

# **Eine molekulare und zellbiologische Untersuchung potentieller Brustkrebskandidaten durch 3D-Kulturen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

**Nicole Hallung**

aus Berlin

2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2009 bis November 2014 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin unter der Leitung von Herrn PD Dr. Bodo Lange in der Abteilung von Prof. Dr. Hans Lehrach angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Bodo Lange
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputationstermin: 26. November 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. BRUSTKREBS</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. ALLGEMEINES.....	2
1.1.2. MOLEKULARE SUBTYPEN VON BRUSTKREBS.....	3
1.1.3. SIGNALWEGE IN BRUSTKREBS.....	5
1.1.4. DIE ROLLE VON <i>BRCA</i> -GENEN FÜR BRUSTKREBS.....	6
1.1.5. BRUSTKREBS-THERAPIE.....	7
<b>1.2. DREIDIMENSIONALE ZELLKULTUR VON MCF10A-ZELLEN</b> .....	<b>8</b>
1.2.1. ALLGEMEINES.....	8
1.2.2. ACINUS-ENTWICKLUNG.....	9
<b>1.3. TUMOR-ASSOZIIERTE FIBROBLASTEN</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4. TUMOR-STROMA-INTERAKTION</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5. APOPTOSE</b> .....	<b>14</b>
1.5.1. ALLGEMEINES.....	14
1.5.2. INTRINSISCHER UND EXTRINSISCHER APOPTOSEWEG.....	14
1.5.3. APOPTOSE IN KREBS.....	15
<b>1.6. TUMORNEKROSEFAKTOR-SUPERFAMILIE</b> .....	<b>16</b>
1.6.1. ALLGEMEINES.....	16
1.6.2. FAS/FASL-INTERAKTION.....	17
1.6.3. TNFRSF6B UND SEINE ROLLE IN APOPTOSE UND KREBS.....	17
<b>1.7. DEATH ASSOCIATED PROTEINS</b> .....	<b>19</b>
1.7.1. DAP-FAMILIE.....	19
1.7.2. DAPs IN KREBS.....	20
1.7.3. DAPL1.....	21
<b>1.8. ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1. MATERIAL</b> .....	<b>24</b>
2.1.1. ANTIKÖRPER.....	24
2.1.2. siRNAs.....	25
2.1.3. PLASMIDE.....	26
2.1.4. LABORUTENSILIEN.....	26
2.1.5. CHEMIKALIEN.....	27
2.1.6. KITS UND REAGENZIEN.....	28

2.1.7. PUFFERLISTE .....	29
<b>2.2. METHODEN .....</b>	<b>30</b>
2.2.1. ISOLATION VON ACINI .....	30
2.2.2. PRÄPARATION VON TOTAL-RNA .....	30
2.2.3. GENEXPRESSIONSANALYSE (MRNA PROFILING) .....	30
2.2.4. GO-ENRICHMENT-ANALYSE .....	31
2.2.5. REVERSE PHASE PROTEIN ARRAY (RPPA) .....	31
2.2.6. SDS-PAGE .....	31
2.2.7. WESTERN BLOT .....	32
2.2.8. WIEDERVERWENDUNG DER WESTERN BLOT-MEMBRAN .....	32
2.2.9. BCA-ASSAY .....	33
2.2.10. ZELLVIABILITÄTS-ASSAY NACH FASL-BEHANDLUNG .....	33
2.2.11. ZELLVIABILITÄTS-ASSAY VON FIBROBLASTEN .....	34
2.2.12. APOPTOSE-ASSAY .....	34
2.2.13. TRANSFORMATION .....	35
2.2.14. PLASMID-PRÄPARATION .....	35
2.2.15. RESTRIKTIONSVERDAU .....	35
2.2.16. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) .....	36
2.2.17. AGAROSE-GEL-ELEKTROPHORESE .....	37
<b>2.3. ZELLKULTUR .....</b>	<b>38</b>
2.3.1. ZELLINIEN .....	38
2.3.2. KULTIVIERUNG .....	38
2.3.3. DREIDIMENSIONALE ZELLKULTUR (3D-KULTUR) (ON TOP METHOD) .....	39
2.3.4. STABILE TRANSFEKTION VON MCF10A ZELLEN .....	39
2.3.5. 3D-KULTUR NACH KNOCK-DOWN .....	40
2.3.6. WIRKSTOFFBEHANDLUNG VON FIBROBLASTEN .....	40
2.3.7. 3D-CO-KULTUR .....	41
<b>2.4. MIKROSKOPIE .....</b>	<b>41</b>
2.4.1. IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG .....	41
2.4.2. IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON 3D-KULTUREN .....	42
2.4.3. MIKROSKOPIE .....	43
2.4.4. CELLOMICS .....	43
2.4.5. DIGITALE BILDBEARBEITUNG .....	43
2.4.6. QUANTIFIZIERUNG VON ACINI-GRÖßEN .....	44
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. UNTERSUCHUNG DER ACINI-BILDUNG IN MCF10A-ZELLEN .....</b>	<b>46</b>
3.1.1. IMMUNFLUORESCENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG VON ACINI-STADIEN .....	46
3.1.2. GENEXPRESSIONSANALYSE (MRNA PROFILING) VON ACINI-STADIEN .....	48
3.1.2.1. CLUSTERING .....	48
3.1.2.2. GO-ANALYSE .....	51
3.1.3. REVERSE PHASE PROTEIN ARRAY (RPPA) VON ACINI-STADIEN .....	52
<b>3.2. UNTERSUCHUNG DER ÜBEREXPRESSION VON KANDIDATENPROTEINEN .....</b>	<b>54</b>
3.2.1. EXPRESSIONSVEKTOREN .....	54
3.2.2. TRANSFEKTION VON MCF10A-ZELLEN .....	54

---

3.2.3.	FASL-INDUZIERTE APOPTOSE IN ÜE-ZELLINIEN .....	55
3.2.3.1.	ZELLVIABILITÄTS-ASSAY .....	57
3.2.3.2.	APOPTOSE-ASSAY .....	58
3.2.4.	UNTERSUCHUNG DER TNFRSF6B-ÜBEREXPRESSION IN MCF10-ACINI .....	61
<b>3.3.</b>	<b>HERUNTERREGULIERUNG VON KANDIDATENPROTEINEN IN MCF10A-ACINI .....</b>	<b>64</b>
<b>3.4.</b>	<b>UNTERSUCHUNG VON FIBROBLASTEN .....</b>	<b>64</b>
3.4.1.	PROTEINEXPRESSION IN FIBROBLASTEN .....	65
3.4.2.	WIRKSTOFFBEHANDLUNG VON FIBROBLASTEN .....	65
3.4.2.1.	ZELLVIABILITÄT NACH WIRKSTOFFBEHANDLUNG VON FIBROBLASTEN .....	66
3.4.2.2.	SIGNALTRANSDUKTION NACH WIRKSTOFFBEHANDLUNG VON FIBROBLASTEN .....	68
3.4.3.	UNTERSUCHUNG DER FASL-INDUZIERTEN APOPTOSE IN FIBROBLASTEN .....	73
3.4.4.	EINFLUSS VON FIBROBLASTEN AUF DIE MCF10A-ACINI-ENTWICKLUNG VIA 3D-CO-KULTUR .....	75
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1.</b>	<b>GENEXPRESSION UND PROTEINREGULATION WÄHREND DER MCF10A-ACINI-ENTWICKLUNG .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2.</b>	<b>DIE ROLLE VON KANDIDATENPROTEINEN FÜR DIE ACINI-ENTWICKLUNG UND DIE FASL-INDUZIERTE APOPTOSE .....</b>	<b>81</b>
4.2.1.	HERSTELLUNG UND FUNKTIONALITÄT STABILER ÜBEREXPRESSIONSZELLINIEN FÜR DIE UNTERSUCHUNG VON KANDIDATENPROTEINEN .....	81
4.2.2.	WIRKUNG VON KANDIDATENPROTEINEN WÄHREND DER FASL-INDUZIERTEN APOPTOSE .....	82
4.2.2.1.	EINFLUSS DER TNFRSF6B-ÜBEREXPRESSION AUF DIE FASL-INDUZIERTE APOPTOSE .....	82
4.2.2.2.	DAPL1 HAT EINE POTENTIELLE ANTI-APOPTOTISCHE FUNKTION WÄHREND DER FASL-INDUZIERTEN APOPTOSE .....	84
4.2.3.	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER TNFRSF6B-ÜBEREXPRESSION AUF DIE MCF10A-ACINI-ENTWICKLUNG .....	85
4.2.4.	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER HERUNTERREGULIERUNG VON KANDIDATENPROTEINEN AUF DIE MCF10A-ACINI-ENTWICKLUNG .....	86
<b>4.3.</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER SIGNALTRANSDUKTION NACH INHIBITOR-BEHANDLUNG IN CAFs UND NORMALEN FIBROBLASTEN .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4.</b>	<b>EINFLUSS VON CAFs UND NORMALEN FIBROBLASTEN AUF DIE MCF10A-ACINI-ENTWICKLUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>4.5.</b>	<b>3D-KULTUR ALS MODELL FÜR DIE UNTERSUCHUNG POTENTIELLER BRUSTKREBSKANDIDATEN .....</b>	<b>92</b>
	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>94</b>
	<b>SUMMARY .....</b>	<b>96</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>106</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>112</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der MCF10A-Acini-Morphogenese.....	10
Abbildung 2:	Aktivierte Fibroblasten .....	12
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges .....	15
Abbildung 4:	TNFRSF6B-Proteinstruktur.....	18
Abbildung 5:	Stadien der Acini-Bildung in MCF10A-Zellen.....	47
Abbildung 6:	Genregulation in MCF10A-3D-Kultur im Vergleich zur Kontrolle.....	49
Abbildung 7:	Überexpression in transient und stabil transfizierten MCF10A-Zellen .....	55
Abbildung 8:	Überlebensrate von MCF10A-Zellen nach FasL-Behandlung .....	56
Abbildung 9:	Zellviabilität nach FasL-Behandlung .....	57
Abbildung 10:	Apoptose-Assay mittels Cellomics.....	59
Abbildung 11:	Apoptoserate nach FasL-Behandlung.....	60
Abbildung 12:	Acini-Anzahl und -Größe nach TNFRSF6B-Überexpression .....	62
Abbildung 13:	Acini-Entwicklung nach TNFRSF6B-ÜE.....	63
Abbildung 14:	Proteinexpression in Fibroblastenzelllinien.....	65
Abbildung 15:	Wirkstoff-Konzentrationsreihen in Fibroblasten.....	67
Abbildung 16:	RPPA nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten 1.....	69
Abbildung 17:	RPPA nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten 2.....	70
Abbildung 18:	RPPA nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten 3.....	71
Abbildung 19:	Zellviabilität von Fibroblasten nach FasL-Behandlung .....	74
Abbildung 20:	Relative Anreicherung von GO-Level-1-Termen der regulierten Gene verschiedener Acini-Stadien.....	111

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der molekularen Subtypen von Brustkrebs.....	4
Tabelle 2: Primärantikörper.....	24
Tabelle 3: Sekundärantikörper .....	25
Tabelle 4: siRNAs .....	25
Tabelle 5: Plasmide.....	26
Tabelle 6: Laborutensilien .....	26
Tabelle 7: Chemikalien.....	27
Tabelle 8: Kits und Reagenzien.....	28
Tabelle 9: Puffer und Lösungen.....	29
Tabelle 10: Restriktionsenzyme .....	36
Tabelle 11: Restriktionsansatz.....	36
Tabelle 12: Pipettierschema für PCR.....	36
Tabelle 13: PCR-Bedingungen .....	37
Tabelle 14: Zelllinien.....	38
Tabelle 15: Mikroskope und Zubehör .....	43
Tabelle 16: Am stärksten regulierte Gene der MCF10A-Acini-Stadien .....	50
Tabelle 17: Vergleich der mRNA und RPPA-Daten.....	53
Tabelle 18: RPPA-Ergebnisse nach Wirkstoffbehandlung .....	73
Tabelle 19: GO-Analyse der spezifisch an 3D Tag 2 regulierten Gene .....	106
Tabelle 20: GO-Analyse der spezifisch an 3D Tag 7 regulierten Gene .....	107
Tabelle 21: GO-Analyse der spezifisch an 3D Tag 11 regulierten Gene .....	107
Tabelle 22: GO-Analyse der an 3D Tag 2/Tag 7/Tag 11 regulierten Gene .....	109

---

## Abkürzungen

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten (cancer associated fibroblast)
CK	Cytokeratin
d	Tag (day)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ER	Estrogenrezeptor
EZM	extrazelluläre Matrix
FasL	Fas Ligand
FCS	Fötales Kälberserum
GO	Gene Ontology
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LI-CycE	leichte Isoform von Cyclin E
M	Molarität
MAPK	MAP-Kinase
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PR	Progesteronrezeptor
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
ÜE	Überexpression
ÜN	über Nacht



---

# EINLEITUNG

# 1. Einleitung

## 1.1. Brustkrebs

### 1.1.1. Allgemeines

Die weibliche Brust besteht aus Drüsen, die Milch produzieren, Fettgewebe, Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen. Die Drüsen sind aus Läppchen (Lobulus), die die Milch produzieren, und den Drüsengängen (Ductus), die die Milch zur Brustwarze leiten, aufgebaut.

Brustkrebs ist die häufigste Krebsart bei Frauen weltweit. Krebszellen sind durch eine kontinuierliche Proliferation der Zellen charakterisiert, die durch ein anormales Mikromilieu und intrinsische Signale verursacht werden [1].

Es gibt verschiedene Arten des Brustkrebses, die nach verschiedenen Systemen klassifiziert werden können:

Die histopathologische Klassifizierung ordnet Brustkrebs je nach Entstehungsort und Invasivität ein. So gibt es duktale und lobuläre Karzinome ohne oder mit invasiven Eigenschaften. Das invasive duktale Karzinom der Brust macht ca. 80 % der Brustkrebsfälle aus [2].

Zudem wird bei Brustkrebs der Hormonrezeptorstatus für den Estrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) sowie für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 ermittelt. Diese können Aufschluss über den Verlauf, Prognose und Behandlung des Brustkrebses geben. So wachsen Hormonrezeptor-positive Tumore langsamer und sprechen besser auf eine Hormonbehandlung an. ER-positive Tumore z.B. benötigen Estrogen um zu wachsen. Dadurch können sie mit Wirkstoffen wie Tamoxifen oder Aromatase-Inhibitoren, die den Effekt oder das Level von Estrogen mindern, behandelt werden. HER2-positive Tumore sind mit einem schlechteren Krankheitsverlauf und einer schlechten Überlebensprognose assoziiert, da HER2 die Proliferation der Zellen stimuliert und die Apoptose hemmt. Ca. 20 % aller invasiven

Mammakarzinome sind HER2-positiv, können jedoch gezielt mit Wirkstoffen wie Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen HER2, behandelt werden.

Eine besondere Form des Brustkrebses bildet der triple-negative Brustkrebs, auch „basal-like“ Brustkrebs genannt. Diesen Zellen fehlen alle drei Rezeptoren ER, PR und HER2. Durch den negativen Rezeptorstatus schlagen Hormonbehandlungen hier nicht an, wodurch diese Krebsart eine schlechte Prognose hat. Für die Behandlung kommt somit eine operative Entfernung in Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie in Frage. Die Rückfallrate für triple-negativen Brustkrebs ist in den ersten drei bis fünf Jahren gegenüber Rezeptor-positiven Tumoren stark erhöht.

### **1.1.2. Molekulare Subtypen von Brustkrebs**

Brustkrebs ist eine sehr heterogene Krankheit. Eine neuere Klassifizierung von Brustkrebs geschieht anhand von Genexpressionsanalysen und biologischen Charakteristika [3]. Cluster-Analysen ergaben fünf molekulare Subtypen: Luminal A und B, HER2, „basal-like“ und normal [4].

Luminal A, der häufigste Subtyp, ist durch die Expression von Genen charakterisiert, die durch den ER-Transkriptionsfaktor aktiviert werden und zeigt eine niedrige Expression von Zellproliferationsgenen. Luminal A-Tumore exprimieren ER, PR, Bcl-2 und Cytokeratin (CK) 8 und 18 und sind negativ für HER2. GATA3 ist hier am höchsten exprimiert. Der Luminal A-Subtyp hat eine gute Prognose und wird i.d.R. durch Aromatase-Inhibitoren oder selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren wie Tamoxifen behandelt.

Luminal B-Tumore sind aggressiver als Luminal A mit einer höheren Proliferation und Expression von Proliferationsgenen, wie MKI67 und Cyclin B1. Neben ER exprimiert der Luminal B-Subtyp oft EGFR (epidermal growth factor receptor) und HER2. Der Luminal B-Subtyp hat eine schlechtere Prognose als der Luminal A-Subtyp.

Der HER2-Subtyp hat eine hohe Expression von HER2 und anderen Genen des HER2-Signalweges. Diese Tumore überexprimieren Proliferationsgene. 40 % des Subtyps

haben eine p53-Mutation. Der Subtyp hat eine hohe Chemosensitivität und kann mit anti-HER2-Wirkstoffen behandelt werden.

Der „basal-like“-Subtyp exprimiert CK5 und 17, P-Cadherin, CD44 und EGFR. Dafür ist er negativ für ER, PR und HER2. Sie haben eine schlechte Prognose und eine hohe Rate an p53-Mutationen und es finden sich Mutationen des *BRCA1*-Gens.

Der normale Subtyp ist wenig charakterisiert und exprimiert fettgewebespezifische Gene. Auch er ist negativ für ER, PR und HER2, ist aber auch negativ für CK5 und EGFR.

Der „Claudin-low“-Subtyp stellt einen neuen Subtyp dar, der eine geringe Expression von Genen zeigt, die in Tight Junctions und Zell-Zell-Kontakte involviert sind, wie Claudin-3, -4 und -7, Occludin und E-Cadherin. Zudem überexprimiert dieser Subtyp ein Gen-Set der Immunantwort, was für eine hohe Infiltration der Tumor-Immunzellen spricht [5].

Die Eigenschaften der verschiedenen Subtypen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Eigenschaften der molekularen Subtypen von Brustkrebs (Tabelle nach [5])**

Molekularer Subtyp	Häufigkeit	ER/PR /HER2	CK5/6 EGFR	Proliferationsgene	Charakteristische Gene	Histologischer Grad	p53 Mutation	Prognose
Basal-like	10-20 %	-/-	+	hoch	KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2	hoch	hoch	schlecht
HER2	10-15 %	-/+	+/-	hoch	ERBB2, GRB7	hoch	hoch	schlecht
Normal	5-10 %	±/ -	-	gering	PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7	gering	gering	mittel
Luminal A	50-60 %	+ +/-	-	gering	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1	gering	gering	exzellent
Luminal B	10-20 %	±/±/±	-	hoch	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B	mittel/ hoch	mittel	mittel/ schlecht
Claudin-low	12-14 %	-/-	+/-	hoch	CD44, SNAI3	hoch	hoch	schlecht

### 1.1.3. Signalwege in Brustkrebs

Verschiedene Signalwege spielen für die Entstehung von Brustkrebs eine Rolle. So fördern anhaltende proliferative Signale, die Umgehung der Wachstumshemmung, Apoptose-Resistenz, unbegrenzte Replikationskapazität, genomische Instabilität, metabolische Umprogrammierung, Induktion der Angiogenese, Invasion und Metastasierung die Tumorentstehung.

Genomische Instabilität führt zu zufälligen Mutationen und chromosomalen Änderungen. Durch Fehler in der DNA-Reparatur kommt es zu einer Anhäufung von Fehlern. Diese können zum Verlust der Funktion von z.B. Tumorsuppressorgenen oder der Steigerung der Funktion von Onkogenen und somit zu Krebs führen. So trägt z.B. die Inaktivierung von BRCA1 zur Brustkrebsentstehung bei [5].

Proliferation und Überleben von Krebszellen können durch verschiedene Mechanismen beeinflusst sein. So können Krebszellen eigene Wachstumsfaktoren produzieren oder die Produktion von Wachstumsfaktoren der umgebenden Zellen aktivieren [6]. Außerdem können Membranrezeptoren überexprimiert sein, wodurch Signale verstärkt werden oder die Struktur des Membranproteins ist verändert, was zu einer konstitutiven Aktivierung des jeweiligen Signalweges unabhängig vom Liganden führt. In Brustkrebs führt z.B. die Überexpression von HER2 zu anhaltenden proliferativen Signalen. Der Membranrezeptor HER2 formt Homo- oder Heterodimere und aktiviert so seine intrazelluläre Kinase-Funktion. Dadurch werden die Signalwege Ras/Raf/MAPK, JAK/STAT und PI3K/AKT/mTOR aktiviert. Diese spielen eine Rolle für Wachstum, Überleben Proliferation, Zellteilung, Metabolismus, Apoptose und Migration von Zellen.

Der IGF1R/PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist für das Zellwachstum und metabolische Regulationen zuständig. Die Aktivierung des Rezeptors durch IGF1 phosphoryliert IRS und Src, die wiederum die Signalwege MAPK und PI3K/AKT/mTOR aktivieren. Die Überexpression des IGF1-Rezeptors induziert die Tumor- und Metastasenbildung [7].

Auch die Angiogenese, im Sinne der Gefäßneubildung, spielt für die Tumorbildung eine wichtige Rolle, um ihn mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen sowie CO<sub>2</sub>

und metabolische Abfallprodukte zu entsorgen. Dieser Prozess ist während der Tumorbildung funktional, obwohl er im adulten Organismus, bis auf Wundheilung und Menstruation, inaktiviert ist [8]. VEGF (vascular endothelial growth factor) ist der Hauptfaktor der Aktivierung der Angiogenese, der von drei Transmembranrezeptoren (VEGFR 1-3) erkannt wird. Die Gefäße in Tumoren sind durch starke Verzweigungen, unregelmäßigen Blutfluss, Mikroblutungen, Apoptose und eine erhöhte endotheliale Proliferation charakterisiert [9]. Die Gefäßbildung findet schon während der frühen Tumorbildung statt und hält während der Entwicklung und Metastasierung an. Deshalb ist VEGF ein wichtiges Zielmolekül für die Krebstherapie.

#### **1.1.4. Die Rolle von *BRCA*-Genen für Brustkrebs**

Brustkrebserkrankungen sind zu ca. 5 % genetisch bedingt. Eine erbliche Form des Brustkrebses wird durch Mutationen der Breast-Cancer (*BRCA*)-Gene *BRCA1* und *BRCA2* hervorgerufen. *BRCA1* ist ein Tumorsuppressorgen und liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q21.31). Es kodiert ein 207,7 kDa großes nukleares Protein, das eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase-Funktion hat und eine entscheidende Rolle für die DNA-Reparatur, Ubiquitinierung und transkriptionale Regulation spielt. Auch *BRCA2* zählt zu den Tumorsuppressorgen und liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 13 (13q12.3). Es kodiert ein 384,2 kDa großes nukleares Protein, welches mit RAD51 interagiert und zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beiträgt. Sowohl *BRCA1* als auch *BRCA2* tragen durch ihre Funktion entscheidend zur genomischen Stabilität von Zellen bei.

Mutationen des *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gens erhöhen das Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Im Alter von 70 Jahren liegt das Brustkrebsrisiko bei einer Mutation des *BRCA1*-Gens bei 65%, bei einer Mutation des *BRCA2*-Gens bei 45 %. Möglicherweise spielt auch die mutierte Genregion eine Rolle für das Brustkrebsrisiko. Eine Mutation der „ovarian-cancer-cluster“-Region von *BRCA2* scheint ein geringeres Brustkrebsrisiko zu haben. Auch eine Mutation der zentralen Region von *BRCA1*

scheint ein geringeres Brustkrebsrisiko zu haben als andere Genregionen. Jedoch konnte hier keine statistische Signifikanz gezeigt werden [10]. Zudem variiert das Brustkrebsrisiko sehr stark in Abhängigkeit von Alter, Familiengeschichte, und anderen Faktoren wie Alter der Erstgeburt, Dauer des Stillens sowie Ernährungsfaktoren wie Alkoholkonsum [11].

Auch Mutationen in den Genen p53, PTEN, STK11 und E-Cadherin (CDH1) erhöhen das Brustkrebsrisiko, wie hoch ist jedoch nicht bekannt. Mutationen der Gene ATM, CHK2 und BRIP-1 haben ein mäßig erhöhtes Risiko. Insgesamt sind nur 5 % der Brustkrebserkrankungen auf Genveränderungen zurückzuführen.

#### **1.1.5. Brustkrebs-Therapie**

Es gibt verschiedene Behandlungsformen des Brustkrebses, wie z.B. die chirurgische Entfernung, die Bestrahlung, um das Tumorwachstum zu stoppen, oder Anti-Krebs-Wirkstoffe, die die Krebszellen töten oder ihre Proliferation stoppen. Diese haben verschiedene Wirkungsweisen:

1. Die klassische Chemotherapie zielt wahllos auf sich schnell teilende Zellen im Körper ab, bei der die Proliferation der Krebszellen gestoppt wird.
2. Die Hormontherapie stoppt das Wachstum der Krebszellen durch die Wirkung auf Rezeptoren und Signalmoleküle von Hormonen, die für die Proliferation dieser Zellen ausschlaggebend sind.
3. Die gezielte Therapie, bei der gezielt die fehlregulierten Signalwege des Karzinoms therapiert werden. Bei einer Fehlfunktion von BRCA1 kann z.B. die Behandlung mit PARP1-Inhibitoren erfolgreich sein. PARP spielt wie BRCA1 eine entscheidende Rolle für die DNA-Reparatur. Durch die Inhibierung von PARP bei gleichzeitiger Gabe zytotoxischer Mittel akkumulieren die Zellen so viele Chromosomenschäden, dass die Zellen zur Apoptose gezwungen werden. Die Behandlung mit Hormonrezeptor-Inhibitoren, wie Trastuzumab gegen HER2, in Kombination mit Chemotherapie zeigte deutliche Wirkung bei der Behandlung von HER2-positiven Tumoren. Allerdings gibt

es auch HER2-Resistenzen. Erste Studien zeigen jedoch, dass eine zweifach-Blockade von HER2 mit verschiedenen Inhibitoren sehr erfolgversprechend ist [12]. Auch die Inhibierung von VEGF als Aktivator der Angiogenese ist ein erfolgversprechender Ansatz, da es im adulten Organismus fast ausschließlich während der Tumorbildung aktiv ist und somit ein geeignetes Ziel darstellt. Hier scheint die Kombination eines monoklonalen Antikörpers gegen VEGF, Bevacizumab, mit Chemotherapie sehr vielversprechend zu sein, auch für die Behandlung von triple-negativem Brustkrebs [13].

Die verschiedenen Signalwege in Brustkrebs bieten eine große Angriffsfläche für die Brustkrebstherapie. Durch die Heterogenität von Brustkrebs ist es jedoch notwendig die molekularen Grundlagen besser zu verstehen sowie patientenspezifisch zu analysieren, um neue Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen zu finden und eine individuelle gezielte Therapie einleiten zu können.

## **1.2. Dreidimensionale Zellkultur von MCF10A-Zellen**

### **1.2.1. Allgemeines**

Die dreidimensionale Zellkultur ist eine Methode sich den *in vivo* - Eigenschaften von Zellen anzunähern. Während Epithelzellen, wie MCF10A-Zellen, in der üblichen Zellkultur einen einschichtigen Zellrasen unpolarisierter Zellen ausbilden, weisen sie in 3D-Kultur gewebespezifische Eigenschaften von Drüsenepithel auf. Dazu zählt die Bildung drüsenartiger Sphäroide, auch Acini genannt, die sogar zur Milchproduktion fähig sind [14]. Diese bestehen aus einer apico-basal polarisierten Zellschicht, die einen inneren Hohlraum umgibt. Zudem sind Acini durch ein kontrolliertes Zellwachstum und Proliferation sowie durch die Ausbildung einer Basalmembran charakterisiert [15, 16]. Für die 3D-Kultur werden die Zellen auf eine Laminin-reiche extrazelluläre Matrix (hier Cultrex Basement Membrane Extract (Matrigel)) gebettet. Diese ist ein wichtiger Faktor für die Reorganisation der Zellen zu dreidimensionalen



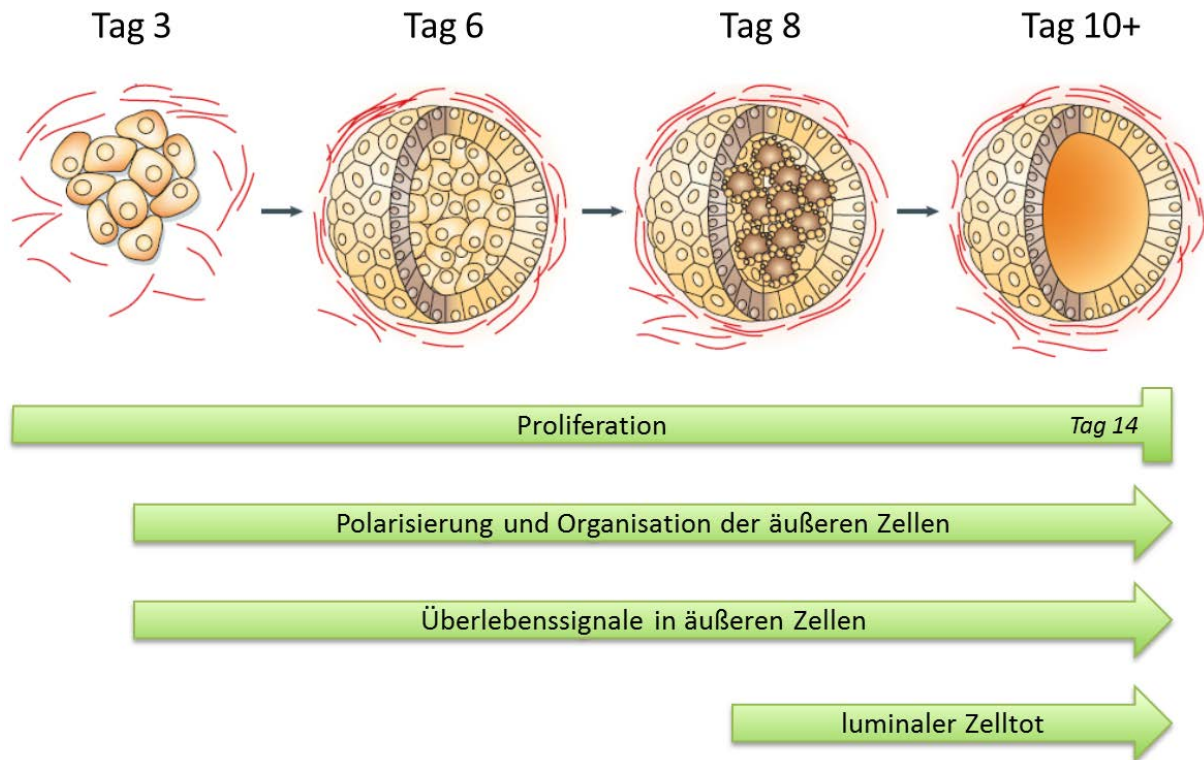
organotypischen Strukturen [17]. Bestandteile der EZM werden im Organismus von Stromazellen, wie Fibroblasten, sekretiert. Die Interaktion zwischen Epithel und Stroma spielt eine entscheidende Rolle für die Differenzierung von Epithelien (s. 1.3. und 1.4.).

### **1.2.2. Acinus-Entwicklung**

Kultiviert man MCF10A-Zellen in 3D, kann man verschiedene Stadien der Acinus-Entwicklung mit spezifischen Eigenschaften beobachten. Zunächst bilden die Zellen eine apico-basale Polarisation aus. An Tag 5 - 8 der 3D-Kultur werden zwei verschiedene Zellpopulationen innerhalb des Acinus erkennbar: eine äußere Zellschicht, die in direktem Kontakt zur Matrix steht und eine innere Gruppe von Zellen ohne Kontakt zur Matrix. Im weiteren Verlauf der Acini-Entwicklung bleibt die Polarisation der äußeren Zellschicht bestehen und richtet sich zum Acinus-Zentrum. Durch Apoptose der inneren Zellpopulation beginnt ab Tag 8 die Bildung eines Hohlraums im Inneren des Acinus [15]. Dies wird durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontakts der inneren Zellen induziert und wird auch Anoikis genannt. Hierbei spielen möglicherweise Proteine wie BIM, JNK und Glucocorticoide eine entscheidende Rolle [18, 19]. Die Acini-Entwicklung ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

Das 3D-Zellkultur-Modell hat bereits zur Aufklärung von molekularen Grundlagen der Acini-Entwicklung beigetragen. So zeigten Whyte et al., dass PKC $\zeta$  für die Regulation der Zellpolarisation und Proliferationsrestriktion eine Rolle spielt [20]. Leslie et al. konnten zeigen, dass die Expression von IL-6 und Stat3 in MCF10A-Zellen durch die Kultivierung in 3D erhöht wird [21]. Durch die 3D-Kultur konnte auch der Einfluss der Fibronectin-Expression auf die Acinus-Proliferation gezeigt werden [22]. Auch die Versuche von Imbalzano et al. zeigen die Wichtigkeit des 3D-Modells für die Aufklärung der Tumorentstehung. Sie verglichen die Wachstums- und Differenzierungseigenschaften von 3D-kultivierten MCF10A-Zellen zu transformierten (prä)malignen MCF10A-T- und MCF10-CA1a-Zelllinien und zeigten Unterschiede in

Proliferation, Polarisation, Bildung von Zell-Zell-Kontakten und Apoptose [23]. Dadurch kann man auch auf molekularer Ebene gezielt Signalwege in einem *in vivo*-ähnlichem System untersuchen, die möglicherweise zur Tumorentstehung beitragen.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der MCF10A-Acini-Morphogenese**

Dargestellt sind die wichtigsten Vorgänge und die morphologische Entwicklung von MCF10A-Acini im zeitlichen Verlauf. Die Acini sind eingebettet in extrazelluläre Matrix (rot). (Abbildung modifiziert von [15, 16])

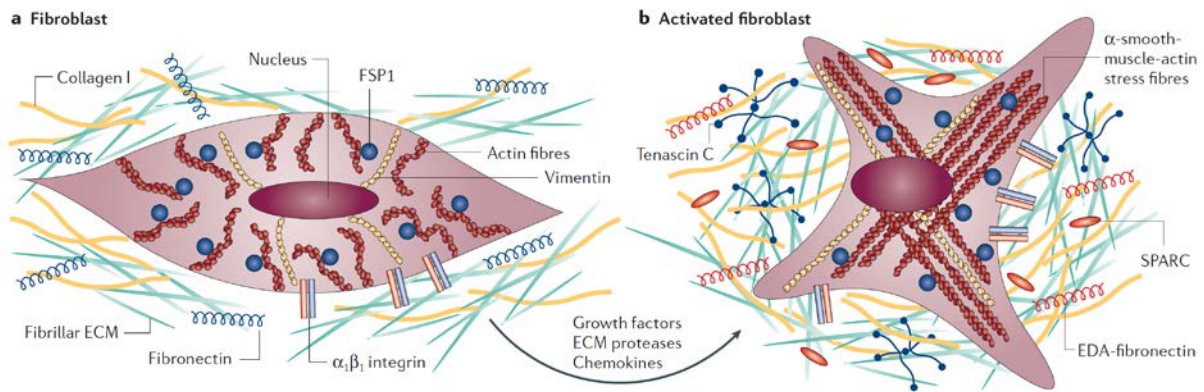
### 1.3. Tumor-assoziierte Fibroblasten

Fibroblasten sind spindelförmige, nicht-vaskuläre, nicht-epitheliale und nicht-inflammatorische Zellen des Bindegewebes [24]. Sie sind von der extrazellulären Matrix (EZM) umgeben und synthetisieren deren Komponenten, wie z.B. Typ I, III und V-Kollagene und Fibronectin sowie Typ IV-Kollagene und Laminin, als Bestandteile der

Basalmembran, und Wachstumsfaktoren. Fibroblasten regulieren zudem die Differenzierung von Epithelzellen, regulieren Entzündungen und sind an der Wundheilung beteiligt [25, 26]. Fibroblasten sind je nach ihrer anatomischen Herkunft sehr heterogen und weisen verschiedene Genexpressionsmuster auf [27].

Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs (Cancer-associated fibroblast)) sind aktivierte Fibroblasten und spielen eine wichtige Rolle für Tumorwachstum und -progression [28]. Sie haben einen ähnlichen Phänotyp wie Fibroblasten, die an der Wundheilung beteiligt sind. Diese sekretieren mehr EZM-Komponenten und haben eine höhere Proliferation als normale Fibroblasten. Außerdem besitzen sie, im Vergleich zu normalen Fibroblasten, einen großen ovalen euchromatischen Nukleus mit einem oder zwei Nukleoli, ein großes endoplasmatisches Retikulum und einen auffälligen Golgi-Apparat [24]. CAFs werden durch die Expression bestimmter Marker, wie  $\alpha$ -smooth-muscle actin ( $\alpha$ -SMA), Fibroblast-activated protein (FAP) oder PDGF- $\beta$ -Rezeptor charakterisiert [29].

Es wird angenommen, dass in Brustkarzinomen ca. 80 % der Fibroblasten den CAF-Phänotyp aufweisen [30]. Welche Signale für die Umwandlung von Fibroblasten in CAFs verantwortlich sind, ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ , welches auch die Aktivierung von Fibroblasten während der Wundheilung und Organfibrose vermittelt, den CAF-Phänotyp in Zellkultur induzieren kann [31]. Ein Vergleich zwischen normalen und aktivierten Fibroblasten ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Aktivierte Fibroblasten**

a) Fibroblast eingebettet in die EZM, die größtenteils aus Typ I Kollagen und Fibronectin besteht. Fibroblasten interagieren über Integreine mit ihrer Mikroumgebung. Sie haben ein Actin-Zytoskelett mit intermediären Vimentinfilamenten. FSP1 (fibroblast-specific protein 1) ist ein Fibroblastenspezifischer Marker. **b)** Aktivierte Fibroblasten mit vermehrter Sekretion von EZM-Proteinen, wie Typ I Kollagen, Tenascin C, EDA (Extradomäne A)-Fibronectin und SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine). Aktivierte Fibroblasten exprimieren oft  $\alpha$ -SMA. Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$ , Chemokine, wie MCP1 (monocyte chemotactic protein 1) und EZM-degradierende Proteasen vermitteln die Aktivierung der Fibroblasten. (Abbildung nach [32])

#### 1.4. Tumor-Stroma-Interaktion

Im Stroma des Brustgewebes kommen verschiedene Zelltypen vor wie z.B. Endothelzellen, residente Immunzellen, Fettzellen und Fibroblasten mit ihren Zellprodukten wie Wachstumsfaktoren und Komponenten der EZM [33].

Im Tumorgewebe finden sich zusätzlich bösartige infiltrierende Makrophagen (Tumor-assoziierte Makrophagen, TAMs), eine modifizierte kollagenreiche EZM und, als häufigster Zelltyp, CAFs. Zwischen dem Epithel und dem Stroma herrschen wechselseitige Interaktionen. So regulieren Stroma- und Epithelzellen die Expression und Umstrukturierung der EZM [34-36]. Diese hat wiederum während der Tumorentstehung einen Effekt auf die Polarität des Epithels und auf die Angiogenese [37].

Karzinomzellen können durch eine Anhäufung von Mutationen in Epithelzellen entstehen [38], wodurch ein aktiviertes Stroma entsteht [39, 40]. Dieses unterstützt

die Proliferation und das Überleben der Karzinomzellen durch einen Überschuss inflammatorischer Zellen und CAFs [41]. CAFs spielen eine entscheidende Rolle für die Proliferation und Erhaltung von Tumoren [33, 42]. Sie exprimieren Wachstumsfaktoren, wie EGF, TGF- $\beta$  oder HGF, die für ihre tumorfördernde Wirkung bekannt sind [32]. Es konnte gezeigt werden, dass CAFs Notch-Moleküle exprimieren [43], die das Überleben und die Proliferation [44, 45] von Krebszellen sowie Angiogenese [46] fördern. Zudem können CAFs die Sensitivität von bösartigen Zellen auf Chemo- oder Radiotherapie beeinflussen [47, 48]. Shekhar et al. zeigten zudem einen Einfluss auf die Tamoxifen-Sensitivität in Brustkrebsmodellen bei Co-Kultivierung von CAFs [49]. CAFs sind auch in der Lage andere Tumorzelltypen zu rekrutieren. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von CXCL14 durch Fibroblasten, die Anzahl an TAMs erhöht und das Tumorstadium stimuliert [50].

Fibroblasten regulieren auch die Differenzierung und Homöostase angrenzender Epithelien. Kuperwasser et al. konnten die Entwicklung von Brustdrüsen mit humanen Brustepithelzellen in einem Mausmodell zeigen. Dies gelang jedoch nur bei einer Co-Injektion der Brustepithel-Organoiden mit humanen Brust-Fibroblasten [51]. Ohne co-injizierte Fibroblasten bildeten sich keine Brustdrüsen aus. Dies zeigt, dass Fibroblasten auch für die Organisation und Entwicklung der Brustdrüsen eine wichtige Rolle spielen.

Die Wichtigkeit der Interaktion zwischen Epithel bzw. Tumor und Stroma für die Entwicklung von Geweben sowie für die Bildung und Progression von Tumoren ist unumstritten.

## **1.5. Apoptose**

### **1.5.1. Allgemeines**

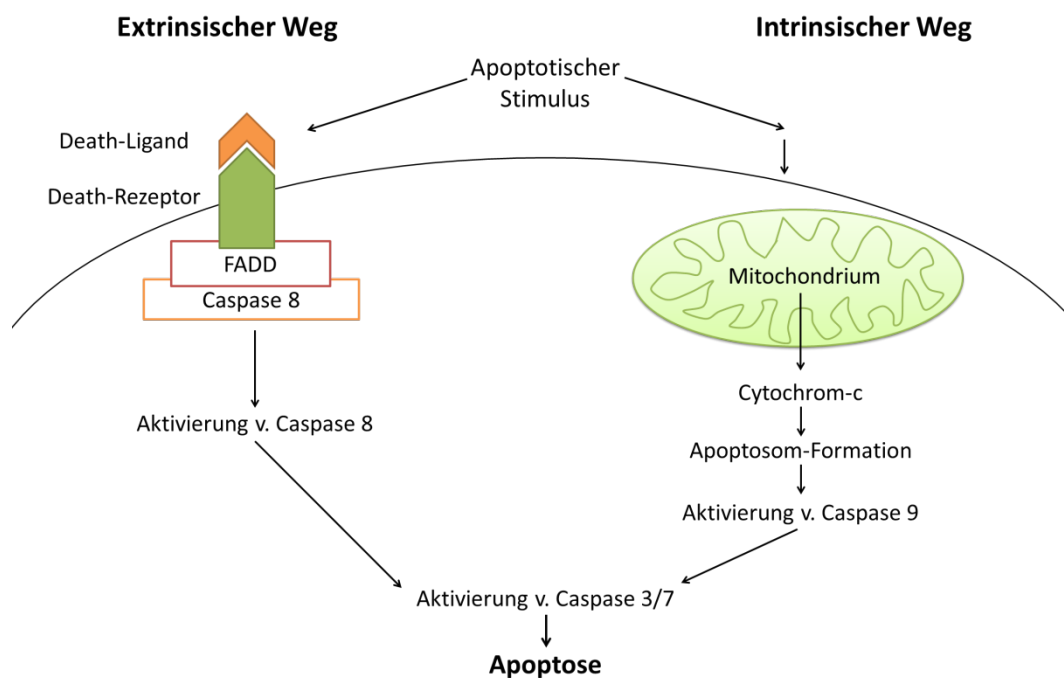
Apoptose ist, neben Autophagie und Nekrose, eine Form des programmierten Zelltodes und wurde zuerst von Kerr et al. beschrieben [52]. Sie tritt während der Entwicklung und Alterung auf und wirkt außerdem als homöostatischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung von Zellpopulationen in Geweben sowie als Abwehrmechanismus bei Infektionen oder bei Zellschädigungen durch schädliche Einflüsse [53]. Ist die DNA irreparabel geschädigt, wird der Zelltod i.d.R. durch Apoptose eingeleitet. Sie ist durch Vorgänge, wie z.B. Zellschrumpfung, Kondensation und Fragmentierung des Chromatins, Bildung von Membranvesikeln und dem Verlust der Adhäsion zu Nachbarzellen oder der EZM charakterisiert [54]. Im Folgenden werden die zwei Hauptformen der Apoptose, der intrinsische und der extrinsische Apoptoseweg, erklärt.

### **1.5.2. Intrinsischer und extrinsischer Apoptoseweg**

Der intrinsische Apoptoseweg, auch mitochondrialer Weg genannt, führt durch mitochondriale Pro-Enzyme zur Aktivierung der Apoptose. Hierbei führen extra- oder intrazelluläre Signale zur Änderung der Permeabilität der mitochondrialen Membran, so dass Cytochrom-c ins Zytosol passieren kann und die Bildung des Apoptosoms, ein Komplex aus Pro-Caspase 8 und Apaf-1, einleitet. Dieses löst eine Caspase 9/3-Kaskade aus, die zur Apoptose führt [55].

Der extrinsische Apoptoseweg, auch Todesrezeptor-Signalweg genannt, wird durch die Bindung eines transmembranen Todesrezeptors, wie Fas, mit seinem extrazellulären Liganden, wie Fas Ligand (FasL), eingeleitet. Der dadurch entstandene Fas/FasL-Komplex rekrutiert FADD (Fas-associated death domain) und Pro-Caspase 8. Diese formen den DISC-Komplex (death inducing signalling complex), der die Pro-Caspase 8 aktiviert. Caspase 8 löst wiederum die Aktivierung der Effektor-Caspase 3

aus [52]. Die Aktivierung von Caspase 3 führt zur DNA-Fragmentierung, Degradierung von Proteinen des Zytoskeletts und des Zellkerns, zur Vernetzung von Proteinen, zur Formation von apoptotischen Körperchen, der Expression von Liganden für phagozytotische Rezeptoren und schließlich zur Phagozytose [53]. Eine schematische Darstellung beider Apoptosewege ist in Abbildung 3 zu sehen.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges

### 1.5.3. Apoptose in Krebs

In Krebs ist der Zellzyklus fehlreguliert, was sich durch eine Überproliferation oder fehlenden Abbau von Zellen äußert [56]. Hierbei spielt die Unterdrückung der Apoptose eine entscheidende Rolle. So können Tumorzellen anti-apoptotische Proteine, wie Bcl-2, exprimieren oder pro-apoptotische Proteine, wie Bax, herunterregulieren. Die Expression beider wird durch das Tumorsuppressorgen p53 reguliert [57]. Der Transkriptionsfaktor p53 aktiviert DNA-Reparaturproteine, arretiert Zellen in der G1/S-Phase um DNA-Schädigungen zu erkennen und kann

Apoptose einleiten, wenn die DNA irreparabel geschädigt ist [58]. Mutationen dieses Gens kommen in 50 % aller humanen Krebsarten vor und spielen somit eine wichtige Rolle für die Krebsentstehung [59].

Des Weiteren sind Krebszellen in der Lage der Immunantwort zu entkommen. Bei der Erkennung von Tumorzellen produzieren T-Zellen FasL um den Todesrezeptor-Signalweg einzuleiten. Einige Tumorzellen können jedoch die Immunreaktion abschwächen, indem sie z.B. den Fas-Rezeptor herunterregulieren, einen nicht-funktionalen Fas-Rezeptor exprimieren, eine lösliche Form des Fas-Rezeptors überexprimieren um FasL abzufangen oder der Expression von FasL an der Zelloberfläche der Tumorzellen [60-62].

Die Aktivierung der Apoptose spielt eine wichtige Rolle während der Entwicklung und Umbildung der Brustdrüsen und ihre Fehlregulierung ist ein wichtiger Faktor für die Brustkrebsentstehung. So konnte gezeigt werden, dass verschiedenen Apoptose-Signalwege in Brustkrebs fehlreguliert sind. Keane et al. fanden heraus, dass verschiedenen Brustkrebszelllinien im Gegensatz zu untransformierten Brustzelllinien den Fas-Rezeptor nur gering exprimieren [63]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Fas-Expression mit einer kleineren Tumorgröße korreliert [64].

Zudem ist bekannt, dass Bcl-2 in ca. 70 % Mammakarzinome exprimiert ist [65]. Die Überexpression von Bcl-2 konnte auch die Kanzerogenität und Metastasierung von MCF-7ADR-Zellen erhöhen [66].

## **1.6. Tumornekrosefaktor-Superfamilie**

### **1.6.1. Allgemeines**

Die Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie besteht aus 19 Liganden und 29 Rezeptoren. Die meisten Liganden sind Typ II Transmembranproteine, die durch Abspaltung ihrer extrazellulären Domäne lösliche Cytokine bilden. TNF-Rezeptoren sind meist oligomerische Transmembranprotein des Typs I oder III, die mehrere



extrazelluläre Cystein-reiche Domänen enthalten. Zudem haben einige der Rezeptoren eine intrazelluläre Todesdomäne, wodurch diese den extrinsischen Apoptoseweg induzieren können (s. 1.5.2). Die spezifischen Bindungen zwischen Ligand und Rezeptor steuern wichtige Funktionen der Zelle wie Proliferation und Apoptose [67-69].

### **1.6.2. Fas/FasL-Interaktion**

Fas ist ein Typ I Transmembranrezeptor und hat eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne, die FasL bindet. Zudem besitzt Fas eine intrazelluläre Todesdomäne, die das Signal zur Einleitung der Apoptose weiterleitet. FasL ist ein trimerisches Protein und wird hauptsächlich von zytotoxischen Lymphozyten, z.B. natürlichen Killerzellen und CD8-positiven T-Zellen, produziert.

Bindet FasL an den Fas-Rezeptor, wird die Trimerisation von FADD induziert. Dadurch wird Pro-Caspase 8 rekrutiert, die durch Autoproteolyse aktiviert wird. Fas, FADD und Pro-Caspase 8 bilden den DISC-Komplex (death-inducing signalling complex). Caspase 8 aktiviert wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die die Apoptose einleiten [70]. Der durch Fas eingeleitete Apoptoseweg spielt eine wichtige Rolle für die Immunantwort, u.a. für den Abbau infizierter Zellen von alten oder gefährlichen Lymphozyten und als Schutz vor Krebsentstehung. Zudem induziert FasL Entzündungsreaktionen, Zellaktivierung und Proliferation in verschiedenen Zelltypen [71, 72].

### **1.6.3. TNFRSF6B und seine Rolle in Apoptose und Krebs**

Tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily member 6b (TNFRSF6B) (auch DcR3 genannt) ist ein Mitglied der TNFR-Familie. Dieser Rezeptor besitzt, im Gegensatz zu den meisten anderen TNFRs, keine Transmembrandomäne und wird

sekretiert. Das Protein ist inklusive Signalpeptid 300 Aminosäuren lang und 33 kDa groß und besitzt vier Cystein-reiche Domänen (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4: TNFRSF6B-Proteinstruktur**

SP: Signalpeptid; CRD: Cystein-reiche Domäne; Die Zahlen markieren den Startpunkt der jeweiligen Domäne in der Aminosäuresequenz.

TNFRSF6B lokalisiert am Telomer des Chromosoms 20 (20q13.3). Diese Region wird sowohl mit Krebs als auch mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [73-75]. TNFRSF6B ist in der Lage die Liganden FasL, LIGHT und TL1A zu binden [76]. FasL wird hauptsächlich in Lymphozyten, wie natürlichen Killerzellen und CD8-positiven T-Zellen gebildet und trägt zur Zerstörung abnormaler oder infizierter Zellen bei [70]. FasL induziert den extrinsischen Apoptoseweg in Zielzellen durch die Bindung an den Fas-Rezeptor (s. 1.5.2. oder 1.6.2.) [71].

TNFRSF6B ist in vielen Krebsarten, wie z.B. Eierstöcken [77], Pankreas [78], Darm [73, 79] und Leber [80], und Autoimmunerkrankungen [81] überexprimiert. Tumorsekretiertes TNFRSF6B könnte zur Umgehung der Immunantwort beitragen, indem es die apoptotischen Signale von Lymphozyten, die FasL und LIGHT exprimieren, blockiert [82-84]. Die Bindung des Zytokins FasL an TNFRSF6B neutralisiert FasL und verhindert somit die Aktivierung von Fas. Dadurch wird auch die Induktion der Apoptose verhindert. TNFRSF6B-exprimierende Tumorzellen können so die zytotoxische Attacke umgehen [85]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TNFRSF6B die Actin-Reorganisation induziert und die Adhäsion von Monozyten und THP-1-Zellen erhöht, indem es Signalmoleküle, wie PKC, PI3K, FAK und Src-Kinasen aktiviert, was für eine Modulation der Zellfunktion durch TNFRSF6B spricht [86].

Andere Studien zeigen, dass Entzündungen ein Hauptfaktor für die Expression von TNFRSF6B sind [81, 87].

Die Rolle von TNFRSF6B in Brustkrebs ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Wu et al. zeigten, dass TNFRSF6B in Brustkrebsgewebe überexprimiert wird [88]. Zudem zeigten Ge et al., dass ein Knock-down von TNFRSF6B in MCF7-Brustkrebszellen einen inhibitorischen Effekt auf die Zellinvasion und -migration hat [89].

## **1.7. Death Associated Proteins**

### **1.7.1. DAP-Familie**

Die Death Associated Protein (DAP)-Familie besteht u.a. aus den Proteinen DAP1, DAP3, DAP5 und DAPK (DAP Kinase). Die Proteinfamilie scheint sowohl für den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg eine Rolle zu spielen.

So konnte gezeigt werden, dass DAPK in Apoptosewege involviert ist, die durch IFN (Interferon)- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Fas induziert werden [90, 91]. DAPK besitzt eine 160 kDa große Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Kinase sowie eine Todesdomäne, die zur pro-apoptotischen Funktion beitragen. Die Überexpression von DAPK induziert die Apoptose in HeLa-Zellen [92]. Außerdem zeigten Inbal et al. die Expression von DAPK in vielen Geweben und Zellen und dessen Induktion durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes [91]. Zudem wird DAPK als Tumorsuppressorgen gehandelt, da es in bestimmten Krebsarten herunterreguliert ist [93].

DAP3 ist ein 46 kDa großes ribosomales Protein des Mitochondriums mit einem potentiellen P-Loop-Motiv zur Nukleotid-Bindung. Es scheint außerdem ein positiver Mediator der Apoptose zu sein. So konnte gezeigt werden, dass eine DAP3-Überexpression in HeLa-Zellen den Zelltod induziert bzw. ein DAP3-Knock-down trotz steter IFN- $\gamma$ -Gabe die Zellviabilität erhöht [94]. Außerdem konnte eine einzelne Aminosäure-Mutation im P-Loop-Motiv den Zelltod abschwächen, was für die

Wichtigkeit der Nukleotid-Bindungseigenschaft für die Apoptose-fördernde Wirkung spricht [95].

DAP5 ist ein 97 kDa großes Protein, das große Ähnlichkeit mit der C-terminalen Region von eIF4G, einer Untereinheit von eIF4F, zeigt. DAP5 ist in der Lage die Translations-Initiationsfaktoren eIF3 und eIF4A zu binden, wirkt aber als Translations-repressor, indem es translatorisch inaktive Komplexe bildet.

DAP1 ist ein 15 kDa großes, Prolin-reiches Protein mit zwei möglichen CDK-Phosphorylierungs-Stellen. Es lokalisiert im Zytoplasma und liegt i.d.R. als Phosphoprotein vor. DAP1 vermittelt die IFN- $\gamma$ -induziert Apoptose, wobei die biochemische Funktion, aufgrund fehlender Motive, nicht geklärt ist. DAP1 wurde zudem als Substrat für mTOR, einem Hauptregulator der Autophagie, identifiziert. Das im phosphorylierten Zustand inaktive Protein scheint bei Aktivierung die Autophagie zu unterdrücken [96].

### **1.7.2. DAPs in Krebs**

DAPs scheinen eine wichtige Rolle für die Entstehung und Progression von Krebs zu spielen. So gibt es einen möglichen Zusammenhang zwischen DAP-Proteinen und dem klinischem Verlauf bei Patienten mit Krebs. So stellten Lehmann et al. einen Zusammenhang zwischen der Promotorhypermethylierung der DAP-Kinase und dem invasiven lobulären Mammakarzinom her [93]. Sugita et al. zeigten eine Verbindung zwischen der Methylierung von DAPK und einer reduzierten Antwort auf Chemotherapie sowie einer schlechten Prognose bei Magenkrebs [97]. Zudem konnte die Tumorsuppressorfunktion von DAPK gezeigt werden: der Verlust der DAPK-Expression hat einen positiv-selektiven Vorteil während der Bildung von Lungenmetastasen; die Transfektion von DAPK erhöht wiederum die Sensibilität für Apoptose-induzierende Stimuli und steigert die anti-metastatische Funktion [91].

In Darmkrebs konnte eine verringerte Expression des DAP1-Transkripts in Zusammenhang mit einem schlechteren Verlauf und Metastasierung gezeigt werden.

Zudem erhöht der Knock-down von DAP1 die Zellmigration und -invasion in Darmkrebszelllinien [98]. DAP1 scheint auch eine pro-apoptotische Rolle in Brustkrebs zu spielen. So korrelieren geringe DAP1-mRNA-Level mit höheren Tumorstadien [99] und DAP1-Knock-down-Linien von MDA-MB-231 und MCF7 zeigen eine höhere Adhäsion und Migration der Zellen [100].

Eine verringerte DAP1-Expression scheint einen starken Einfluss auf Krebszellen zu haben und auch für die Brustkrebsentwicklung eine Rolle zu spielen.

### **1.7.3. DAPL1**

Death Associated Protein-Like 1 (DAPL1), auch EEDA (Early Epithelial Differentiation-Associated Protein) genannt, ist ein größtenteils uncharakterisiertes Protein. Das Protein ist 107 Aminosäuren lang und hat eine Größe von ca. 11,9 kDa. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu DAP1 (Death Associated Protein 1) wird eine Rolle in der frühen Epitheldifferenzierung oder Apoptose angenommen. Sun et al. konnten eine Expression des Proteins in frühen differenzierenden Zellen zeigen und vermuten eine mögliche Rolle für die frühe Epitheldifferenzierung [101].

## **1.8. Ziel der Arbeit**

Als häufigste Krebsform bei Frauen weltweit ist Brustkrebs Gegenstand intensiver biochemischer und genetischer Studien gewesen. Doch noch immer fehlen relevante molekulare Informationen über die Tumorentwicklung und über dynamische Proteininteraktionen. In dieser Arbeit verwenden wir ein dreidimensionales Zellkulturmodell als System für die Acini-Bildung der Brustepithelzelllinie MCF-10A, welches die Bildung von Brustdrüsengewebe simuliert. Diese Methode hilft, sich den *in vivo* – Eigenschaften von Zellen, z.B. bezüglich Wachstum und Zellkommunikation im Vergleich zu einschichtigen Zellrasen, anzunähern. Ein Fokus dieser Arbeit liegt in

der Analyse verschiedener Acini-Stadien via Genexpressionsanalyse und Reverse Phase Protein Array (RPPA) um Signalkaskaden zu charakterisieren, die zur Ausbildung reifer Acini führen. Darauf basierend, die Identifizierung potentieller Kandidatengene, die zur Entstehung von Brustkrebs führen könnten. Ein weiterer Fokus liegt auf der Analyse von stromal-epithelialen Interaktionen im Hinblick auf den Einfluss von normalen und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf die Acini-Entwicklung.

---

# **M**MATERIAL UND **M**METHODEN

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper

Antikörper	Merkmale	Anbieter	Verdünnung IF	Verdünnung WB	Verdünnung 3D-IF
ANGPTL4	rb PK	Santa Cruz	—	1:500	—
Anti-Maus IgG (Fab spezifisch)	Ziege	Sigma-Aldrich	—	—	Für Block-Lösung 20 µg/ml
αSMA	rb PK	Abcam	—	1:400	—
DAPL1	rb PK	Santa Cruz	—	1:100	—
Flag-tag	m MK	Sigma	1:800	1:1000	
GM130	rb MK	Epitomics	1:400	—	1:100
GPNMB	m MK	Santa Cruz	—	1:100	—
H3P	rb PK	Upstate	1:800	1:2000	1:100
Laminin5	m MK	Millipore	1:400	—	1:100
myc tag	m MK	Upstate	1:1000	1:1000	—
TNFRSF6B	m MK	BioLegend	—	1:200	—
β-actin	m MK	Sigma	—	1:40000	—

IF: Immunfluoreszenzfärbung

PK: polyklonal

WB: Western Blot

m: Maus

MK: monoklonal

rb: Kaninchen (rabbit)



**Tabelle 3: Sekundärantikörper**

Antikörper	Anbieter	Verdünnung IF	Verdünnung WB	Verdünnung 3D-IF
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Molecular Probes	1:2000	—	1:200
Alexa Fluor 594 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Molecular Probes	—	—	1:200
Alexa Fluor 594 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Molecular Probes	1:2000	—	1:200
Peroxidase(HRP) Esel anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	—	1:2000	—
Peroxidase(HRP) Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova	—	1:2000	—

H: schwere Kette des Antikörpers

L: leichte Kette des Antikörpers

### 2.1.2. siRNAs

**Tabelle 4: siRNAs**

Name	Typ	Anbieter
ANGPTL4 (51129)	siGenome SMARTpool	Thermo Scientific
DAPL1 (92196)	siGenome SMARTpool	Thermo Scientific
GPNMB (10457)	siGenome SMARTpool	Thermo Scientific
Non-Targeting siRNA Pool #2	siGenome SMARTpool	Thermo Scientific
TNFRSF6B (8771)	siGenome SMARTpool	Thermo Scientific

### 2.1.3. Plasmide

Tabelle 5: Plasmide

Name	Beschreibung	Tag	Anbieter
ANGPTL4	TrueORF Gold clone	c-term Myc-DDK	OriGene
DAPL1	TrueORF Gold clone	c-term Myc-DDK	OriGene
GPNMB	TrueORF Gold clone	c-term Myc-DDK	OriGene
pCMV6-Entry	TrueORF Gold clone	c-term Myc-DDK	OriGene
TNFRSF6B	TrueORF Gold clone	c-term Myc-DDK	OriGene

### 2.1.4. Laborutensilien

Tabelle 6: Laborutensilien

Laborutensilien	Anbieter
8well-chamber slides	Nunc
96 Well SensiPlate™, schwarz, Glasboden	Greiner Bio-One
Eppendorf Mini Spin Plus	Eppendorf
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf
Neubauer Kammer	Optik Labor
Pasteurpipetten, Einweg	ISO
QIAshredder™	Qiagen
Zellkultur-Flaschen 25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup>	TPP
Zellkultur-Platten 6-, 12-, 24-, 96-Loch	TPP
Zellkultur-Schalen 60 mm, 100 mm	TPP
Zentrifugenröhren 15 ml; 50 ml	Sarstedt

### 2.1.5. Chemikalien

**Tabelle 7: Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Anwendung</b>
4-Hydroxytamoxifen	Sigma	Zellkultur
Acrylamid/Bis Lösung 37,5:1	Serva Electrophoresis	SDS-PAGE/Western Blot
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck	SDS-PAGE/Western Blot
Choleratoxin	Sigma	Zellkultur
DAPI (Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid)	AppliChem	Immunfluoreszenzmikroskopie
EGF	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Fas Ligand (SuperFasLigand)	Enzo Life Science	Zellkultur
G418 (Neomycin)	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Gefitinib	LC Laboratories	Zellkultur
humanes Insulin	Sigma	Zellkultur
Hydrocortison	Sigma	Zellkultur
L-Glutamin	Invitrogen	Zellkultur
Mowiol 4-88	Calbiochem	Immunfluoreszenzmikroskopie
Nonidet P40 (NP-40)	AppliChem	Pufferkomponente
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem	Immunfluoreszenzmikroskopie
Parthenolid	Calbiochem	Zellkultur
p-Phenylendiamin (pda)	Sigma-Aldrich	Immunfluoreszenzmikroskopie
Rapamycin	LC Laboratories	Zellkultur
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Invitrogen	SDS-PAGE/Western Blot
Trypsin-EDTA 10x	Gibco	Zellkultur
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma	Zellkultur

### 2.1.6. Kits und Reagenzien

**Tabelle 8: Kits und Reagenzien**

<b>Kit / Reagenz</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Anwendung</b>
AllPrep <sup>®</sup> DNA/RNA/Protein Mini Kit	Qiagen	DNA/RNA/Protein Präparation
APO LOGIX <sup>™</sup> FAM-LETD-FMK Caspase 8 detection kit	Cell Technology Inc	Apoptose Assay
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Immunfluoreszenzfärbung
CellTiter-Blue <sup>®</sup> Cell Viability Assay	Promega	Zellkultur
Cultrex Basement Membrane Extract	Trevigen	Zellkultur
Dharmafect 1	Thermo Fisher Scientific	Zellkultur
DMEM	Gibco	Zellkultur
DMEM/F12	Gibco	Zellkultur
Effekten Transfektions-Reagenz	Qiagen	Zellkultur
EndoFree <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Plasmid DNA Präparation
Fötales Bovines Serum	Biochrom AG	Zellkultur
Horse Serum	Gibco	Zellkultur
HumanHT-12 v4 BeadChip Kit	Illumina	Genexpressionsanalyse
M-PER Reagent	Thermo Scientific	Proteinextraktion
Pierce <sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Protein- Konzentrationsbestimmung
Prolong Gold	Invitrogen	Immunfluoreszenzfärbung
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmid DNA Präparation
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Gelextraktion
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen	RNA Präparation
Western Lightning Plus-ECL	PerkinElmer	Western Blot
Zymoclean <sup>™</sup> Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research	Gelextraktion

### 2.1.7. Pufferliste

Tabelle 9: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1. Block-Lösung	10 % Ziegen Serum in IF-Puffer
10x Annealing-Puffer	100 mM K-acetat; 30 mM HEPES-KOH (pH 7,4); 2 mM Mg-acetat
2. Block-Lösung	10 % Ziegen Serum; 20 µg/ml anti-Maus-IgG in IF-Puffer
6x DNA Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF; 30 % Glycerol
Glycin/PBS	1,5 g Glycin in 200 ml PBS
IF-Puffer	0,1 % BSA; 0,2 % TritonX; 0,05 % Tween20 in PBS
Laemmli Ladepuffer 2x	4 % SDS; 20 % Glycerol; 10 % β-Mercaptoethanol; 0,004 % Bromphenolblau (Applichem); 0,125 M Tris pH 6,8
Laufgel-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris; 0,4 % SDS
Mowiol	6 g Glycerol; 2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem); 6 ml ddH <sub>2</sub> O; 12 ml 0,2 M Tris-HCl
Paraformaldehyd-Lösung	4 % PFA in PBS
PBS 10x (pH 7,4)	1,37 M NaCl; 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 78,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 26,8 mM KCl
PBS-T	0,003 % TritonX 100 in PBS
Polyacrylamid Laufgel	3,5 ml H <sub>2</sub> O; 4,15 ml 30 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1; Serva); 4,6 ml Laufgel-Puffer; 10 µl Temed (Invitrogen); 83 µl 10 % APS (Applichem)
Polyacrylamid Sammelgel	3 ml H <sub>2</sub> O; 0,6 ml 30 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1; Serva); 1,3 ml Sammelgel-Puffer; 4 µl Temed (Invitrogen); 58 µl 10 % APS (Applichem)
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S (Sigma); 5 % Essigsäure
Sammelgel-Puffer pH 6,8	0,5 M Tris; 0,4 % SDS
SDS-PAGE Laufpuffer 10x	250 mM Tris base; 2,5 M Glycin; 1 % SDS
TAE 10x pH 8,5	0,4 M Tris base; 0,01 M EDTA; 0,2 M Essigsäure
TE 10x	100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA
Western Blot Transfer-Puffer	4,55 g Tris-HCl ; 21,6 g Glycin; 300 ml Methanol; auffüllen auf 1,5 l mit ddH <sub>2</sub> O

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Isolation von Acini**

Um das Matrigel der 3D-Kulturen aufzulösen und die Acini für weitere Analysen zu isolieren, wurde das Medium abgenommen und die Kulturen mit kaltem PBS/EDTA (5 mM) versetzt. Das Gel wurde vorsichtig abgelöst und zerteilt und mit dem PBS/EDTA in ein Falcon überführt. Die Falcons wurden auf Eis auf einem Schüttler für 15 min inkubiert und anschließend 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und der Waschschrift 2-3x wiederholt, bis das Matrigel vollständig gelöst war. Anschließend wurden die Acini pelletiert und zur RNA- oder Proteinisolierung verwendet.

### **2.2.2. Präparation von total-RNA**

Die total-RNA wurde mittels RNeasy Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers extrahiert und in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Zellen der 2D-Kontrolle wurden direkt mit dem Lysispuffer des Kits versetzt. Die Zellen/Acini der 3D-Kulturen wurden zunächst isoliert (s. 2.2.1) und anschließend die RNA präpariert (nach Angaben des Herstellers).

### **2.2.3. Genexpressionsanalyse (mRNA Profiling)**

Für die genomweite Expressionsanalyse wurde das HumanHT-12 v4 BeadChip Kit (Illumina) verwendet. Probenbearbeitung und Messungen wurden von der Service Gruppe des MPI für Molekulare Genetik (Berlin) durchgeführt.

Die statistischen Analysen der Microarray-Daten wurden von Felix Dreher (Bioinformatik Gruppe, Abt. Lehrach, MPI für Molekulare Genetik (Berlin)) durchgeführt. Dafür wurde das limma-Paket für die R-Software genutzt.

#### **2.2.4. GO-Enrichment-Analyse**

Es wurde eine Überrepräsentationsanalyse der Daten der Genexpressionsanalyse mit Hilfe des R-/Bioconductor-Pakets GOstats<sup>1</sup> durchgeführt (p-Wert-Grenze: 0.001).

Zudem wurden die Genlisten hinsichtlich GO direkt miteinander verglichen, wobei die relative Anreicherung von GO-Level-1-Termen berechnet wurde. Die Analysen wurden von Felix Dreher (Bioinformatik Gruppe, Abt. Lehrach, MPI für Molekulare Genetik (Berlin) durchgeführt.

#### **2.2.5. Reverse Phase Protein Array (RPPA)**

Die jeweiligen Kulturen wurden isoliert und anschließend in MPER-Puffer lysiert. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mittels BCA-Assay (2.2.9.) bestimmt. Die Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt. Die Probenbearbeitung und -messung erfolgte durch Frauke Henjes (AG Korf, DKFZ Heidelberg) nach der in Loebke et al. durchgeführten Methode [102]. Jede Probe wurde dreifach gemessen.

#### **2.2.6. SDS-PAGE**

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [103] durchgeführt. Dafür wurden die Zellsuspensionen 5 min bei 4500 rpm (Eppendorf Mini Spin Plus) abzentrifugiert und das Pellet in 2x Laemmli-Puffer (Tabelle 9) resuspendiert. Die Proben wurden für 10 min bei 99 °C (Eppendorf Thermomixer) denaturiert und konnten anschließend bei -20 °C gelagert werden.

Für die Auftrennung wurden die Proben auf ein Polyacrylamid-Gel (Tabelle 9) aufgetragen. Als molekularer Gewichtsstandard diente die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Die Auftrennung erfolgte in einer

---

<sup>1</sup> <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GOstats.html>

Gelelektrophoresekammer (EMBL Werkstatt) in SDS-Laufpuffer (Tabelle 9) bei 25 mA mittels dem BioRad PowerPac 300-Netzgerät.

### **2.2.7. Western Blot**

Für den immunchemischen Nachweis spezifischer Proteine wurde ein Western Blot nach Towbin et al. [104] durchgeführt. Dabei wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel bei 400 mA im nassen Tank-Blot-Verfahren in einer Hoefer TE 22-Blotkammer (Amersham Biosciences) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, Porengröße 0,45 µm) transferiert. Der Transfer wurde durch Ponceaufärbung (Tabelle 9) überprüft und die Membran in 5 % Milchpulverlösung (in PBS-0,05 % Tween) geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C mit dem Primärantikörper (verdünnt in 5 % Milchpulverlösung) inkubiert. Die Membran wurde 4x 10 min mit PBS-Tween gewaschen und dann mit einem mit der Peroxidase(HRP)-konjugierter Sekundärantikörper (verdünnt in 5 % Milchpulverlösung) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (4x 15 min mit PBS-Tween) erfolgte die Entwicklung mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (PerkinElmer Life Science). Das Signal wurde mit einem Super RX Röntgenfilm (Fuji) detektiert.

### **2.2.8. Wiederverwendung der Western Blot-Membran**

Um die Western Blot-Membran nacheinander auf mehrere Proteine hin zu untersuchen, wurde diese für maximal 15 min in 0,5 M Natriumhydroxid (NaOH) inkubiert um die Antikörper von dem vorhergehenden Immunodetektionsexperiment zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 2x 5 min mit PBS-Tween gewaschen und konnte nun erneut mit Antikörpern inkubiert werden.



### **2.2.9. BCA-Assay**

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung der RPPA-Proben wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet. Dafür diente das Protokoll für die Mikroplatten-Prozedur des Herstellers. Die Messung der Standards und Proben erfolgte jeweils in Duplikaten im Mikrotiterformat (96-Loch-Platte). Für die Erstellung der Eichgeraden dienten Rinderserumalbumin (BSA)-Standards mit einer Konzentration von 0,5 bis 200 µg/ml. Die Absorption wurde per Elisa-Reader bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Gleichung der Eichgeraden berechnet.

### **2.2.10. Zellviabilitäts-Assay nach FasL-Behandlung**

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. Um die Zellviabilität nach der Behandlung mit FasL zu untersuchen, wurden zunächst geeignete Parameter, wie FasL-Konzentration und Behandlungsdauer ermittelt. Dafür wurden MCF10A-Zellen mit einer Dichte von 2500 Zellen/Well, Fibroblasten-Linien mit 2000 Zellen/Well in 96-Loch-Platten (TPP) ausgesät und ÜN wachsen lassen. Die Zellen wurden mit verschiedenen FasL-Konzentrationen (1; 2,5; 5; 10; 25; 50 und 100 ng/ml) für 24 h und 48 h behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte MCF10A-Zellen. Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten. Ca. 2 h vor Ablauf der Behandlungszeit wurde 20 µl CellTiter-Blue®-Reagenz zu den Zellen gegeben und für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Fluoreszenz-Platten-Lesegerätes DTX Series Detector (DTX 880; Beckman Coulter) mit einem Anregungsfilter von 535 nm und einem Emissionsfilter von 595 nm gemessen und anhand der Daten die Viabilität der Zellen berechnet.

Für den eigentlichen Zellviabilitätstest wurden verschiedene Zelllinien nach obigem Schema ausgesät und für 24 h mit 10 ng/ml und 25 ng/ml FasL behandelt. Als Kontrolle diente die jeweilige unbehandelte Zelllinie.

### **2.2.11. Zellviabilitäts-Assay von Fibroblasten**

Für die Untersuchung der Effekte unterschiedlicher Wirkstoffe auf die Fibroblastenzelllinien wurden je 2000 Zellen/Well in 96-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Wirkstoffe Gefitinib, Parthenolid, Rapamycin und Tamoxifen in je fünf verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben und für 24 h und 48 h inkubiert. Als Kontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel der Wirkstoffe (Ethanol oder DMSO) in der Konzentration zu den Zellen gegeben, wie in der Wirkstoff-Höchstkonzentration vorhanden. Die Messung und Auswertung des Assays erfolgte wie in 2.2.10. angegeben.

### **2.2.12. Apoptose-Assay**

Der Apoptose-Assay wurde mit Hilfe des APO LOGIX™ FAM-LETD-FMK Caspase 8 detection kit (Cell Technology Inc) nach Angaben des Herstellers (Protokoll X. A. Adherente Zellen) durchgeführt.

Zunächst wurden die Wells einer 96 Well SensoPlate™ (Greiner Bio-One) mit PLL (100 µg/ml) beschichtet. Dann wurden verschiedenen Zelllinien mit einer Dichte von 8000 Zellen/Well ÜN ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für 24 h mit 10 ng/ml und 25 ng/ml FasL behandelt. Als Kontrolle diente die jeweilige unbehandelte Zelllinie. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurde das 30x Caspase 8-Detektionsreagenz im Verhältnis 1:30 zum Medium hinzugegeben und für 1-2 h im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde 3x mit 1x Waschpuffer (200 µl/Well) gewaschen und mit 4 % PFA/PBS (100 µl/Well) für 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI (1 µg/ml) für 2 min gefärbt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Dann wurden je 100 µl PBS zu den Wells gegeben und die Platte mit einer Folie verschlossen.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung des Apoptose-Assays erfolgte mit Hilfe des Cellomics® ArrayScan® VTI HCS Reader (s. 2.4.4.).

### **2.2.13. Transformation**

Die Transformation der Expressionsvektoren erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* Top10-Zellen (Invitrogen). Dazu wurde je 1 µl Plasmid-DNA zu 25 µl kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und dann in 200 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen) aufgenommen und 1 h bei 500 rpm auf 37 °C (Eppendorf Thermomixer) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (Eppendorf Mini Spin Plus 4500 rpm, 5 min), in 100 µl des Mediums resuspendiert und auf LB-Agar-Ampicillin (Amp) -Platten (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden ÜN-Kulturen in LB-Amp (100 µg/ml) angesetzt.

### **2.2.14. Plasmid-Präparation**

Die Plasmid-Präparation von ÜN-Kulturen erfolgte mit dem QIAprep Miniprep-Kit (Qiagen) oder dem EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers für Plasmid DNA Aufreinigung. Die aufgereinigten Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau (s. 2.2.15.) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

### **2.2.15. Restriktionsverdau**

Um die aufgereinigten Plasmide auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, wurden sie mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.17.) aufgetrennt. Die erhaltenen Bandengrößen wurden mit den erwarteten Bandengrößen verglichen. Die verwendeten Restriktionsenzyme und der Restriktionsansatz sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 10: Restriktionsenzyme**

Restriktionsenzym	Hersteller
BamHI	NEB
EcoRI	NEB
NotI	NEB
PvuI	NEB
SacI	NEB

**Tabelle 11: Restriktionsansatz**

Komponente	Volumen
Plasmid	3 µl
Restriktionsenzym	0,5 µl
Restriktionspuffer	1 µl
10x BSA	1 µl
H <sub>2</sub> O	auf 10 µl

### 2.2.16. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Integrität der aufgereinigten Plasmide zu überprüfen, wurde eine PCR nach Saiki et al. [105] auf Plasmid-DNA mit spezifischen Sequenzier-Primern (VP1.5, XL39; Origene) durchgeführt. Für die Synthese wurde der Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) verwendet. Die PCR wurde nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 12) durchgeführt:

**Tabelle 12: Pipettierschema für PCR**

Komponente	Volumen
Plasmid DNA	100 – 200 ng
Primer VP1.5 (Origene) (10mM)	0,6 µl
Primer XL39 (Origene) (10mM)	0,6 µl
dNTPs (10mM) (PeqLab)	0,4 µl
TaqPlusPrecision DNA Polymerase mixture (Stratagene)	0,1 µl
TaqPlusPrecision DNA 10x Polymerase Buffer (Stratagene)	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
H <sub>2</sub> O	auf 20 µl

Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 13: PCR-Bedingungen**

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	15 sek	
Annealing	Primer $T_m - 5^\circ\text{C}$	30 sek	30
Elongation	72°C	1 min	
finale Elongation	72°C	10 min	1
Lagerung	16°C	$\infty$	1

### 2.2.17. Agarose-Gel-Elektrophorese

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurden 0,8 %ige Agarose-Gele (in TAE Puffer (Tabelle 9)) gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer (Tabelle 9) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard dienten die 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) oder die 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Die DNA wurde bei ca. 80 mV mit dem BioRAD PowerPac 3000-Netzgerät elektrophoretisch aufgetrennt.

## 2.3. Zellkultur

### 2.3.1. Zelllinien

Tabelle 14: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Produkt-Nr./Anbieter	Medium
PC-breast 60161A1	Human, primäre Fibroblasten, invasiv-duktales Karzinom der Brust Stadium IIB; adhären	PC60161A1-CAF-P0; Asterand	DMEM; 10 % FCS; 1 % L-Glu
PC-breast 60161B1	Human, primäre Fibroblasten, Tumor-angrenzendes Gewebe, invasiv-duktales Karzinom der Brust Stadium IIB; adhären	PC60161B1-CAF-P1; Asterand	DMEM; 10 % FCS; 1 % L-Glu
MCF10A	Human, Brustepithelzellen; Normal; adhären	ATCC-CRL-10317; ATCC	DMEM/F12; 5 % HS; 20 ng/ml EGF; 0,5 µg/ml Hydrocortison; 10 µg/ml humanes Insulin; 0,1 µg/ml Cholera toxin
E. coli Top10	Chemisch kompetent	Invitrogen	LB-Medium

### 2.3.2. Kultivierung

Die humanen Zelllinien wurden in verschiedenen Medien kultiviert (s. Tabelle 14). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup>; TPP) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in einem Inkubator kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt und die Zellen bei ca. 80 % Konfluenz gesplittet. Dafür wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen mit 5ml warmem PBS gewaschen und anschließend 5 min trypsinisiert (1x Trypsin-EDTA, Gibco). Zellen, die in DMEM kultiviert wurden, wurden in DMEM resuspendiert und nach Bedarf 1:2 bis 1:4 in neues Medium gesplittet. In DMEM/F12 kultivierte Zellen wurden nach der Trypsinierung in Resuspensionsmedium (DMEM/F12 + 10 % HS) resuspendiert in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 min bei RT und 1200 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R). Dann wurde das Medium abgenommen

und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer (Optik Labor) bestimmt und die Zellen mit der benötigten Dichte von 1500 Zellen/cm<sup>2</sup> bis 10000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

### **2.3.3. Dreidimensionale Zellkultur (3D-Kultur) (On Top Method)**

Medium für MCF10A: DMEM F12 + 2 % HS + Zusätze

Medium-Mix: Medium mit 2 % Cultrex und 20 ng/ml EGF

Um die Zellen dreidimensional wachsen zu lassen, wurden 8 well-chamber slides (Nunc) mit 60 µl/Well eiskaltem Matrigel (Cultrex Basement Membrane Extract; Trevigen) beschichtet. Für die Polymerisation des Matrigels wurden die Slides für 30 min bei 37 °C im Zellinkubator inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Medium-Mix hergestellt (400 µl/Well), die Zellen trypsiniert, gezählt und in 3D-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2500 Zellen/Well ausgesät und der Medium-Mix alle 4 Tage gewechselt.

Für Genexpressionsanalysen und RPPA wurden die Zellen in einer Dichte von 30000 Zellen/Well in Matrigel-beschichteten 6-Loch-Platten ausgesät.

### **2.3.4. Stabile Transfektion von MCF10A Zellen**

Für die stabile Transfektion von MCF10A Zellen wurde das Effekten Transfektions-Reagenz (Qiagen) verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 10000 Zellen/cm<sup>2</sup> ( $\triangleq 10^5$  Zellen/6-Well) in ein Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Transfektion folgendermaßen durchgeführt:

0,4 µg Plasmid-DNA wurde in EC-Puffer zu einem finalen Volumen von 100 µl verdünnt. 3,2 µl Enhancer wurden hinzugefügt und die Lösung für 1 sek gevortext

und dann 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 10 µl Effekten hinzugegeben, die Lösung 10 sek gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und 1,6 ml frisches Medium hinzugegeben. Dann wurden 600 µl frisches Medium zum Transfektionsmix gegeben und die Lösung tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 24 h der Transfektion wurde die Selektion durch Zugabe von Medium mit 400 mg/ml G418 für 14 Tage begonnen.

### **2.3.5. 3D-Kultur nach Knock-down**

MCF10A-Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von 50000 Zellen/Well ausgesät und ÜN anwachsen lassen. Am nächsten Tag wurde ein Knock-down mittels Dharmafect Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Jede Transfektion erfolgte in Duplikaten mit jeweils 1 µl/ml der in Tabelle 4 angegebenen siRNAs und 0,5 µl/ml Dharmafect Transfektionsreagenz. Die Zellen wurden 72 h mit dem Transfektionsmix inkubiert und anschließend trypsinisiert. Die behandelten Zellen wurden nun als 3D-Kultur mit je 2500 Zellen/cm<sup>2</sup> für die licht- und immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung ausgesät. Das Wachstum der Acini wurde an Tag 7 und Tag 10 lichtmikroskopisch dokumentiert. Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung erfolgte an Tag 11 des Acini-Wachstums. Die übrigen Zellen wurden nach dem Knock-down gewaschen, gesammelt und für die SDS-PAGE vorbereitet.

### **2.3.6. Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten**

Die Fibroblastenzelllinien 60161A1 und 60161B1 wurden mit einer Dichte von 80000 Zellen/Well in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und frisches Medium mit den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen zugegeben. Die anschließenden Wirkstoffe wurden in den



angegebenen Lösungsmitteln gelöst und in folgenden Konzentrationen getestet: Gefitinib (DMSO) (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M), Parthenolid (DMSO) (1  $\mu$ M; 5  $\mu$ M), Rapamycin (DMSO) (1  $\mu$ M; 5  $\mu$ M), Tamoxifen (Ethanol) (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M). Als Kontrolle diente die jeweilige unbehandelte Zelllinie. Jeder Ansatz erfolgte in Triplikaten. Nach 48 h wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 40  $\mu$ l MPER-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 15 min auf Eis inkubiert und dann bei 4 °C und 1400 rpm 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für eine RPPA-Analyse (s. 2.2.5.) verwendet. Die Daten wurden als Box Plots dargestellt. Zusätzlich wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt (mittels Microsoft Excel).

### **2.3.7. 3D-Co-Kultur**

Für die 3D-Co-Kultur wurden MCF10A-Zellen mit 6000 Zellen/24 Well auf Matrigel ausgesät und jeweils eine der beiden Fibroblastenzelllinien 60161A1 und 60161B1 im Verhältnis 1:2 und 2:1 zugegeben. Die Co-Kulturen wurden in einem 1:1-Mix der jeweiligen Standardmedien nach der 3D-On-Top-Methode (s. 2.3.3.) kultiviert. Als Kontrolle dienten 3D-kultivierte MCF10A-Zellen ohne Fibroblasten. Jeder Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die Acini wurden an Tag 7 lichtmikroskopisch fotografiert und die Größe der Acini ausgewertet. Hierfür wurden jeweils mindestens 200 Acini ausgewertet und der Mittelwert der Duplikate gebildet.

## **2.4. Mikroskopie**

### **2.4.1. Immunfluoreszenzfärbung**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (PLL, 100  $\mu$ g/ml) beschichtet und auf eine 24-Loch-Platte (TPP) verteilt. Die Zellen wurden

ausgesät und ÜN anwachsen lassen. Anschließend wurden die Zellen in 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Tabelle 9) für 20 min bei RT inkubiert. Die PFA-Lösung wurde entfernt und die Zellen in -20 °C kaltem Methanol für 5 min bei -20 °C fixiert. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen für 15 min bei RT in PBS-T (Tabelle 9) rehydriert. Anschließend wurden die Deckgläschen in PBS-T mit 1 % BSA für 30-60 min bei RT inkubiert um alle freien Bindungsstellen des Paraformaldehyds zu blocken. Dann wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (verdünnt in PBS-T mit 0,1 % BSA) für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden nun viermal mit PBS-T mit 0,1 % BSA bei RT gewaschen und anschließend max. 45 min mit dem Sekundärantikörper (gelöst in PBS-T mit 0,1 % BSA) inkubiert. Um die DNA anzufärben wurde zusätzlich DAPI in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml für 1 min hinzugegeben und die Zellen anschließend viermal mit PBS-T gewaschen. Für die Mikroskopie wurden die Deckgläschen mit p-Phenylendiamin-haltigem (2 mg/ml) Mowiol (Tabelle 9) auf Objektträgern befestigt.

#### **2.4.2. Immunfluoreszenzfärbung von 3D-Kulturen**

Das Medium wurde vorsichtig von den Slides abgenommen und die Zellen mit 400 µl 4 % PFA für 20 min bei RT fixiert. Das PFA wurde abgenommen und 200 µl 0,5 % TritonX/PBS für 10 min bei 4 °C hinzugegeben um die Zellen zu permeabilisieren. Die Zellen wurde 3x10 min mit 400 µl Glycin/PBS gewaschen um überschüssiges PFA abzufangen. Dann wurden die Zellen zunächst mit 100 µl der ersten Blocklösung für 1 h bei RT und anschließend mit 100 µl der zweiten Blocklösung für 30 min bei RT geblockt. Die Zellen wurden nun mit dem Primärantikörper (verdünnt in zweiter Blocklösung) für 1 h bei RT inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift für 3x 20 min mit 400 µl IF-Puffer. Dann wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in erster Blocklösung) für 45 min bei RT inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift 3x 20 min mit 400 µl IF-Puffer. Um die DNA anzufärben wurden 100 µl DAPI/PBS (0,5 µg/ml) für 15 min zu den Zellen gegeben und anschließend mit 400 µl PBS für

10 min gewaschen. Die Slides wurden mit Prolong gold versehen, mit Deckgläschen fixiert und 2-4 Tage im Dunkeln trocknen lassen. Acini-Formationen wurden mit dem LSM 700 analysiert.

### 2.4.3. Mikroskopie

Zur Auswertung der verschiedenen Zellpräparate wurden die folgenden Mikroskope mit der angegebenen Software für Mikroskopsteuerung und Bildaufnahmen verwendet (s. Tabelle 15).

**Tabelle 15: Mikroskope und Zubehör**

Mikroskop	Anwendung	Software
Axio Imager.Z1	IFM von normalen Zellkulturpräparate	AxioVision (Zeiss)
LSM 700	IFM von 3D-Zellkulturpräparaten	ZEN (Zeiss)
LSM 510 Meta	Lichtmikroskopie von lebenden 3D-Zellkulturen	AxioVision (Zeiss)

### 2.4.4. Cellomics

Für die Auswertung des Apoptose-Assay (s. 2.2.11.) wurde der Cellomics<sup>®</sup> ArrayScan<sup>®</sup> VTI HCS Reader mit der Software Thermo Scientific HCS Studio: Cellomics Navigator Version 6.4.4 genutzt.

### 2.4.5. Digitale Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung, wie z.B. Konvertierung, Kontrastverstärkung etc. wurde mit den Programmen AxioVision LE 4.2 (Carl Zeiss Vision), Adobe Photoshop und Illustrator (Adobe Systems) und ImageJ (NIH, open source software) durchgeführt.

#### **2.4.6. Quantifizierung von Acini-Größen**

Für die Quantifizierung von Acini-Größen wurden zunächst lichtmikroskopische Aufnahmen der Acini am LSM-510 Meta angefertigt. Die Acini wurden anschließend in der AxioVision LE 4.2 Software (Carl Zeiss Vision) ausgemessen. Dafür wurden mit dem Kontur-Werkzeug die Umrise der einzelnen Acini per Hand markiert und so die Fläche der Acini ermittelt. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

---

# ERGEBNISSE

### **3. Ergebnisse**

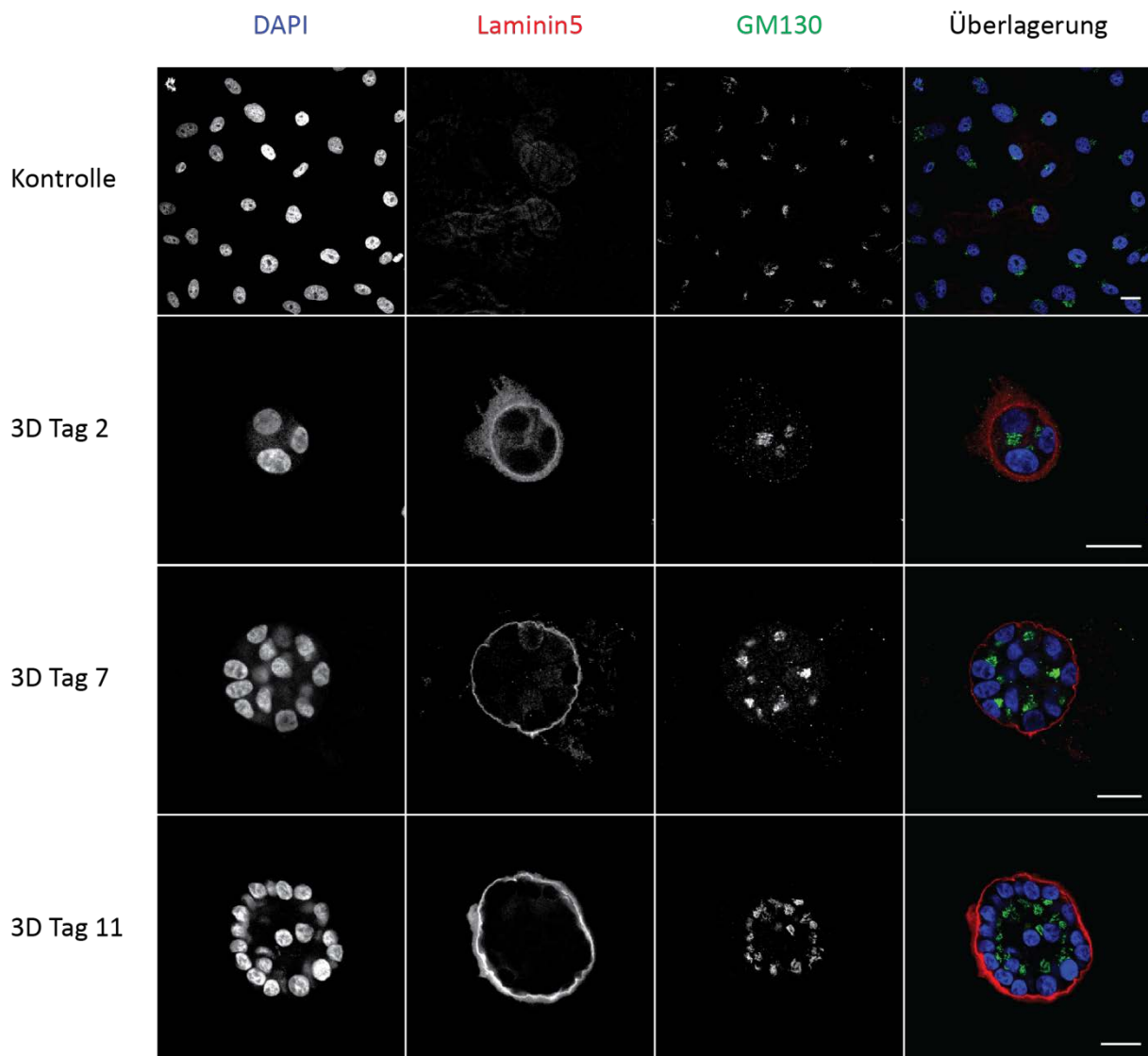
#### **3.1. Untersuchung der Acini-Bildung in MCF10A-Zellen**

MCF10A-Zellen sind nicht-tumorigene epitheliale Zellen der Brust. In einer gewöhnlichen zweidimensionalen Zellkultur (2D-Kultur) bilden sie einen einschichtigen unpolarierten Zellrasen. Kultiviert man MCF10A-Zellen jedoch in einer extrazellulären Matrix (3D-Kultur), bilden sie dreidimensionale brustdrüsenartige Strukturen, auch Acini genannt. Aufgrund dieser Eigenschaften sind MCF10A-Zellen ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Acini-Bildung und für die Untersuchung von potentiellen Zielgenen für die Brustkrebsentstehung.

Um die Vorgänge während der Entstehung und Ausbildung von Acini zu untersuchen, wurden MCF10A-Zellen in 3D kultiviert. Von verschiedenen Stadien der Acini-Formation sowie von einer 2D-Kontrolle wurde RNA und Protein isoliert. Die RNA-Proben wurden für eine Genexpressionsanalyse verwendet. Die Proteinproben dienten zur Durchführung einer RPPA-Analyse. Außerdem wurden die verschiedenen Stadien und Kontrolle fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

##### **3.1.1. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Acini-Stadien**

Die verschiedenen Stadien der Acini-Bildung wurden immunfluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Als Standardmarker für die Immunfluoreszenzmikroskopie der Acini wurden Laminin 5 und GM130 verwendet, die beide als Marker für die apikal-basale Polarisation der MCF10A-Zellen in 3D-Kultur dienen. Kultiviert man MCF10A-Zellen in 3D, beginnen diese, im Vergleich zur 2D-Kultur, zu polarisieren und zu proliferieren und bilden so drüsenähnliche dreidimensionale Strukturen aus, wie in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Stadien der Acini-Bildung in MCF10A-Zellen**

(blau) DAPI: Zellkerne; (rot) Laminin 5: basaler Zellpol; (grün) GM130: apikaler Zellpol; Kontrolle: 2D-Kultur; Maßstab: 20 µm

Das Protein Laminin 5 wird von Zellen sekretiert und an die Basallamina abgegeben. Dies ist in allen Stadien der 3D-Kultur zu erkennen und grenzt den Acinus deutlich nach außen zum Matrigel ab. Das Golgi-Matrix-Protein GM130 richtet sich in polarisierten Zellen zum apikalen Zellpol aus. Wie in Abbildung 5 zu sehen, gibt es in den 3D-Kulturen, im Vergleich zur 2D-Kontrolle, eine hohe Konzentration von GM130 an einer Seite der Zellkerne. Zudem richten sich diese deutlich zum Inneren des

Acinus aus. Typisch für den Verlauf der Acini-Bildung ist außerdem das Größenwachstum der Acini, erkennbar an der vermehrten Zahl der Zellkerne sowie die Bildung des Lumens innerhalb des Acinus, welche ca. ab Tag 8 der Acini-Bildung einsetzt.

### **3.1.2. Genexpressionsanalyse (mRNA Profiling) von Acini-Stadien<sup>2</sup>**

Um Veränderungen in der Genexpression während der Acini-Bildung zu untersuchen wurde RNA von verschiedenen Acini-Stadien (Tag 2, Tag 7 und Tag 11) sowie einer 2D-Kontrolle isoliert. Die RNA wurde für ein genomweites mRNA-Profilings verwendet.

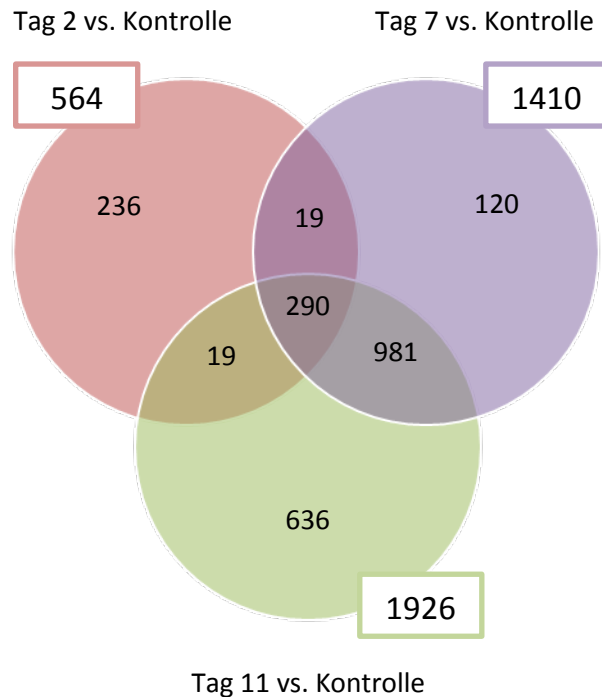
#### **3.1.2.1. Clustering**

Anhand des mRNA-Profilings konnten 2301 Gene identifiziert werden, die während der Acini-Bildung im Vergleich zur Kontrolle reguliert werden. Von diesen sind 236 Gene spezifisch an Tag 2, 120 Gene spezifisch an Tag 7 und 636 Gene spezifisch an Tag 11 reguliert. 290 Gene konnten identifiziert werden, die in allen drei Stadien der 3D-Kultur reguliert sind. Diese scheinen somit eine generelle Rolle für die Bildung und Erhaltung der 3D-Strukturen zu haben. Zudem ist ein Teil der 2301 Gene nur in zwei der drei Stadien reguliert. So lässt sich eine Schnittmenge zwischen Tag 2 und Tag 7 von 19 Genen, zwischen Tag 2 und Tag 11 von 19 Genen und zwischen Tag 7 und Tag 11 von 981 Genen feststellen (Abbildung 6). Diese Schnittmengen repräsentieren die Gene, deren Regulation für den Übergang zwischen den verschiedenen Stadien von Bedeutung ist.

---

<sup>2</sup> In Zusammenarbeit mit Aydah Sabah und Claudia Vogelgesang (Durchführung des Microarrays), und Felix Dreher (Datenanalyse), MPI-MG, Berlin, Deutschland





**Abbildung 6: Genregulation in MCF10A-3D-Kultur im Vergleich zur Kontrolle**

Dargestellt sind Anzahl und Schnittmengen der Gene, die während der verschiedenen Stadien der Acini-Bildung im Vergleich zur 2D-Kontrolle reguliert werden.

Die jeweils 20 am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene für die verschiedenen Acini-Stadien im Vergleich zur 2D-Kontrolle sind in Tabelle 16 dargestellt. Die hochregulierten Gene sind grün, die herunterregulierten Gene rot unterlegt. Zusätzlich sind die später ausgewählten Zielgene „Fett“ markiert. Doppelt auftretende Gene (z.B. GPNMB oder TNFRSF6B) kommen z.B. durch verschiedene Transkriptionsvarianten eines Gens zustande.

Anhand der Genexpressionsanalyse sollten potentielle Zielgene für die Brustkrebsentwicklung gefunden werden. Da Tumorwachstum u.a. durch unbegrenztes Zellwachstum und den Verlust apoptotischer Prozesse charakterisiert ist, wurden die Zielgene aufgrund ihrer möglichen Rolle für die Apoptose ausgesucht. Deshalb wurden TNFRSF6B und DAPL1 als Kandidaten für weitere Untersuchungen gewählt.

Tabelle 16: Am stärksten regulierte Gene der MCF10A-Acini-Stadien

3D Tag 2 / Kontrolle		3D Tag 7 / Kontrolle		3D Tag 11 / Kontrolle	
Symbol	Quotient	Symbol	Quotient	Symbol	Quotient
HMOX1	19,48	KRT15	71,97	GPNMB	67,02
S100P	16,69	LOC651397	46,62	KRT16	38,91
LOC651397	15,01	KRT14	34,40	GPNMB	33,48
ID3	13,54	GPNMB	28,93	LOC729252	30,24
KRT14	12,45	KRT16	23,09	SAA1	27,69
KANK4	11,79	LOC729252	18,07	LOC651397	25,41
ANKRD38	11,75	SLC7A8	17,30	TXNIP	25,14
HSD17B2	10,65	MAOA	16,97	LOC400578	23,52
LOX	9,85	FGFR3	16,70	SGPP2	22,66
CHRNA9	9,73	<b>DAPL1</b>	<b>15,73</b>	KRT15	21,92
SLC7A8	9,33	ANKRD38	15,33	FABP4	21,88
DCN	6,79	ID3	14,89	AQP9	21,09
SCG5	6,75	ID2	14,60	SERPINA3	19,45
ID2	6,42	HSPBL2	14,51	FGFR3	19,19
CES1	6,22	CLCA2	13,55	MGC102966	19,05
CA12	6,12	TXNIP	13,00	S100A7	17,83
GDPD3	5,98	GPNMB	12,97	<b>DAPL1</b>	<b>16,44</b>
ACOT11	5,88	KANK4	12,89	LOC400578	16,28
MFGE8	5,85	CLCA4	12,48	MAOA	16,18
SERPINA3	5,69	CA12	12,33	S100P	14,73
SDPR	0,35	MGC4677	0,15	CCNA2	0,08
KRT80	0,35	UHRF1	0,15	GINS2	0,08
ARHGAP23	0,34	LOC100132240	0,15	FGFBP1	0,08
KRT86	0,34	<b>TNFRSF6B</b>	<b>0,15</b>	EPCAM	0,08
TYMS	0,32	GINS2	0,15	TK1	0,08
ACOX2	0,32	LOC100132240	0,14	UBE2C	0,07
DBNDD2	0,30	DKK1	0,14	TUBA1A	0,07
LOC399942	0,29	ALOX5AP	0,14	UHRF1	0,07
C8orf13	0,29	CDC20	0,14	LOC399942	0,07
TACSTD1	0,28	ALDH1A3	0,13	MGC4677	0,07
EPCAM	0,28	SERPINE2	0,13	UBE2C	0,07
<b>TNFRSF6B</b>	<b>0,27</b>	ACOX2	0,13	THBS1	0,07
C9orf140	0,26	TUBA1A	0,13	TYMS	0,07
FAM167A	0,25	TYMS	0,13	PHGDH	0,07
EFEMP1	0,24	THBS1	0,13	KRT7	0,06
CAMK2B	0,23	LOC399942	0,12	TACSTD1	0,06
FGFBP1	0,22	ALDH1A3	0,11	<b>TNFRSF6B</b>	<b>0,06</b>
KRT80	0,21	CTGF	0,09	HMGA1	0,06
<b>TNFRSF6B</b>	<b>0,18</b>	ANGPTL4	0,08	CDC20	0,04
<b>TNFRSF6B</b>	<b>0,10</b>	<b>TNFRSF6B</b>	<b>0,06</b>	ANGPTL4	0,04

### 3.1.2.2. GO-Analyse<sup>3</sup>

Um herauszufinden welche biologischen Prozesse, wie molekulare Funktionen oder zelluläre Komponenten, im Verlauf der Acini-Bildung aktiv sind, wurde eine Überrepräsentationsanalyse der Genexpressionsanalyse-Daten mit einer p-Wert-Grenze von 0,001 durchgeführt. Für die 290 Gene, die in allen drei Acini-Stadien reguliert sind (s. Abbildung 6), konnte eine Anreicherung von Transkripten gezeigt werden, die u.a. für folgende Prozesse eine Rolle spielen: Zellzyklus, Zellproliferation, Organisation zellulärer Komponenten, Organisation des Zytoskeletts, Gewebeentwicklung, Zellmigration, Regulation der Apoptose und des Zellwachstums. Diese Prozesse spielen während der gesamten Acini-Entwicklung eine wichtige Rolle. Für Tag 2 der 3D-Kultur lassen sich zudem Prozesse, wie Aggregation von Zellkontakten, Zellmigration, Organentwicklung und negative Regulation der Apoptose feststellen, die ein Zeichen für die Organoidentwicklung sind und die Veränderungen beim Übergang von der 2D-Kultur zur 3D-Kultur aufzeigen. Die GO-Listen für die verschiedenen Acini-Stadien sind tabellarisch im Anhang dargestellt. Für einen direkten Vergleich der Acini-Stadien-spezifischen Genlisten hinsichtlich der GO-Terme wurde zusätzlich die relative Anreicherung von GO-Level-1-Termen berechnet. Hierfür wurden zunächst die Acini-Stadien-spezifischen Genlisten, d.h. die Listen der im Vergleich zur 2D-Kontrolle regulierten Gene des jeweiligen Acini-Stadiums, hinsichtlich der Anreicherung von GO-Termen untersucht. Die GO-Level-1-Terme der drei Acini-Stadien wurden anschließend direkt miteinander verglichen und eine relative Anreicherung dieser berechnet. Diese Analyse zeigte jedoch keine eindeutige Anreicherung spezifischer GO-Terme für eines der Acini-Stadien (s. Anhang Abbildung 20).

---

<sup>3</sup> In Kollaboration mit Felix Dreher, MPI-MG, Berlin, Deutschland

### 3.1.3. Reverse Phase Protein Array (RPPA) von Acini-Stadien<sup>4</sup>

Um Veränderungen in der Signalkaskade der MCF10A-Zellen während der Acini-Bildung zu untersuchen wurden Proteinproben von verschiedenen Acini-Stadien (Tag 2, Tag 7 und Tag 11) sowie einer 2D-Kontrolle isoliert. Diese wurden für eine RPPA-Analyse verwendet. Die Proben von Tag 2 konnten jedoch aufgrund zu geringer Proteinkonzentrationen nicht analysiert werden. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der RPPA-Analyse zweier biologischer Replikate dargestellt (RPPA\_1 und RPPA\_2), unterteilt in Proteine und Phosphoproteine. Zudem sind die zu RPPA\_1 gehörigen mRNA-Daten der entsprechenden Gene dargestellt um eine mögliche Korrelation zwischen mRNA und Protein zu zeigen.

RPPA\_1 zeigt u.a. eine Hochregulierung der Proteine AKT, BCL2, gespaltener Caspase 3, cJUN und der Zellkontakt-Marker  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin sowie bestimmter Phosphoproteine wie z.B. pFOXO1/3a, pJAK2 und pPRAS40. Außerdem zeigt RPPA\_1 eine Herunterregulierung von Proteinen wie z.B. BRAF, Caspase 3, NF $\kappa$ B, den Proliferations-Markern CDK2, cMyc, JNK, Ki-67, p70S6K, S6 und ERK1/2 sowie der Phosphoproteine pcJUN, pNF $\kappa$ B, pRB, pS6 und pSRC. Ca. 30 % der mRNA und Protein-Daten korrelieren. Auch im Vergleich der beiden biologischen Replikate korrelieren die Protein-Daten zu ca. 50 %. Es lässt sich jedoch kaum eine gegensätzliche Tendenz der Ergebnisse erkennen.

---

<sup>4</sup> In Kollaboration mit Frauke Henjes (Durchführung des Microarrays und Datenauswertung), AG Korf, DKFZ Heidelberg, Deutschland

Tabelle 17: Vergleich der mRNA und RPPA-Daten

Protein	mRNA	RPPA_1	RPPA_2
4EBP1	0	-	0
ADAM10	0	0	+
AKT	0	+	-
BAD	0	0	n.a.
BCL2	0	+	n.a.
BIM	0	0	0
bRAF	0	-	0
Caspase3	0	-	-
Caspase3_cleaved	n.a.	+	n.a.
CDK2	-	-	-
cJUN	+	+	n.a.
cMyc	0	-	-
CyclinD1	-	0	-
E-cadherin	+	+	+
EGFR	0	+	+
eIF4B	+	+	0
ERBB2	-	+	0
ERK1/2	0	-	+
FOXO3a	+	+	n.a.
GSK3	0	-	0
IRS1	-	-	-
JNK	0	-	-
Ki67	0	-	-
MET	+	n.a.	0
mTOR	0	0	+
NFκB	+	-	0
p27	0	+	n.a.
p70S6K	0	-	-
PCNA	-	-	0
PI3K_p110	0	n.a.	0
PI3K_p85	+	+	-
PRAS40	0	-	0
PTEN	+	0	+
RAC	-	+	n.a.
RB	-	n.a.	-
RhoA	0	-	n.a.
S6	0	-	-
SMAD2	0	-	+
SMAD7	+	-	-
SRC	0	0	0
β-catenin	0	+	+
STAT1	0	-	0
STAT3	+	0	n.a.
TGFbetaRII	-	0	n.a.
TSC1	+	n.a.	+
TSC2	+	0	0
Vimentin	-	0	n.a.

Phosphoprotein	mRNA	RPPA_1	RPPA_2
p4EBP1_T37/46	n.a.	-	-
pcJUN_S63	n.a.	-	-
pcRAF_S289/296/301	n.a.	0	-
peIF4B_S422	n.a.	-	-
pEGFR_Y1173	n.a.	n.a.	0
pERBB2_Y1248	n.a.	0	0
pERK1/2_T202/Y204	n.a.	0	-
pFAK_S843	n.a.	-	n.a.
pFOXO1/4_S319/S262	n.a.	0	-
pFOXO1/3a_T24/T32	n.a.	+	+
pFOXO3a_S253	n.a.	-	n.a.
pFOXO3a_S318/321	n.a.	-	-
pGSK3_Y279/216	n.a.	-	-
pIGF1R_Y1135/1136	n.a.	+	0
pIRS1_S636/639	n.a.	0	0
pJAK2_Y1007/8	n.a.	+	n.a.
pJNK_T183/Y185	n.a.	0	-
pNFκB_S536	n.a.	-	0
pmTOR_S2448	n.a.	n.a.	-
pp70S6K_T421/S424	n.a.	0	-
pPRAS40_T246	n.a.	+	-
pRB_S780	n.a.	-	-
pRB_S807/811	n.a.	-	-
pS6_S235/236	n.a.	-	-
pS6_S240/S244	n.a.	n.a.	-
pSMAD2	n.a.	+	n.a.
pSRC_Y416	n.a.	-	n.a.
pSTAT1_Y701	n.a.	-	n.a.
pSTAT3_S727	n.a.	+	n.a.
pY	n.a.	0	0

+	hochreguliert
-	herunterreguliert
0	keine differentielle Expression
n.a.	Daten nicht vorhanden
	mRNA und RPPA_1 korrelieren
	RPPA_1 und RPPA_2 korrelieren

## **3.2. Untersuchung der Überexpression von Kandidatenproteinen**

### **3.2.1. Expressionsvektoren**

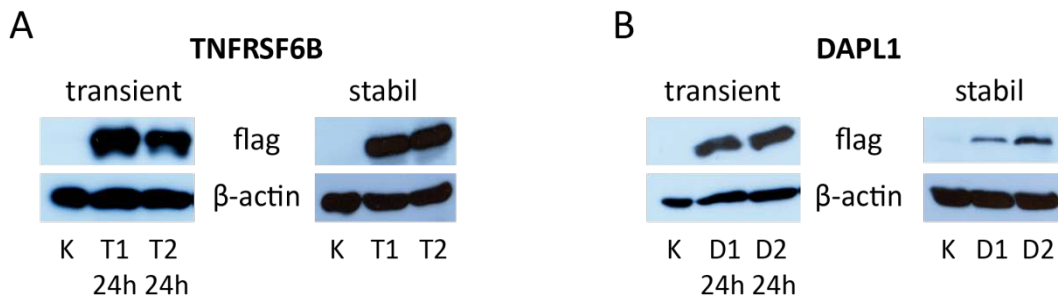
Die Gene *TNFRSF6B* und *DAPL1* waren unter den am stärksten regulierten Genen der Genexpressionsanalyse der MCF10A-Acini-Stadien (Tabelle 16). *TNFRSF6B* spielt eine wichtige Rolle im extrinsischen Apoptoseweg und *DAPL1* wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu DAP eine mögliche Rolle für die Apoptose zugesprochen. Jedoch ist *DAPL1* ein größtenteils unbeschriebenes Protein. Um den Einfluss der Überexpression der Zielgene *TNFRSF6B* und *DAPL1* auf MCF10A-Zellen zu untersuchen, wurden „TrueORF Gold clones“ von Origene für die Transfektion von MCF10A-Zellen verwendet. Diese Vektoren besitzen einen C-terminalen Myc-DDK-tag und werden durch einen Cytomegalievirus (CMV) -Promotor konstitutiv exprimiert.

Als Kontrolle wurden MCF10A-Zellen mit dem entsprechenden Leervektor pCMV6-Entry von Origene transfiziert. Diese Entry-Vektor-Zelllinie wurde ursprünglich in den folgenden Überexpressions (ÜE)-Versuchen als Transfektionskontrolle mitgeführt. Jedoch zeigte die Entry-Vektor-Zelllinie bereits im Vorfeld Einschränkungen im Zellwachstum und auch im Verlauf der verschiedenen ÜE-Versuche konnte kein reproduzierbares Verhalten der Zellen beobachtet werden. Deshalb wurde sie aus der Auswertung genommen und stattdessen untransfizierte MCF10A-Zellen konsistent als Kontrolle für die Versuche mit den ÜE-Zelllinien genutzt.

### **3.2.2. Transfektion von MCF10A-Zellen**

Um eine Überexpression der Zielgene *TNFRSF6B* und *DAPL1* in MCF10A-Zellen zu erreichen, wurden diese mit Effectene Transfektions-Reagenz transfiziert. Ein Teil der zunächst transienten ÜE-Zellen wurde weiterkultiviert und mit G418 selektiert um stabile Zellkulturen zu erhalten. Die übrigen transienten Zellen wurden geerntet um die transiente Transfektion per Western Blot nachzuweisen. Nach Beendigung der

Selektionsperiode wurden auch die stabilen Zellen mittels Western Blot auf die Expression der Zielgene getestet, wie in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Überexpression in transient und stabil transfizierten MCF10A-Zellen**

(A) Transfektion des pCMV6-TNFRSF6B-Vektors. (B) Transfektion des pCMV6-DAPL1-Vektors. Transient transfizierte Zellen wurden 24 h nach Ende der Transfektion geerntet. Stabil transfizierte Zellen wurden nach der Selektion geerntet. Jede Transfektion erfolgte in Duplikaten, benannt als T1 und T2 bzw. D1 und D2.

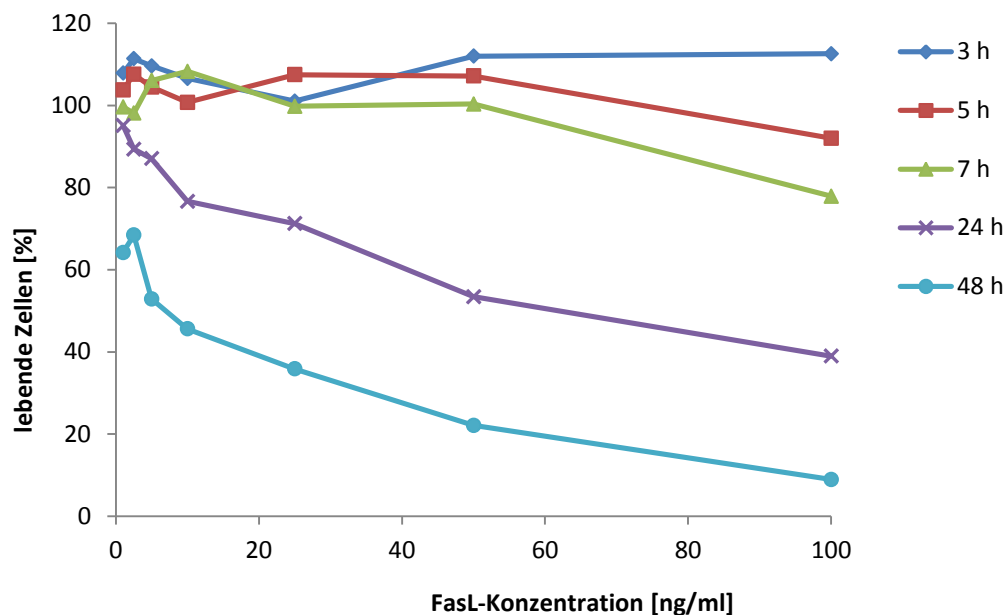
K: MCF10A Kontrolle; T: MCF10A-TNFRSF6B-ÜE-Zellen; D: MCF10A-DAPL1-ÜE-Zellen; β-actin: Ladekontrolle

Wie in Abbildung 7 dargestellt, zeigen sowohl die transient als auch die stabil transfizierten MCF10A-Zellen eine Überexpression von TNFRSF6B und von DAPL1.

### 3.2.3. FasL-induzierte Apoptose in ÜE-Zelllinien

FasL induziert den extrinsischen Apoptoseweg in Zellen, indem es an Death-Rezeptoren bindet. Das Zielprotein TNFRSF6B bindet ebenfalls FasL und konkurriert so mit den Death-Rezeptoren um die Bindung des Liganden. Somit hemmt TNFRSF6B den FasL-induzierten Zelltod und hat eine anti-apoptotische Wirkung in Zellen. Um im weiteren Verlauf die Reaktion der ÜE-Zelllinien auf die FasL-Behandlung zu untersuchen, wurden zunächst die optimalen Bedingungen der FasL-Behandlung in untransfizierten MCF10A Zellen untersucht. Hierfür wurden 7 FasL-Konzentrationen

in Kombination mit 5 verschiedenen Behandlungszeiträumen getestet. Jede Bedingung wurde in Triplikaten angesetzt. Die Überlebensrate der Zellen wurden mit dem CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay (Promega) analysiert und mit einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät ausgelesen. Die relative Überlebensrate der Zellen unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen wurde im Vergleich zur unbehandelten MCF10A-Kontrolle bestimmt und ist Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Überlebensrate von MCF10A-Zellen nach FasL-Behandlung**

MCF10A-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume (wie angegeben) verschiedenen FasL-Konzentrationen (1; 2,5; 5; 10; 25; 50 und 100 ng/ml) ausgesetzt. Dargestellt ist die relative Überlebensrate von MCF10A-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

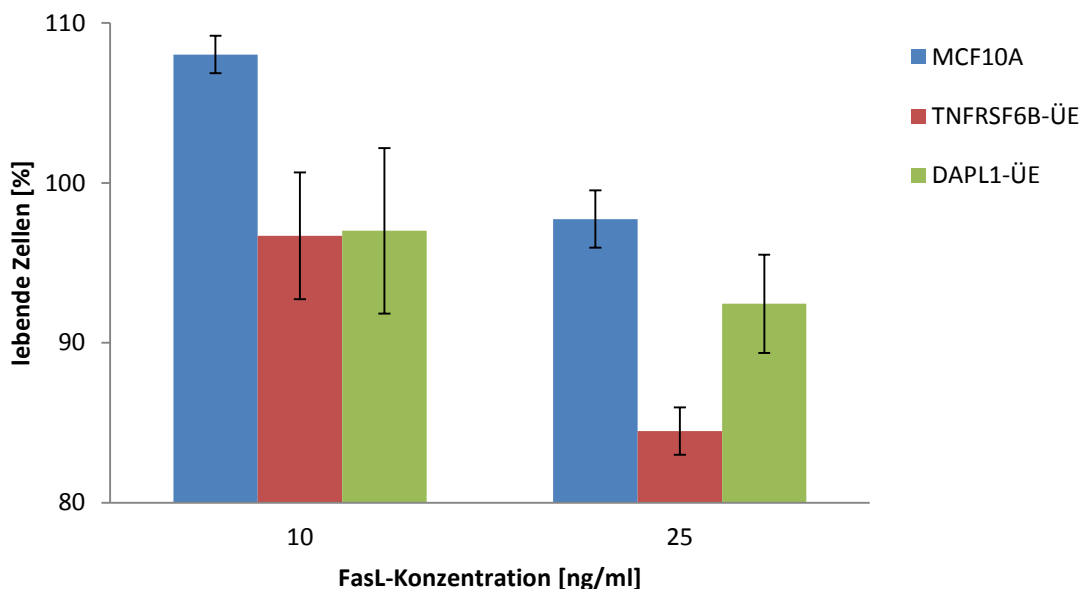
Die verschiedenen FasL-Behandlungsbedingungen lassen sowohl eine zeit- als auch konzentrationsabhängige Abnahme der Überlebensrate der MCF10A-Zellen erkennen. Nach 3, 5, oder 7 h ist die Überlebensrate der Zellen bis zu einer Konzentration von 50 ng/ml kaum beeinträchtigt und sinkt erst bei der maximalen FasL-Konzentration von 100 ng/ml nach 5 h auf ca. 92 % und nach 7 h auf ca. 78 %. Bei einer Behandlungsdauer von 24 h lässt sich ein steter Abfall der Überlebensrate



beobachten. Schon eine geringe FasL-Konzentration von 2,5 ng/ml zeigt eine Minderung der Überlebensrate auf unter 90 %. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml sinkt die Rate auf ca. 40 %. Dieser Trend wird bei einer 48-stündigen Behandlungsdauer noch verstärkt. Hier sinkt die Überlebensrate bereits bei einer Konzentration von 5 ng/ml auf nahezu 50 %. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml überleben weniger als 10 % die 48-stündige FasL-Behandlung. Anhand dieser Wachstumskurven wurden die folgenden Bedingungen für weitere Versuche mit FasL-Behandlung ausgewählt: 10 bzw. 25 ng/ml bei jeweils 24-stündiger Behandlung.

### 3.2.3.1. Zellviabilitäts-Assay

Um den Einfluss von FasL auf verschiedene Zelllinien zu testen, wurden diese für 24 h mit FasL in zwei Konzentrationen (10 ng/ml und 25 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde die Überlebensrate der Zellen mittels CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay bestimmt.



**Abbildung 9: Zellviabilität nach FasL-Behandlung**

Dargestellt ist die relative Änderung der Lebendzellzahl von FasL-behandelten Zellen zu unbehandelten Zellen. Fehlerbalken: Standardabweichung

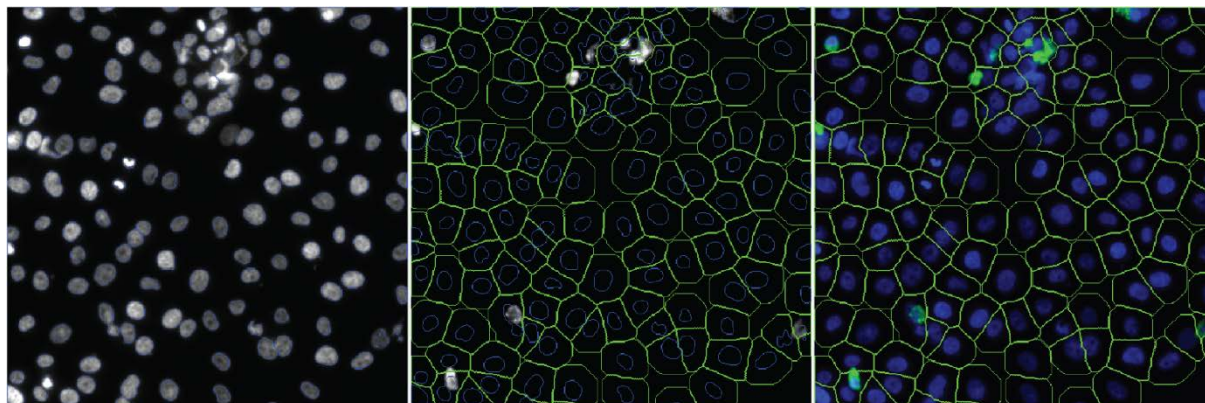
Wie in Abbildung 9 zu sehen, hat die FasL-Behandlung auf die Viabilität der Kontrollzelllinie MCF10A keinen negativen Einfluss. Bei einer FasL-Behandlung von 10 ng/ml zeigt sich sogar eine Zunahme der Lebendzellzahl von ca. 8 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Sowohl die TNFRSF6B-ÜE-Zellen als auch die DAPL1-Zellen zeigen bei einer FasL-Konzentration von 10 ng/ml nur eine leichte Abnahme der Lebendzellzahl auf ca. 97 %, welche aufgrund der Standardabweichung zu vernachlässigen ist. Bei einer FasL-Konzentration von 25 ng/ml zeigen die TNFRSF6B-ÜE-Zellen eine Abnahme der Lebendzellzahl von ca. 13 % im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis steht jedoch im Gegensatz zur Funktion von TNFRSF6B als anti-apoptotisches Protein. Die DAPL1-ÜE-Zellen zeigen bei einer FasL-Konzentration von 25 ng/ml eine Abnahme der Lebendzellzahl von nur 5 % im Vergleich zur Kontrolle und ist somit zu vernachlässigen.

Zusätzlich zur MCF10A-Kontrolle wurde in diesem Versuch eine stabile Entry-Vektor-Kontrolle mitgetestet. Da schon unbehandelte Entry-Vektor-Zellen starke Einschränkungen im Zellwachstum zeigen, wurden die Ergebnisse dieser Kontrolle aus der Auswertung genommen und die untransfizierten MCF10A-Zellen als Kontrolle herangezogen.

### **3.2.3.2. Apoptose-Assay**

Um den Einfluss von FasL auf die Apoptoserate der Zelllinien TNFRSF6B-ÜE und DAPL1-ÜE sowie der Kontrollzelllinie MCF10A zu testen, wurde diese für 24 h mit FasL in zwei Konzentrationen (10 ng/ml und 25 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle diente die jeweilige unbehandelte Zelllinie. Anschließend wurde die Apoptoserate mittels APO LOGIX™ FAM-LETD-FMK Caspase 8 detection kit bestimmt. Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder wurden mit Hilfe des Cellomics erstellt und mittels eines Algorithmus der dazugehörigen Software die apoptotischen Zellen definiert. Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurden hierfür zunächst die Zellkerne anhand des DAPI-Signals erkannt und anschließend eine Maske um den Zellkern

gelegt. Anhand der Zellkerngrenzen wurden die Zellgrenzen algorithmisch erstellt und innerhalb dieser, die Durchschnittsintensität des Caspase 8-Signals (grüner Fluoreszenzkanal) gemessen.



DAPI

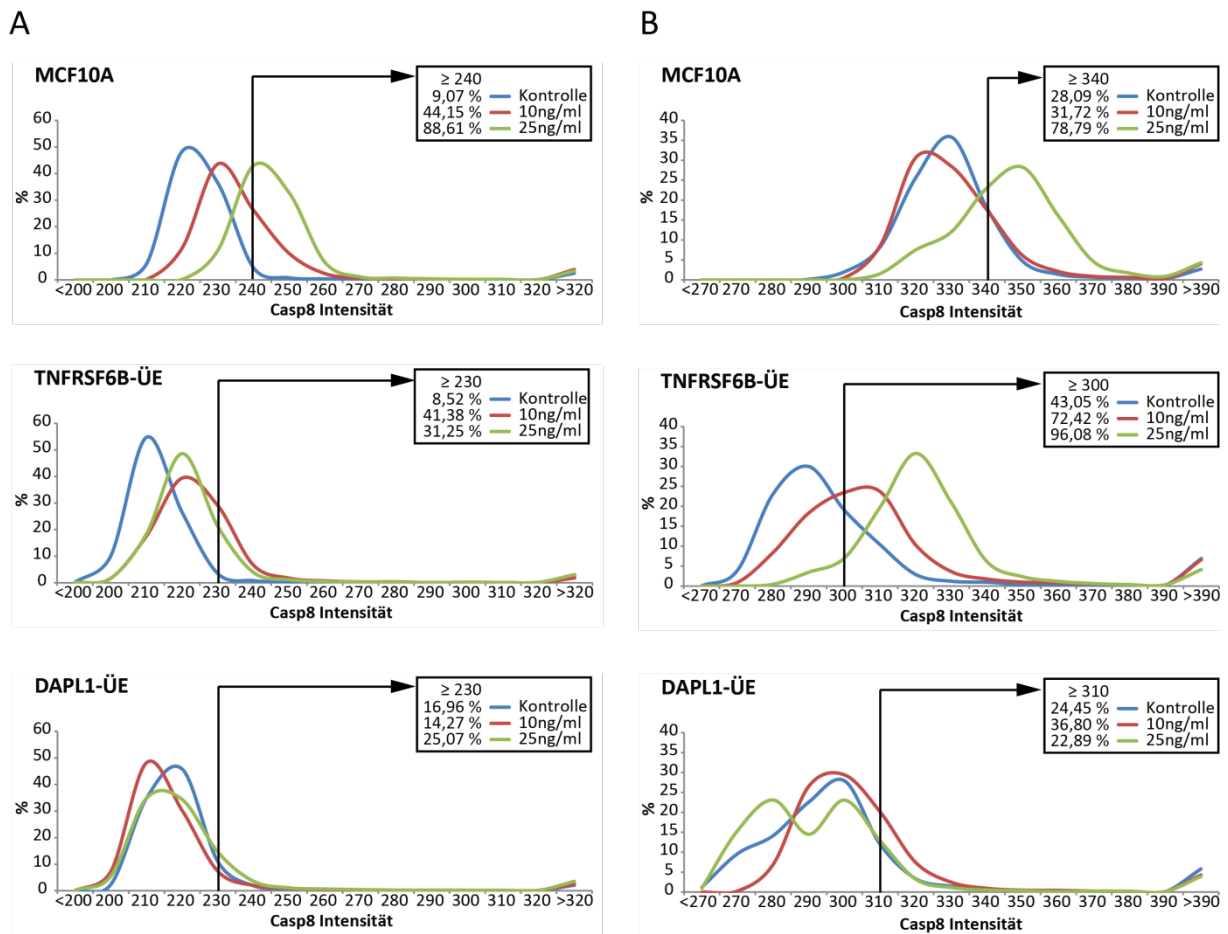
Caspase 8

Überlagerung

**Abbildung 10: Apoptose-Assay mittels Cellomics**

blau: DAPI; grün: Caspase 8; blaue Linie: Zellkerngrenze; grüne Linie: Zellgrenze

Für die Auswertung der Apoptoserate wurden die Durchschnittsintensitäten des Apoptosesignals als Histogramm dargestellt (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Apoptoserate nach FasL-Behandlung**

A und B zeigen die Ergebnisse des Apoptose-Assays aus zwei unabhängigen Experimenten. Pfeil: Apoptose-Grenze

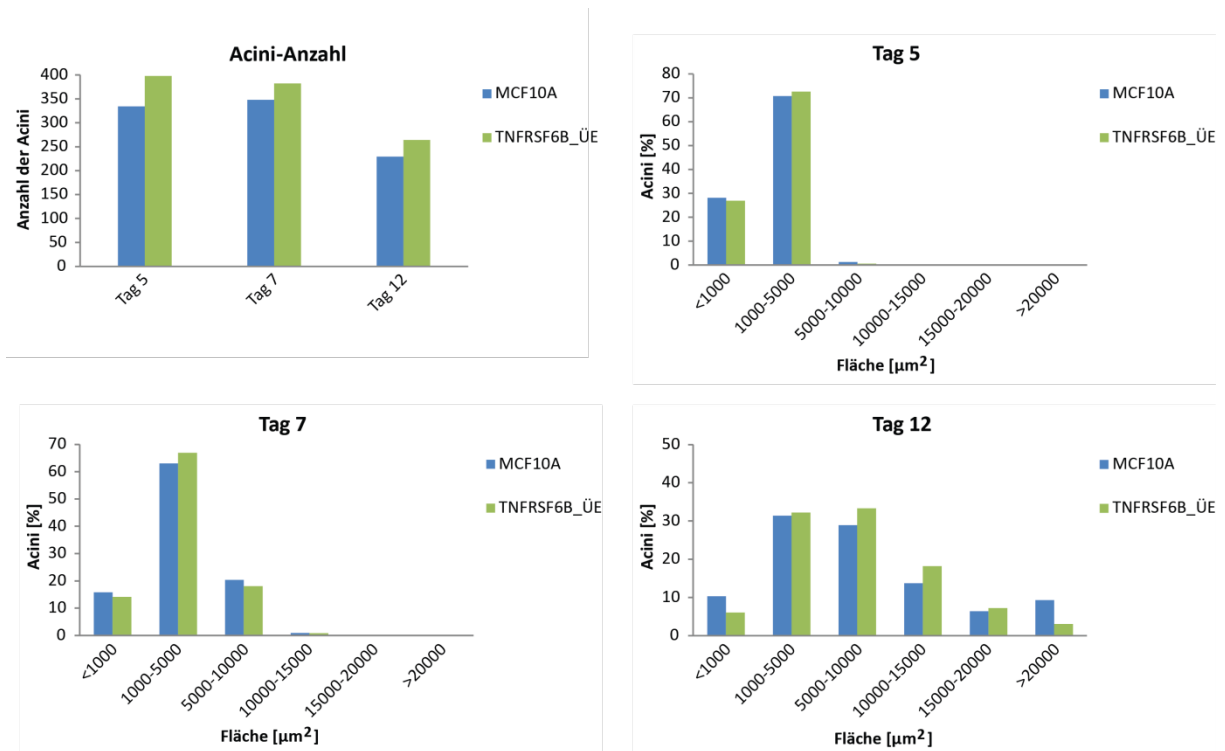
In Abbildung 11 ist die Verteilung der Durchschnittsintensitäten des Apoptosesignals aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (A und B). Getestet wurden MCF10A-, TNFRSF6B-ÜE- und DAPL1-ÜE-Zelllinien. Um Apoptose-positive Zellen zu definieren, wurde anhand der jeweiligen Kontrollkurve jeder Zelllinie ein Grenzwert festgelegt. Dieser wurde im Intensitätsbereich bei abnehmender Zellzahl gewählt. Alle Zellen oberhalb dieses Grenzwertes gelten als apoptotische Zellen und sind als relative Apoptoserate in der jeweiligen Box angegeben.

Die MCF10A-Zellen zeigen in Versuch A eine deutliche Zunahme der Apoptoserate von ca. 30 % bei 10 ng/ml und von fast 80 % bei 25 ng/ml FasL-Behandlung. In Versuch B zeigt sich nur eine deutliche Zunahme der Apoptoserate bei 25 ng/ml FasL-

Behandlung von ca. 50 %, wohingegen die 10 ng/ml FasL-Behandlung keinen Einfluss zeigt. Die TNFRSF6B-ÜE-Zellen zeigen in beiden Versuchen eine Zunahme der Apoptoserate von ca. 30 % bei 10 ng/ml FasL-Behandlung. Bei 25 ng/ml FasL-Behandlung zeigt sich in Versuch A eine Zunahme der Apoptoserate von ca. 20 %, in Versuch B von 50 %. Auch diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur anti-apoptotischen Funktion des TNFRSF6B-Proteins. Die DAPL1-ÜE-Zellen zeigen hingegen in beiden Versuchen kaum einen Einfluss der FasL-Behandlung auf die Apoptoserate. In Versuch A gibt es lediglich einen Anstieg von ca. 10 % bei 25 ng/ml FasL-Behandlung und in Versuch B von ca. 10 % bei 10 ng/ml FasL-Behandlung, was auf eine mögliche anti-apoptotische Funktion von DAPL1 für die FasL-induzierte Apoptose schließen lässt.

#### **3.2.4. Untersuchung der TNFRSF6B-Überexpression in MCF10-Acini**

Um zu sehen, ob die Überexpression von TNFRSF6B einen Einfluss auf die Acini-Entwicklung hat, wurden TNFRSF6B-ÜE-Zellen in 3D kultiviert und verschiedene Stadien der Acini-Entwicklung untersucht. Zum einen wurde die Acini-Anzahl, zum anderen die Acini-Größe an den Tagen 5, 7 und 12 ausgewertet.



**Abbildung 12: Acini-Anzahl und -Größe nach TNFRSF6B-Überexpression**

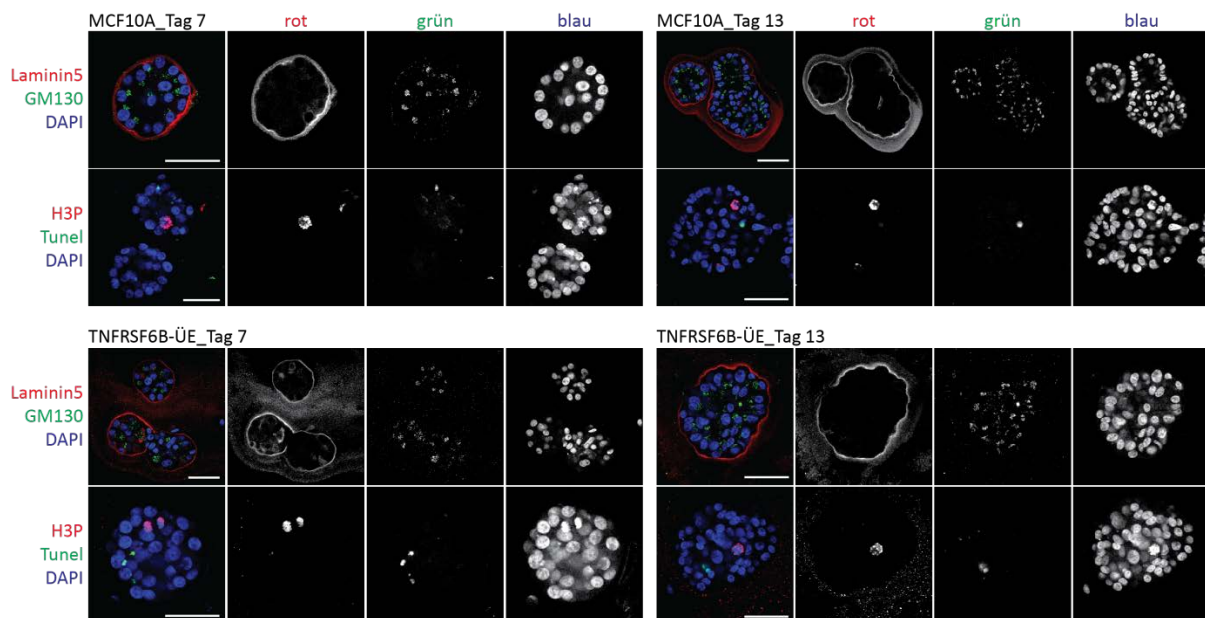
n > 200

In Abbildung 12 ist zu sehen, dass die Acini-Anzahl zwischen TNFRSF6B-ÜE- und MCF10A-Zellen nur geringfügig variiert und über den Versuchszeitraum konstant ist. Die Abnahme der Acini-Anzahl an Tag 12 ist mit dem teilweisen Zusammenwachsen von einzelnen Acini aufgrund der Acini-Dichte zu erklären. Somit wurden verwachsene Acini nur noch als eine Kolonie gewertet.

Zudem wurde die Größe der Acini untersucht um eine eventuelle Abweichung im Größenwachstum zu zeigen. Hierfür wurde die Fläche der einzelnen Acini an den Tagen 5, 7 und 12 bestimmt und definierten Größenkategorien zugeordnet. Um einen Überblick über die Größenverteilung der Acini an den verschiedenen Tagen zu bekommen, ist die relative Anzahl der Acini in den definierten Größenkategorien in Abbildung 12 dargestellt. Wie man sehen kann, variiert die Größenverteilung zwischen den TNFRSF6B-ÜE-Zellen und der Kontrolle unabhängig vom Tag der Untersuchung nur minimal. Demzufolge scheint TNFRSF6B keinen Einfluss auf das Größenwachstum von Acini zu haben.

Zusätzlich wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der TNFRSF6B-ÜE-Acini und Kontroll-Acini der Tage 7 und 13 gemacht und hinsichtlich der Polaritätsmarker GM130 und Laminin 5 sowie des Proliferationsmarkers H3P und einer Tunel-Färbung zum Apoptosenachweis untersucht. Eine repräsentative Auswahl der Bilder ist in Abbildung 13 dargestellt. Die TNFRSF6B-ÜE-Acini zeigen keine Störung der Proliferation. GM130 zeigt die normale apikale Polarisation der Zellen zur Acinusmitte hin. Auch Laminin 5 lokalisiert um den Acinus herum, was für die Sekretion zur Basallamina spricht. Auch der Proliferationsmarker H3P und der Apoptosemarker (hier durch Tunel-Färbung dargestellt) zeigen keinen Unterschied zu den Kontroll-Acini.

Abschließend lassen sich keine Hinweise für eine wichtige Rolle von TNFRSF6B in der Acini-Entwicklung erkennen.



**Abbildung 13: Acini-Entwicklung nach TNFRSF6B-ÜE**

Dargestellt sind Tag 7 und Tag 13 der Acini-Entwicklung nach TNFRSF6B-ÜE im Vergleich zur MCF10A-Kontrolle. IFM der jeweils angegebenen Marker.

### **3.3. Herunterregulierung von Kandidatenproteinen in MCF10A-Acini**

Die Genexpressionsanalyse verschiedener Acini-Stadien ergab einige sehr stark regulierte Gene. Um den Einfluss bestimmter Proteine auf die Acini-Entwicklung zu testen, wurde ein Knock-down in MCF10A-Zellen mittels siRNA für die Zielgene ANGPTL4, GPNMB, TNFRSF6B und DAPL1 durchgeführt. Als Kontrolle diente eine non target (nt)-siRNA. Anschließend wurden die Zellen in 3D kultiviert und die Acinigrößen an Tag 7 und Tag 10 untersucht. Der Knock-down wurde mittels Western Blot analysiert und konnte für TNFRSF6B nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Acini-Größen ergab keine deutlichen Abweichungen im Vergleich zur nt-Kontrolle. Auch die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der 3D-Kulturen an Tag 11 bezüglich der Marker Laminin 5, GM139, H3P und TUNEL zeigte keine Unterschiede zur Kontrolle. Aufgrund der geringfügigen Abweichungen zur Kontrolle sind die Ergebnisse hier nicht graphisch dargestellt.

### **3.4. Untersuchung von Fibroblasten**

Sowohl die Zusammensetzung des Stromas epithelialer Gewebe als auch die von Stromazellen exprimierten Faktoren können einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und die Progression von Tumoren haben. Um diesen Einfluss von Stromazellen zu untersuchen, wurden zwei primäre Fibroblastenzelllinien herangezogen, die Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF)-Zelllinie 60161A1 und die nicht-kanzerogene (normale) Zelllinie 60161B1. Beide Linien stammen von derselben Patientin und wurden aus Tumorgewebe oder Tumor-angrenzendem Gewebe isoliert, was einen direkten Vergleich beider Linien sehr vereinfacht. Die Zelllinien sind Hormonrezeptor- und HER2-negativ.

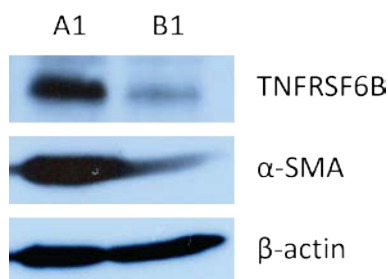
Im Folgenden werden diese beiden Fibroblastenzelllinien hinsichtlich ihrer Proteinexpression, möglichen Unterschiede in der Signaltransduktion und Reaktion auf verschiedene Wirkstoffbehandlungen getestet. Zudem dienen die folgenden



Experimente zur Charakterisierung der beiden Zelllinien für die Durchführung einer 3D-Co-Kultur mit MCF10A-Zellen. Im Sinne der epithelial-stromalen Interaktion soll hierbei gezeigt werden, ob die Fibroblasten einen Einfluss auf die Entwicklung von Acini haben.

### 3.4.1. Proteinexpression in Fibroblasten

Um Unterschiede in der Proteinexpression der beiden Fibroblastenzelllinien zu zeigen, wurden diese hinsichtlich ihrer Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) und des Kandidatenproteins TNFRSF6B per Western Blot untersucht.  $\alpha$ -SMA wird i.d.R. von Myofibroblasten exprimiert, ist aber auch bei CAFs stark exprimiert und dient als CAF-Marker. In Abbildung 14 ist zu sehen, dass die CAF-Linie 60161A1 auch ein sehr viel höheres Expressionslevel von  $\alpha$ -SMA hat als die normale Zelllinie 60161B1. Auch die Untersuchung hinsichtlich des TNFRSF6B-Expressionslevels zeigte eine deutlich höhere TNFRSF6B-Expression der CAF-Linie als der normalen Fibroblastenzelllinie, wie in Abbildung 14 zu sehen.



**Abbildung 14: Proteinexpression in Fibroblastenzelllinien**

Immunodetektion mittels Western Blot; A1: 60161A1-Zelllinie; B1: 60161B1-Zelllinie;  
 $\beta$ -actin: Ladekontrolle

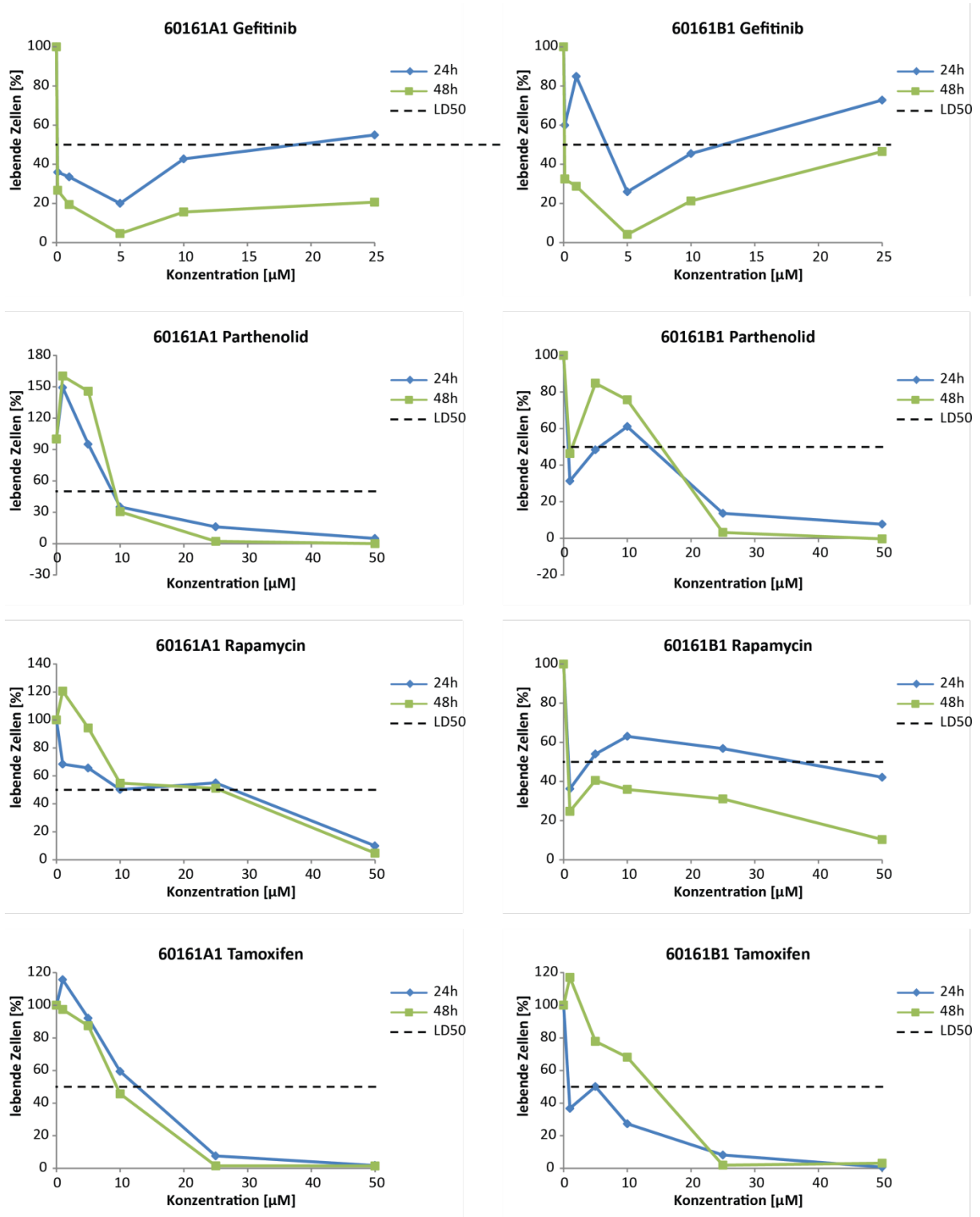
### 3.4.2. Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten

Durch die veränderte Expression von Genen zeigen Tumorzellen ein modifiziertes Verhalten in der Signaltransduktion. Um zu untersuchen, ob sich die CAF- und die

normale Fibroblastenzelllinie in ihrer Reaktion auf die Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen unterscheiden, wurden die Zellen verschiedenen Wirkstoffen ausgesetzt. Die Reaktion wurde anschließend hinsichtlich wichtiger Signaltransduktoren mittels RPPA analysiert.

#### **3.4.2.1. Zellviabilität nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten**

Für die Untersuchung der Effekte unterschiedlicher Wirkstoffe auf die Fibroblastenzelllinien 60161A1 und 60161B1 wurden die Wirkstoffe Gefitinib (EGFR-Inhibitor), Parthenolid (NFκB-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) und Tamoxifen (selektiver Estrogenrezeptormodulator) eingesetzt. Um optimale Behandlungsbedingungen für die Zellkulturen zu ermitteln, wurden zunächst verschiedene Wirkstoffkonzentrationen und Behandlungszeiträume getestet und die Zellviabilität ermittelt (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Wirkstoff-Konzentrationsreihen in Fibroblasten**

Dargestellt ist die relative Überlebensrate von 60161A1- und 60161B1-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Anhand der Wirkstoffkonzentrationsreihen (Abbildung 15) wurden die optimalen Behandlungsbedingungen für die einzelnen Wirkstoffe festgelegt: 0,1 µM und 1 µM

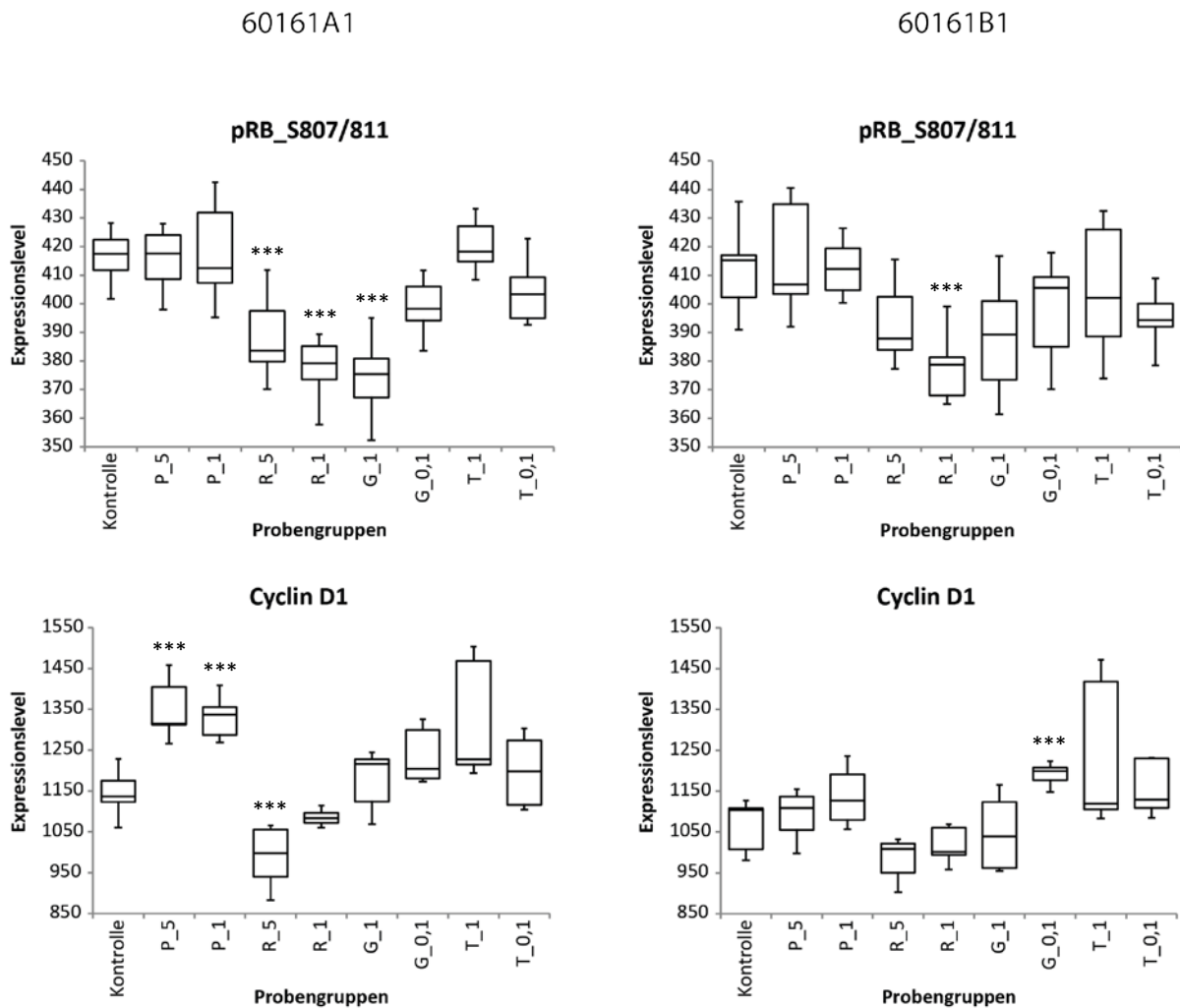
Gefitinib, 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Parthenolid, 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Rapamycin, 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M Tamoxifen bei einer Inkubationszeit von je 48 h. Diese Parameter wurden für eine Wirkstoffbehandlung mit anschließender RPPA-Analyse angewendet.

#### **3.4.2.2. Signaltransduktion nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten**

Um mögliche Unterschiede in der Signaltransduktion der beiden Fibroblastenzelllinien zu finden, wurden diese mit den o.g. Parametern mit Gefitinib, Parthenolid, Rapamycin und Tamoxifen behandelt und anschließend mittels RPPA analysiert. Dabei wurde der Fokus auf die Aktivität wichtiger Signaltransduktoren gelegt, um mögliche modifizierte Signalwege in der CAF-Zelllinie aufzudecken. In den Abbildung 16 - Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Proteine als Box Plots dargestellt, die eine Reaktion auf mindestens eine der Wirkstoffbehandlungen zeigen. Die Untersuchungen der Proteine pmTOR, pNF $\kappa$ B, pRAF, p27, pSRC, pJNK und pp38 ergaben keine deutlichen Abweichungen zur Kontrolle und sind deshalb nicht dargestellt.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der RPPA-Analyse für die Zellproliferationsproteine Retinoblastoma (RB) und Cyclin D1 dargestellt. Cyclin D1 wird während der G1-Phase synthetisiert und fördert den Übergang zur S-Phase. Dafür bildet es einen Cyclin D-CDK4/6-Komplex, der zur Phosphorylierung von RB führt, was den Durchlauf durch die G1-Phase vorantreibt. Die Phosphorylierung von RB an Serin 807/811, durch CDK3/Cyclin C, fördert den Übergang von der G0- zur G1-Phase und führt somit zur Aktivierung des Zellzyklus. Bei 60161A1 führt die Behandlung mit Rapamycin zu einer Dephosphorylierung von RB und 5  $\mu$ M Rapamycin zu einer signifikanten Reduktion von Cyclin D1, was für einen Zellzyklusarrest spricht. Auch 1  $\mu$ M Gefitinib bewirkt eine Dephosphorylierung von RB. Parthenolid führt zu einer Zunahme von Cyclin D1, was für Zellproliferation spricht, hat allerdings keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von RB. Bei 60161B1

führt 1  $\mu\text{M}$  Rapamycin zu einer Dephosphorylierung von RB, hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Reduktion von Cyclin D1. Hier bewirkt jedoch 0,1  $\mu\text{M}$  Gefitinib eine Zunahme von Cyclin D1.

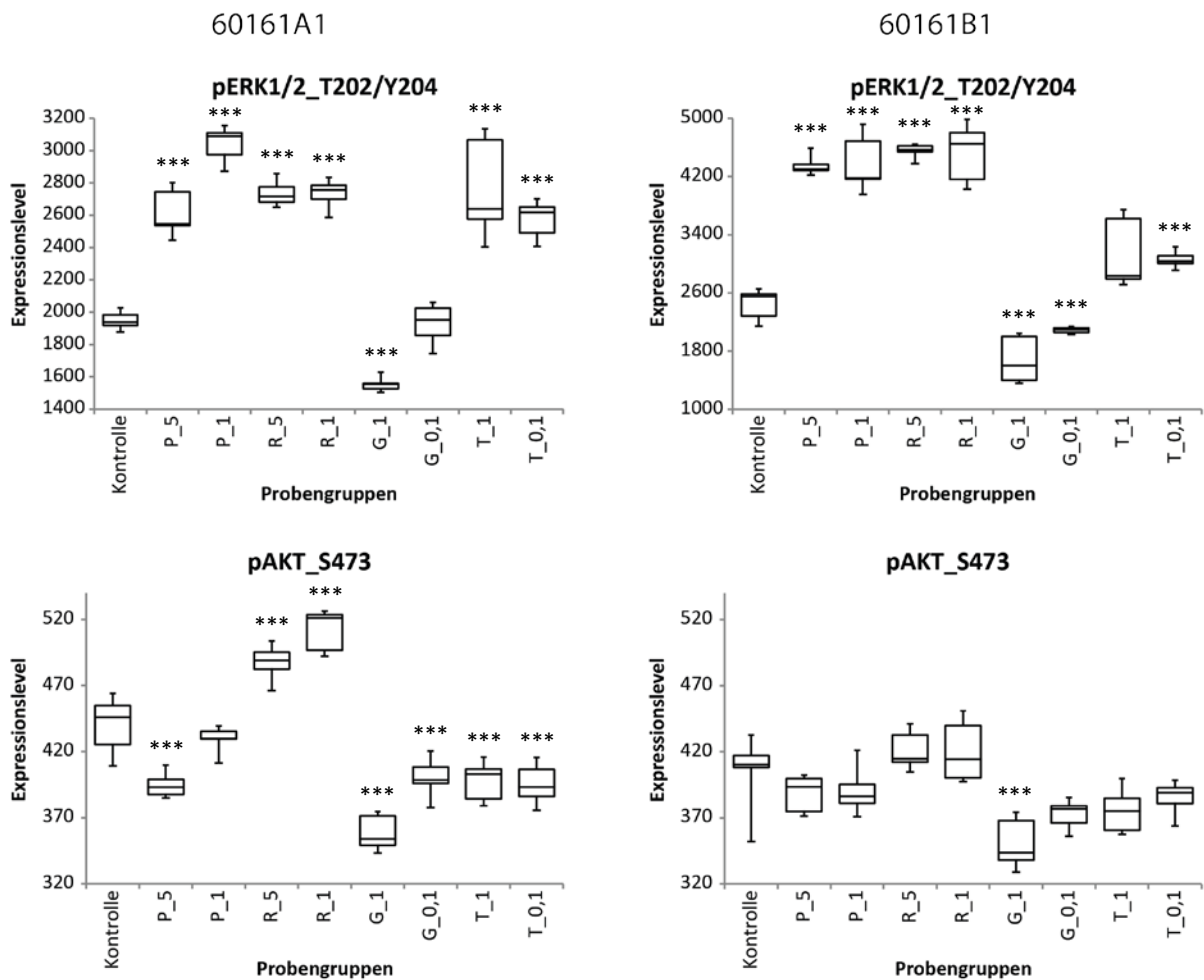


**Abbildung 16: RPPA nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten 1**

P: Parthenolid, R: Rapamycin, G: Gefitinib, T: Tamoxifen mit jeweiliger Wirkstoffkonzentration in  $\mu\text{M}$ ; \*\*\*: P-Wert < 0,001

In Abbildung 17 ist die Regulation von ERK1/2 und AKT nach Wirkstoffbehandlung der Fibroblasten dargestellt. ERK1/2 spielt eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie den Zellzyklus und wird als Antwort auf extrazelluläre Signale von MEK phosphoryliert und somit aktiviert. Auch AKT ist ein

wichtiger Regulator für Metabolismus, Proliferation sowie Zellwachstum und -überleben und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Beide Proteine sind jedoch auch in vielen Krebsarten fehlreguliert, wobei ihre Aktivität zur Tumorprogression beiträgt.



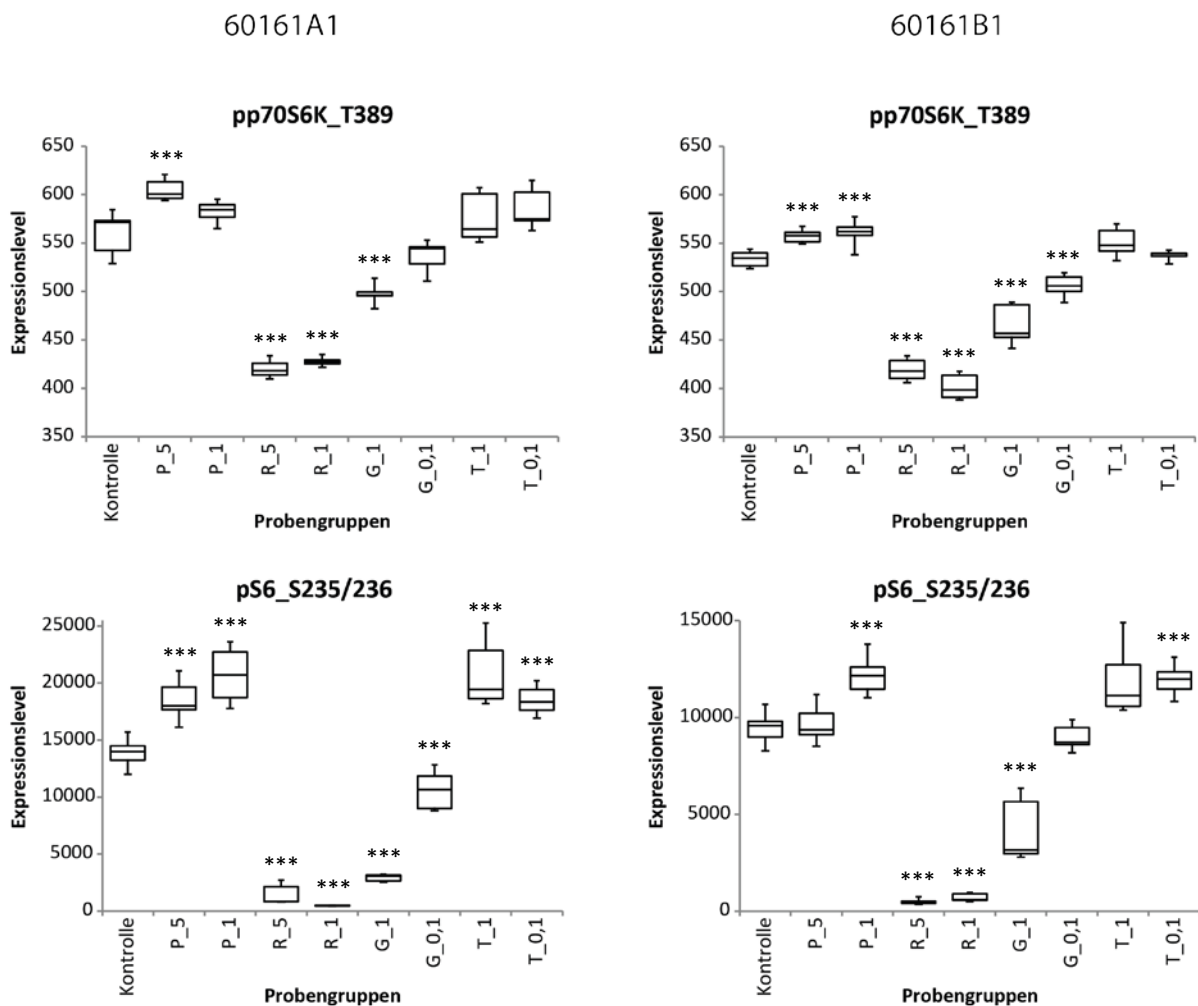
**Abbildung 17: RPPA nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten 2**

P: Parthenolid, R: Rapamycin, G: Gefitinib, T: Tamoxifen mit jeweiliger Wirkstoffkonzentration in  $\mu\text{M}$ ; \*\*\*: P-Wert < 0,001

Bei 60161A1 führt Parthenolid zur Phosphorylierung von ERK1/2 und 5  $\mu\text{M}$  Parthenolid zur Dephosphorylierung von AKT. Rapamycin führt zur Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT. Gefitinib bewirkt eine Dephosphorylierung von AKT und bei

einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auch von ERK1/2. Tamoxifen bewirkt eine Phosphorylierung von ERK1/2 und eine Dephosphorylierung von AKT.

Bei 60161B1 führen sowohl Parthenolid als auch Rapamycin zur Phosphorylierung von ERK1/2 aber nicht von AKT. Gefitinib bewirkt eine Dephosphorylierung von ERK1/2 und eine Dephosphorylierung von AKT bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Tamoxifen bewirkt eine Phosphorylierung von ERK1/2 bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 18: RPPA nach Wirkstoffbehandlung von Fibroblasten 3**

P: Parthenolid, R: Rapamycin, G: Gefitinib, T: Tamoxifen mit jeweiliger Wirkstoffkonzentration in  $\mu\text{M}$ ; \*\*\*: P-Wert < 0,001

In Abbildung 18 ist die Regulation von p70S6K und S6 nach Wirkstoffbehandlung der Fibroblasten dargestellt. Die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 geschieht durch eine Vielzahl von Faktoren, wie Wachstumsfaktoren und Mitogene. Bei einem Wachstumsarrest kommt es zur Dephosphorylierung von S6. Das Protein p70S6K wird von mTOR reguliert und fördert die Proteinsynthese, Zellwachstum und Proliferation. p70S6K wird durch Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert u.a. S6. Bei 60161A1 führt Parthenolid zur Phosphorylierung von S6 und bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auch von p70S6K. Rapamycin führt zur Dephosphorylierung von p70S6K und S6, was für einen Wachstumsarrest spricht. Auch Gefitinib bewirkt eine Dephosphorylierung von S6 und bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auch von p70S6K. Tamoxifen bewirkt eine Phosphorylierung von S6, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p70S6K.

Bei 60161B1 führt Parthenolid zur Phosphorylierung von p70S6K und bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auch von S6. Sowohl Rapamycin als auch Gefitinib führen zur Dephosphorylierung von p70S6K und mit Ausnahme von 0,1  $\mu\text{M}$  Gefitinib auch von S6. Tamoxifen zeigt eine Phosphorylierung von S6 bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$ .

Die Ergebnisse der RPPA-Analyse sind noch einmal in Tabelle 18 zusammengefasst. Dargestellt ist, ob die Phosphoproteine nach Wirkstoffbehandlung hochreguliert (+), herunterreguliert (-) oder nicht reguliert (0) sind mit einem P-Wert  $<0,001$  (t-Test).



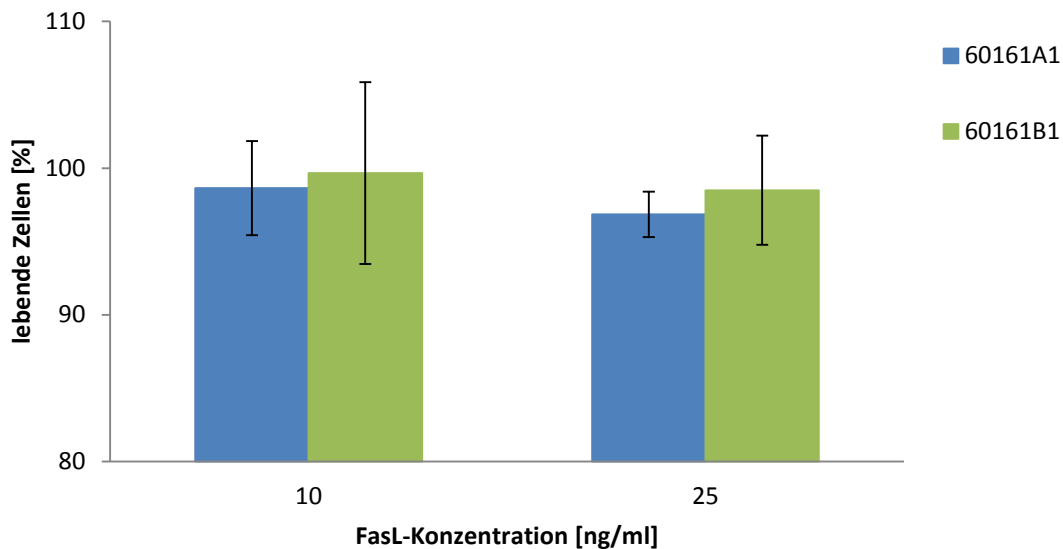
**Tabelle 18: RPPA-Ergebnisse nach Wirkstoffbehandlung**

Phosphoprotein	60161A1 0,1 µM Gefitinib	60161A1 1 µM Gefitinib	60161B1 0,1 µM Gefitinib	60161B1 1 µM Gefitinib
CyclinD1	0	0	+	0
pAKT_S473	-	-	0	-
pERK1/2_T202/Y204	0	-	-	-
pp70S6K_T389	0	-	-	-
pRB_S807/811	0	-	0	0
pS6_S235/236	-	-	0	-
Phosphoprotein	1 µM Parthenolid	5 µM Parthenolid	1 µM Parthenolid	5 µM Parthenolid
CyclinD1	+	+	0	0
pAKT_S473	0	-	0	0
pERK1/2_T202/Y204	+	+	+	+
pp70S6K_T389	0	+	+	+
pRB_S807/811	0	0	0	0
pS6_S235/236	+	+	+	0
Phosphoprotein	1 µM Rapamycin	5 µM Rapamycin	1 µM Rapamycin	5 µM Rapamycin
CyclinD1	0	-	0	0
pAKT_S473	+	+	0	0
pERK1/2_T202/Y204	+	+	+	+
pp70S6K_T389	-	-	-	-
pRB_S807/811	-	-	-	0
pS6_S235/236	-	-	-	-
Phosphoprotein	0,1 µM Tamoxifen	1 µM Tamoxifen	0,1 µM Tamoxifen	1 µM Tamoxifen
CyclinD1	0	0	0	0
pAKT_S473	-	-	0	0
pERK1/2_T202/Y204	+	+	+	0
pp70S6K_T389	0	0	0	0
pRB_S807/811	0	0	0	0
pS6_S235/236	+	+	+	0

### 3.4.3. Untersuchung der FasL-induzierten Apoptose in Fibroblasten

Da die beiden Fibroblastenzelllinien 60161A1 und 60161B1 unterschiedliche Expressionen von TNFRSF6B zeigen (s. 3.4.1.), wurden auch sie auf ihre Reaktion auf eine FasL-Behandlung getestet. Aufgrund der endogenen Überexpression von TNFRSF6B der Zelllinie 60161A1 würde man eine höhere Zellviabilität nach FasL-Behandlung gegenüber der Zelllinie 60161B1 erwarten. Um dies zu testen, wurden die Zelllinien für 24 h mit 10 ng/ml und 25 ng/ml FasL behandelt und anschließend die Zellviabilität bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse des Zellviabilitäts-Assays mit Standardabweichung dargestellt.



**Abbildung 19: Zellviabilität von Fibroblasten nach FasL-Behandlung**

Dargestellt ist die relative Änderung der Lebendzellzahl von FasL-behandelten Zellen zu unbehandelten Zellen. Fehlerbalken: Standardabweichung

Wie in Abbildung 19 zu sehen, zeigt keine der beiden Fibroblastenzelllinien eine deutliche Reaktion auf die Behandlung mit FasL. Die Abnahme der Lebendzellzahl beträgt bei beiden FasL-Konzentrationen weniger als 5 %. Auch zwischen den Zelllinien lassen sich nur minimale Unterschiede feststellen. Aufgrund der geringeren FasL-Expression von 60161B1 hätte man eine höhere FasL-Sensibilität dieser Zelllinie erwartet.

#### **3.4.4. Einfluss von Fibroblasten auf die MCF10A-Acini-Entwicklung via 3D-Co-Kultur**

Um den Einfluss der Fibroblasten auf das Größenwachstum der Acini zu testen und einen möglichen tumorigenen Einfluss der CAF-Zelllinie auf die Acini zu untersuchen, wurden 3D-Co-Kulturen der Fibroblastenzelllinien 60161A1 und 60161B1 mit MCF10A Zellen angesetzt. Hierfür wurden die Zellen in den Verhältnissen 1:2 und 2:1 (E:F) in 3D ausgesät. Als Kontrolle dienten 3D-kultivierte MCF10A-Zellen ohne Fibroblasten. An Tag 7 wurden die Acini lichtmikroskopisch fotografiert und ihre Größe bestimmt und ausgewertet. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Größenverteilung zwischen den beiden Fibroblastenzelllinien. Auch das Verhältnis der MCF10A-Zellen zu Fibroblasten zeigte keinen Einfluss auf das Größenwachstum. Es konnte zwar festgestellt werden, dass die MCF10A-Kontrolle etwas kleinere Acini als die Co-Kulturen aufweisen. Dies lässt sich aber dadurch erklären, dass die Acini der Co-Kulturen i.d.R. von einer Schicht von Fibroblasten umgeben sind, die in der Größenmessung der Acini enthalten ist. Aufgrund der geringen Abweichungen der Ergebnisse, sind diese hier nicht graphisch dargestellt.

Zusätzlich wurde an Tag 7 der 3D-Co-Kultur eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt um mögliche Unterschiede für die Marker Laminin 5, GM130, H3P und Apoptose aufzuzeigen. Weder zwischen den verschiedenen Co-Kulturen noch zur MCF10A-Monokultur (Kontrolle) zeigte die Immunfluoreszenzfärbung Unterschiede hinsichtlich der Polaritätsmarker GM130 und Laminin 5 oder hinsichtlich des Proliferationsmarkers H3P bzw. der Apoptoserate, die mittels Tunel-Färbung gezeigt wurde. Da keine Unterschiede festgestellt werden konnten, sind diese Ergebnisse hier nicht graphisch dargestellt.

---

# DISKUSSION

## 4. Diskussion

### 4.1. Genexpression und Proteinregulation während der MCF10A-Acini-Entwicklung

Als eine der häufigsten Krebsarten bei Frauen weltweit ist Brustkrebs Gegenstand zahlreicher biochemischer und genetischer Studien. Jedoch fehlen immer noch relevante molekulare Informationen über die Tumorentstehung und -entwicklung.

Die 3D-Kultur von MCF10A-Zellen ist ein Modell für die Acini-Bildung und spiegelt die Drüsenbildung der Brust wider. Dieses Modell hilft dabei, sich den *in vivo*-Eigenschaften der Zellen, wie Wachstum und Signaltransduktion, im Vergleich zur normalen einschichtigen Zellkultur anzunähern.

Um die molekularen Grundlagen der Brustdrüsenentwicklung zu untersuchen, wurde zum einen eine genomweite Genexpressionsanalyse und zum anderen eine RPPA-Analyse wichtiger Signalproteine verschiedener Stadien der Acini-Entwicklung durchgeführt.

Um Unterschiede in der Genexpression von verschiedenen Stadien der Acini-Bildung sowie zur 2D-Kultur zu untersuchen, wurde für diese eine genomweite Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden Genlisten der drei Acini-Stadien erstellt, die die im Vergleich zur 2D-Kontrolle regulierten Gene beinhalten. Zudem wurden diese Genlisten untereinander verglichen, um Schnittmengen zwischen den Acini-Stadien aufzuzeigen. Die Durchführung einer Überrepräsentationsanalyse der Genexpressionsdaten zeigt unterschiedliche Ergebnisse. Sucht man angereicherte GO-Terme für die einzelnen Acini-Stadien und deren Schnittmengen, lassen sich spezifische GO-Terme erkennen. Vergleicht man die Stadiums-spezifischen Genlisten auf einem höheren Level direkt miteinander, um eine relative Anreicherung von GO-Level-1-Termen zu erhalten, ist zwischen den verschiedenen Acini-Stadien jedoch keine Anreicherung zu erkennen.

Um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse besser nachzuvollziehen und zu ergänzen, wurde ein paralleler Ansatz auf Proteinebene mittels RPPA-Analyse der entsprechenden Stadien und der Kontrolle durchgeführt. Aufgrund zu geringer Proteinkonzentrationen konnten jedoch die Proben für Tag 2 der 3D-Kultur nicht ausgewertet werden. Die Ergebnisse für die RPPA-Analyse beziehen sich also auf Tag 7 und Tag 11 der 3D-Kultur. Wie in Tabelle 17 zu sehen, lässt sich eine Korrelation der mRNA und Proteindaten von ca. 30 % erkennen. Dies entspricht publizierten Werten [106, 107]. Die Unterschiede zwischen mRNA- und Proteinexpression lassen sich durch verschiedene Prozesse, wie Transkriptionsregulation, RNA-Prozessierung, RNA-Stabilität, Proteininstabilität und -modifikation, erklären.

Ordnet man die regulierten Proteine ihren Signalkaskaden zu, lässt sich jedoch kein eindeutiger Trend erkennen. Dies liegt zum einen daran, dass die Ergebnisse nicht konsistent sind. So sind verschiedene Proteine eines Signalweges in konträre Richtungen reguliert. Es zeigt sich z.B. eine Hochregulierung von PI3K und folglich PKB/AKT. Jedoch sind die anschließend regulierten Proteine, wie mTOR, Bad, GSK3 oder p27 sehr unterschiedlich reguliert. Bad und mTOR zeigen keine Regulation, obwohl das von mTOR regulierte Protein p70S6K herunterreguliert und eIF4EBP hochreguliert wird. Die Proteindaten zeigen zudem eine widersprüchliche Herunterregulierung sowohl von GSK3 als auch pGSK3. PKB/AKT führt eigentlich zur Phosphorylierung und somit zur Inhibierung von GSK3. Auch das Protein p27, das von PKB/AKT phosphoryliert wird, zeigt eine widersprüchliche Hochregulierung des unphosphorylierten p27.

Zum anderen wurden nur einzelne Proteine in einem riesigen Netzwerk aus Signalwegen untersucht. Dadurch gibt es zu wenige auswertbare Protein-Daten, um die spezifischen Kaskaden einigermaßen lückenlos abzudecken.

Die Genomexpressionsanalyse zeigte eine starke Herunterregulierung der Gene Ubiquitin-conjugated enzyme 2C (UBE2C) an Tag 11 und Cell division cycle 20 (CDC20) an Tag 7 und 11 der MCF10A-3D-Kultur. CDC20 ist ein wichtiger Regulator der Zellteilung und aktiviert den Anaphase-Promoting-Complex, der für die Chromatid-

Separation und den Übergang in die Anaphase zuständig ist. UBE2C spielt für den Abbau von mitotischen Cyclinen und die Progression des Zellzyklus eine wichtige Rolle. Eine Überexpression beider Gene konnte in Zusammenhang mit Brustkrebs gebracht werden. So zeigten Karra et al., dass eine Überexpression von CDC20 mit einer sehr aggressiven Form des Brustkrebs und einer kurzen Überlebensrate assoziiert ist [108]. Eine Überexpression von UBE2C konnten Rawat et al. in verschiedenen Brustkrebszelllinien zeigen. Zudem führte eine Inhibition von UBE2C zu einer Sensibilisierung der Brustkrebszellen gegenüber Strahlung und Hormoninhibitoren [109]. Somit scheint die Herunterregulierung beider Gene für die normale Entwicklung der Brustdrüsen eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Genexpressionsanalyse ergab auch eine starke Herunterregulierung von Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) an Tag 7 und 11 und von TNFRSF6B an allen drei Tagen der MCF10A-3D-Kultur. ANGPTL4 ist ein Serumhormon, das in den Lipidmetabolismus involviert ist. Studien ergaben, dass eine erhöhte Expression von ANGPTL4 für das Wachstum und Metastasierung von Tumoren sowie den Schutz von Zellen vor Anoikis führt [110]. TNFRSF6B ist ein Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Superfamilie und bindet u.a. FasL und LIGHT und spielt durch die Neutralisierung von FasL eine wichtige Rolle für die Inhibierung des extrinsischen Apoptoseweges. Es ist in vielen Tumorarten, wie z.B. Brustkrebs [88], überexprimiert und eine Herunterregulierung hat einen inhibitorischen Effekt auf die Zellinvasion und -migration in MCF7-Brustkrebszellen [89].

Während der Acini-Entwicklung wurden die Keratine (KRT) 14, 15 und 16 stark hochreguliert. KRT 14, 15 und 16 sind Typ I-Zytokeratine und sind Bestandteile der Intermediärfilamente des zytoplasmatischen Zytoskeletts. Diese Keratine sind in normalen Brustdrüsen exprimiert und konnten auch in MCF10A-Zellen nachgewiesen werden [111, 112]. Auch GPNMB (Glycoprotein nmb) und DAPL1 zählen zu den 20 am stärksten hochregulierten Genen. GPNMB ist ein Typ I Transmembran-Glycoprotein und seine hohe Expression konnte in verschiedenen Krebsarten gezeigt werden. Auch in Brustkrebs ist GPNMB oft stark exprimiert und konnte mit einer Begünstigung der

Zellmigration, Invasion und Metastasierung in Tumoren und Brustkrebszelllinien in Verbindung gebracht werden [113]. DAPL1 ist an Tag 7 und 11 der Acini-Bildung stark hochreguliert. Als weitestgehend uncharakterisiertes Protein war es aufgrund seiner möglichen Rolle in der Apoptose ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen.

Für Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2), Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS1) und E-Cadherin korrelieren unsere mRNA-Daten mit den Daten beider RPPA-Ansätze. Cdk2 und IRS1 sind in allen Ansätzen während der Acini-Entwicklung herunterreguliert. Cdk2 ist eine Cyclin-abhängige Kinase, deren Aktivierung durch Cyclin E im Zellzyklus für den Übergang von der G1- zur S-Phase zuständig ist. Cyclin E ist in Krebs oft dereguliert und Akli et al. fanden heraus, dass in Brustkrebs eine leichte Isoform von Cyclin E (LI-CycE) im starken Zusammenhang mit einer verminderten Überlebensrate steht. Durch Versuche in einem transgenischen Mausmodell konnten sie zeigen, dass Cdk2 für die LI-CycE-vermittelte Tumorentstehung erforderlich ist [114]. IRS1 leitet Signale vom Insulin- und Insulin-like growth factor-1-Rezeptor weiter und aktiviert dadurch den PI3K- und MAP-Kinase-Signalweg. Porter et al. zeigten eine geringe Expression von IRS1 in normalem Brustgewebe und eine hohe Expression in duktalem Karzinomen *in situ*. Zudem konnten sie eine erhöhte Chemosensitivität von Brustkrebszellen mit höheren IRS1-Leveln für Wirkstoffe, die Zellen in der G2-Phase arretieren, nachweisen [115]. E-Cadherin ist in unseren Versuchen während der Acini-Entwicklung in allen Ansätzen hochreguliert. E-Cadherin ist Bestandteil der Adherens Junctions und somit für die Bildung von Zell-Zell-Kontakten unerlässlich. E-Cadherin ist als Tumorsuppressorgen bekannt, dessen Inaktivierung ist mit der Invasivität von Brustkrebs assoziiert ist [116].



## **4.2. Die Rolle von Kandidatenproteinen für die Acini-Entwicklung und die FasL-induzierte Apoptose**

### **4.2.1. Herstellung und Funktionalität stabiler Überexpressionszelllinien für die Untersuchung von Kandidatenproteinen**

Anhand der Genexpressionsanalyse der verschiedenen Acini-Stadien wurden die Zielgene TNFRSF6B, DAPL1 sowie GPNMB und ANGPTL4 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Letztere wurden sowohl in einer 3D-ÜE-Kultur als auch in einem Knock-down in MCF10A-Acini analysiert. Jedoch sind die Ergebnisse aufgrund nicht-funktionaler Antikörper nicht aussagekräftig, weshalb sich unsere Versuche größtenteils auf TNFRSF6B und DAPL1 beschränken.

TNFRSF6B ist Mitglied der TNF-Rezeptoren und hat entfaltet seine anti-apoptotische Wirkung durch die Bindung von Todesliganden. DAPL1 ist ein weitestgehend unbeschriebenes Protein, dem aufgrund von Ähnlichkeiten eine Rolle für die Apoptose nachgesagt wird. Da Apoptose in Krebs sehr oft fehlreguliert ist und beide Gene während der Acini-Entwicklung stark reguliert sind, wurden sie für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Von beiden Zielgenen wurden stabile Zelllinien hergestellt um die jeweilige Überexpression zu untersuchen. Die stabile Transfektion der Expressionsvektoren TNFRSF6B und DAPL1 konnte gezeigt werden. Da es sich bei TNFRSF6B um ein sekretorisches Protein handelt, ist die Funktionalität des exogenen Proteins, d.h. die Sekretion, von Interesse. Dies konnte in den Versuchen jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von TNFRSF6B-ÜE-Zellen konnte eine zytoplasmatische Lokalisation gezeigt werden, die Sekretion des Proteins konnte mit dieser Methode jedoch nicht gezeigt werden. Auch ein Nachweis der Sekretion des Proteins ins Zellkulturmedium konnte aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht gezeigt werden. Hierzu wurde eine Aufreinigung und Konzentration der Mediumbestandteile mittels Ultrazentrifugationsröhrchen durchgeführt und die Fraktionen anschließend mittels Western Blot analysiert. Der

Nachweis des exogenen Proteins mittels flag-Antikörper führte jedoch zu einem breiten unspezifischen Protein-Schmier in allen Proteinfractionen. Dies ist möglicherweise durch die Serumproteine im Zellkulturmedium und eine Überladung der SDS-Gele zu erklären. Dadurch ist der Nachweis der Sekretion des exogenen TNFRSF6B-Proteins mittels Western Blot nicht eindeutig. Zudem wurde eine Entry-Vektor-Zelllinie hergestellt, die in den ÜE-Versuchen als Transfektionskontrolle mitgeführt wurde. Diese zeigte jedoch schon im unbehandelten Zustand starke Einschränkungen im Zellwachstum und ein nicht reproduzierbares Verhalten. Aufgrund dessen wurde die Entry-Vektor-Zelllinie aus den Auswertungen genommen. Möglicherweise sind hier durch die stabile Transfektion der Zellen Gene betroffen, die die Proliferation oder Entwicklung der Zellen beeinflussen und die Zellen somit als Kontrolle ungeeignet machen. Stattdessen wurden untransfizierte MCF10A-Zellen als Kontrolle herangezogen.

#### **4.2.2. Wirkung von Kandidatenproteinen während der FasL-induzierten Apoptose**

##### **4.2.2.1. Einfluss der TNFRSF6B-Überexpression auf die FasL-induzierte Apoptose**

Der extrinsische Apoptoseweg wird u.a. durch die Bindung des trimerischen Proteins FasL an den transmembranen Fas-Rezeptor aktiviert. Dadurch wird die Trimerisation von FADD eingeleitet, wodurch Pro-Caspase 8 rekrutiert und autoproteolytisch aktiviert wird. Caspase 8 aktiviert anschließend die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die die Apoptose einleiten [70]. Der durch Fas eingeleitete Apoptoseweg spielt eine wichtige Rolle für die Immunantwort, u.a. für den Abbau infizierter Zellen von alten oder gefährlichen Lymphozyten und als Schutz vor Krebsentstehung [72].

TNFRSF6B ist in der Lage die Liganden FasL, LIGHT und TL1A zu binden [76]. So konkurriert TNFRSF6B mit Fas um die Bindung von FasL und hemmt somit den FasL-induzierten Zelltod. Dadurch hat TNFRSF6B eine anti-apoptotische Wirkung in Zellen. Da TNFRSF6B in vielen Krebsarten überexprimiert ist, könnte es auch eine Rolle für die Brustkrebsentwicklung spielen. Da TNFRSF6B in unserer Genexpressionsanalyse

von MCF10A-Acini-Stadien herunterreguliert war, wurden ÜE-Zelllinien hergestellt um den Einfluss von FasL auf die Zellen zu testen.

Der Zellviabilitäts-Assay zeigte keinen negativen Einfluss der FasL-Behandlung auf die Kontrollzelllinie MCF10A. Wir konnten feststellen, dass die MCF10A-TNFRSF6B-ÜE-Zellen bei einer Behandlung mit 25 ng/ml FasL eine Abnahme der Lebendzellzahl von ca. 13 % im Vergleich zur Kontrolle zeigen. Dies steht im Gegensatz zur Funktion von TNFRSF6B als anti-apoptotisches Protein. Da nicht genau gezeigt werden konnte, ob das exogene TNFRSF6B-Protein tatsächlich von den Zellen sekretiert wird, ist die Funktionalität des Proteins nicht eindeutig. Sollte das exogene TNFRSF6B nicht sekretiert werden, würde man allerdings keinen Unterschied zur Kontrolle erwarten. Jedoch zeigt auch die Kontrollzelllinie MCF10A keine Abnahme der Lebendzellzahl nach FasL-Behandlung. Der Vortest zur FasL-Behandlung zeigte jedoch eine Abnahme der Lebendzellzahl um 25 bzw. 30 % bei einer 10 ng/ml bzw. 25 ng/ml-FasL-Behandlung. Außerdem konnten Müllauer et al. die Expression von Fas in MCF10A-Zellen nachweisen [117]. Um diese Differenzen auszuschließen, wurde ein Apoptose-Assay unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe des Nachweises von Caspase 8 bestimmt. Da Caspase 8 eine Initiator-Caspase ist, können hier auch sehr frühe Apoptosestadien nachgewiesen werden, wohingegen beim Zellviabilitäts-Assay erst spät-apoptotische Zellen zum Tragen kommen, wenn diese den Metabolismus einstellen. Beim Apoptose-Assay zeigte die Kontrollzelllinie im Gegensatz zum Zellviabilitäts-Assay eine Zunahme der apoptotischen Zellen nach FasL-Behandlung. Bei den TNFRSF6B-ÜE-Zellen ist ein Anstieg der Apoptoserate bei FasL-Behandlung zu sehen, was auch in diesem Fall nicht mit der anti-apoptotischen Funktion des Proteins einhergeht. Jedoch sind die Apoptoseraten der TNFRSF6B-ÜE-Zellen nach FasL-Behandlung nicht gegenüber der MCF10A-Kontrolle erhöht. Dies spricht eher für die fehlende Integrität des exogenen TNFRSF6B.

Jedoch konnten wir auch keinen Einfluss des endogen überexprimierten TNFRSF6B in der CAF-Zelllinie 60161A1 gegenüber der normalen Fibroblastenzelllinie 60161B1

nach FasL-Behandlung feststellen. Als endogenes ÜE-System bestätigen diese Ergebnisse, die der FasL-Behandlung der exogenen MCF10A-TNFRSF6B-ÜE-Zelllinie. Auch wenn die Rolle von TNFRSF6B in Brustkrebs noch nicht vollständig geklärt ist, konnten Wu et al. zeigen, dass TNFRSF6B in Brustkrebsgewebe überexprimiert wird [88]. Zudem zeigten Ge et al., dass ein Knock-down von TNFRSF6B in MCF7-Brustkrebszellen einen inhibitorischen Effekt auf die Zellinvasion und -migration hat [89]. Es konnte auch beobachtet werden, dass TNFRSF6B-exprimierende Tumorzellen die zytotoxische Attacke umgehen können [85]. So könnte Tumor-sekretiertes TNFRSF6B zur Umgehung der Immunantwort beitragen, indem es die apoptotischen Signale von Lymphozyten, die FasL und LIGHT exprimieren, blockiert [82-84].

#### **4.2.2.2. DAPL1 hat eine potentielle anti-apoptotische Funktion während der FasL-induzierten Apoptose**

Die Rolle von DAPL1 in der Apoptose ist bisher weitestgehend ungeklärt. Um den Einfluss der DAPL1-Überexpression während der FasL-induzierten Apoptose zu testen, wurden DAPL1-ÜE-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen FasL behandelt und mittels Zellviabilitäts-Assay und Apoptose-Assay ausgewertet. Die DAPL1-ÜE-Zellen zeigten nach der FasL-Behandlung weder eine Abnahme der Lebendzellzahl noch eine Erhöhung der Apoptoserate. Dies spricht für eine mögliche anti-apoptotische Rolle von DAPL1 für die FasL-induzierte Apoptose. Die Funktionsweise von DAPL1 ist bisher unbekannt. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu DAP1 wird eine Funktion in der Apoptose angenommen. Liou et al. zeigten, dass DAP1 die Apoptose induziert indem es mit der Todesdomäne des Tumornekrosefaktor-Rezeptors (TNF-R1) interagiert und außerdem an der Aktivierung von FADD beteiligt ist [118]. An der FasL-induzierten Apoptose ist der Fas-Rezeptor mit seiner Todesdomäne als auch FADD zur Aktivierung von Caspase 8 beteiligt. Da wir eine anti-apoptotische Wirkung von DAPL1 nach FasL-induzierter Apoptose beobachten konnten, lässt dies vermuten, dass DAPL1 möglicherweise in der Lage ist mit der Todesdomäne von Fas zu interagieren und die Trimerisation oder Rekrutierung von FADD inhibiert. Dadurch

würde die Aktivierung von Caspase 8 und den folgenden Effektor-Caspasen verhindert.

#### **4.2.3. Untersuchung des Einflusses der TNFRSF6B-Überexpression auf die MCF10A-Acini-Entwicklung**

Die Genexpressionsanalyse der verschiedenen Acini-Stadien zeigte eine Herunterregulierung der TNFRSF6B-mRNA während der Acini-Entwicklung für alle drei Acini-Stadien (s. Tabelle 16), was auf eine mögliche Rolle von TNFRSF6B für die Apoptose während der Acini-Entwicklung schließen lässt. Zu den späteren Zeitpunkten der Acini-Entwicklung lässt sich die Herunterregulierung von TNFRSF6B durch die einsetzende Lumenbildung erklären, bei der die Zellen im Inneren des Acinus absterben. Warum TNFRSF6B an Tag 2 der 3D-Kultur herunterreguliert ist, ist nicht eindeutig, da es die Zellen sensibler für den Todesrezeptor-Signalweg macht, was zu diesem frühen Zeitpunkt der Acini-Bildung kontraproduktiv wäre. Durch die Überexpression von TNFRSF6B in der MCF10A-3D-Kultur würde man eventuell eine Abnahme der apoptotischen Zellen erwarten, was sich zusätzlich durch eine Zunahme des Größenwachstums oder das Fehlen des inneren Lumens äußern könnte. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden die TNFRSF6B-ÜE-Zelllinien in 3D kultiviert. Die Überexpression von TNFRSF6B in MCF10A-Zellen zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Acini-Entwicklung. Die Untersuchung von Anzahl und Größe der Acini in verschiedenen Stadien zeigt nur sehr geringe Abweichungen zur Kontrolle. Auch die immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung der Acini zeigte keine Abweichung bei der Untersuchung spezifischer Marker für Polarisation, Proliferation und Apoptose zu verschiedenen Zeitpunkten der Acini-Entwicklung. Ebenso konnte kein Einfluss auf die Lumenbildung beobachtet werden.

Bisher wurde die Lumenbildung hauptsächlich mit dem Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes (Anoikis) in Verbindung gebracht, wobei Proteine, wie BIM, JNK und Glucocorticoide beteiligt sind [18, 19]. Jedoch zeigen weder unsere mRNA- noch

Protein-Daten eine Hochregulierung von BIM. Auch JNK zeigt auf der Transkriptionsebene keine Regulation. Auf Proteinebene wird JNK herunterreguliert, während pJNK keine Regulation zeigt. Das von JNK aktivierte Protein c-Jun zeigt auf mRNA- und Proteinebene eine Zunahme des Gesamtlevels, wobei das pc-Jun-Level jedoch abnimmt. Andere Studien zeigen jedoch eine Rolle des FasL/Fas-Systems für Anoikis. So konnten Aoudjit et al. beobachten, dass Anoikis in HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) die Interaktion zwischen Fas und FasL benötigt. Sie konnten Anoikis durch die Verwendung Fas- bzw. FasL-blockierenden Antikörpern inhibieren und zeigten zudem eine Hochregulierung von Fas nach der Ablösung der Zellen [119]. Auch Ishida et al. konnten eine Hochregulierung von FasL in Leberzellen von Ratten nachweisen, wenn diese sich ablösen oder bei Störung des Zytoskeletts. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Herunterregulierung von FasL eine AKT- und ERK1/2-unabhängige Form der Anoikis-Inhibierung darstellt [120]. Eine weitere Studie unterstreicht die Rolle von FasL für Anoikis. Puviani et al. untersuchten die Seren von Pemphigus-Patienten, einer Hautkrankheit, die durch den Verlust der Adhäsion von suprabasalen Keratinozyten charakterisiert ist. Sie fanden erhöhte FasL-Level in Patienten-Seren und stellten eine entscheidende Rolle von FasL für die Pathogenese fest [121]. Dies spricht für eine unabhängige Funktion des FasL/Fas-Systems für Anoikis und lässt auch eine Rolle von TNFRSF6B als Anoikis-Inhibitor zu. Da die Integrität unseres exogenen TNFRSF6B in MCF10A-Zellen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, spricht dies für den fehlenden Einfluss der TNFRSF6B-ÜE für die MCF10A-Acini-Entwicklung.

#### **4.2.4. Untersuchung des Einflusses der Herunterregulierung von Kandidatenproteinen auf die MCF10A-Acini-Entwicklung**

Die Genexpressionsanalyse verschiedener MCF10A-Acini-Stadien brachte einige interessante Kandidaten hervor. Neben TNFRSF6B und DAPL1 waren auch die Transkripte von GPNMB und ANGPTL4 stark reguliert. Um den Einfluss dieser Gene

auf die Acini-Entwicklung zu überprüfen, wurde ein Knock-down in MCF10A-Zellen mittels siRNA für die Zielgene TNFRSF6B, DAPL1, ANGPTL4 und GPNMB durchgeführt und die Zellen anschließend in 3D kultiviert. Nur für TNFRSF6B konnte der Knock-down im Western Blot nachgewiesen werden. Für ANGPTL4 und GPNMB konnte kein Knock-down mittels Western Blot gezeigt werden.

Für keines der Gene konnte ein Effekt auf das Größenwachstum oder bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Acini im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

Da der Knock-down vor der 3D-Kultivierung durchgeführt wurde, könnte es sein, dass der Knock-down-Effekt während der Acini-Bildung wieder verloren gegangen ist.

Da TNFRSF6B schon ab Tag 2 der Acini-Bildung stark herunterreguliert war, hätte man durch den Knock-down keinen deutlichen Effekt auf die Acini-Bildung erwartet.

DAPL1 hingegen war während der Acini-Bildung ab Tag 7 stark hochreguliert. Betrachtet man die Ergebnisse der FasL-Behandlung der DAPL1-ÜE-Zelllinie, zeigt sich eine mögliche anti-apoptotische Funktion von DAPL1 in der FasL-induzierten Apoptose. Möglicherweise schützt DAPL1 die äußere Zellschicht der Acini vor apoptotischen Signalen. Durch einen DAPL1-Knock-down in der 3D-Kultur hätte man also eventuell eine höhere Apoptoserate in den Acini erwarten. Es ließen sich jedoch keine Abweichungen zur Kontrolle nachweisen. Allerdings konnte der Knock-down für DAPL1 nicht gezeigt werden, da das DAPL1-Grundlevel schon in den Kontrollzellen zu gering und somit im Western Blot nicht nachweisbar ist.

### **4.3. Untersuchung der Signaltransduktion nach Inhibitor-Behandlung in CAFs und normalen Fibroblasten**

Die Entstehung und Progression von Tumoren kann entscheidend durch die Zusammensetzung des Stromas epithelialer Gewebe als auch durch die von Stromazellen exprimierten Faktoren beeinflusst werden. Fibroblasten sind je nach ihrer anatomischen Herkunft sehr heterogen und weisen verschiedene

Genexpressionsmuster auf [27]. CAFs sind aktivierte Fibroblasten und spielen eine entscheidende Rolle für das Tumorwachstum und -progression [28]. Sie können Wachstumsfaktoren wie IGF1 und HGF sekretieren, die das Überleben von Tumorzellen fördern sowie VEGF oder MCP1, die das Stroma aktivieren können [122]. Die verschiedenen Signalwege in Brustkrebs bieten eine große Angriffsfläche für die Brustkrebstherapie. Durch die Heterogenität von Brustkrebs ist es jedoch notwendig, die molekularen Grundlagen genauer zu analysieren, um neue Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen zu finden und eine individuelle gezielte Therapie einleiten zu können. Um Unterschiede in der Signaltransduktion von CAFs und normalen Fibroblasten besser zu verstehen, wurden sie mit verschiedenen Inhibitoren behandelt und wichtige signaltransduzierende Proteine analysiert. Dafür wurden zwei primäre Fibroblastenzelllinien selben Ursprungs herangezogen, die Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF) -Zelllinie 60161A1 und die nicht-karzinogene (normale) Zelllinie 60161B1. Die Zelllinien sind Hormonrezeptor- und HER2-negativ.

Gefitinib ist ein Wirkstoff, der die Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) inhibiert. EGFR wird von Wachstumsfaktoren, z.B. EGF, phosphoryliert und reguliert dadurch wichtige Signalkaskaden der Zellproliferation, sowie der Differenzierung oder des Überlebens von Zellen. Dies geschieht über die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine, wie z.B. AKT, ERK, p70S6K, GSK3 $\alpha/\beta$ , MEK1 und p90RSK, durch EGFR. Da viele Tumorzellen EGFR überexprimieren, ist Gefitinib in der Lage das Tumorwachstum zu hemmen oder ggf. die Zellen abzutöten. Auch Zellen die EGFR nur gering exprimieren und HER2/neu-überexprimierende Zellen zeigen eine Sensitivität für Gefitinib [123, 124]. Die in unseren Versuchen verwendeten Fibroblastenzelllinien zeigen beide eine Sensitivität für Gefitinib. Dies zeigt sich durch die Dephosphorylierung von ERK1/2, AKT, p70S6K und S6. Die Herunterregulierung des AKT und MAPK-Signalweges durch Gefitinib konnte auch in Brustkrebszelllinien gezeigt werden [125].

Parthenolid (PTL) ist ein natürliches Sesquiterpenlacton des Mutterkrauts (*Tanacetum parthenium*). Seine anti-inflammatorische sowie Apoptose-induzierende Wirkung



machen es u.a. als Krebstherapeutikum interessant. Studien haben gezeigt, dass PTL als NFκB-Inhibitor wirkt sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) produziert [126, 127].

Unser Versuch zur PTL-Behandlung der beiden Fibroblastenzelllinien zeigt jedoch eher gegensätzliche Ergebnisse. Wir konnten eine Aktivierung der Proliferationsmarker ERK1/2, p70S6K und S6 durch PTL in beiden Fibroblastenzelllinien beobachten. In der CAF-Zelllinie zeigte sich zusätzlich eine Zunahme von Cyclin D1. Es konnte auch keine Inaktivierung/Dephosphorylierung von NFκB durch PTL beobachtet werden. Der einzige mögliche Hinweis für eine Inhibierung der Zellproliferation ist die Dephosphorylierung von AKT der Zelllinie 60161A1 bei 5 μM Parthenolid-Behandlung, die jedoch im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen steht.

Rapamycin ist ein mTOR-Inhibitor und hat eine anti-proliferative Wirkung auf Zellen. Es ist in der Lage den mTORC1-Komplex zu inhibieren, welcher für die Phosphorylierung von p70S6K an Threonin 389 zuständig ist und dadurch S6 aktiviert. Der mTORC2-Komplex, der AKT phosphoryliert, ist hingegen nicht sensitiv für Rapamycin [128]. Dies lässt sich durch unsere Ergebnisse bestätigen. In beiden Fibroblastenzelllinien führt Rapamycin zu einer Dephosphorylierung von p70S6K, S6 sowie RB. Eine Abnahme von Cyclin D konnte nur in der CAF-Zelllinie beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen für die anti-proliferative Wirkung von Rapamycin. Auch die Unempfindlichkeit von mTORC2 gegenüber Rapamycin lässt sich bestätigen. 60161B1 zeigt keine Änderung der AKT-Aktivität nach Rapamycin-Behandlung, wohingegen 60161A1 sogar eine erhöhte Phosphorylierung von AKT zeigt. Dies lässt sich durch eine Zunahme des IRS-1 Proteins erklären, was durch die Inhibierung des mTORC1 angereichert und zu einer AKT-Aktivierung führt [129]. Auch die Phosphorylierung von ERK1/2 in beiden Zelllinien nach Rapamycin-Behandlung lässt sich durch andere Studien bekräftigen. So zeigten Chaturvedi et al., dass Rapamycin in verschiedene Zelltypen eine extrazellulär regulierte ERK1/2-Signalkaskade aktiviert und so die Zellen der Rapamycin-induzierten Apoptose entkommen [130].

Studien zeigen, dass eine HER2-Überexpression zu einer erhöhten Phosphorylierung von mTOR führt und diese Zellen Rapamycin-sensitiv sind [131]. Eine Kombination mit anderen Wirkstoffen kann bei Rapamycin-sensitiven Zellen noch effektiver sein [132]. HER2-negative Tumore oder Zellen reagieren nicht auf eine Rapamycin-Behandlung [133]. Unsere Fibroblasten zeigen jedoch eine deutliche Reaktion auf die Rapamycin-Behandlung, obwohl sie laut Herstellerangaben (Asterand) Hormonrezeptor- und HER2-negativ sind.

Tamoxifen ist ein selektiver Estrogenrezeptormodulator und bindet an Estrogenrezeptoren (ER). Der aktive Metabolit 4-Hydroxytamoxifen, der in diesen Versuchen verwendet wurde, hat eine noch höhere Affinität zu ERs. Durch die Bindung an den Rezeptor wird eine Konformationsänderung des Rezeptors eingeleitet, wodurch die Expression Estrogen-abhängiger Gene geändert oder blockiert wird. Estrogene und ihre Rezeptoren spielen eine Rolle für die Regulation der Zellproliferation und Differenzierung.

Insgesamt zeigt sich eine Aktivierung von ERK1/2 und S6 in beiden Fibroblastenzelllinien und eine Dephosphorylierung von AKT für die CAF-Zelllinie durch die Behandlung mit Tamoxifen.

Da die Estrogenrezeptoren auch PI3K und MAPK regulieren, würde man durch die Tamoxifen-Behandlung eine Inhibierung von ERK1/2 und AKT erwarten. Da unsere Fibroblastenzelllinien Hormonrezeptor-negativ sind, würde dies die fehlende Wirkung von Tamoxifen auf die Zellen erklären.

Zusammenfassend zeigen sich sehr ähnliche Regulationen der Proteine in der CAF-Zelllinie 60161A1 und der normalen Fibroblastenzelllinie 60161B1 nach den verschiedenen Wirkstoffbehandlungen. Es lassen sich keine gegensätzlichen Regulationen erkennen.

Trotzdem bleiben das Tumorstroma und seine Komponenten interessante Ziele für die gezielte Therapie, u.a. weil Stromazellen genetisch stabiler sind als Krebszellen und dadurch weniger Potential haben Wirkstoffresistenzen zu entwickeln [134, 135]. Zudem können CAFs die Wirkstoffsensitivität von Krebszellen beeinflussen, wie

Shekhar et al. am Beispiel von Tamoxifen in Brustkrebsmodellen bei einer Co-Kultivierung von CAFs zeigen konnten [49]. Auch die Behandlung mit nichtsteroidalen anti-inflammatorischen Wirkstoffen kann das Risiko für Darm- und Brustkrebs durch die Inhibierung inflammatorischer Zellen und Cytokine verringern [136]. Ebenfalls konnten bereits VEGF-Inhibitoren erfolgreich getestet werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Behandlung mit HER2-neutralisierenden Antikörpern auch einen Effekt auf das Tumorstroma hat und tumorzellgenerierte Angiogenesefördernde Moleküle herunterreguliert [137].

Fibroblasten spielen auch eine wichtige Rolle für die Prognostik. In einer Brustkrebsstudie konnte anhand von Genexpressionsprofilen des Tumorstromas ein prognostischer Test entwickelt werden, der erfolgreich den Brustkrebsverlauf vorhersagen kann [138]. Die prognostische Rolle von Brust-CAFs zeigt sich auch dadurch, dass eine hohe Expression des PDGF- $\beta$ -Rezeptors in CAFs mit einer kürzeren Überlebensrate einhergeht [139].

#### **4.4. Einfluss von CAFs und normalen Fibroblasten auf die MCF10A-Acini-Entwicklung**

Im Stroma des Brustgewebes kommen verschiedene Zelltypen vor wie z.B. Endothelzellen, residente Immunzellen, Fettzellen und Fibroblasten mit ihren Zellprodukten wie Wachstumsfaktoren und Komponenten der EZM [33].

Im Tumorgewebe sind zusätzlich CAFs zu finden. Diverse Veröffentlichungen zeigen die Wichtigkeit der Interaktion zwischen Epithel und Stroma und auch Tumor und Stroma. So haben Fibroblasten einen Einfluss auf die Differenzierung des Epithels [51]. Zudem konnte der Einfluss von CAFs für die Tumorentstehung und -progression gezeigt werden [33, 37, 42, 44, 45]. CAFs exprimieren Wachstumsfaktoren, wie EGF, TGF- $\beta$  oder HGF, die für ihre tumorfördernde Wirkung bekannt sind [32]. Um die Interaktion zwischen Fibroblasten und Epithelzellen zu bestätigen, haben wir den Einfluss der CAF-Zelllinie und der normalen Fibroblastenzelllinie auf die Entwicklung

der MCF10A-Acini untersucht. Dafür wurde eine Co-Kultur von MCF10A-Acini mit jeweils einer der beiden Fibroblastenzelllinien durchgeführt. Zwischen den Co-Kulturen der beiden Fibroblastenzelllinien zeigten sich keine Unterschiede in der Größe oder der Anzahl der Acini zu verschiedenen Zeitpunkten der Acini-Entwicklung. Auch der immunfluoreszenzmikroskopische Vergleich zur MCF10A-3D-Monokultur ließ keinen Einfluss der Fibroblasten auf die untersuchten Marker für Polarisierung, Proliferation oder Apoptose erkennen.

Sadlonova et al. und andere zeigten, dass das Verhältnis von E:F in Co-Kultur entscheidend für einen Einfluss auf die Epithelzellen ist [140, 141]. Auch dies konnte hier nicht bestätigt werden, da die verschiedenen Verhältnisse keine Unterschiede zeigten.

Der Einfluss von CAFs für die Entstehung von Brustkrebs ist jedoch nicht von der Hand zu weisen. Orimo et al. injizierten einen Mix aus MCF7-ras-Zellen und CAFs invasiver humaner Brustkarzinome oder normalen Fibroblasten desselben Patienten in Mäuse und konnten zeigen, dass CAFs öfter Karzinome ausbilden [142]. Auch der Einfluss von CAF-konditioniertem Medium auf Brustkrebszellen konnte beobachtet werden. So zeigten Lebet et al. den Verlust der E-Cadherin-abhängigen Adhäsion von Brustkrebszellen nach Inkubation mit CAF-konditioniertem Medium [143].

#### **4.5. 3D-Kultur als Modell für die Untersuchung potentieller Brustkrebskandidaten**

Die 3D-Kultivierung bringt entscheidende Vorteile gegenüber der einschichtigen Zellkultur. So können die Signalwege in beiden Kultur-System stark voneinander abweichen. Für die Untersuchung von Brustkrebs ist die 3D-Kultur wichtig, da es den *in vivo*-Eigenschaften von Zellen sehr ähnlich ist. Auch der Einfluss von CAFs auf Epithelzellen kann in diesem System untersucht werden, da sie eine entscheidende Rolle für die Tumorentstehung und -progression spielen. Bei der genexpressionsanalytischen und proteinbasierten Untersuchung verschiedener MCF10A-

Acini-Stadien konnten neue potentielle Brustkrebskandidaten gefunden werden. TNFRSF6B, ein FasL-Rezeptor der den extrinsischen Apoptoseweg inhibieren kann, wurde während der Acini-Entwicklung stark herunterreguliert. Zudem ist es in verschiedenen Krebsarten wie auch Brustkrebs überexprimiert. Verschiedene Versuche mit einer TNFRSF6B-ÜE-Zelllinie sowie einer TNFRSF6B-exprimierenden CAF-Zelllinie brachten jedoch keine neuen Erkenntnisse bezüglich der Rolle von TNFRSF6B für die Brustkrebsentstehung.

Das bisher weitestgehend uncharakterisierte Protein DAPL1 war während der MCF10A-Acini-Entwicklung stark exprimiert. Die Funktion von DAPL1 ist bisher nicht bekannt, jedoch zeigte die FasL-Behandlung in einer MCF10A-DAPL1-ÜE-Zelllinie eine anti-apoptotische Wirkung von DAPL1. Dies spricht für eine bisher unbekannte inhibitorische Funktion von DAPL1 für die FasL-induzierte Apoptose.

## Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Krebsart bei Frauen weltweit und machte 2012 ca. 25 % der Krebsneudiagnosen bei Frauen aus. Ein wichtiges Modell für die Erforschung von Brustkrebs ist die dreidimensionale Zellkultur (3D-Kultur). Hierbei werden Brustepithelzellen in eine extrazelluläre Matrix gebettet, wodurch sie drüsenartige Sphäroide, Acini genannt, ausbilden. Dies spiegelt die Drüsenbildung der Brust wider und ermöglicht eine bessere Untersuchung der *in vivo*-Eigenschaften von Brustepithelzellen im Vergleich zur normalen einschichtigen Zellkultur. Dieses experimentelle System dient auch der Analyse bestimmter Teilaspekte der Brustkrebsentwicklung. Basierend auf diesem Modell, wurde zum einen eine genomweite Genexpressionsanalyse verschiedener Stadien der MCF10A-Acini-Entwicklung durchgeführt, um die molekularen Grundlagen der Brustdrüsenentwicklung zu untersuchen. Um diese Ergebnisse zu ergänzen, wurde zum anderen eine RPPA-Analyse wichtiger Signalproteine der verschiedenen Acini-Stadien durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse wurden potentielle Zielgene ausgewählt und auf ihre mögliche Funktion für die Brustkrebsentstehung analysiert. So zeigten sich TNFRSF6B und DAPL1, aufgrund ihrer starken Regulation während der Acini-Entwicklung und ihrer Funktion für die Apoptose, als gute Kandidaten für weitere Untersuchungen. Es wurden MCF10A-Überexpressionszelllinien hergestellt und deren Reaktion auf eine Fas Ligand-Behandlung getestet. Fas Ligand induziert durch die Bindung an den Fas-Rezeptor den extrinsischen Apoptoseweg und spielt eine wichtige Rolle für die Tumorprogression. Hierbei konnten wir eine mögliche anti-apoptotische Funktion von DAPL1 während der Fas Ligand-induzierten Apoptose feststellen. Zudem wurde der Einfluss der Überexpression und eines Knock-downs der Kandidatengene auf die Acini-Entwicklung analysiert. Dies zeigte jedoch keine direkte Rolle von TNFRSF6B oder DAPL1 für die Acini-Entwicklung.

Ein weiterer Fokus dieser Studie liegt auf der Untersuchung der Epithel-Stroma-Interaktion, da diese eine wichtige Rolle für die Krebsentstehung spielt. Hierfür

wurden eine normale und eine Tumor-assoziierte Brust-Fibroblastenzelllinie gleichen Ursprungs herangezogen. Diese wurden zunächst mittels Western Blot im direkten Vergleich auf ihre Proteinexpression untersucht, wobei die Tumor-assoziierte Zelllinie eine endogene Überexpression von TNFRSF6B zeigte. Aufgrund dessen wurde die Zellviabilität der Fibroblasten nach Fas Ligand-Behandlung untersucht. Zudem wurden die Fibroblasten mit verschiedenen Wirkstoffen behandelt, die in unterschiedlichen Krebsignalwegen wirken, um ihre Reaktion mittels RPPA-Analyse verschiedener Signalproteine zu testen. Anschließend wurden die Fibroblasten mit MCF10A-Zellen in 3D co-kultiviert. Jedoch zeigten die Fibroblasten keinen deutlichen Einfluss bzw. transformative Eigenschaften während der Acini-Entwicklung. Trotz der häufigen Überexpression von TNFRSF6B in Brustkrebs ist dessen Rolle weiterhin nicht vollständig geklärt.

## Summary

Breast cancer is one of the most common cancers in women worldwide and accounted for 25 % of all new female cancers in 2012. The three-dimensional cell culture is an important model to study breast cancer. Therefore breast epithelial cells are embedded into an extracellular matrix thus forming glandular-like structures called acini. This resembles the glandular organization of breast tissue and helps to approximate the *in vivo* properties of cells and their growth and signaling behavior in comparison to normal monolayer cell cultures. Based on this model we performed a whole genome mRNA-profiling of different stages of MCF10A-acinus-formation to investigate the molecular basis of mammary gland development. To complement these results we used RPPA to analyze the regulation of important signaling proteins at the different stages of acini-formation. On the basis of these results the target genes TNFRSF6B and DAPL1 were picked for further analysis. Both showed a high regulation during acini-development and are involved in apoptosis. MCF10A-overexpression cell lines were made to analyze their reaction on Fas ligand treatment. Fas ligand induces the extrinsic pathway of apoptosis via the binding of Fas-receptor and plays a critical role in cancer progression. Here we show a potential role of DAPL1 as an anti-apoptotic protein during Fas ligand-induced apoptosis. Furthermore we investigated the influence of overexpression and knock-down of the target genes on acini-formation but without convincing results.

Another focus of this study was the investigation of stromal-epithelial-interaction as it has a great impact on cancer development. Therefore a normal (from tumor-adjacent tissue) and a tumor-associated mammary fibroblast cell line of the same origin were used. A direct comparison of protein expression via Western blot showed the tumor-associated cell line overexpressing TNFRSF6B endogenously. Therefore cell viability of fibroblasts was measured after Fas ligand treatment. Furthermore fibroblasts were treated with different compounds that affect different cancer signaling pathways to test their reaction via RPPA of several signaling proteins.



Additionally the influence or transformation potential of the fibroblasts during acini-development was analyzed by 3D-co-culture with MCF10A cells but the fibroblasts did not show a convincing influence on acini-formation.

Although TNFRSF6B is often overexpressed its role in breast cancer still remains largely unexplained.

---

## Literaturverzeichnis

1. Nwabo Kamdje AH, Etet PF, Vecchio L, *et al.*: **New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers.** *World journal of clinical cases* 2014, **2**(12):769-786.
2. Arps DP, Jorns JM, Zhao L, *et al.*: **Re-excision rates of invasive ductal carcinoma with lobular features compared with invasive ductal carcinomas and invasive lobular carcinomas of the breast.** *Annals of surgical oncology* 2014, **21**(13):4152-4158.
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
4. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, *et al.*: **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(18):10393-10398.
5. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, *et al.*: **Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways.** *Cancer treatment reviews* 2012, **38**(6):698-707.
6. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, *et al.*: **Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion.** *Molecular cancer research : MCR* 2008, **6**(10):1521-1533.
7. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K: **The IGF-1 receptor in cancer biology.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003, **107**(6):873-877.
8. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
9. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM: **Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer.** *Current opinion in genetics & development* 2005, **15**(1):102-111.
10. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, *et al.*: **Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies.** *American journal of human genetics* 2003, **72**(5):1117-1130.
11. Rebbeck TR, Domchek SM: **Variation in breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers.** *Breast cancer research : BCR* 2008, **10**(4):108.
12. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, *et al.*: **Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, **28**(7):1124-1130.
13. Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, *et al.*: **RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(10):1252-1260.
14. Barcellos-Hoff MH, Aggeler J, Ram TG, *et al.*: **Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane.** *Development* 1989, **105**(2):223-235.
15. Debnath J, Brugge JS: **Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures.** *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(9):675-688.
16. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS: **Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.** *Methods* 2003, **30**(3):256-268.
17. Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, *et al.*: **Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(19):9064-9068.

18. Murtagh J, McArdle E, Gilligan E, *et al.*: **Organization of mammary epithelial cells into 3D acinar structures requires glucocorticoid and JNK signaling.** *The Journal of cell biology* 2004, **166**(1):133-143.
19. Reginato MJ, Mills KR, Becker EB, *et al.*: **Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes.** *Molecular and cellular biology* 2005, **25**(11):4591-4601.
20. Whyte J, Thornton L, McNally S, *et al.*: **PKCzeta regulates cell polarisation and proliferation restriction during mammary acinus formation.** *Journal of cell science* 2010, **123**(Pt 19):3316-3328.
21. Leslie K, Gao SP, Berishaj M, *et al.*: **Differential interleukin-6/Stat3 signaling as a function of cellular context mediates Ras-induced transformation.** *Breast cancer research : BCR* 2010, **12**(5):R80.
22. Williams CM, Engler AJ, Slone RD, *et al.*: **Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation.** *Cancer research* 2008, **68**(9):3185-3192.
23. Imbalzano KM, Tatarkova I, Imbalzano AN, *et al.*: **Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture.** *Cancer cell international* 2009, **9**:7.
24. Tarin D, Croft CB: **Ultrastructural features of wound healing in mouse skin.** *Journal of anatomy* 1969, **105**(Pt 1):189-190.
25. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, *et al.*: **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2002, **3**(5):349-363.
26. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, *et al.*: **A stromal address code defined by fibroblasts.** *Trends in immunology* 2005, **26**(3):150-156.
27. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, *et al.*: **Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(20):12877-12882.
28. Mueller MM, Fusenig NE: **Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2004, **4**(11):839-849.
29. Ostman A, Augsten M: **Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players.** *Current opinion in genetics & development* 2009, **19**(1):67-73.
30. Sappino AP, Skalli O, Jackson B, *et al.*: **Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 1988, **41**(5):707-712.
31. Ronnov-Jessen L, Petersen OW: **Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1993, **68**(6):696-707.
32. Kalluri R, Zeisberg M: **Fibroblasts in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2006, **6**(5):392-401.
33. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, *et al.*: **Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer.** *Cancer metastasis reviews* 2013, **32**(1-2):303-315.
34. Fata JE, Werb Z, Bissell MJ: **Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes.** *Breast cancer research : BCR* 2004, **6**(1):1-11.
35. Werb Z, Sympson CJ, Alexander CM, *et al.*: **Extracellular matrix remodeling and the regulation of epithelial-stromal interactions during differentiation and involution.** *Kidney international Supplement* 1996, **54**:S68-74.
36. Bissell MJ, Weaver VM, Lelievre SA, *et al.*: **Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast.** *Cancer research* 1999, **59**(7 Suppl):1757-1763s; discussion 1763s-1764s.
37. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH: **The influence of the microenvironment on the malignant phenotype.** *Molecular medicine today* 2000, **6**(8):324-329.

38. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control.** *Nature medicine* 2004, **10**(8):789-799.
39. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ: **Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction.** *Physiological reviews* 1996, **76**(1):69-125.
40. Tlsty TD, Hein PW: **Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals.** *Current opinion in genetics & development* 2001, **11**(1):54-59.
41. Bhowmick NA, Moses HL: **Tumor-stroma interactions.** *Current opinion in genetics & development* 2005, **15**(1):97-101.
42. Vivacqua A, Romeo E, De Marco P, et al.: **GPER mediates the Egr-1 expression induced by 17beta-estradiol and 4-hydroxitamoxifen in breast and endometrial cancer cells.** *Breast cancer research and treatment* 2012, **133**(3):1025-1035.
43. Pupo M, Pisano A, Abonante S, et al.: **GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs).** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2014, **46**:56-67.
44. Nwabo Kamdje AH, Mosna F, Bifari F, et al.: **Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.** *Blood* 2011, **118**(2):380-389.
45. Nwabo Kamdje AH, Bassi G, Pacelli L, et al.: **Role of stromal cell-mediated Notch signaling in CLL resistance to chemotherapy.** *Blood cancer journal* 2012, **2**(5):e73.
46. Guo S, Gonzalez-Perez RR: **Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer.** *PLoS one* 2011, **6**(6):e21467.
47. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, et al.: **Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression.** *Cancer research* 2008, **68**(3):918-926.
48. Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, et al.: **Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta.** *Cancer research* 2004, **64**(4):1331-1337.
49. Shekhar MP, Santner S, Carolin KA, et al.: **Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity.** *The American journal of pathology* 2007, **170**(5):1546-1560.
50. Augsten M, Hagglof C, Olsson E, et al.: **CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(9):3414-3419.
51. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, et al.: **Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(14):4966-4971.
52. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *British journal of cancer* 1972, **26**(4):239-257.
53. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicologic pathology* 2007, **35**(4):495-516.
54. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K: **Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease.** *Circulation research* 2008, **103**(4):343-351.
55. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA: **Targeting apoptosis pathways in cancer therapy.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2005, **55**(3):178-194.
56. King KL, Cidlowski JA: **Cell cycle regulation and apoptosis.** *Annual review of physiology* 1998, **60**:601-617.
57. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al.: **Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo.** *Oncogene* 1994, **9**(6):1799-1805.
58. Pietenpol JA, Stewart ZA: **Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis.** *Toxicology* 2002, **181-182**:475-481.

- 
59. Wang XW, Harris CC: **p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis.** *Journal of cellular physiology* 1997, **173**(2):247-255.
  60. Cheng J, Zhou T, Liu C, *et al.*: **Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule.** *Science* 1994, **263**(5154):1759-1762.
  61. Cefai D, Favre L, Wattendorf E, *et al.*: **Role of Fas ligand expression in promoting escape from immune rejection in a spontaneous tumor model.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2001, **91**(4):529-537.
  62. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, *et al.*: **Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism for immune escape.** *International journal of oncology* 2001, **18**(1):33-39.
  63. Keane MM, Ettenberg SA, Lowrey GA, *et al.*: **Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines.** *Cancer research* 1996, **56**(20):4791-4798.
  64. Mottolese M, Buglioni S, Bracalenti C, *et al.*: **Prognostic relevance of altered Fas (CD95)-system in human breast cancer.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2000, **89**(2):127-132.
  65. Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, *et al.*: **Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer.** *British journal of cancer* 1995, **72**(2):354-360.
  66. Ricca A, Biroccio A, Del Bufalo D, *et al.*: **bcl-2 over-expression enhances NF-kappaB activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7(ADR) breast-cancer cells.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2000, **86**(2):188-196.
  67. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: **The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.** *Cell* 2001, **104**(4):487-501.
  68. Pfeffer K: **Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors.** *Cytokine & growth factor reviews* 2003, **14**(3-4):185-191.
  69. Ware CF: **The TNF superfamily.** *Cytokine & growth factor reviews* 2003, **14**(3-4):181-184.
  70. Lin WW, Hsieh SL: **Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer.** *Biochemical pharmacology* 2011, **81**(7):838-847.
  71. Strasser A, Jost PJ, Nagata S: **The many roles of FAS receptor signaling in the immune system.** *Immunity* 2009, **30**(2):180-192.
  72. Whiteside TL: **The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment.** *Immunological investigations* 2007, **36**(1):25-46.
  73. Bai C, Connolly B, Metzker ML, *et al.*: **Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(3):1230-1235.
  74. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, *et al.*: **Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease.** *Nature genetics* 2008, **40**(10):1211-1215.
  75. Muleris M, Almeida A, Gerbault-Seureau M, *et al.*: **Identification of amplified DNA sequences in breast cancer and their organization within homogeneously staining regions.** *Genes, chromosomes & cancer* 1995, **14**(3):155-163.
  76. Zhan C, Patskovsky Y, Yan Q, *et al.*: **Decoy strategies: the structure of TL1A:DcR3 complex.** *Structure* 2011, **19**(2):162-171.
  77. Simon I, Liu Y, Krall KL, *et al.*: **Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer.** *Gynecologic oncology* 2007, **106**(1):112-118.
  78. Chen PH, Yang CR: **Decoy receptor 3 expression in AsPC-1 human pancreatic adenocarcinoma cells via the phosphatidylinositol 3-kinase-, Akt-, and NF-kappa B-dependent pathway.** *Journal of immunology* 2008, **181**(12):8441-8449.
  79. Liang QL, Wang BR, Li GH: **DcR3 and survivin are highly expressed in colorectal carcinoma and closely correlated to its clinicopathologic parameters.** *Journal of Zhejiang University Science B* 2009, **10**(9):675-682.
-

80. Chen G, Luo D: **Expression of decoy receptor 3 in liver tissue microarrays.** *The National medical journal of India* 2008, **21**(6):275-278.
81. Funke B, Autschbach F, Kim S, *et al.*: **Functional characterisation of decoy receptor 3 in Crohn's disease.** *Gut* 2009, **58**(4):483-491.
82. Ashkenazi A: **Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(6):420-430.
83. Chang YC, Hsu TL, Lin HH, *et al.*: **Modulation of macrophage differentiation and activation by decoy receptor 3.** *Journal of leukocyte biology* 2004, **75**(3):486-494.
84. Shi G, Wu Y, Zhang J, *et al.*: **Death decoy receptor TR6/DcR3 inhibits T cell chemotaxis in vitro and in vivo.** *Journal of immunology* 2003, **171**(7):3407-3414.
85. Green DR: **Apoptosis. Death deceiver.** *Nature* 1998, **396**(6712):629-630.
86. Hsu MJ, Lin WW, Tsao WC, *et al.*: **Enhanced adhesion of monocytes via reverse signaling triggered by decoy receptor 3.** *Experimental cell research* 2004, **292**(2):241-251.
87. Kim S, Fotiadu A, Kotoula V: **Increased expression of soluble decoy receptor 3 in acutely inflamed intestinal epithelia.** *Clinical immunology* 2005, **115**(3):286-294.
88. Wu Q, Zheng Y, Chen D, *et al.*: **Aberrant expression of decoy receptor 3 in human breast cancer: relevance to lymphangiogenesis.** *The Journal of surgical research* 2014, **188**(2):459-465.
89. Ge Z, Sanders AJ, Ye L, *et al.*: **Expression of death decoy receptor-3 (DcR3) in human breast cancer and its functional effects on breast cancer cells in vitro.** *Journal of experimental therapeutics & oncology* 2011, **9**(2):109-118.
90. Cohen O, Inbal B, Kissil JL, *et al.*: **DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain.** *The Journal of cell biology* 1999, **146**(1):141-148.
91. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, *et al.*: **DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis.** *Nature* 1997, **390**(6656):180-184.
92. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A: **DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity.** *The EMBO journal* 1997, **16**(5):998-1008.
93. Lehmann U, Celikkaya G, Hasemeier B, *et al.*: **Promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene in breast cancer is associated with the invasive lobular subtype.** *Cancer research* 2002, **62**(22):6634-6638.
94. Kissil JL, Deiss LP, Bayewitch M, *et al.*: **Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(46):27932-27936.
95. Kissil JL, Cohen O, Raveh T, *et al.*: **Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death.** *The EMBO journal* 1999, **18**(2):353-362.
96. Koren I, Reem E, Kimchi A: **Autophagy gets a brake: DAP1, a novel mTOR substrate, is activated to suppress the autophagic process.** *Autophagy* 2010, **6**(8):1179-1180.
97. Sugita H, Iida S, Inokuchi M, *et al.*: **Methylation of BNIP3 and DAPK indicates lower response to chemotherapy and poor prognosis in gastric cancer.** *Oncology reports* 2011, **25**(2):513-518.
98. Jia Y, Ye L, Ji K, *et al.*: **Death associated protein 1 is correlated with the clinical outcome of patients with colorectal cancer and has a role in the regulation of cell death.** *Oncology reports* 2014, **31**(1):175-182.
99. Wazir U, Jiang WG, Sharma AK, *et al.*: **The mRNA expression of DAP1 in human breast cancer: correlation with clinicopathological parameters.** *Cancer genomics & proteomics* 2012, **9**(4):199-201.
100. Wazir U, Sanders AJ, Wazir A, *et al.*: **Effect of the knockdown of death-associated protein 1 expression on cell adhesion, growth and migration in breast cancer cells.** *Oncology reports* 2014.
101. Sun L, Ryan DG, Zhou M, *et al.*: **EEDA: a protein associated with an early stage of stratified epithelial differentiation.** *Journal of cellular physiology* 2006, **206**(1):103-111.

- 
102. Loebke C, Sueltmann H, Schmidt C, *et al.*: **Infrared-based protein detection arrays for quantitative proteomics.** *Proteomics* 2007, **7**(4):558-564.
  103. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
  104. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979, **76**(9):4350-4354.
  105. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, *et al.*: **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science* 1985, **230**(4732):1350-1354.
  106. Lundberg E, Fagerberg L, Klevebring D, *et al.*: **Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines.** *Molecular systems biology* 2010, **6**:450.
  107. Schwanhausser B, Busse D, Li N, *et al.*: **Global quantification of mammalian gene expression control.** *Nature* 2011, **473**(7347):337-342.
  108. Karra H, Repo H, Ahonen I, *et al.*: **Cdc20 and securin overexpression predict short-term breast cancer survival.** *British journal of cancer* 2014, **110**(12):2905-2913.
  109. Rawat A, Gopal G, Selvaluxmy G, *et al.*: **Inhibition of ubiquitin conjugating enzyme UBE2C reduces proliferation and sensitizes breast cancer cells to radiation, doxorubicin, tamoxifen and letrozole.** *Cellular oncology* 2013, **36**(6):459-467.
  110. Zhu P, Tan MJ, Huang RL, *et al.*: **Angiopoietin-like 4 protein elevates the prosurvival intracellular O2(-):H2O2 ratio and confers anoikis resistance to tumors.** *Cancer cell* 2011, **19**(3):401-415.
  111. Moll R, Franke WW, Schiller DL, *et al.*: **The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell* 1982, **31**(1):11-24.
  112. Paine TM, Fontanini G, Basolo F, *et al.*: **Mutated c-Ha-ras oncogene alters cytokeratin expression in the human breast epithelial cell line MCF-10A.** *The American journal of pathology* 1992, **140**(6):1483-1488.
  113. Rose AA, Grosset AA, Dong Z, *et al.*: **Glycoprotein nonmetastatic B is an independent prognostic indicator of recurrence and a novel therapeutic target in breast cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010, **16**(7):2147-2156.
  114. Akli S, Van Pelt CS, Bui T, *et al.*: **Cdk2 is required for breast cancer mediated by the low-molecular-weight isoform of cyclin E.** *Cancer research* 2011, **71**(9):3377-3386.
  115. Porter HA, Perry A, Kingsley C, *et al.*: **IRS1 is highly expressed in localized breast tumors and regulates the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy, while IRS2 is highly expressed in invasive breast tumors.** *Cancer letters* 2013, **338**(2):239-248.
  116. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, *et al.*: **E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.** *The EMBO journal* 1995, **14**(24):6107-6115.
  117. Mullauer L, Mosberger I, Grusch M, *et al.*: **Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer.** *The Journal of pathology* 2000, **190**(1):20-30.
  118. Liou ML, Liou HC: **The ubiquitin-homology protein, DAP-1, associates with tumor necrosis factor receptor (p60) death domain and induces apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(15):10145-10153.
  119. Aoudjit F, Vuori K: **Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis.** *The Journal of cell biology* 2001, **152**(3):633-643.
  120. Ishida K, Nagahara H, Kogiso T, *et al.*: **Cell adhesion aside from integrin system can abrogate anoikis in rat liver cells by down-regulation of FasL expression, not by activation of PI-3K/Akt and ERK signaling pathway.** *Biochemical and biophysical research communications* 2003, **300**(1):201-208.
-

121. Puviani M, Marconi A, Cozzani E, *et al.*: **Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8.** *The Journal of investigative dermatology* 2003, **120**(1):164-167.
122. Orimo A, Tomioka Y, Shimizu Y, *et al.*: **Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001, **7**(10):3097-3105.
123. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, *et al.*: **Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo.** *Cancer research* 2001, **61**(24):8887-8895.
124. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, *et al.*: **The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells.** *Cancer research* 2001, **61**(19):7184-7188.
125. D'Alessio A, De Luca A, Maiello MR, *et al.*: **Effects of the combined blockade of EGFR and ErbB-2 on signal transduction and regulation of cell cycle regulatory proteins in breast cancer cells.** *Breast cancer research and treatment* 2010, **123**(2):387-396.
126. Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, *et al.*: **Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(3):1288-1297.
127. D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, *et al.*: **Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer.** *Cell death & disease* 2013, **4**:e891.
128. Ballou LM, Lin RZ: **Rapamycin and mTOR kinase inhibitors.** *Journal of chemical biology* 2008, **1**(1-4):27-36.
129. Manning BD: **Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis.** *The Journal of cell biology* 2004, **167**(3):399-403.
130. Chaturvedi D, Gao X, Cohen MS, *et al.*: **Rapamycin induces transactivation of the EGFR and increases cell survival.** *Oncogene* 2009, **28**(9):1187-1196.
131. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, *et al.*: **Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, **10**(20):6779-6788.
132. Mondesire WH, Jian W, Zhang H, *et al.*: **Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, **10**(20):7031-7042.
133. Chan S: **Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer.** *British journal of cancer* 2004, **91**(8):1420-1424.
134. Kerbel RS: **A cancer therapy resistant to resistance.** *Nature* 1997, **390**(6658):335-336.
135. Sporn MB, Suh N: **Chemoprevention of cancer.** *Carcinogenesis* 2000, **21**(3):525-530.
136. Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A, *et al.*: **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy.** *British journal of cancer* 2003, **88**(6):803-807.
137. Tan AR, Swain SM: **Ongoing adjuvant trials with trastuzumab in breast cancer.** *Seminars in oncology* 2003, **30**(5 Suppl 16):54-64.
138. Finak G, Bertos N, Pepin F, *et al.*: **Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer.** *Nature medicine* 2008, **14**(5):518-527.
139. Frings O, Augsten M, Tobin NP, *et al.*: **Prognostic significance in breast cancer of a gene signature capturing stromal PDGF signaling.** *The American journal of pathology* 2013, **182**(6):2037-2047.
140. Sadlonova A, Novak Z, Johnson MR, *et al.*: **Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture.** *Breast cancer research : BCR* 2005, **7**(1):R46-59.



141. Carpenter PM, Gatanaga T, Nguyen HP, *et al.*: **Lymphocyte and monocyte-induced motility of MCF-7 cells by tumor necrosis factor-alpha.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 1997, **71**(1):64-70.
142. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, *et al.*: **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** *Cell* 2005, **121**(3):335-348.
143. Lebreton SC, Newgreen DF, Thompson EW, *et al.*: **Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors.** *Breast cancer research : BCR* 2007, **9**(1):R19.

## Anhang

**Tabelle 19: GO-Analyse der spezifisch an 3D Tag 2 regulierten Gene (236 Transkripte) ( $P < 0,001$ )**

GO-ID	GO-term	p-value
GO:0048514	blood vessel morphogenesis	7,11E-07
GO:0001568	blood vessel development	4,12E-06
GO:0001944	vasculature development	5,72E-06
GO:0001525	angiogenesis	3,20E-05
GO:0045765	regulation of angiogenesis	1,07E-04
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	1,46E-04
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	1,46E-04
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	1,94E-04
GO:0043436	oxoacid metabolic process	1,94E-04
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	2,08E-04
GO:0006082	organic acid metabolic process	2,19E-04
GO:0034329	cell junction assembly	2,21E-04
GO:0006631	fatty acid metabolic process	2,30E-04
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	2,48E-04
GO:0045780	positive regulation of bone resorption	4,23E-04
GO:0046852	positive regulation of bone remodeling	4,23E-04
GO:0051101	regulation of DNA binding	5,26E-04
GO:0016477	cell migration	5,48E-04
GO:0048513	organ development	5,72E-04
GO:0043066	negative regulation of apoptosis	6,38E-04
GO:0034330	cell junction organization	6,52E-04
GO:0043069	negative regulation of programmed cell death	7,06E-04
GO:0030514	negative regulation of BMP signaling pathway	7,06E-04
GO:0048545	response to steroid hormone stimulus	7,58E-04
GO:0060548	negative regulation of cell death	7,95E-04
GO:0006690	icosanoid metabolic process	9,02E-04
GO:0042364	water-soluble vitamin biosynthetic process	9,29E-04
GO:0016616	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	2,68E-04
GO:0016614	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	4,62E-04

**Tabelle 20: GO-Analyse der spezifisch an 3D Tag 7 regulierten Gene (120 Transkripte) (P<0,001)**

GO-ID	GO-term	p-value
GO:0015838	betaine transport	7,00E-04
GO:0015879	carnitine transport	7,00E-04
GO:0004142	diacylglycerol cholinephosphotransferase activity	1,00E-04
GO:0017169	CDP-alcohol phosphatidyltransferase activity	9,19E-04
GO:0005587	collagen type IV	4,52E-04
GO:0044424	intracellular part	4,84E-04
GO:0030935	sheet-forming collagen	6,31E-04

**Tabelle 21: GO-Analyse der spezifisch an 3D Tag 11 regulierten Gene (636 Transkripte) (P<0,001)**

GO-ID	GO-term	p-value
GO:0006396	RNA processing	1,80E-07
GO:0008380	RNA splicing	4,70E-07
GO:0006397	mRNA processing	1,26E-06
GO:0016126	sterol biosynthetic process	2,17E-06
GO:0006695	cholesterol biosynthetic process	2,99E-06
GO:0008152	metabolic process	3,42E-06
GO:0006694	steroid biosynthetic process	1,18E-05
GO:0016071	mRNA metabolic process	1,24E-05
GO:0044237	cellular metabolic process	4,37E-05
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	6,60E-05
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	1,20E-04
GO:0055114	oxidation reduction	1,27E-04
GO:0044238	primary metabolic process	1,34E-04
GO:0016125	sterol metabolic process	1,96E-04
GO:0008299	isoprenoid biosynthetic process	1,98E-04
GO:0006979	response to oxidative stress	2,24E-04
GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	2,50E-04
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	2,50E-04
GO:0044281	small molecule metabolic process	2,54E-04
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	3,37E-04
GO:0048678	response to axon injury	3,50E-04
GO:0008203	cholesterol metabolic process	3,98E-04
GO:0042159	lipoprotein catabolic process	4,29E-04
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	4,45E-04
GO:0051651	maintenance of location in cell	6,68E-04
GO:0006621	protein retention in ER lumen	7,36E-04
GO:0035437	maintenance of protein localization in endoplasmic reticulum	7,36E-04
GO:0035021	negative regulation of Rac protein signal transduction	8,08E-04
GO:0006749	glutathione metabolic process	8,77E-04
GO:0005515	protein binding	7,81E-08
GO:0003723	RNA binding	3,56E-05

---

GO:0000166	nucleotide binding	1,22E-04
GO:0016765	transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	3,47E-04
GO:0005488	binding	5,18E-04
GO:0005525	GTP binding	7,02E-04
GO:0004766	spermidine synthase activity	7,80E-04
GO:0005153	interleukin-8 receptor binding	7,80E-04
GO:0051427	hormone receptor binding	9,15E-04
GO:0005737	cytoplasm	2,41E-10
GO:0030529	ribonucleoprotein complex	2,94E-09
GO:0044424	intracellular part	4,82E-09
GO:0043226	organelle	7,40E-08
GO:0005622	intracellular	8,48E-08
GO:0043229	intracellular organelle	1,04E-07
GO:0044428	nuclear part	4,66E-07
GO:0043228	non-membrane-bounded organelle	8,96E-07
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	8,96E-07
GO:0005681	spliceosomal complex	1,29E-06
GO:0043227	membrane-bounded organelle	3,80E-06
GO:0044444	cytoplasmic part	5,06E-06
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	5,45E-06
GO:0005829	cytosol	1,31E-05
GO:0044422	organelle part	2,67E-05
GO:0005634	nucleus	4,86E-05
GO:0044446	intracellular organelle part	5,85E-05
GO:0005862	muscle thin filament tropomyosin	8,71E-05
GO:0031428	box C/D snoRNP complex	8,71E-05
GO:0044452	nucleolar part	1,08E-04
GO:0031981	nuclear lumen	2,31E-04
GO:0005732	small nucleolar ribonucleoprotein complex	3,63E-04
GO:0043233	organelle lumen	6,99E-04
GO:0005655	nucleolar ribonuclease P complex	7,15E-04
GO:0030677	ribonuclease P complex	7,15E-04
GO:0030681	multimeric ribonuclease P complex	7,15E-04
GO:0005688	U6 snRNP	7,92E-04
GO:0032991	macromolecular complex	8,06E-04

---

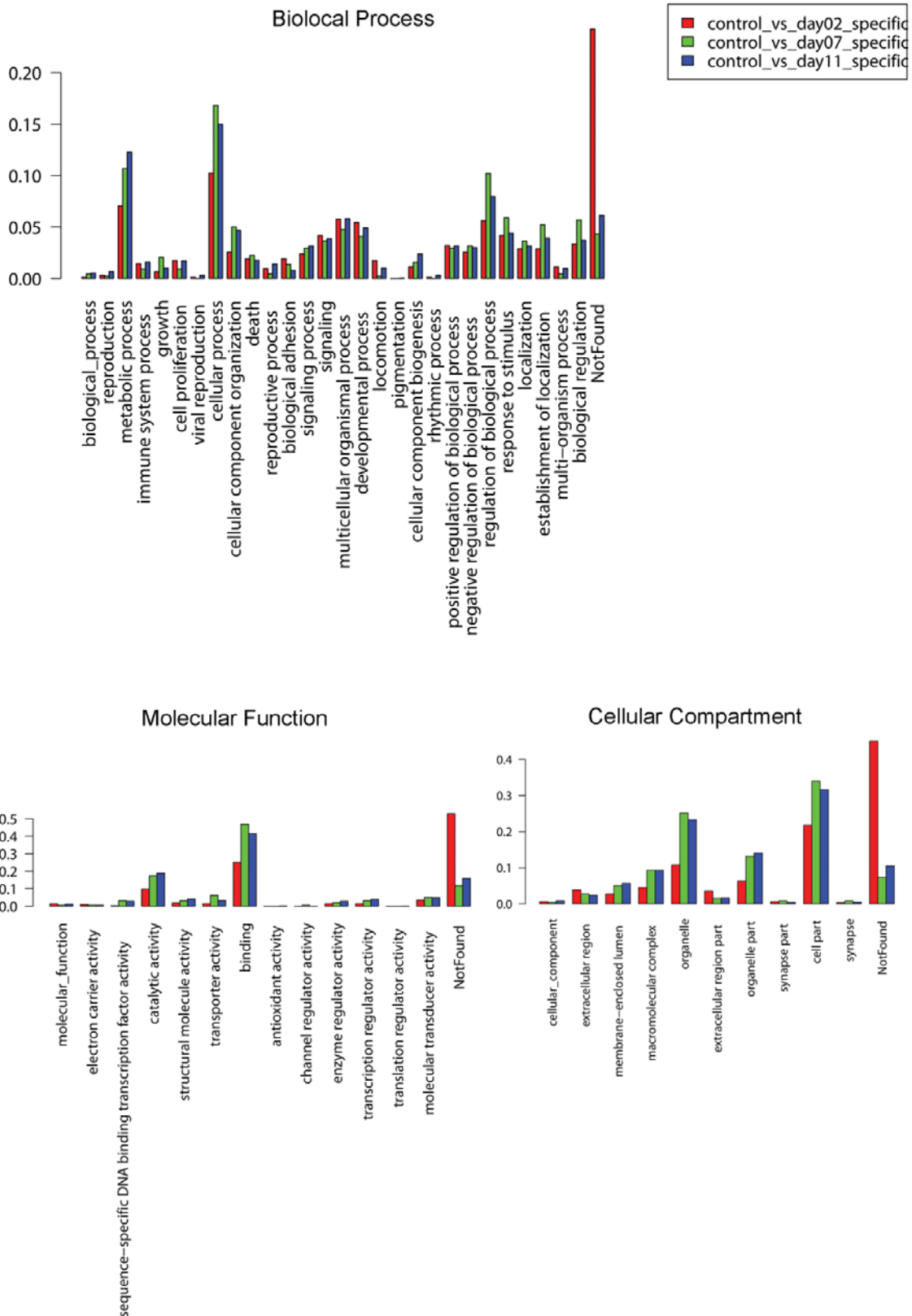
**Tabelle 22: GO-Analyse der an 3D Tag 2/Tag 7/Tag 11 regulierten Gene (290 Transkripte) (P<0,001)**

GO-ID	GO-term	p-value
GO:0022403	cell cycle phase	1,04E-09
GO:0007049	cell cycle	8,21E-09
GO:0022402	cell cycle process	6,31E-08
GO:0000279	M phase	8,71E-08
GO:0000278	mitotic cell cycle	1,14E-07
GO:0008283	cell proliferation	1,30E-07
GO:0010564	regulation of cell cycle process	1,40E-06
GO:0022607	cellular component assembly	1,69E-06
GO:0016043	cellular component organization	1,84E-06
GO:0051726	regulation of cell cycle	2,02E-06
GO:0042127	regulation of cell proliferation	2,13E-06
GO:0000280	nuclear division	3,66E-06
GO:0007067	Mitosis	3,66E-06
GO:0042221	response to chemical stimulus	4,13E-06
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	5,64E-06
GO:0048285	organelle fission	5,64E-06
GO:0051128	regulation of cellular component organization	7,41E-06
GO:0031581	hemidesmosome assembly	8,86E-06
GO:0007051	spindle organization	9,16E-06
GO:0071103	DNA conformation change	1,39E-05
GO:0044085	cellular component biogenesis	1,85E-05
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle	1,88E-05
GO:0071174	mitotic cell cycle spindle checkpoint	1,88E-05
GO:0006323	DNA packaging	2,34E-05
GO:0009888	tissue development	3,04E-05
GO:0007093	mitotic cell cycle checkpoint	5,84E-05
GO:0031577	spindle checkpoint	6,00E-05
GO:0007017	microtubule-based process	8,48E-05
GO:0051329	interphase of mitotic cell cycle	8,59E-05
GO:0034621	cellular macromolecular complex subunit organization	9,77E-05
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	1,15E-04
GO:0000226	microtubule cytoskeleton organization	1,16E-04
GO:0017085	response to insecticide	1,19E-04
GO:0000819	sister chromatid segregation	1,31E-04
GO:0006928	cellular component movement	1,37E-04
GO:0051325	Interphase	1,39E-04
GO:0007398	ectoderm development	1,45E-04
GO:0007499	ectoderm and mesoderm interaction	1,72E-04
GO:0007052	mitotic spindle organization	1,75E-04
GO:0007059	chromosome segregation	2,36E-04
GO:0009636	response to toxin	2,43E-04
GO:0007091	mitotic metaphase/anaphase transition	2,49E-04
GO:0030071	regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	2,49E-04
GO:0051301	cell division	2,75E-04

---

GO:0045787	positive regulation of cell cycle	2,86E-04
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	2,86E-04
GO:0090068	positive regulation of cell cycle process	2,96E-04
GO:0010033	response to organic substance	2,96E-04
GO:0007143	female meiosis	3,41E-04
GO:0006950	response to stress	3,46E-04
GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	3,87E-04
GO:0065003	macromolecular complex assembly	3,92E-04
GO:0016477	cell migration	3,97E-04
GO:0007094	mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint	4,50E-04
GO:0045926	negative regulation of growth	4,97E-04
GO:0006288	base-excision repair, DNA ligation	5,11E-04
GO:0060394	negative regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	5,11E-04
GO:0030308	negative regulation of cell growth	5,21E-04
GO:0007010	cytoskeleton organization	5,28E-04
GO:0001944	vasculature development	5,32E-04
GO:0007167	enzyme linked receptor protein signaling pathway	5,37E-04
GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	5,41E-04
GO:0048513	organ development	5,51E-04
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	5,61E-04
GO:0045841	negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	5,79E-04
GO:0000075	cell cycle checkpoint	5,82E-04
GO:0034622	cellular macromolecular complex assembly	6,00E-04
GO:0042981	regulation of apoptosis	6,13E-04

---



**Abbildung 20: Relative Anreicherung von GO-Level-1-Termen der regulierten Gene verschiedener Acini-Stadien**

Die Acini-Stadien-spezifischen Genlisten wurden hinsichtlich der Anreicherung von GO-Termen untersucht. Die GO-Level-1-Terme der drei Acini-Stadien wurden anschließend direkt miteinander verglichen und die relative Anreicherung dargestellt.

---

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit, diese Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen in Anspruch genommen zu haben.

Experimente und Analysen wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von mir durchgeführt.

Berlin, Februar 2015

Nicole Hallung