasierung des Mammakarzinoms, aufzuzeigen (Abb. 6).

5.1 EMT als Erklärungsmodell für die Tumor- und Metastasenbildung

Die epitheliale-mesenchymale Transition, kurz EMT genannt, wird als ein initialer Schritt für die Tumorprogression und Metastasierung angesehen (Drasin et al., 2011; Kalluri & Weinberg, 2009).

Laut Literatur haben invasive Mammakarzinome ihren Ausgangspunkt in den terminalen duktulo-lobulären Einheiten der Mamma (Wellings et al., 1975). Damit Zellen invasiv werden können, müssen sie bestimmte Eigenschaften erwerben. Während der EMT kommt es zur Umwandlung der Epithelzellen zu Zellen mit phänotypisch mesenchymalen Merkmalen und Eigenschaften. Vor allem der Verlust der Zellpolarität und der Verlust spezifischer fester Zellverbindungen befähigt diese zur Invasion und Bildung von Metastasen – siehe auch 1.2.2 (Christina Scheel & Weinberg, 2012; M. Singh, Yelle, Venugopal, & Singh, 2017; J. P. Thiery & Sleeman, 2006). Die genauen biochemischen Prozesse in der EMT sind noch nicht ausreichend geklärt.

5.2 *Twist1*: Ein EMT induzierender Transkriptionsfaktor

Twist1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher EMT induzieren kann und somit an der Karzinogenese beteiligt ist (Ansieau, 2013; Jung & Yang, 2015; Lamouille et al., 2014; Christina Scheel & Weinberg, 2012; M. Singh et al., 2017; Yang et al., 2004). Yang et al. stellten im Jahr 2004 in ihren Studien fest, dass die Expression von *Twist1* in lobulären Mammakarzinomen deutlich gesteigert ist (Yang et al., 2004). Auch in einer anderen Studie zeigte sich die pathogenetische Bedeutung eines geringen *Twist1*-Spiegels, welcher bereits zur Initiation von malignen Hauttumoren führt (Beck et al., 2015). Zudem scheinen hohe *Twist1*-Spiegel für Metastasierungsvorgänge verantwortlich zu sein (Jung & Yang, 2015). Außerdem wurden *Twist1*-Expressionen auch häufig bereits in DCIS entdeckt, somit wäre *Twist1* als ein wichtiger Biomarker bei Mammakarzinomen anzusehen (Ansieau, 2013). Weiters wurde bereits untersucht, ob eine *Twist1*-Promotormethylierung und eine *Twist1*-Überexpression miteinander korrelieren. Allerdings gab es hier keine signifikanten Unterschiede. Jedoch wird von den Autoren dieser Studie empfohlen, dass in der Mammakarzinomdiagnostik eine etwaige Promotormethylierung als ein weiterer Biomarker nebst einer *Twist1*-Überexpression betrachtet werden sollte (Gort et al., 2008).

Aufgrund einer Studie aus dem Jahr 2007 von Sahlin et al. dachte man zunächst, dass Patientinnen mit dem Saethre-Chotzen Syndrom (SCS) zugleich ein erhöhtes Risiko hätten, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Das Saethre-Chotzen Syndrom ist eine kraniofaziale Fehlbildung, welche auf eine Mutation des *Twist1*-Transkriptionsfaktors zurückzuführen ist. In dieser Studie erkrankten 15 von 29 schwedischen Frauen mit diesem Syndrom zugleich an einem Mammakarzinom (Sahlin et al., 2007). Zwei Jahre später konnten multizentrische Studien von James et al. widerlegen, dass das Mammakarzinomrisiko bei Patientinnen mit dem SCS erhöht sei (James et al., 2009).

Xu et al. entwickelten 2017 ein Mausmodell mit einem onkogen induzierbaren Mammatumor. Mäuse im fortgeschrittenem Stadium, welche im Wildtyp *Twist1* exprimierten, entwickelten Lungenmetastasen, wohin gegen jene fortgeschrittenen Tumorzellen mit einem *Twist1*-Knockout, weit weniger Lungenmetastasen bildeten (Yixiang Xu et al., 2017).

Die vorliegende Arbeit unterstützt die genannten Aussagen, dass eine *Twist1*-Induktion zu einer EMT beitragen kann, in dem diese zu einer Überexpression der beiden microRNAs (hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214) führt und einhergehend zum Absenken der *BRCA1*-Expression. Daher besteht Grund zur Annahme, dass durch diesen Prozess die protoonkogene Wirkung von *BRCA1* unterdrückt wird.

5.3 microRNAs im Zusammenhang einer EMT

Immer näher in den Fokus einer EMT induzierenden Wirkungen sind unter anderem auch microRNAs gerückt (Nassar, Nasr, & Talhouk, 2017; Zou et al., 2017).

Sie gewinnen in der Karzinomforschung immer mehr an Bedeutung, da sie sowohl tumorsuppressiv als auch onkogen wirken können (Iorio et al., 2005; Lewis, Shih, Jones-Rhoades, Bartel, & Burge, 2003; Mees, Schwarze, Starke, Senninger, & Stölting, 2015; Moazzeni, Najafi, & Khani, 2017; H. P. Tsai, Huang, Li, Chien, & Chen, 2018; Wilk & Braun, 2017).

Einen kleinen Überblick über tumorsuppressive oder onkogene microRNAs gibt eine Studie von Zhang und Ma (Zhang & Ma, 2012). Durch ihre geringe Größe und enorme Stabilität eignen sich microRNAs besonders gut als prognostische Biomarker (Huang, 2017). So kann eine Dysregulation von miRNA mit einer schlechten Prognose einhergehen

(Chan & Wang, 2015). Ihre Expression ist gewebspezifisch (Mishra & Merlino, 2009) und sie sind mit etablierten Methoden relativ einfach nachweisbar (Hamam et al., 2017; Nassar et al., 2017; Shin, Siu, Cheuk, Ng, & Kwong, 2015). Beispielsweise kann über den *nCounter*[®]-Assay von *NanoString* die Expression von über 800 verschiedener microRNAs amplifikationsfrei gemessen werden (Geiss et al., 2008; Y. Liu et al., 2015).

Über komplementäre Bindungen in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) einer mRNA können solche microRNAs die Genexpression so maßgeblich verändern, dass diese zu einer verminderten Translation von Proteinen oder zu Degradation der jeweiligen mRNA führen können. Je mehr Bindungsstellen es für solche onkogenen miRNAs in dieser Region gibt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Repression der Genexpression (Fang & Rajewsky, 2011; Guttilla, Adams, & White, 2012; Hamam et al., 2017).

5.3.1 Transiente *Twist1* Aktivierung führt zur Überexpression der microRNAs und zum Absenken des *BRCA1* Spiegels in HMLE-Twist1-ER-Zellen

Wie aus der Literatur bekannt ist, kann *Twist1* über die Bindung an die E-Box innerhalb des *Dynamin3*-Gens den miR199/214 Cluster steuern (Y. B. Lee et al., 2009). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass in epithelialen Ovarialkarzinomstammzellen vom Typ II die Expression dieser beiden microRNAs (mir-199, mir-214) erhöht war (Yin et al., 2010).

In den Untersuchungen von Baumgarten et al. zeigte sich bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu Spenderherzen eine Repression des Faktors *Twist1* um 43 %, welche ebenfalls mit einer reduzierten Expression von miR-199 um rund 38 % und miR-214 um rund 41 % korrelierte. Durch *Silencing* von *Twist1* in Rattenmyozyten kamen sie zu einem ähnlichen Ergebnis (Baumgarten et al., 2013).

Aufgrund dieser genannten Studienlage war es interessant nachzuprüfen, ob es eventuell durch eine direkte Induktion von *Twist1* über diese beiden microRNAs zum Absenken des *BRCA1* Spiegels kommen könnte.

Zunächst wurde im ersten Teil dieser vorliegenden Arbeit auf Zellebene überprüft, inwiefern sich der mRNA-Spiegel von *BRCA1* aufgrund einer *Twist1*-Induktion durch Tamoxifen-Stimulation in den HMLE-Twist1-ER-Zellen verhält. Die Expression, sowohl der microRNAs als auch der mRNA von *BRCA1* wurde mittels einer qPCR überprüft.

Zusätzlich wurde diese mRNA-Expression von *BRCA1* auf Proteinebene mittels einem Westernblot analysiert.

Nach einer transienten Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Twist1* von bis zu 72 Stunden zeigte sich in den HMLE-Twist1-ER-Zellen ein 50%iger Abfall des mRNA-Spiegels von *BRCA1* (Abb. 14). Dieses Ergebnis ließ sich auch auf Proteinebene verifizieren (Abb. 15 und Abb. 16).

Abb. 13 veranschaulicht einen kontinuierlichen Abfall des *BRCA1*-Spiegels nach Zugabe von Tamoxifen um zwar nach 48 Stunden auf 60 % und nach 72 Stunden auf 40 % im Vergleich zu den Zellen ohne vorherige Stimulation mit Tamoxifen.

Nach dieser Vorarbeit wurde das Expressionslevel der microRNAs überprüft. Die Analyse zeigte folglich ein zu erwartendes Ergebnis: Nach einer 72-stündigen Tamoxifenbehandlung zeigte sich ein 2,1-facher Anstieg der hsa-miR-199a und ein 4,1-facher Anstieg der hsa-miR-214 (Abb. 17).

Somit wurde mit diesem Ergebnis wiederum veranschaulicht, dass die beiden microRNAs über den Transkriptionsfaktor *Twist1* gesteuert werden könnten. Hierbei ist zu beachten, dass in diesen Zellen keine experimentelle Überexpression stattgefunden hat.

Eine zusätzliche Wnt5a-Expressions-Analyse konnte die *Twist1*-Aktivierung bestätigen (Abb. 18).

Somit bestätigen diese Ergebnisse (siehe 4.2.3), dass *Twist1* den miR-199/214 Cluster (Y. B. Lee et al., 2009; Yin et al., 2010) steuert und es darüber hinaus in weiterer Folge zur Herunterregulierung des *BRCA1*-Spiegels kommen kann.

5.4 Überexpression von miR-199a-5p und miR-214 führt zur Reprimierung von *BRCA1* in geringinvasiven Zellen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene

Die vorläufigen Ergebnisse konnten zunächst die Hypothese bestätigen, dass diese beiden progressionsrelevanten microRNAs durch eine *Twist1*-Induktion überexprimiert werden und es folglich zu einem *Knock-Down* von *BRCA1* führen kann.

Hsa-miR-199a-5p

Die mRNA-Expression von *BRCA1* zeigte im Vergleich zur Kontrolle (ohne Überexpression) in den beiden Zelllinien mit der miR199a-Überexpression in MCF-7 und HMT-3522-S1 eine 70%ige bzw. 60%ige Herunterregulierung von *BRCA1* (Abb. 21 und Abb. 28).

Hsa-miR-214

Die Überexprimierung der miR-214 wirkte sich zum Teil stärker auf die *BRCA1*-Expression aus. In den MCF-7 Zellen zeigte sich eine 70%ige Herunterregulierung und in den HMT-3522-S1 sogar eine 90%ige Herunterregulierung (Abb. 21 und Abb. 28).

Eine weitere Frage, die sich stellte war, ob die Proteinsynthese von *BRCA1* so maßgeblich von der Überexpression der microRNAs beeinflusst wird, sodass es zu einer verminderten Proteinsynthese kommen kann oder diese komplett inhibiert wird.

Daher wurde zugleich in all diesen Zelllinien auf Proteinebene mit Hilfe des Westen Blots der *BRCA1*-Spiegel analysiert.

In der transduzierten MCF-7-Zelllinie und einem biologischen Replikat und in der transduzierten HMT-3522-S1 Zelllinie kam man zu einem ähnlichen Ergebnis, wie in den qPCRs – nämlich der Herunterregulierung von *BRCA1* (Abb. 26 und Abb. 30).

Die *BRCA1*-Bande im Bereich der 220 kDa Region stellte sich im Vergleich zur Kontrolle in beiden miRNAs überexprimierten Zellen (miR-199/214) sehr schwach da (Abb. 22, Abb. 24, Abb. 29). Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Überexpression dieser microRNAs den Tumorsuppressor *BRCA1* auf Proteinebene herunterregulieren können. Diese Ergebnisse würden auch die Studie von Dr. med. Bartsch bekräftigen, da wie eingangs erwähnt (siehe 1.4), diese beiden microRNAs auch im invasiven Mammakarzinom überexprimiert sind (Bartsch, 2016). Daher ist Grund zur Annahme, dass der Tumorsuppressor *BRCA1*, zumindest auf Zellebene, durch diese microRNAs unterdrückt werden könnte.

5.5 miR-199a ein mögliches direktes Target von *BRCA1*

Zusätzlich wurden komplementäre Bindungsstellen dieser microRNAs in der 3'UTR von *BRCA1* in der Datenbank („microRNA.org“ Datenbank) recherchiert. Hier konnten in der 3'UTR für hsa-miR-199a-5p zwei Bindungsstellen eruiert werden. Die Bezeichnung „5p“ in der hsa-miR-199a-5p bezieht sich auf die Position der miRNA in der 3' UTR, welche sich in diesem Fall in vorderer Position in 5'-3' Richtung befindet. Für die miR-214 konnte in der Datenbank keine Bindungsstellen gefunden werden (siehe 4.5).

Um einen etwaigen direkten Einfluss dieser microRNA auf die mRNA-Synthese von *BRCA1* zu überprüfen wurde dies mit dem Luciferase Assay von Promega getestet. Nach gescheiterten Transfektionsversuchen mit den HMLE-Twist1-ER Zellen wurden H1299 Zellen verwendet.

Im Dual-Luciferase®Reporter Assay bestätigte sich, dass *BRCA1* ein direktes Target von hsa-miR-199a-5p ist. Dies zeigte sich in einer verminderten Leuchtkraft (Abb. 33). Eine erst kürzlich publizierte Studie von Ho et al. kam ebenso zu selbigem Ergebnis. Die Untersuchungen wurden an 32 triple negativen Tumorproben durchgeführt. Hier korrelierte die miR-199a-3p Expression invers mit der von *BRCA1*-Expression. Dies zeigte sich in den erniedrigten Proteinlevels. Außerdem konnten sie ebenso eine direkte Interaktion der miR-199a-3p im Dual-Luciferase®Reporter Assay bestätigen (Ho et al., 2018). In dieser vorliegenden Doktorarbeit konnte somit gleichfalls eine inverse Korrelation mit der miR-199a-5p und *BRCA1* aufgezeigt werden.

MicroRNAs können, wie auch hier gezeigt wurde, an die 3'UTR der mRNA von *BRCA1* andocken und somit die Proteinproduktion vermindern.

5.6 Material und Methodenauswahl

5.6.1 Auswahl und aktuelle Studien der beiden microRNAs

Aus Voruntersuchungen in unserer Arbeitsgruppe kristallisierten sich zwei microRNAs (hsa-miR-199-5p und hsa-miR-214) heraus, welche in invasiven Mammakarzinomen im Vergleich zu DCIS höher exprimiert waren (Schultz, Bartsch, Sotlar, Paetat-Dutter, et al., 2011). Noch während der Verfassung dieser Arbeit wurde zur Validierung verschiedener microRNAs das NanoString®-System vorgestellt, welches in einer einzigen Probe bis zu 800 microRNAs gleichzeitig analysieren kann. In sechs formalinfixierten, paraffineingebetteten Tumorproben, mit einem dukalen Carcinoma in situ (DCIS) und einer invasiven Komponente (NST), war die hsa-miR-199a-5p im invasiven dukalen Mammakarzinom (NST) vergleichsweise signifikant überexprimiert ($p < 0,05$) (Fehm et al., 2016). In einer weiteren Studie von Dr. med. Bartsch war in invasiven Mammakarzinomen die microRNA hsa-miR-199a ebenso signifikant überexprimiert ($p < 0,0001$). Die Expression von hsa-miR-214 ($p = 0,0733$) war jedoch nicht so signifikant erhöht (Bartsch, 2016).

Auch andere Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss der microRNA hsa-miR-199a-5p in der Karzinomforschung, auf die nun genauer eingegangen wird.

In einer erst kürzlich publizierten Studie aus dem Jahr 2018 von Tsai et al. wurde die Expression von hsa-miR-199a-5p im unterschiedlichen Erkrankungsalter und Subtypen genauer analysiert. Allerdings wurde hier bezüglich dieser microRNA keine Aussage über die Pathogenität getroffen (H. P. Tsai et al., 2018).

Sowohl beim Lungenkarzinom (Ahmadi, Khansarinejad, Hosseinkhani, Ghanei, & Mowla, 2017) als auch beim Weichteilsarkom (Keßler et al., 2016) gilt diese microRNA als ein markanter Biomarker.

In den Studien von Shin et al. im Jahr 2015 wurde die Expression dieser microRNA in triple negativen Mammakarzinomen (TNBC) mit nicht triple negativen Mammakarzinomen verglichen. Hier zeigte sich, dass diese in TNBC unterexprimiert war (Shin et al., 2015). Auch die Untersuchungen von Piasecka et al. zeigten eine Herunterregulierung der hsa-miR-199a-5p in TNBC (Piasecka, Braun, Kordek, Sadej, & Romanska, 2018). In einer weiterführenden Studie aus dem Jahr 2016 von Chen et al. - zu welcher auch Frau Shin aus der vorigen Studie zählte – schreiben sie der miR-199a-5p eine EMT unterdrückende Wirkung zu. Eine Überexpression führte hier zu verändertem *Twist1* (Chen et al., 2016).

Beim Prostata-Adenokarzinom ist die miR-199a-5p ebenso ein direktes Target der mRNA von Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α). Eine Überexprimierung dieser microRNA wirkte hier hingegen wiederum tumorsuppressiv über die Bindung an die 3' UTR (Zhong et al., 2017).

Bei der Untersuchung des follikulären Schilddrüsenkarzinoms, wurde eine verminderte Expression der miR-199a-5p festgestellt. Hier ist das CTGF-Gen (englisch: *Connective Tissue Growth Factor*) ein Target der miR-199a-5p (Sun et al., 2016).

In den Studien von Guo et al. mit Leberkrebszellen wurde diese microRNA ebenso als tumorsuppressiv identifiziert (Guo et al., 2015)

Bei Patienten mit einem Hepatozellulärem Karzinom kam es durch die Cisplatin(Zytostatika)-Behandlung, welche intravenös appliziert wurde, zur verminderten Expression dieser microRNA und dadurch zur verminderten Zellproliferation (Xu et al., 2012).

Somit gibt es unterschiedliche Aussagen über das Expressionsniveau der hsa-miR-199a-5p und deren Auswirkungen.

In einer weiteren Studie wurden diese beiden microRNAs als mögliche therapeutischen Targets beim Pankreas-Adenokarzinom näher untersucht. Die Inhibierung dieser microRNAs ließ sich über die Marker wie α -SMA und Kollagen-Typ-I, welche durch den TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor-beta 1*) beeinflusst werden, durch eine Verminderung im Western Blot und in der Immunhistochemischen Färbung bestätigen (Kuninty et al., 2016).

Die microRNA miR-214 wurde ebenso in der Studie von Orso et al. bereits untersucht. Hier kam man zu dem Ergebnis, dass diese microRNA die Tumorprogression beim Mammakarzinom fördert (Orso et al., 2016).

5.6.2 Auswahl der Zelllinien für die Überexpression der miRNAs

Um den Einfluss dieser miRNAs auf *BRCA1* während der EMT auf Zellebene untersuchen zu können wurde die gut etablierte und gering invasive MCF-7 Zelllinie und zum Vergleich die HMT-3522-S1 Zelllinie ausgewählt.

5.6.2.1 MCF-7-Zelllinie

Wie unter 3.1.1 erwähnt, wird die MCF-7 Zelllinie in der Literatur als geringgradig invasive Mammazelllinie beschrieben, so wurde für diese Studie vorrangig diese Zelllinie ausgesucht um den Einfluss der der miRNAs hsa-miR199a und hsa-miR-214-5p auf *BRCA1* besser untersuchen zu können.

Zudem zeigten bisherige Forschungen mit MCF-7 Zellen in denen *Twist1* überexprimiert wurde, dass durch die Überexpression dieses Faktors eine EMT ausgelöst wurde (Mironchik et al., 2005). Weiters soll laut Literatur der *BRCA1*-Spiegel auf mRNA-Ebene, ohne einer Überexprimierung der microRNAs erhöht sein (Vissac, Peffault De Latour, Communal, Bignon, & Bernard-Gallon, 2002). Dies würde bestätigen, dass *BRCA1* ohne Mutationen und anderer Einflüsse normalerweise als Tumorsuppressor agiert.

Daher wurden in dieser MCF-7 Zelllinie die beiden microRNAs über lentivirale Transduktion überexprimiert und anschließend weiter in Kultur genommen.

5.6.2.2 HMT-3522-S1 Zelllinie

Als eine weitere Zelllinie wurde zum Vergleich eine benigne Zelllinie ausgewählt, um die möglichen Folgen einer Überexpression der microRNAs besser studieren zu können.

Wie unter 3.1.1.3 erwähnt wurde, ist sie eine östrogenrezeptorfremde und somit auch nicht durch Östradiol stimulierbar, nicht-tumorigene benigne Mammaepithelzelllinie, welche aus einem fibrozystischem Mammagewebe entnommen wurde.

5.6.2.3 HMLE-Twist1-ER Zelllinie

Dank der Kooperation mit Frau Prof. Dr. med. Christina Scheel vom Helmholtz Zentrum München erhielten wir HMLE-Twist1-ER Zellen mit induzierbarem *Twist1*-Konstrukt. In ihren Studien mit diesen Zellen stellt sie fest, dass eine vorübergehende *Twist1*-

Aktivierung (15 Tage) mit anschließender Deaktivierung zur Induktion einer EMT führte. Diese Zellen erwarben stammzellartige Eigenschaften, welche sie zur Invasion und Metastasierung befähigte (Schmidt et al., 2015).

Daher wurde diese Zelllinie in dieser Arbeit verwendet, da sie ein interessantes Modell bezüglich auf die Induzierbarkeit der EMT darstellte. Durch den induzierbaren Transkriptionsfaktor *Twist1* konnten genauere Zusammenhänge beziehend der *Twist1* induzierbaren microRNAs auf *BRCA1* und EMT erschlossen werden.

5.6.3 Methodenauswahl

qPCR und Westernblot-Analyse

Um die Expression von *BRCA1* in den verschiedenen Zelllinien unter verschiedenen Ausgangsbedingungen zu überprüfen, sei es die Aktivierung des *Twist1* Faktors in der HMLE-*Twist1*-ER-Zelllinie oder die die lentivirale Überexprimierung der beiden microRNAs in der MCF-Zelllinie und HMT-3522-S1-Zelllinie, wurden daher die Ergebnisse auf Transkriptionsebene und auf Translationsebene Ergebnisse verglichen. Eine Genexpression auf mRNA- Ebene liefert zwar eine gewisse Vorhersagbarkeit auf die spätere Proteinexpression, dennoch ist sie kein tatsächlicher Beweis für die ausschlaggebende Proteinbildung, daher wurden neben den qPCRs zusätzlich auch immer Westernblotanalysen durchgeführt.

Wnt5A-Expression

Die Wnt5A Expressionsanalyse diente zur weiteren Verifizierung der *Twist1*- Aktivierung und somit auch der EMT-Induktion (Y. Xu et al., 2017). So konnte bestätigt werden, dass über die Tamoxifenstimulation der *Twist1*-Transkriptionsfaktor tatsächlich auch aktiviert wurde.

Dual-Luciferase®Reporter Assay System von Promega

Um eine direkte Interaktion von mRNA und der microRNA-199a verifizieren zu können, wurde dieser Assay ausgewählt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Mammakarzinom der Frau ist eine heterogene Erkrankung, die sich durch eine hohe Zellplastizität auszeichnet, welche durch verschiedene Faktoren hervorgerufen wird (Turashvili & Brogi, 2017). Wegen der hohen Inzidenz und Mortalitätsrate, insbesondere im metastasierten Stadium (Robert Koch-Institut, 2019), ist eine frühzeitige Diagnose- und die Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen für die Prognosestellung wichtig. Dafür ist es notwendig mögliche prognostische Biomarker und Regelmechanismen aufzudecken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Transkriptionsfaktors *Twist1* auf den Tumorsuppressor *BRCA1* während der EMT auf Zellebene zu überprüfen.

In diesem Zusammenhang wurden die zwei microRNAs hsa-miR-199a-5p und hsa-miR-214 näher untersucht, da, wie sich in Voruntersuchungen herausstellte, diese beiden microRNAs besonders in invasiven Mammakarzinomen (NST) im Vergleich zu duktalem Mammakarzinomen in situ (DCIS) stark überexprimiert waren.

In den hier durchgeführten Untersuchungen mit MCF-7 und HMT-3522-S1, stabil mit den beiden microRNAs transfizierten Zellen, zeigte sich sowohl in der qPCR als auch in der Westernblot-Analyse eine verminderte Expression von *BRCA1* nach zweiwöchiger Kultur. Dies könnte auf eine onkogene Wirkung dieser beiden microRNAs durch *Knockdown* von *BRCA1* deuten.

Weiters konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass in HMLE-Twist1-ER-Zellen eine transiente *Twist1*-Aktivierung über 72 Stunden zur Überexpression dieser microRNAs um das 2- bis 4-fache führte. Daraus resultierte eine verminderte relative mRNA-Expression von *BRCA1* von bis zu 50 %. Das Ergebnis konnte per Westernblot auch auf Proteinebene bestätigt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Twist1 den miR199/214 Cluster steuert und es folglich über diese zur Induktion einer EMT kommen könnte.

Zusätzlich konnte mittels Luciferase-Assay gezeigt werden, dass die microRNA hsa-miR-199a-5p ein direktes Target von *BRCA1* ist. Somit kommt es über die *Twist1*-Induktion über diese microRNA zum direkten *Knockdown* von *BRCA1*.

Die Inhibition des dargestellten Regelmechanismus könnte eine mögliche zukünftige Therapieoption darstellen, welche die Rate metastasierter Mammakarzinome reduzieren könnte.

Literaturverzeichnis

- ACOG Committee on Practice Bulletins. (2009). Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Gynecologic Oncology*, 113(1), 6-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.02.017>
- AGO. (2019). *Kommission "Mamma" der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e. V. (AGO) in der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. sowie in der deutschen Krebsgesellschaft e. V., Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome, Version 2019.1D, W. Zuckerschwerdt Verlag GmbH, München (abgerufen am: 24.06.2019)*. Retrieved from München: https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2019-03/DE/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2019.pdf
- Ahmadi, A., Khansarinejad, B., Hosseinkhani, S., Ghanei, M., & Mowla, S. J. (2017). miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer. *Gene*, 620, 15-22. doi:10.1016/j.gene.2017.03.032
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355. doi:10.1038/nature02871
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Orntoft, T. F. (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 Res*, 64(15), 5245-5250. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0496
- Ansieau, S. (2013). EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer Lett*, 338(1), 63-68. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.014
- Apostolou, P., & Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international*, 2013, 747318. doi:<https://doi.org/10.1155/2013/747318>
- Arizti, P., Fang, L., Park, I., Yin, Y., Solomon, E., Ouchi, T., . . . Lee, S. W. (2000). Tumor Suppressor p53 Is Required To Modulate BRCA1 Expression. *Mol Cell Biol*, 20(20), 7450-7459.
- Bai, F., Chan, H. L., Scott, A., Smith, M. D., Fan, C., Herschkowitz, J. I., . . . Pei, X. H. (2014). BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development. *Cancer Res*, 74(21), 6161-6172. doi:10.1158/0008-5472.can-14-1119
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*, 136(2), 215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Bartsch, H. S. (2016). *Validierung und funktionelle Analyse von Micro-RNA und deren Zielgene am duktalem Mammakarzinom*: Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Baumgarten, A., Bang, C., Tschirner, A., Engelmann, A., Adams, V., von Haehling, S., . . . Springer, J. (2013). TWIST1 regulates the activity of ubiquitin proteasome system

- via the miR-199/214 cluster in human end-stage dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 168(2), 1447-1452. doi:10.1016/j.ijcard.2012.12.094
- Beck, B., Lapouge, G., Rorive, S., Drogat, B., Desaedelaere, K., Delafaille, S., . . . Blanpain, C. (2015). Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. *Cell Stem Cell*, 16(1), 67-79. doi:10.1016/j.stem.2014.12.002
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., & Leslie, C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biology*, 11(8), R90-R90. doi:10.1186/gb-2010-11-8-r90
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S., & Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D149-D153. doi:10.1093/nar/gkm995
- Böcker, W., & Decker, T. (2008a). Pathologie des invasiven Mammakarzinoms. *Der Onkologe*, 14(5), 443. doi:10.1007/s00761-008-1352-y
- Böcker, W., & Decker, T. (2008b). The pathology of invasive breast carcinoma. *Der Onkologe*, 14(5), 443-453. doi:10.1007/s00761-008-1352-y
- Bombonati, A., & Sgroi, D. C. (2011). The Molecular Pathology of Breast Cancer Progression. *The Journal of pathology*, 223(2), 307-317. doi:10.1002/path.2808
- Boulton, S. J. (2006). Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 633-645. doi:10.1042/bst0340633
- Boxberger, H. J. (2013). *Leitfaden für die zell-und Gewebekultur: einföhrung in Grundlagen und techniken*: John Wiley & Sons.
- Briand, P., Petersen, O. W., & Van Deurs, B. (1987). A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23(3), 181-188.
- Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 175-205. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Helleman, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C. J., & Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*, 71(1), 245-254. doi:10.1158/0008-5472.can-10-2330
- Cathrin Zeeck, D. H. (22. Januar 2013). Western Blot Eine Einföhrung zu den Prinzipien mit hilfreichen Tipps. *Abcam*. Retrieved from <https://docs.abcam.com/pdf/events/German-WB-Webinar-15-Jan.pdf>
- Chan, S.-H., & Wang, L.-H. (2015). Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *Journal of Biomedical Science*, 22(1), 9. doi:10.1186/s12929-015-0113-7
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast disease*, 32(1-2), 35-48. doi:10.3233/BD-2010-0307

- Chen, J., Shin, V. Y., Siu, M. T., Ho, J. C., Cheuk, I., & Kwong, A. (2016). miR-199a-5p confers tumor-suppressive role in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 16(1), 887. doi:10.1186/s12885-016-2916-7
- Choi, Y., Lee, H. J., Jang, M. H., Gwak, J. M., Lee, K. S., Kim, E. J., . . . Park, S. Y. (2013). Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Human Pathology*, 44(11), 2581-2589. doi:<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.07.003>
- Clark, S. L., Rodriguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D., & Boehning, D. (2012). Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*, 1(1). doi:10.5936/csbj.201204005
- Clark, S. L., Rodriguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D. V., & Boehning, D. (2012). Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 1, e201204005. doi:10.5936/csbj.201204005
- Cowell, C. F., Weigelt, B., Sakr, R. A., Ng, C. K. Y., Hicks, J., King, T. A., & Reis-Filho, J. S. (2013). Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. *Molecular Oncology*, 7(5), 859-869. doi:10.1016/j.molonc.2013.07.005
- Cummings, M. C., Simpson, P. T., Reid, L. E., Jayanthan, J., Skerman, J., Song, S., . . . Lakhani, S. R. (2014). Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies. *J Pathol*, 232(1), 23-31. doi:10.1002/path.4288
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131-3141. doi:10.7150/jca.18457
- Degenhardt, T., Harbeck, N., & Würtle, R. (2015). Individuelle Tumorthherapie beim Mammakarzinom—Möglichkeiten der Vermeidung von Über- und Untertherapie unter besonderer Berücksichtigung zielgerichteter Therapien. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*, 47(02), 57-65.
- Deng, C.-X. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic acids research*, 34(5), 1416-1426. doi:10.1093/nar/gkl010
- Deng, C. X., & Brodie, S. G. (2000). Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays*, 22(8), 728-737. doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<728::aid-bies6>3.0.co;2-b
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, & AWMF. Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020 AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 23.05.20).
- Domchek, S. M., & Rebbeck, T. R. (2007). Prophylactic oophorectomy in women at increased cancer risk. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 19(1), 27-30. doi:10.1097/GCO.0b013e32801195da
- Drasin, D. J., Robin, T. P., & Ford, H. L. (2011). Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res*, 13(6), 226. doi:10.1186/bcr3037

- Eisen, A., Lubinski, J., Klijn, J., Moller, P., Lynch, H. T., Offit, K., . . . Narod, S. A. (2005). Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol*, 23(30), 7491-7496. doi:10.1200/jco.2004.00.7138
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*, 29(10), 569-574. doi:10.1016/j.tig.2013.05.010
- El Khachibi, M., Diakite, B., Hamzi, K., Badou, A., Senhaji, M. A., Bakhchane, A., . . . Nadifi, S. (2015). Screening of exon 11 of BRCA1 gene using the high resolution melting approach for diagnosis in Moroccan breast cancer patients. *BMC Cancer*, 15, 81-81. doi:10.1186/s12885-015-1040-4
- Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M. D., Zimonjic, D. B., Donaher, J. L., . . . Weinberg, R. A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, 15(1), 50-65.
- Engel, C., Zachariae, S., & Fischer, C. (2015). Familiärer Brustkrebs – empirische Erkrankungsrisiken und Risikoberechnungsmodelle. *medizinische genetik*, 27(2), 217-222. doi:10.1007/s11825-015-0043-5
- Engel, L. W., & Young, N. A. (1978). Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Research*, 38(11 Part 2), 4327-4339.
- Esteller, M., Silva, J. M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., . . . Herman, J. G. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92(7), 564-569.
- Ettl, J. (2015). Genexpressionstests zur Prognose und Prädiktion. *Der Gynäkologe*, 48(12), 871-875. doi:10.1007/s00129-015-3804-y
- Fang, Z., & Rajewsky, N. (2011). The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One*, 6(3), e18067. doi:10.1371/journal.pone.0018067
- Fehm, T., Schultz, S., Bartsch, H., Petat-Dutter, K., Kahlert, S., Sotlar, K., . . . Neubauer, H. (2016). Abstract P4-09-09: Verification of the breast cancer progression-associated miRNA hsa-miR-199a-5p using NanoString® platform. *Cancer Research*, 76(4 Supplement), P4-09-09-P04-09-09. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs15-p4-09-09
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210
- Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 9(10), 775-789. doi:10.1038/nrd3179
- Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., . . . Dimitrov, K. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*, 26(3), 317-325. doi:10.1038/nbt1385
- Gordanpour, A., Nam, R. K., Sugar, L., Bacopulos, S., & Seth, A. (2012). MicroRNA detection in prostate tumors by quantitative real-time PCR (qPCR). *Journal of visualized experiments : JoVE*(63), e3874-e3874. doi:10.3791/3874

- Gorski, J. J., Kennedy, R. D., Hosey, A. M., & Harkin, D. P. (2009). The complex relationship between BRCA1 and ER α in hereditary breast cancer. *Clin Cancer Res*, 15(5), 1514-1518. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-08-0640
- Gort, E. H., Suijkerbuijk, K. P., Roothaan, S. M., Raman, V., Vooijs, M., van der Wall, E., & van Diest, P. J. (2008). Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(12), 3325-3330. doi:10.1158/1055-9965.epi-08-0472
- Greer, L. F., 3rd, & Szalay, A. A. (2002). Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*, 17(1), 43-74. doi:10.1002/bio.676
- Grey, F., Tirabassi, R., Meyers, H., Wu, G., McWeeney, S., Hook, L., & Nelson, J. A. (2010). A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. *PLoS Pathog*, 6(6), e1000967. doi:10.1371/journal.ppat.1000967
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), D140-D144. doi:10.1093/nar/gkj112
- Gstraunthaler, G., & Lindl, T. (2013a). Subkultivierung/ Passagieren. In G. Gstraunthaler & T. Lindl (Eds.), *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen* (pp. 113-119). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Gstraunthaler, G., & Lindl, T. (2013b). Zell-und Gewebekultur. In: Springer.
- Guo, W., Qiu, Z., Wang, Z., Wang, Q., Tan, N., Chen, T., . . . He, X. (2015). MiR-199a-5p is negatively associated with malignancies and regulates glycolysis and lactate production by targeting hexokinase 2 in liver cancer. *Hepatology*, 62(4), 1132-1144. doi:10.1002/hep.27929
- Guttilla, I. K., Adams, B. D., & White, B. A. (2012). ER α , microRNAs, and the epithelial $\rightarrow$ mesenchymal transition in breast cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(2), 73-82. doi:10.1016/j.tem.2011.12.001
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., & King, M.-C. (1990). Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689. doi:10.2307/2878541
- Hamam, R., Hamam, D., Alsaleh, K. A., Kassem, M., Zaher, W., Alfayez, M., . . . Alajezi, N. M. (2017). Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis*, 8(9), e3045. doi:10.1038/cddis.2017.440
- Harbeck, N. (2013). Mammakarzinom: Tumorbiologie-basierte Konzepte für operative und medikamentöse Therapie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 138(5), 180-182. doi:10.1055/s-0032-1327410
- Helleman, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, 8(2), R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19

- Hiddemann W., & Bartram C.R. . (2010). *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie-Pathogenese-Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren-Lymphome-Leukämien*. Berlin: Springer-Verlag.
- Ho, J. C., Shin, V. Y., Chen, J., Siu, M. T., Cheuk, I., & Kwong, A. (2018). Abstract A046: miR-199a-3p induces BRCA1 dysfunction in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(1 Supplement), A046-A046. doi:10.1158/1535-7163.targ-17-a046
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(4), 215-215. doi:10.1186/bcr2889
- Holzapfel, B., & Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2), 120-126. doi:10.1002/biuz.200610332
- Huang, W. (2017). MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Methods Mol Biol*, 1617, 57-67. doi:10.1007/978-1-4939-7046-9_4
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., . . . Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65(16), 7065-7070. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-1783
- James, P. A., Culling, B., Mullan, G., Jenkins, M., Elakis, G., Turner, A. M., . . . Roscioli, T. (2009). Breast cancer risk is not increased in individuals with TWIST1 mutation confirmed Saethre-Chotzen syndrome: an Australian multicenter study. *Genes Chromosomes Cancer*, 48(7), 533-538. doi:10.1002/gcc.20661
- Jhanwar-Uniyal, M. (2003). BRCA1 in cancer, cell cycle and genomic stability. *Front Biosci*, 8, s1107-1117.
- Jung, H. Y., & Yang, J. (2015). Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness. *Cell Stem Cell*, 16(1), 1-2. doi:10.1016/j.stem.2014.12.005
- Kalluri, R. (2009). EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1417-1419. doi:10.1172/JCI39675
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kamangar, F., Dores, G. M., & Anderson, W. F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*, 24(14), 2137-2150. doi:10.1200/jco.2005.05.2308
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny = Menopause Review*, 14(3), 196-202. doi:10.5114/pm.2015.54346
- Kang, K., Peng, X., Luo, J., & Gou, D. (2012). Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *Journal of animal science and biotechnology*, 3(1), 4.
- Kang, Y., & Massague, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *cell*, 118(3), 277-279. doi:10.1016/j.cell.2004.07.011

- Keßler, J., Rot, S., Bache, M., Kappler, M., Würfl, P., Vordermark, D., . . . Greither, T. (2016). miR-199a-5p regulates HIF-1 α and OSGIN2 and its expression is correlated to soft-tissue sarcoma patients' outcome. *Oncology Letters*, 12(6), 5281-5288. doi:10.3892/ol.2016.5320
- Kim, D. H., Xing, T., Yang, Z., Dudek, R., Lu, Q., & Chen, Y.-H. (2017). Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *Journal of Clinical Medicine*, 7(1), 1. doi:10.3390/jcm7010001
- Klöppel, G., Kreipe, H. H., Remmele, W., & Dietel, M. (2013). *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*: Springer-Verlag.
- Knudsen, E. S., Ertel, A., Davicioni, E., Kline, J., Schwartz, G. F., & Witkiewicz, A. K. (2012). Progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer is associated with gene expression programs of EMT and myoepithelia. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(3), 1009-1024. doi:10.1007/s10549-011-1894-3
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4), 820-823.
- Kreienberg, R., Moebus, V., Jonat, W., & Kühn, T. (2011). *Mammakarzinom: Interdisziplinär*: Springer-Verlag.
- Kress, W., Schropp, C., Lieb, G., Petersen, B., Busse-Ratzka, M., Kunz, J., . . . Collmann, H. (2006). Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet*, 14(1), 39-48. doi:10.1038/sj.ejhg.5201507
- Kuninty, P. R., Bojmar, L., Tjomsland, V., Larsson, M., Storm, G., Ostman, A., . . . Prakash, J. (2016). MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. *Oncotarget*, 7(13), 16396-16408. doi:10.18632/oncotarget.7651
- Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*, 83(3), 249-289. doi:10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S., Tan, P. H., & van de Vijver, M. (2012). *WHO classification of tumours of the breast* (Vol. 4). Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196. doi:10.1038/nrm3758
- Lee, I., Ajay, S. S., Yook, J. I., Kim, H. S., Hong, S. H., Kim, N. H., . . . Athey, B. D. (2009). New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res*, 19(7), 1175-1183. doi:10.1101/gr.089367.108
- Lee, M. S., LeMaistre, A., Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Freireich, E. J., Trujillo, J. M., & Stass, S. A. (1989). Detection of two alternative bcr/abl mRNA junctions and

- minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. *Blood*, 73(8), 2165-2170.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), 843-854.
- Lee, Y. B., Bantounas, I., Lee, D. Y., Phylactou, L., Caldwell, M. A., & Uney, J. B. (2009). Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res*, 37(1), 123-128. doi:10.1093/nar/gkn920
- Lewis, B. P., Shih, I. h., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *cell*, 115(7), 787-798. doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(6), 321-333. doi:10.1038/nrc3932
- Liu, X., & Fan, D. (2015). The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Curr Pharm Des*, 21(10), 1279-1291.
- Liu, Y., Cai, Q., Bao, P.-P., Su, Y., Cai, H., Wu, J., . . . Shu, X.-O. (2015). Tumor tissue microRNA expression in association with triple-negative breast cancer outcomes. *Breast Cancer Research and Treatment*, 152(1), 183-191. doi:10.1007/s10549-015-3460-x
- López-Soto, A., Gonzalez, S., Smyth, M. J., & Galluzzi, L. (2017). Control of metastasis by NK cells. *Cancer Cell*, 32(2), 135-154.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(9), 1463-1467. doi:10.1043/1543-2165-133.9.1463
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., . . . Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *cell*, 133(4), 704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- Mathew, A., Rajagopal, P. S., Villgran, V., Sandhu, G. S., Jankowitz, R. C., Jacob, M., . . . Brufsky, A. (2017). Distinct pattern of metastases in patients with invasive lobular carcinoma of the breast. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 77(06), 660-666.
- Mees, S., Schwarze, J., Starke, M., Senninger, N., & Stölting, M. (2015). Inhibition von miR-200c im Pankreaskarzinom führt zu veränderter Proteinexpression und Zellfunktion. *Z Gastroenterol*, 53(08), KC126. doi:10.1055/s-0035-1559516
- Meindl, A., Ditsch, N., Kast, K., Rhiem, K., & Schmutzler, R. (2011). Hereditary breast and ovarian cancer—new genes, new treatments, new concepts. . *Dtsch Arztebl Int*, 108(19), 323-330. doi:DOI: 10.3238/arztebl.2011.0323

- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., . . . Skolnick, M. H. (1994). A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71. doi:10.2307/2884716
- Mironchik, Y., Winnard, P. T., Jr., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A. P., . . . Raman, V. (2005). Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res*, 65(23), 10801-10809. doi:10.1158/0008-5472.can-05-0712
- Mishra, P. J., & Merlino, G. (2009). MicroRNA reexpression as differentiation therapy in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(8), 2119-2123. doi:10.1172/JCI40107
- Moazzeni, H., Najafi, A., & Khani, M. (2017). Identification of direct target genes of miR-7, miR-9, miR-96, and miR-182 in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Cell Probes*, 34, 45-52. doi:10.1016/j.mcp.2017.05.005
- Montserrat, N., Gallardo, A., Escuin, D., Catusus, L., Prat, J., Gutiérrez-Avignó, F. J., . . . Lerma, E. (2011). Repression of E-cadherin by SNAIL, ZEB1, and TWIST in invasive ductal carcinomas of the breast: a cooperative effort? *Human Pathology*, 42(1), 103-110. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.05.019>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335-350.
- Nassar, F. J., Nasr, R., & Talhouk, R. (2017). MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. *Pharmacology & Therapeutics*, 172, 34-49. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.012>
- Orso, F., Quirico, L., Virga, F., Penna, E., Dettori, D., Cimino, D., . . . Taverna, D. (2016). miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer. *Cancer Research*, 76(17), 5151-5162. doi:10.1158/0008-5472.can-15-1322
- Pal, M., & Pal, P. (2013). BRCA1 and miRNAs: an emerging therapeutic target and intervention tool in breast cancer. *diabetes*, 22, 23.
- Pang, J.-M. B., Deb, S., Takano, E. A., Byrne, D. J., Jene, N., Boulghourjian, A., . . . Fox, S. B. (2014). Methylation profiling of ductal carcinoma in situ and its relationship to histopathological features. *Breast Cancer Research : BCR*, 16, 423. doi:10.1186/s13058-014-0423-9
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7(6), 415-428. doi:10.1038/nrc2131
- Pfaffl, M. W. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1(10), 92-95.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36. doi:10.1093/nar/30.9.e36

- Piasecka, D., Braun, M., Kordek, R., Sadej, R., & Romanska, H. (2018). MicroRNAs in regulation of triple-negative breast cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol*. doi:10.1007/s00432-018-2689-2
- Pinder, S. E. (2010). Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation. *Modern Pathology*, 23, S8-S13.
- Qiagen. (2012). RNeasy® Mini Handbook, RNeasy Mini Kit - For purification of total RNA from animal cells, animal tissues, bacteria, and yeast, and for RNA cleanup; RNeasy Protect Mini Kit - For immediate stabilization of RNA in harvested animal tissues and subsequent total RNA purification; RNeasy Plant Mini Kit - For purification of total RNA from plants and filamentous fungi In *Sample & Assay Technologies* (4 ed., pp. 1 - 80).
- Rhiem, K., & Schmutzler, R. K. (2015). Risikofaktoren und Prävention des Mammakarzinoms. *Der Onkologe*, 21(3), 202-210. doi:10.1007/s00761-014-2837-5
- Riede, U.-N., & Werner, M. (2017). *Allgemeine und spezielle Pathologie*: Springer-Verlag.
- Rizki, A., Weaver, V. M., Lee, S.-Y., Rozenberg, G. I., Chin, K., Myers, C. A., . . . Bissell, M. J. (2008). A Human Breast Cell Model of Preinvasive to Invasive Transition. *Cancer Research*, 68(5), 1378-1387. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2225
- Robert Koch-Institut. (2019). Krebs in Deutschland für 2015/2016. In (Vol. 12. Ausgabe). Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). doi:10.25646/5977
- Roche, J. (2018). The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel)*, 10(2), 52. doi:10.3390/cancers10020052
- Sahlin, P., Windh, P., Lauritzen, C., Emanuelsson, M., Gronberg, H., & Stenman, G. (2007). Women with Saethre-Chotzen syndrome are at increased risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 46(7), 656-660. doi:10.1002/gcc.20449
- Schaefer, A., Jung, M., Miller, K., Lein, M., Kristiansen, G., Erbersdobler, A., & Jung, K. (2010). Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 42(11), 749-758. doi:10.3858/emm.2010.42.11.076
- Scheel, C., Eaton, E. N., Li, S. H., Chaffer, C. L., Reinhardt, F., Kah, K. J., . . . Weinberg, R. A. (2011). Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *cell*, 145(6), 926-940. doi:10.1016/j.cell.2011.04.029
- Scheel, C., & Weinberg, R. A. (2012). Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology*, 22(5), 396-403.
- Schlehe, B., & Schmutzler, R. (2008). Hereditäres Mammakarzinom. *Der Chirurg*, 79(11), 1047. doi:10.1007/s00104-008-1556-0
- Schmidt, Johanna M., Panzilius, E., Bartsch, Harald S., Irmeler, M., Beckers, J., Kari, V., . . . Scheel, Christina H. (2015). Stem-Cell-like Properties and Epithelial Plasticity

- Arise as Stable Traits after Transient Twist1 Activation. *Cell Reports*, 10(2), 131-139. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.032
- Schrödel, A. (2010). Western-Blot Teil 1: Die Blotting-Technik. *Biologie in unserer Zeit*, 40(2), 78-78. doi:doi:10.1002/biuz.201090031
- Schultz, S., Bartsch, H., Petat-Dutter, K., Bonin, M., Seeger, H., Kahlert, S., . . . Sotlar, K. (2013). Hsa-miR-199a-5 p is functionally relevant in progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast tumours. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 10(02), A138. doi:10.1055/s-0033-1347673
- Schultz, S., Bartsch, H., Sotlar, K., Paetat-Dutter, K., Bonin, M., Poths, S., . . . Neubauer, H. (2011). Differentielle Expression von mRNAs und miRNAs während der Progression des Mammakarzinoms. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 8(02), A182. doi:10.1055/s-0031-1278185
- Schultz, S., Bartsch, H., Sotlar, K., Petat-Dutter, K., Bonin, M., Poths, S., . . . Neubauer, H. (2011). Differentielle Expression von mRNAs und miRNAs während der Progression des Mammakarzinoms. In *Geburtshilfe Frauenheilkunde* (pp. 71 - M_71).
- Schultz, S., Winter, K., Sotlar, K., Petat-Dutter, K., Bonin, M., Poths, S., . . . H., N. (2010). Differentielle Expression von miRNA und deren Kandidatengene beim Übergang von DCIS zum IDC beim Mammakarzinom. In *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* (pp. 7 - A157): Georg Thieme Verlag KG.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., . . . Livingston, D. M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *cell*, 88(2), 265-275. doi:10.1016/s0092-8674(00)81847-4
- Shamir, E. R., Pappalardo, E., Jorgens, D. M., Coutinho, K., Tsai, W. T., Aziz, K., . . . Ewald, A. J. (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *J Cell Biol*, 204(5), 839-856. doi:10.1083/jcb.201306088
- Shi, J., Wang, Y., Zeng, L., Wu, Y., Deng, J., Zhang, Q., . . . Zhou, B. P. (2014). Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell*, 25(2), 210-225. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.028
- Shin, V. Y., Siu, J. M., Cheuk, I., Ng, E. K. O., & Kwong, A. (2015). Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, 112(11), 1751-1759. doi:10.1038/bjc.2015.143
- Silver, D. P., & Livingston, D. M. (2012). Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer Discov*, 2(8), 679-684. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0221
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29, 4741-4751. doi:10.1038/onc.2010.215
- Singh, M., Yelle, N., Venugopal, C., & Singh, S. K. (2017). EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.009>

- Sinn, H.-P., & Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care*, 8(2), 149-154. doi:10.1159/000350774
- Skloot, R. (2010). *Die Unsterblichkeit der Henrietta Lacks*: Irisiana.
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2011). *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons.
- Soini, Y., Tuhkanen, H., Sironen, R., Virtanen, I., Kataja, V., Auvinen, P., . . . Kosma, V. M. (2011). Transcription factors zeb1, twist and snai1 in breast carcinoma. *BMC Cancer*, 11, 73. doi:10.1186/1471-2407-11-73
- Sommers, C. L., Byers, S. W., Thompson, E. W., Torri, J. A., & Gelmann, E. P. (1994). Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 31(2-3), 325-335.
- Son, H., & Moon, A. (2010). Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion. *Toxicological research*, 26(4), 245-252. doi:10.5487/TR.2010.26.4.245
- Soule, H., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416.
- Sun, D., Han, S., Liu, C., Zhou, R., Sun, W., Zhang, Z., & Qu, J. (2016). MicroRNA-199a-5p Functions as a Tumor Suppressor via Suppressing Connective Tissue Growth Factor (CTGF) in Follicular Thyroid Carcinoma. *Med Sci Monit*, 22, 1210-1217.
- Takahashi, M., Suzuki, M., Fukuoka, M., Fujikake, N., Watanabe, S., Murata, M., . . . Hohjoh, H. (2015). Normalization of Overexpressed α -Synuclein Causing Parkinson's Disease By a Moderate Gene Silencing With RNA Interference. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4, e241.
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., . . . Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(35), 15449-15454. doi:10.1073/pnas.1004900107
- Tavassoli, F. A., & Devilee, P. (2003). World Health Organization Classification of Tumours. . In *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., . . . Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75(2-3), 291-295.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454. doi:10.1038/nrc822
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *cell*, 139(5), 871-890. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>

- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(2), 131-142. doi:10.1038/nrm1835
- Thisse, B., El Messal, M., & Perrin-Schmitt, F. (1987). The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygote gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic acids research*, 15(8), 3439-3453.
- Tomaskovic-Crook, E., Thompson, E. W., & Thiery, J. P. (2009). Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11(6), 213. doi:10.1186/bcr2416
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., . . . Orlando, C. (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*, 309(2), 293-300.
- Tsai, H. P., Huang, S. F., Li, C. F., Chien, H. T., & Chen, S. C. (2018). Differential microRNA expression in breast cancer with different onset age. *PLoS One*, 13(1), e0191195. doi:10.1371/journal.pone.0191195
- Tsai, J. H., Donaher, J. L., Murphy, D. A., Chau, S., & Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, 22(6), 725-736. doi:10.1016/j.ccr.2012.09.022
- Tsai, J. H., & Yang, J. (2013). Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev*, 27(20), 2192-2206. doi:10.1101/gad.225334.113
- Turashvili, G., & Brogi, E. (2017). Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Frontiers in medicine*, 4, 227-227. doi:10.3389/fmed.2017.00227
- Ugozzoli, L. A., Latorra, D., Pucket, R., Arar, K., & Hamby, K. (2004). Real-time genotyping with oligonucleotide probes containing locked nucleic acids. *Analytical Biochemistry*, 324(1), 143-152. doi:10.1016/j.ab.2003.09.003
- Van Rij, R. P. (2011). Antiviral RNAi: concepts, methods, and applications. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 721, pp. 267-292): Springer.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vidi, P.-A., J Bissell, M., & A Lelièvre, S. (2013). *Three-Dimensional Culture of Human Breast Epithelial Cells: The How and the Why* (Vol. 945).
- Vissac, C., Peffault De Latour, M., Communal, Y., Bignon, Y. J., & Bernard-Gallon, D. J. (2002). Expression of BRCA1 and BRCA2 in different tumor cell lines with various growth status. *Clin Chim Acta*, 320(1-2), 101-110.
- Wang, Y., Liu, J., Ying, X., Lin, P. C., & Zhou, B. P. (2016). Twist-mediated Epithelial-mesenchymal Transition Promotes Breast Tumor Cell Invasion via Inhibition of Hippo Pathway. *Scientific Reports*, 6, 24606. doi:10.1038/srep24606

- Wang, Y., & Zhou, B. P. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*, 30(9), 603-611. doi:10.5732/cjc.011.10226
- Wellings, S. R. (1980). A Hypothesis of the Origin of Human Breast Cancer from the Terminal Ductal Lobular Unit. *Pathology - Research and Practice*, 166(4), 515-535. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338\(80\)80248-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338(80)80248-2)
- Wellings, S. R., & Jensen, H. M. (1973). On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst*, 50(5), 1111-1118.
- Wellings, S. R., Jensen, H. M., & Marcum, R. G. (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst*, 55(2), 231-273.
- Welsch, U., & Sobotta, J. (2006). Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie. In: mit.
- Wienholds, E., & Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, 579(26), 5911-5922. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.070
- Wilk, G., & Braun, R. (2017). Integrative analysis reveals disrupted pathways regulated by microRNAs in cancer. *Nucleic acids research*, gkx1250-gkx1250. doi:10.1093/nar/gkx1250
- Wu, W., Koike, A., Takeshita, T., & Ohta, T. (2008). The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Division*, 3, 1-1. doi:10.1186/1747-1028-3-1
- Wuerstlein, R., Sotlar, K., Gluz, O., Otremba, B., von Schumann, R., Witzel, I., . . . Harbeck, N. (2016). The West German Study Group Breast Cancer Intrinsic Subtype study: a prospective multicenter decision impact study utilizing the Prosigna assay for adjuvant treatment decision-making in estrogen-receptor-positive, HER2-negative early-stage breast cancer. *Current Medical Research and Opinion*, 32(7), 1217-1224. doi:10.1185/03007995.2016.1166102
- Xu, N., Zhang, J., Shen, C., Luo, Y., Xia, L., Xue, F., & Xia, Q. (2012). Cisplatin-induced downregulation of miR-199a-5p increases drug resistance by activating autophagy in HCC cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(4), 826-831. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.048>
- Xu, Y., Lee, D.-K., Feng, Z., Xu, Y., Bu, W., Li, Y., . . . Xu, J. (2017). Breast tumor cell-specific knockout of *Twist1* inhibits cancer cell plasticity, dissemination, and lung metastasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43), 11494-11499. doi:10.1073/pnas.1618091114
- Xu, Y., Qin, L., Sun, T., Wu, H., He, T., Yang, Z., . . . Xu, J. (2017). Twist1 promotes breast cancer invasion and metastasis by silencing Foxa1 expression. *Oncogene*, 36(8), 1157-1166. doi:10.1038/onc.2016.286
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., . . . Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *cell*, 117(7), 927-939. doi:10.1016/j.cell.2004.06.006

- Yao, T., & Lin, Z. (2012). MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(2), 248-260.
- Ye, X., & Weinberg, R. A. (2015). Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol*, 25(11), 675-686. doi:10.1016/j.tcb.2015.07.012
- Yerushalmi, R., Hayes, M. M., & Gelmon, K. A. (2009). Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Ann Oncol*, 20(11), 1763-1770. doi:10.1093/annonc/mdp245
- Yin, G., Chen, R., Alvero, A. B., Fu, H. H., Holmberg, J., Glackin, C., . . . Mor, G. (2010). TWISTing stemness, inflammation and proliferation of epithelial ovarian cancer cells through MIR199A2/214. *Oncogene*, 29(24), 3545-3553. doi:<http://www.nature.com/onc/journal/v29/n24/supinfo/onc2010111s1.html>
- Zhang, J., & Ma, L. (2012). MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 653-662. doi:10.1007/s10555-012-9368-6
- Zhong, J., Huang, R., Su, Z., Zhang, M., Xu, M., Gong, J., . . . Zhou, Q. (2017). Downregulation of miR-199a-5p promotes prostate adeno-carcinoma progression through loss of its inhibition of HIF-1α. *Oncotarget*, 8(48).
- Zhu, Q. Q., Ma, C., Wang, Q., Song, Y., & Lv, T. (2016). The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol*, 37(1), 185-197. doi:10.1007/s13277-015-4450-7
- Zou, X. Z., Liu, T., Gong, Z. C., Hu, C. P., & Zhang, Z. (2017). MicroRNAs-mediated epithelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases. *Eur J Pharmacol*, 796, 190-206. doi:10.1016/j.ejphar.2016.12.003

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Robert Koch-Institut, 2019)	9
Abb. 2 : Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C50, Deutschland 1999–2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020 (Robert Koch-Institut, 2019)	9
Abb. 3: Molekulare Subtypen und Therapieempfehlung nach Univ.-Prof. Dr. med. Nadia Harbeck (Abb. entnommen aus: (Harbeck, 2013))	12
Abb. 4: Biogenese von miRNAs (Bildquelle: (Garzon, Marcucci, & Croce, 2010))	19
Abb. 5 A und B: Mutationsrate (A) und funktionelle Domänen (B) von BRCA1 (modifizierte Abbildung aus (Serena L. Clark et al., 2012))	23
Abb. 6: Mögliche Interaktion von <i>BRCA1</i>, <i>Twist1</i> und der beiden microRNAs <i>hsa-miR199a-5p</i> und <i>hsa-miR214</i>	25
Abb. 7: Beispiel einer Eichkurve	33
Abb. 8: Mini-PROTEAN® Casting Stand der Firma Bio-Rad	35
Abb. 9: Gelelektrophorese im Mini-PROTEAN Tetra Cell System der Firma Bio-Rad	36
Abb. 10: Schematische Darstellung des psiCHECK™2 Vektors der Firma Promega)	55
Abb. 11: Effizienztestung des Primerpaares von <i>BRCA1</i> mit dem LightCycler®480 II (Firma Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) Screenshot	57
Abb. 12: <i>BRCA1</i> Primerspezifität	57
Abb. 13: Relative mRNA-Expression von <i>BRCA1</i> der <i>Twist1</i> induzierbaren HMLE-Twist1-ER Zelllinie im zeitlichen Verlauf einer 24-, 48-, und 72-stündigen Tamoxifenbehandlung	58
Abb. 14: Relative mRNA-Expression von <i>BRCA1</i> in HMLE-Twist-ER-Zellen	59
Abb. 15: Nachweis der BRCA1-Proteinexpression in HMLE-Twist1-ER Zellen mittels Western Blot	60
Abb. 16: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung aus Abb. 15) der HMLE-Twist1-ER Zellen	60
Abb. 17: Relative miRNA-Expression in HMLE-Twist1-ER Zellen	61
Abb. 18: Wnt-5a Expression in den HMLE-Twist1-ER Zellen (vor und nach Stimulation mit Tamoxifen)	62
Abb. 19: Überprüfung der lentiviralen Transduktion von MCF-7 mit pre-miRNA (<i>mir-199a</i>), fluoreszierende Zellen im linken Bild, Zellen im Phasenkontrast im rechten Bild	63
Abb. 20 A und B: Transduktionskontrolle in der Zelllinie MCF-7	64
Abb. 21: Relative mRNA-Expression von <i>BRCA1</i> in stabil transduzierten MCF-7 Zellen	65
Abb. 22: Nachweis der BRCA1 Proteinexpression in transduzierten MCF-7 Zellen mittels Western Blot	66
Abb. 23: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung von Abb. 22) der stabil transduzierten MCF-7 Zellen nach 2-wöchiger Kultur	66
Abb. 24: Nachweis der BRCA1 Proteinexpression in stabil transduzierten MCF-7 Zellen (biologisches Replikat) mittels Western Blot	67
Abb. 25: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung) der stabil transduzierten MCF-7 Zellen (biologisches Replikat) aus Abb. 24	67

Abb. 26: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung) in stabil transduzierten MCF-7 Zellen (2 Replikate)	68
Abb. 27: Transduktionskontrolle in der HMT-3522-S1 Zelllinie	69
Abb. 28: Relative mRNA Expression von <i>BRCA1</i> in der überexprimierenden Zelllinie HMT-3522-S1 (nach 2-wöchiger Kultur)	70
Abb. 29: Nachweis der BRCA1 Proteinexpression in stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen mittels Western Blot	71
Abb. 30: Proteinexpression von BRCA1 (densitometrische Auswertung) der stabil transduzierten HMT-3522-S1 Zellen (2-wöchige Kultur) aus Abb. 29)	71
Abb. 31: Sequenz von hsa-miR-199a	72
Abb. 32: Zwei Bindungsstellen für hsa-miR-199a-5p	73
Abb. 33: Einfluss von miR-199a-5p auf <i>BRCA1</i> in der 3'UTR-Region	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO Klassifikation modifizierter Auszug aus (Lakhani et al., 2012)	11
Tabelle 2: Vektoren, welche von Firma abmGood bezogen wurden	31
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Puffer, welche für den Western Blot verwendet wurden	38
Tabelle 4: Firmenliste der Materialien und Reagenzien die für den Western Blot bezogen wurden	40
Tabelle 5: Komponenten für Reaktionsansatz für die qPCR	44
Tabelle 6: Ablauf der qPCR	44
Tabelle 7: Primerdesign der Referenzgene und dem Zielgen mit zugehörigen UPL-Sonden.	46
Tabelle 8: Reaktionsansatz mit SYBR Green zur Validierung der miRNAs	49
Tabelle 9: miScript Primer Assays der Firma Qiagen	49
Tabelle 10: Programmverlauf der qPCR mittels SYBR Green	50
Tabelle 11: Primer für Wnt5a-Expression	50
Tabelle 12: Verwendete Primer für die Amplifikation der jeweiligen Inserts	52
Tabelle 13: Oligonukleotide – Teilsequenz der 3'UTR-Region von <i>BRCA1</i>	54
Tabelle 14: Optimale Primerkonzentration mit bester Effizienz	56

Danksagung

Herrn Prim. Univ.-Prof. Dr. Karl Sotlar danke ich herzlichst für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, für die Korrektur meiner Dissertation und dass ich in seinem Laborteam so herzlich aufgenommen wurde.

Dem Herrn Dr. med. Harald Sebastian Bartsch danke ich für die Betreuung und besonders für die Begeisterung, mit der er meine Arbeit vorantrieb und mich dabei tatkräftig unterstützte.

Frau Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter danke ich vor allem für die großartige Hilfe im Labor, die vielen Ratschläge und die Geduld, die sie mir entgegen brachte.

Frau Simone Wehner und Herrn Daniel Hofmann danke ich ebenso für die praktische Hilfe und Einarbeitung im Labor.

Bedanken möchte ich mich grundsätzlich beim ganzen Laborteam und dem Institut, dass sie mir einen Einblick in die Forschungsarbeit gewährten und mich hierbei tatkräftig unterstützten. Ich zolle höchsten Respekt an alle Wissenschaftler, die sich mit der Erforschung von Krankheiten befassen, um hieraus mögliche Therapiemaßnahmen zu entwickeln. Es bedarf höchster Genauigkeit, Geduld und Optimismus. Somit ist meine Arbeit "nur ein Tropfen auf den heißen Stein" und wie Frau Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter so schön sagte: "Ein kleines Rädchen in einer riesigen Maschinerie". So betrachtet ist ein gut funktionierendes Team äußerst wichtig um erfolgreich zu sein und an seinen Zielen festzuhalten. Daher machte es mir auch riesengroßen Spaß in diesem Team zu arbeiten und entwickelte größtes Interesse in der Forschungsarbeit und so übernahm ich auch gerne andere Laboraufgaben, welche nicht im Zusammenhang der Doktorarbeit standen.

Großer Dank ergeht an meine Eltern für die überaus große emotionale Unterstützung. Außerordentlich möchte ich mich bei meinem Freund bedanken, denn durch seine Geduld und Fürsorglichkeit konnte ich mich immerwährend auf das Studium und Verfassung dieser Dissertation konzentrieren.

Eidesstattliche Versicherung



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Kreil, Irmgard

Name, Vorname

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

**Interaktion von Twist1 und BRCA1 während der
epithelial-mesenchymalen Transition und Progression des
Mammakarzinoms unter Berücksichtigung spezifischer microRNAs**

selbständig verfasst, 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.

Weng, 09.02.2026

Ort, Datum

Irmgard Kreil

Unterschrift Irmgard Kreil

Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Kreil, Irmgard

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Interaktion von Twist1 und BRCA1 während der
epithelial-mesenchymalen Transition und Progression des
Mammakarzinoms unter Berücksichtigung spezifischer microRNAs**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Weng, 09.02.2026

Ort, Datum

Irmgard Kreil

Unterschrift Irmgard Kreil