

Hormonelle Regulation von WNT1 und SDC1 in humanen Mammakarzinomzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biol. Peggy Benad

geboren am 13.08.1976 in Bautzen

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2008 bis
Januar 2012 am Universitätsklinikum Dresden, Medizinische Klinik und
Poliklinik III, Bereich Endokrinologie, Diabetes und metabolische
Knochenerkrankungen angefertigt.

Eingereicht am 24.01.2012.

Verteidigung am 13.06.2012

Gutachter: Prof. Günter Vollmer und Prof. Lorenz C. Hofbauer

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	6
1.1.1	Karzinogenese.....	7
1.1.2	Einfluss von Steroidhormonen auf physiologische und pathophysiologische Prozesse des Brustgewebes.....	8
1.1.3	Relevanz des Wnt-Signalweges für das Mammakarzinom.....	10
1.1.4	RU-486 und dessen antitumorale Wirkung auf Brustkrebszellen.....	11
1.1.5	Rolle von Syndecan-1 für das Mammakarzinom.....	12
1.1.6	Bedeutung des RANK/RANKL/OPG-Systems innerhalb des Brust- und Knochenkompartments.....	16
1.2	Die Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231.....	17
2	ZIELSETZUNG	19
3	MATERIALIEN UND METHODEN	21
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	21
3.2	Zellbiologische Methoden	21
3.2.1	Die Brustkrebszelllinien.....	21
3.2.2	Ansetzen einer Zellkultur aus gefrorenen Zellen.....	22
3.2.3	Kultivierung der Brustkrebszelllinien.....	22
3.2.4	Passage der Brustkrebszelllinien.....	22
3.2.5	Herstellung von Kryoröhrchen zur Konservierung der Zellen.....	23
3.2.6	Behandlung der Brustkrebszelllinien.....	23
3.2.7	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	24
3.2.8	Transfektion.....	24
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	25
3.3.1	RNA-Isolation.....	25
3.3.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	25
3.3.3	cDNA-Synthese.....	25
3.3.4	PCR.....	26
3.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.3.6	<i>Real-time</i> PCR.....	28
3.3.7	Primer.....	29
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	31
3.4.1	Proteinlyse.....	31
3.4.2	Bestimmung des Proteingehaltes.....	31

3.4.3	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	31
3.4.4	Western Blot.....	33
3.4.5	Proteinnachweis.....	33
3.4.6	Immunfluoreszenz.....	34
3.4.7	Syndecan-1-ELISA.....	35
3.4.8	Osteoprotegerin-ELISA.....	35
3.5	Funktionelle Analysen.....	35
3.5.1	Vitalität.....	35
3.5.2	Apoptose.....	36
3.5.3	Caspase-Aktivierung/Apoptoseassays.....	38
3.5.4	Invasion.....	38
3.5.5	Migration.....	40
3.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Expression der Steroidhormonrezeptoren in den Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231.....	42
4.2	Einfluss von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges und dessen funktionelle Relevanz.....	43
4.2.1	RU-486 hemmt die Vitalität der Progesteronrezeptor-positiven Brustkrebszellen.....	43
4.2.2	Einfluss von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges.....	44
4.2.3	Analyse des WNT1 <i>downstream targets</i> Cyclin D1.....	46
4.2.4	WNT1-Expression und Sensitivität der Brustkrebszelllinien.....	46
4.2.5	WNT1 blockiert partiell die RU-486-abhängige Hemmung der Zellvitalität in MCF-7-Zellen.....	47
4.2.6	RU-486 induziert in MCF-7- und T-47D-Zellen Apoptose.....	48
4.2.7	RU-486 moduliert die Expression der Steroidhormonrezeptoren in MCF-7-Zellen.....	49
4.2.8	Dexamethason hemmt die WNT1-Expression in MCF-7-Zellen.....	50
4.3	Syndecan-1-Expression, Regulation und Funktion in Brustkrebszellen.....	52
4.3.1	Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231.....	52
4.3.2	Syndecan-1-Regulation in MCF-7-Zellen.....	53
4.3.3	Regulation der mRNA-Expression Matrix-modulierender und Zell-Zell-Kontakte vermittelnder Proteine in MCF-7-Zellen.....	55

4.3.4	Funktionelle Relevanz der Dexamethason-abhängigen Syndecan-1-Regulation in MCF-7-Zellen.....	59
4.3.5	Relevanz von Syndecan-1 für die Vitalität der MCF-7-Zellen.....	60
4.3.6	Interaktion von Syndecan-1 und Osteoprotegerin.....	61
5	DISKUSSION	64
5.1	Einfluss von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges und dessen funktionelle Relevanz.....	64
5.2	Syndecan-1-Expression, Regulation und Funktion in Brustkrebszellen.....	69
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	78
8	ANHANG	84
8.1	Expression der Isoformen der Steroidhormonrezeptoren in den Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231.....	84
8.2	Effekte von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges und dessen funktionelle Relevanz.....	85
8.2.1	Einfluss von RU-486 auf die Expression von DKK1, SOST und WNT5A in MCF-7-Zellen.....	85
8.2.2	<i>Knock-down</i> der Steroidhormonrezeptoren und Expression von β -Aktin in MCF-7-Zellen.....	86
8.3	Syndecan-1-Expression, Regulation und Funktion in Brustkrebszellen.....	87
8.3.1	Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien nach Behandlung mit Zoledronsäure und Aromataseinhibitor.....	87
8.3.2	Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien T-47D und MDA-MB-231 nach Behandlung mit Dexamethason.....	88
8.3.3	Vitalität, Apoptose, Invasion und Migration der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason.....	90
8.3.4	Syndecan-1 <i>knock-down</i> in MCF-7-Zellen.....	92
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
	PUBLIKATIONEN	94
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	95
	DANKSAGUNG	96

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

In Europa und den USA stellt das Mammakarzinom die **häufigste Krebserkrankung der Frau** dar [1-3]. Dabei handelt es sich um **kein einheitliches Krankheitsbild**, sondern es werden unter diesem Begriff eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen zusammengefasst, die sich histopathologisch und genetisch unterscheiden sowie verschiedene genomische Variationen aufweisen [3]. Etwa 15 % aller Brustkrebs-Erkrankungen treten familiär gehäuft auf und basieren zu ca. 90 – 95 % auf einer Mutation in den BRCA1/2-Genen bzw. noch nicht identifizierten Brustkrebsgenen [4]. Häufiger kommt es jedoch **sporadisch** zur Entwicklung eines Mammakarzinoms, welches auf der Akkumulation genetischer Veränderungen basiert [4]. Der Großteil der diagnostizierten Brustkrebsfälle entspricht histopathologisch dem lobulären bzw. dem **duktalen Subtyp**, wobei letzterer deutlich **überwiegt** [1]. Das invasive duktales Karzinom (IDC) weist eine Heterogenität hinsichtlich der Expression verschiedener Steroidrezeptoren und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors Her2 (ERBB2) sowie der Prognose (Abb. 1.1) auf [1, 3].

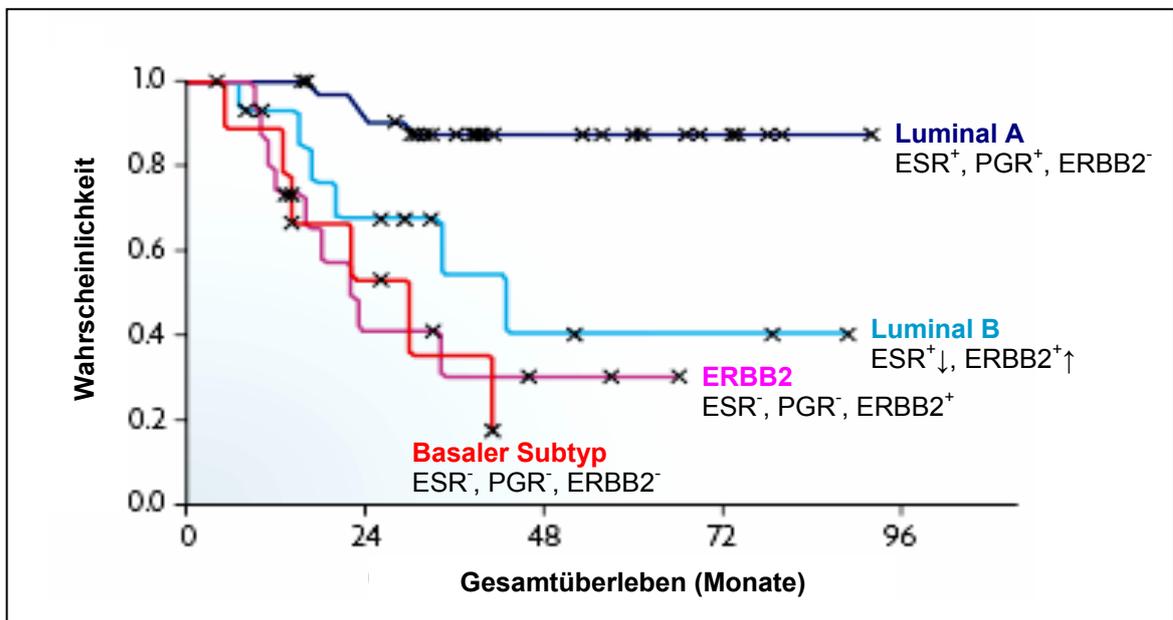


Abbildung 1.1 Überlebensrate verschiedener molekularer Subtypen des invasiven duktales Karzinoms. ESR – Östrogenrezeptor, PGR – Progesteronrezeptor, ERBB2 - *human epidermal growth factor receptor 2*, + Expression vorhanden, - keine Expression, ↑ - gesteigerte Expression, ↓ - verminderte Expression. Abbildung verändert nach Vargogogola und Rosen, 2007 [3].

1.1.1 Karzinogenese

Charakteristisch für die **Karzinogenese** ist die Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressor- und Protoonkogenen sowie das Auftreten epigenetischer Ereignisse in somatischen Zellen [5]. Die Mutation spezifischer Gene erfordert eine genomische Instabilität, welches durch eine gesteigerte Mutationsrate gekennzeichnet ist und beim Mammakarzinom zwischen den Stadien der Hyperplasie und dem Karzinom *in situ* auftritt (Abb. 1.2) [6-9].

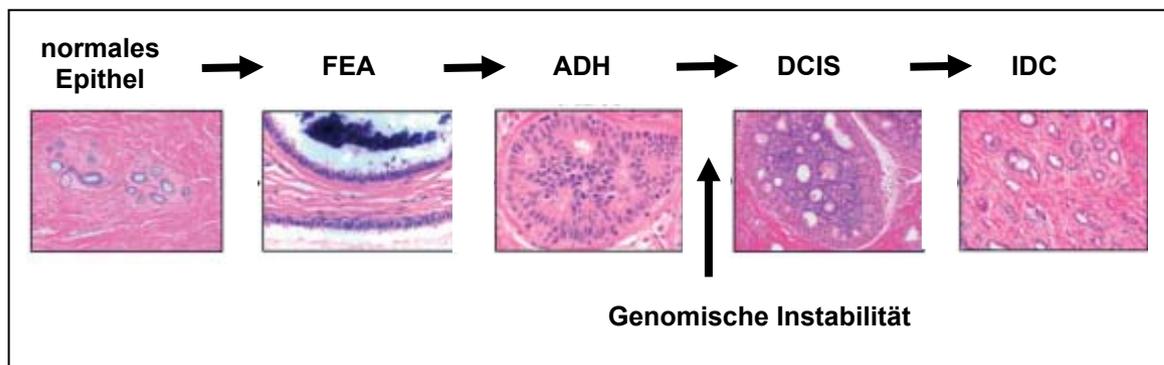


Abbildung 1.2 Modell der Progression des invasiven duktales Karzinoms. FEA – flaches atypisches Epithel, ADH – atypische duktales Hyperplasie, DCIS – duktales Karzinom *in situ*, IDC – invasives duktales Karzinom. Abbildung verändert nach Bombonati und Sgoi, 2010 [1].

Genetische bzw. epigenetische Ereignisse statten die Tumorzellen mit neuen Eigenschaften aus, wodurch diese unabhängig von äußeren Signalen überleben können. Dabei spielt die Expression von Wachstumssignalen, wie z.B. Wnt-Liganden, durch die Tumorzellen selbst eine bedeutende Rolle. Weitere zusätzlich erworbene Eigenschaften von Tumorzellen umfassen die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, das Entgehen des programmierten Zelltods, das Erlangen eines unbegrenzten replikativen Potentials, die Neubildung von Gefäßen sowie die Invasion in das umliegende Gewebe. Letzteres erfordert die Loslösung der Tumorzelle aus dem Zellverband [7, 8]. Die epitheliale-mesenchymale Transition spielt innerhalb dieses Prozesses eine zentrale Rolle. Charakteristisch ist dabei ein Verlust der Zellpolarität und die verringerte Expression epithelialer Proteine wie E-Cadherin und Syndecan-1, welche die Zellmorphologie aufrechterhalten [10, 11]. Des Weiteren kommt es bei diesem Prozess zur Induktion mesenchymaler Proteine wie N-Cadherin [12, 13]. Über die Blut- oder Lymphbahnen gelangt die Krebszelle an tumorferne Stellen im Körper, was eine Ausbildung von Metastasen ermöglicht. Für die Metastasierung gibt es mehrere Theorien, welche von Lance A. Liotta in einem Artikel prägnant zusammengefasst

werden. Eine Theorie geht davon aus, dass über den Blut- bzw. den Lymphweg die Ausbreitung der Tumorzellen in die Organe erfolgt, es jedoch nur dort zur Vermehrung der Zellen kommt, wo entsprechende Wachstumsfaktoren vorhanden sind. Eine andere Theorie besagt, dass die Tumorzellen entlang eines Gradienten von Chemokinen wandern, wenn sie den entsprechenden Rezeptor dafür besitzen [14]. Beim Mammakarzinom kommt es besonders häufig zur Ausbildung von Metastasen im Knochenkompartiment, wobei das RANK/RANKL/OPG-System eine zentrale Rolle einnimmt (siehe 1.1.6). Häufige und schwere Komplikationen osteolytischer Metastasen des Mammakarzinoms sind Frakturen, Schmerzen und eine verminderte Lebensqualität [15]. Bisphosphonate wie Zoledronsäure und ein monoklonaler Antikörper gegen RANKL (Denosumab) stellen eine effektive Therapie dar, um das Auftreten skeletaler Metastasen zu verzögern bzw. zu verhindern. In einer Studie wurde die Effektivität der beiden Substanzen hinsichtlich der Prävention skeletaler Ereignisse beim Mammakarzinom verglichen, wobei Denosumab der Zoledronsäure leicht überlegen war [16].

Verschiedene **Risikofaktoren** spielen für die Entstehung des Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle. Einen großen Einfluss haben das Alter und die familiäre Belastung. Jedoch sind weitere Umweltfaktoren für die Ausbildung des Mammakarzinoms relevant, wie z.B. eine „westliche“ Lebensweise (wenig Bewegung, ungesunde Ernährung), hormonelle Einflüsse (frühe Menarche, späte Menopause, späte erste Schwangerschaft) und die Einnahme von Hormonen wie Östrogen und Progesteron [4].

1.1.2 Einfluss von Steroidhormonen auf physiologische und pathophysiologische Prozesse des Brustgewebes

Für die Entwicklung der Brustdrüse ist der Einfluss verschiedener Steroidhormone unabdingbar. Nach einer hormonunabhängigen Phase, die bis zur Pubertät andauert, kommt es in Abhängigkeit der Hormone Östrogen und Progesteron zur Verlängerung und Verzweigung der Brustdrüsengänge. Die epitheliale Expression der Rezeptoren für diese Steroidhormone ist dabei essentiell. Während der Schwangerschaft erfolgen die weitere Verzweigung der Gänge, die Ausbildung der Alveolen und die Milchbildung sowie die Rückbildung nach dem Abstillen (Abb. 1.3). Diese Prozesse werden vor allem durch die Wirkung von Prolaktin gefördert. Obwohl die Expression der Steroidrezeptoren für Progesteron und Östrogen auf einige epitheliale Zellen beschränkt ist, proliferieren vor allem diejenigen Zellen, welche negativ für diese Hormonrezeptoren sind [17]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Steroidhormone auch indirekt über die

Expression nachgeschalteter Gene wirken. So induziert z. B. Progesteron die Expression von WNT4 und RANKL, welche die Proliferation Hormonrezeptor-negativer Brustepithelzellen fördern [18-21].

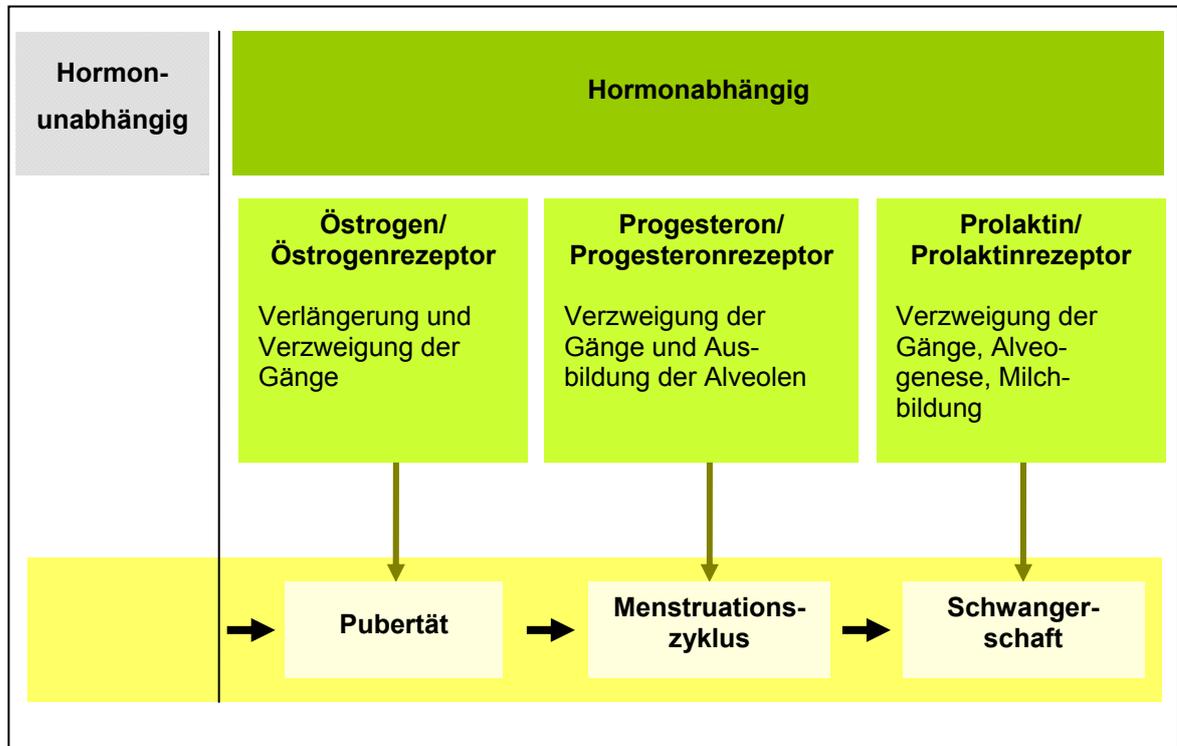


Abbildung 1.3 Physiologische Rolle der Steroidhormone bei der Brustentwicklung.

Bis zur Pubertät erfolgt die Entwicklung der Brust hormonunabhängig. Anschließend erfolgt die Brustentwicklung in Abhängigkeit der Hormone Östrogen, Progesteron und Prolaktin. Abbildung verändert nach Brisken und O'Malley, 2011 [17].

Beim klassischen Weg entfalten die Steroidhormone ihre Wirkung, indem sie an den im Zytoplasma lokalisierten Rezeptor binden. Es folgt die Ablösung der assoziierten *heat shock* Proteine (HSP90), die Rezeptordimerisierung und die Translokation des Komplexes in den Zellkern. Nach Bindung an die entsprechenden *response elements* erfolgt die Expression nachgeschalteter Steroidhormon-regulierter Gene [22].

Neben der physiologischen Rolle der Hormone bei der Entwicklung der Brust kommt den **Steroidhormonen im pathophysiologischen Kontext** eine zentrale Rolle zu.

Bei der Entstehung des Mammakarzinoms können **Östrogene** sowohl als Tumorpromotoren als auch Tumorinitiatoren wirken. Im ersten Fall erfolgt die Bindung der Hormone an deren Rezeptor, wodurch es zur Aktivierung von nachgeschalteten Proliferationsgenen kommt. Bei der zweiten Theorie wird von einer mutagenen Wirkung

des Östrogenderivats Östradiol-3,4-Chinon ausgegangen, welches kovalent an Purinbasen der DNA bindet und Einzelstrangbrüche oder Punktmutationen erzeugt [23, 24].

Bei der Therapie des Mammakarzinoms werden **Glukokortikoide** wie Dexamethason als Komedikation eingesetzt, um Übelkeit und Erbrechen der zytostatischen Therapie zu lindern [25]. Verschiedene Studien analysierten die Wirkung der Glukokortikoide in Kombination mit Zytostatika. Es zeigte sich, dass diese eine ambivalente Wirkung besitzen. Einerseits fungierte Dexamethason als Chemosensitizer, andererseits kam es jedoch auch zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod. Die Rolle der Glukokortikoide beim Mammakarzinom ist somit noch nicht vollständig geklärt [25-28].

Die Rolle von **Gestagenen** bei der Entstehung des Mammakarzinoms wurde lange Zeit kontrovers diskutiert [4]. Verschiedene Studien belegen jedoch die Bedeutung der Gestagene bei der Entstehung des Mammakarzinoms [18, 20, 21, 29]. So konnte die „*Million Women Study*“ frühere Ergebnisse bestätigen, dass die Kombination von Östrogenen und Gestagenen bei der Hormonersatztherapie mit einem gesteigerten Brustkrebsrisiko einhergeht im Vergleich zur alleinigen Östrogengabe [29]. Mittels *in vivo* und *in vitro* Experimenten konnten verschiedene Wirkmechanismen der Gestagene aufgeklärt werden. So wird durch die Behandlung mit dem Gestagen R5020, unabhängig vom Progesteronrezeptor-Status, die Induktion der Apoptose in verschiedenen Brustkrebszellen gehemmt [30]. Des Weiteren fördern Gestagene sowohl Progesteronrezeptor-abhängig die Proliferation von Brustkrebszellen über die Aktivierung von Kinasekaskaden im Zytoplasma [31] als auch indirekt über einen RANKL-abhängigen Mechanismus. Dabei kommt es zuerst zu einer Progesteronrezeptor-abhängigen Proliferation von Brustepithelzellen, gefolgt vom Wachstum Progesteronrezeptor-negativer Brustepithelzellen via des parakrin wirkenden Mediators RANKL [18, 20, 21]. Neben dem nicht-kanonischen Signalweg unterliegt auch der kanonische Wnt-Signalweg der Progesteron-abhängigen Regulation. So konnte gezeigt werden, dass WNT1 die Progesteron-abhängige Proliferation von Brustkrebszellen vermittelt [32]. Die Verbindung zwischen Gestagenen und dem Wnt-Signalweg ist, wie nachfolgend detailliert dargestellt, von großer Bedeutung für das Mammakarzinom.

1.1.3 Relevanz des Wnt-Signalweges für das Mammakarzinom

In über **50 % aller Brustkrebsfälle ist der Wnt-Signalweg aktiviert**. Eine Studie konnte zeigen, dass die Aktivität von β -Catenin in diesen Fällen gesteigert ist und mit

einer ungünstigen Prognose korreliert. Die dabei wirksamen Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt. In diesem Zusammenhang wurde eine Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Hemmung von Wnt-Inhibitoren oder die Aktivierung von Wnt-Liganden diskutiert [33]. Das Protoonkogen WNT1 zum Beispiel beeinflusst die Progression von Krebs, indem es die Zellproliferation fördert und somit das Überleben der Krebszellen verlängert [34, 35]. Analysen zur WNT1-Expression in Gewebeproben der Brust wiesen sowohl im normalen als auch im malignen Gewebe das WNT1 nach [36-39]. Eine Studie berichtete von einer Korrelation der WNT1-Expression und dem Tumorgrad. So war die WNT1-Expression bei Tumoren vom Grad 1 erhöht und bei Tumoren mit Grad 2 und 3 verringert [39].

Beim kanonischen Wnt-Signalweg binden die Wnt-Liganden z. B. WNT1 an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die sich aus Proteinen der Frizzled-Familie (7-Transmembranrezeptor) und Korezeptoren LRP (low density lipoproteins) zusammensetzen. Nachfolgend kommt es zur Inaktivierung des Multiproteinkomplexes bestehend aus Axin, APC und GSK-3 β . Dies hat eine Stabilisierung von β -Catenin zur Folge wodurch dieses Protein in den Zellkern wandert und zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Expression nachgeschalteter Gene wie Cyclin D aktiviert [40-43].

Aufgrund der Rolle von Gestagenen bei der Progedienz des Mammakarzinoms und der Verbindung zum Wnt-Signalweg werden Antigestagene als Behandlungsoptionen für das Mammakarzinom diskutiert [44-47].

1.1.4 RU-486 und dessen antitumorale Wirkung auf Brustkrebszellen

In mehreren *in vivo* und *in vitro* Studien konnten die **antitumorale Wirkung von Antigestagenen** auf Brustkrebszellen nachgewiesen werden. So zeigte sich, dass RU-486 (Mifepriston) signifikant die Zellproliferation in normalen Brustgewebe reduziert [48], die Remission des Tumorwachstums in Kombination mit einer anti-östrogenen Therapie fördert [44, 46] und die Apoptose in anti-östrogen-resistenten Brustkrebszellen induziert [45]. **RU-486** ist ein etabliertes Antigestagen, welches hauptsächlich zur oralen Kontrazeption und Induktion von Aborten eingesetzt wird [49]. In seiner chemischen Struktur ist RU-486 der von Progesteron sehr ähnlich (Abb. 1.4), besitzt jedoch in der 17 β -Position eine Substitution, welche für die Progesteron-antagonistische Wirkung verantwortlich ist [50]. Die Bindungsaffinität von RU-486 zum Progesteronrezeptor wird, im Vergleich zum Progesteron, in der Literatur als ähnlich stark [51] oder als größer [49] beschrieben. Des Weiteren bindet RU-486 mit einer hohen Affinität an den Glukokortikoidrezeptor und mit einer geringeren Affinität an den Androgenrezeptor [51].

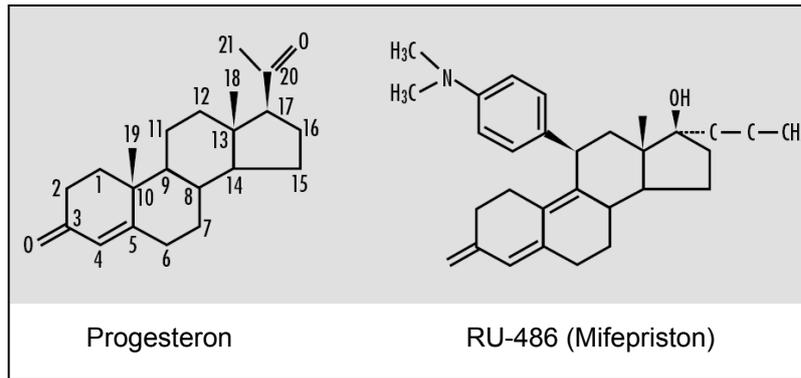


Abbildung 1.4 Chemische Struktur von Progesteron und RU-486.

Abbildung entnommen aus Winkler und Rath, 1999 [50].

Nach oraler Applikation erfolgt eine rasche, bis zu 70 %ige Absorption von RU-486 über den Darm. Die Bioverfügbarkeit dieser Substanz beträgt jedoch ca. 40 %, was auf den *first-pass effect* in der Leber und die Umwandlung in die weniger aktiven Metaboliten zurückzuführen ist [49, 51]. Plasmakonzentrationen von RU-486 von bis zu 4,4 µmol/l konnten bei Schwangeren nach einer oralen Gabe von 400-600 mg der Substanz gemessen werden. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Faeces und zu einem geringeren Anteil über die Nieren. Die zweifache Demethylierung am Phenylring in C11-Position und die Hydroxylierung der 17-Propynyl-Kette bewirkt die Inaktivierung der Substanz [49-51].

Obwohl sich der Einsatz von RU-486 auf die Abortinduktion beschränkt, wird in der Literatur auf weitere Anwendungsmöglichkeiten hingewiesen, wie die Behandlung des *Uterus myomatosus*, der Endometriose und verschiedener Tumoren [50, 52, 53].

1.1.5 Rolle von Syndecan-1 für das Mammakarzinom

Syndecan-1 gehört zur Familie der Heparansulfat-Proteoglykane, welcher insgesamt 4 Mitglieder (Syndecan-1 bis Syndecan-4) angehören. Die Transmembrandomäne, welche die Rezeptoroligomerisierung ermöglicht sowie die beiden Regionen C1 und C2 der intrazellulären Domäne sind innerhalb der Heparansulfat-Proteoglykane hoch konserviert. Die C1 und C2 Domänen vermitteln Interaktionen zu Proteinen im Zytoplasma (Abb 1.5). Zwischen C1 und C2 liegt eine variable Region, deren physiologische Bedeutung bisher nur für Syndecan-4 beschrieben ist. Beim Syndecan-4 interagiert diese variable Region mit zytoplasmatischen Proteinen und ist für die Stabilisierung von Syndecan-4-Oligomeren zuständig [54]. Charakteristisch für die extrazelluläre Domäne sind die Heparan- und Chondroitinsulfat-Seitenketten, über welche die Bindung verschiedenster Liganden erfolgen kann wie z.B. Matrixkomponenten, Wachstumsfaktoren und Chemokinen [55, 56]. Diese Domäne ist

innerhalb der Syndecan-Familie sehr divergent mit Ausnahme der Regionen für die Bindung der Seitenketten und scheint für die Funktion des jeweiligen Proteoglykans verantwortlich zu sein [54]. Durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne von Syndecan-1 durch Sheddasen kann dieses Proteoglykan auch in einer löslichen Form vorliegen. Lösliches Syndecan-1 kann so als parakriner bzw. autokriner Effektor wirken oder die Effekte der membranständigen Form hemmen. Die Abspaltung der extrazellulären Domäne erfolgt durch verschiedene Matrixmetalloproteasen wie MMP2, 7 und 9 [56].

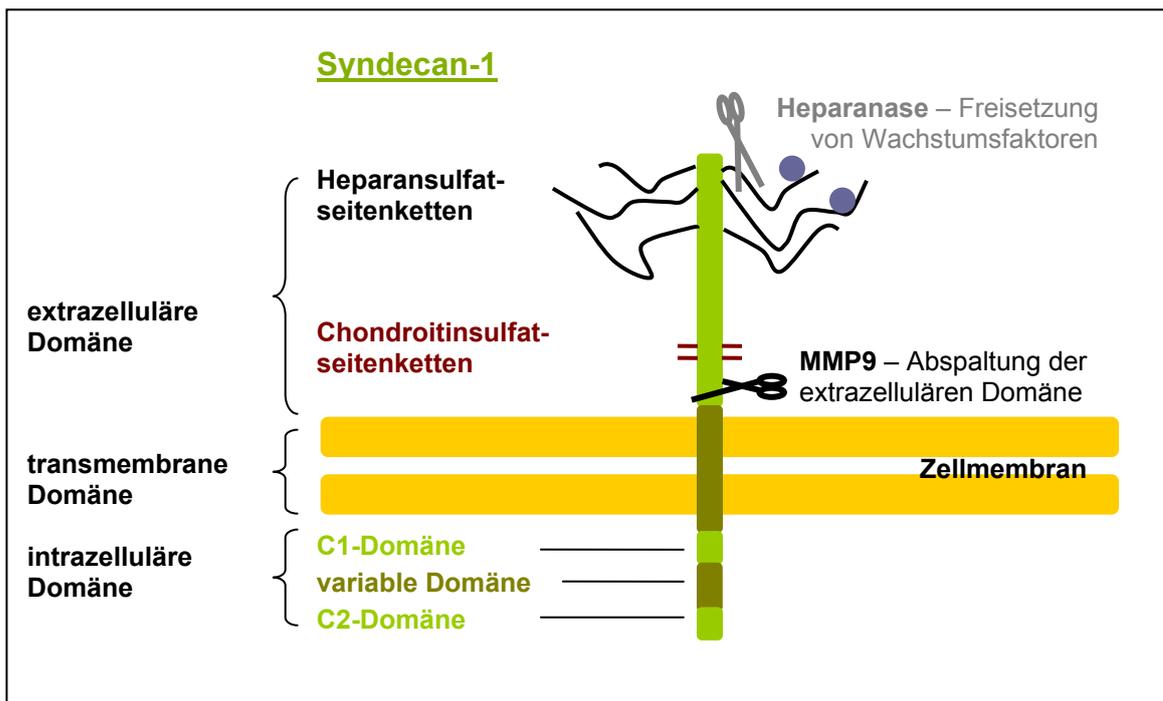


Abbildung 1.5 Aufbau von Syndecan-1. Syndecan-1 besitzt eine kurze intrazelluläre Domäne, welche Interaktionen zu Proteinen im Zytoplasma vermittelt. Die transmembrane Domäne dient der Rezeptoroligomerisation. Die extrazelluläre Domäne ist innerhalb der Familie hoch divergent und für die jeweilige Funktion des Proteoglykan-Mitglieds verantwortlich. Diese Domäne kann über ihre Heparansulfatseitenketten verschiedene Proteine wie z.B. Wachstumsfaktoren, Chemokine und Matrixkomponenten binden. Neben dieser membranständigen Syndecan-1-Form existiert noch eine lösliche Form, die durch Abspaltung der extrazellulären Domäne erfolgt. Dies wird durch verschiedene Matrixmetalloproteasen bewerkstelligt. Die abgespaltene extrazelluläre Domäne kann selbst als Effektor wirken oder die Wirkung der membranständigen Form kompetetieren. Auch die Abspaltung der Heparansulfatseitenketten durch das Enzym Heparanase führt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Abbildung verändert nach Beauvais und Rapraeger, 2004, Manon-Jensen et al., 2010 [54, 56]

Große Bedeutung im Zusammenhang mit Syndecan-1 besitzt das Enzym Heparanase, welches über verschiedene Mechanismen auf das Proteoglykan wirkt. Heparanase beeinflusst indirekt die Abspaltung der extrazellulären Domäne von Syndecan-1, indem es die Expression der Matrixmetalloprotease-9 steigert. Außerdem führt eine hohe Expression von Heparanase zu einer verstärkten Expression des Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptors und des dazugehörigen Liganden. Dieses Rezeptor-Liganden-Paar initiiert eine Proteasekaskade, die zur Aktivierung der Matrixmetalloprotease-9 führen [57-59]. Ein weiterer Wirkmechanismus der Heparanase besteht in der Abspaltung der Heparansulfatseitenketten von Syndecan-1, was zur Freisetzung der daran gebundenen Wachstumsfaktoren führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Heparanase die Lokalisation von Syndecan-1 beeinflusst. Bei einer geringen Expression dieses Enzyms konnte Syndecan-1 im Zytoplasma, an der Zelloberfläche und im Zellkern lokalisiert werden. Bei höheren Heparanasespiegeln ließ sich hingegen kein Syndecan-1 im Zellkern nachweisen. Der genaue Mechanismus, wie Heparanase die Lokalisation von Syndecan-1 reguliert, ist noch unklar [57, 59].

Verschiedene Studien analysierten den **prognostischen Wert von Syndecan-1** bei verschiedenen Krebsarten. Im Gegensatz zum Multiplem Myelom bei dem die Syndecan-1-Expression mit einer ungünstigen Prognose korreliert [60], konnte dies für den **Brustkrebs nicht vollständig geklärt werden**. Nachgewiesen werden konnte, dass Syndecan-1 im normalen Brustgewebe hauptsächlich von Epithelzellen, nicht jedoch von Stromazellen exprimiert wird [61, 62]. Untersuchungen zur Expression von Syndecan-1 beim Brustkrebs zeigten jedoch, dass neben den epithelialen auch stromale Zellen dieses Proteoglykan exprimieren. Hinsichtlich der klinischen Relevanz der Syndecan-1-Expression beim Brustkrebs lieferten nachfolgende Studien aber unterschiedliche Ergebnisse (Tabelle 1.1) [61-63]. So fanden Leivonen et al. heraus, dass die Expression von Syndecan-1 auf epithelialen und Stromazellen mit einer ungünstigen Prognose korreliert [63]. Bei Analysen von Loussouarn et al. zeigte sich eine schlechte Prognose bei Brustkrebsfällen, bei denen kein Syndecan-1 auf Epithel- und Stromazellen detektiert werden konnte [62]. Eine weitere Studie analysierte die Syndecan-1-Expression beim Brustkrebs, ohne näher auf die einzelnen Gewebekomponenten einzugehen. Dabei korrelierte eine hohe Expression von Syndecan-1 mit einem aggressiven Phänotyp [61].

Tabelle 1.1 Syndecan-1-Expression beim Mammakarzinom. BC – Brustkrebs, DC – duktales Karzinom, IDC – invasives duktales Karzinom, LC – lobuläres Karzinom

Studie	Anzahl Patienten	SDC1-Expression		Prognose
		epithelial	stromal	
Leivonen et al. [63]	200 (72 % DC 13 % LC 14 % andere Karzinome)	61 %	67 %	Sowohl epitheliale als auch stromale Expression von SDC1, und vor allem die Kombination beider, korreliert mit einer ungünstigen Prognose
		39 % (epithelial & stromal)		
Barbareschi et al. [61]	254 (BC)	41,7 % (keine Unterscheidung)		Hohe SDC1-Expression korreliert mit einem aggressiven Phänotyp
Loussouarn et al. [62]	80 (IDC)	61,25 %	30 %	Verlust epithelialer und stromaler SDC1-Expression korreliert mit einer ungünstigen klinischen Prognose
		8,75 % (epithelial & stromal)		

Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse lieferte die Arbeitsgruppe um Nikolova, die 2009 eine umfangreiche Studie zur funktionellen Relevanz von Syndecan-1 in Brustkrebszellen veröffentlichten. Dazu wurde mittels Überexpression der verschiedenen Syndecan-1-Formen deren Funktion näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die lösliche und membranständige Form jeweils verschiedene Mechanismen des Zellschicksals beeinflussen [64]. So fördert membranständiges Syndecan-1 vor allem die Proliferation der Brustkrebszellen und hemmt deren Invasion. Die lösliche Form dieses Proteoglykans hingegen führt zu gegenteiligen Effekten [64]. Des Weiteren beeinflusst lösliches Syndecan-1 die Expression von *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1*, E-Cadherin und Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor, was die Invasion der Brustkrebszellen steigert [64].

Über die **Regulation der Syndecan-1-Expression** ist bisher wenig bekannt. Beschrieben wurde bereits eine Stimulation der Syndecan-1-Expression in Abhängigkeit mehrfach ungesättigter Fettsäuren via des PPAR- γ (peroxisome proliferation-activated receptor- γ) [65]. Weitere Studien konnten eine E-Cadherin-abhängige Expression des Proteoglykans zeigen, wobei auch posttranskriptionelle Effekte eine Rolle spielen [10, 11].

Aufgrund der vielfältigen Interaktionen von Syndecan-1 mit anderen Proteinen und dessen Regulation werden sowohl direkt als auch indirekt eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse von Zellen beeinflusst [11, 56, 64-71]. Für das multiple Myelom wurde bereits gezeigt, dass Syndecan-1 über dessen Heparin-bindende Domäne OPG bindet, internalisiert und degradiert, was eine Imbalance des RANKL/OPG-Quotienten zur Folge hat. Dieser Mechanismus liefert eine überzeugende

Erklärung für erniedrigte OPG-Spiegel im Knochenmark von Myelompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen [70]. Weitere Studien konnten ebenfalls den Einfluss von Syndecan-1 auf den Knochen belegen. Von Tumorzellen abgespaltenes lösliches Syndecan-1 moduliert sowohl die Differenzierung der Osteoblasten als auch der Osteoklasten [67, 68].

1.1.6 Bedeutung des RANK/RANKL/OPG-Systems innerhalb des Brust- und Knochenkompartments

Das RANK/RANKL/OPG-System ist an der Regulation physiologischer Prozesse innerhalb des Knochens und des Brustgewebes beteiligt. Im Brustgewebe ist die Expression des konstitutiv exprimierten Rezeptors RANK und seines durch Gestationshormone induzierbaren, korrespondierenden Liganden RANKL essentiell für die Morphogenese der laktierenden Mamma [72]. Der Rezeptorantagonist Osteoprotegerin (OPG) dagegen wird im normalen Brustgewebe nicht exprimiert [73, 74].

Im Gegensatz dazu zeigten maligne Zellen des Brustgewebes eine Expression von Osteoprotegerin, wobei die Ergebnisse hinsichtlich einer negativen Korrelation zwischen Tumorgrad und OPG-Expression uneinheitlich sind [73, 75]. Pathophysiologisch ist die Störung des RANK/RANKL/OPG-Systems von großer Bedeutung. In einer umfangreichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Brustkrebszellen RANKL-abhängig migrieren, was die bevorzugte skeletale Metastasierung RANK-positiver Tumorzellen plausibel erklärt [76]. Des Weiteren spielen die Proteine RANK, RANKL und OPG bei der Persistenz von Knochenmetastasen eine wichtige Rolle. Eingewanderte Tumorzellen modulieren und stören dadurch das für den Knochen bedeutendste Regulationssystem. Über die Ausschüttung von PTHrP (parathyroid hormone-related peptide) wird die osteoblastäre Osteoprotegerin-Sekretion gehemmt und die RANKL-Sekretion erhöht. Dies hat eine gesteigerte Aktivität der Osteoklasten und somit eine erhöhte Knochenresorption zur Folge. Aus dem abgebauten Knochen werden wiederum gespeicherte Stoffe wie TGF- β freigesetzt, was stimulierend auf die Tumorzellen wirkt. Dieser Mechanismus wird auch als *Circulus vitiosus* (Abb. 1.6) bezeichnet [15, 77-83]

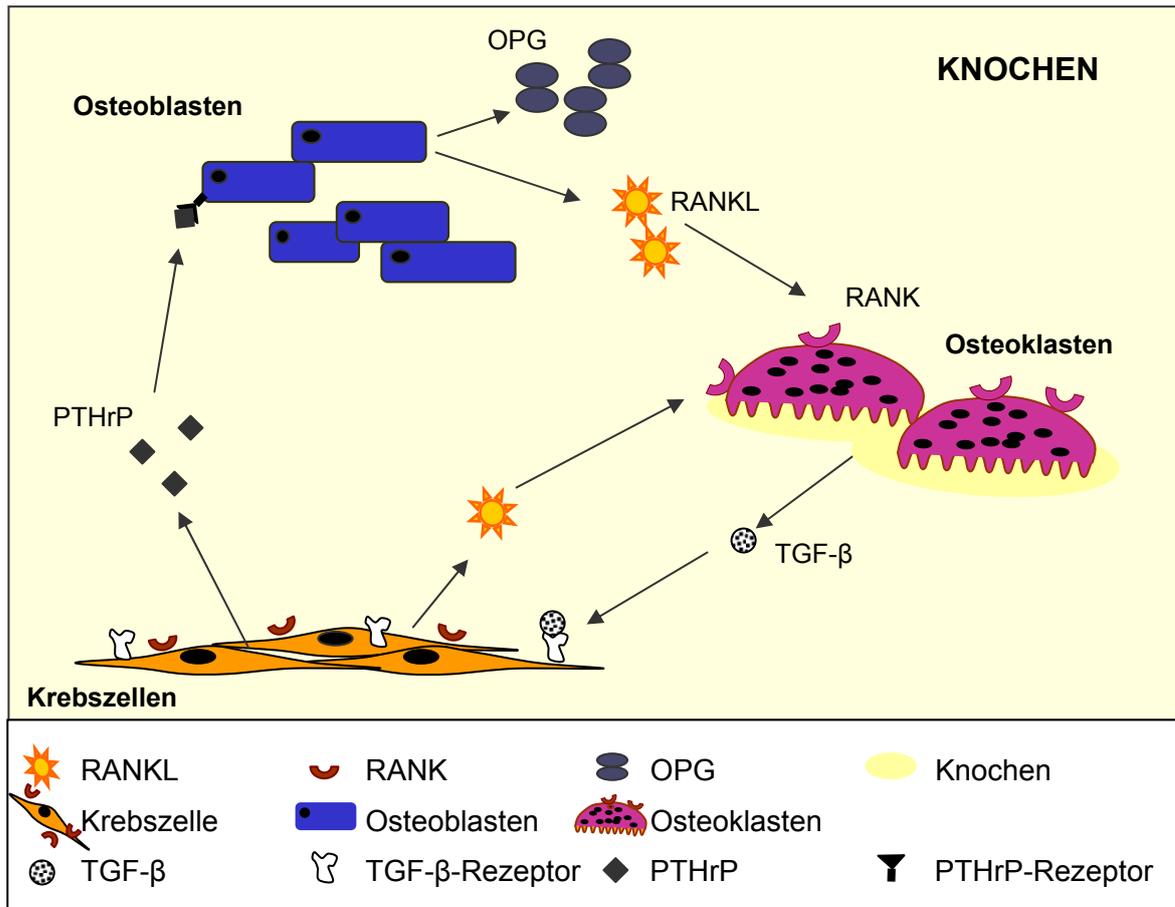


Abb. 1.6 Einfluss von RANK/RANKL/OPG bei der Persistenz von Knochenmetastasen des Mammakarzinoms. *Circulus vitiosus*-Konzept: Krebszellen veranlassen durch die Sekretion von PTHrP Osteoblasten zur verstärkten RANKL-Expression und einer Erniedrigung der OPG-Produktion. Das veränderte RANKL/OPG-Verhältnis fördert die Osteoklastenaktivierung und steigert die Knochenresorption. Dies resultiert in der Ausbildung osteolytischer Knochenmetastasen. Durch Knochenabbau freigesetztes TGF-β stimuliert wiederum die Tumorzellen, womit sich der Kreis schließt. Inwieweit die Tumorzellen selbst RANKL produzieren und eine direkte Aktivierung der Osteoklasten verursachen ist unklar. Abbildung verändert nach Benad et al., 2009 [84].

1.2 Die Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231

Das Krankheitsbild des Mammakarzinoms weist eine hohe Komplexität und Heterogenität auf, welche eine einzelne Zelllinie nicht zu repräsentieren vermag [3]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231 entsprechen dem duktalem Phänotyp des Brustkrebs [85, 86]. Unterschiede zwischen den Zelllinien bestehen hinsichtlich der Expression der Steroidhormonrezeptoren und des metastatischen Potentials. Im Gegensatz zu den MDA-MB-231-

Zellen exprimieren MCF-7- und T-47D-Zellen sowohl den Östrogen- als auch den Progesteronrezeptor [85, 86]. Dafür besitzen MDA-MB-231-Zellen jedoch ein höheres invasives Potential [86] und können zur Ausbildung von Metastasen im Tiermodell intrakardial injiziert werden [77, 87].

2 ZIELSETZUNG

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung der Frau dar [2]. Im Gegensatz zu Östrogenen wurde die Rolle von Gestagenen, wie Progesteron bei diesem Krankheitsbild lange Zeit kontrovers diskutiert [4]. Drei neue Studien belegen jedoch den Einfluss von Progesteron und Progestinen bei der Karzinogenese des Mammakarzinoms [18, 20, 21]. Der Einsatz von Anti-Gestagenen als therapeutische Substanzen bei der Behandlung des Brustkrebses gewinnt dadurch wieder zunehmend an Bedeutung. Die antitumorale Wirkung dieser Substanzklasse konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden [44-46]. In diesem Zusammenhang ist die Verbindung zwischen Progesteron und dem Wnt-Signalweg von pathophysiologischer Bedeutung [19, 32]. In über 50 % der Brustkrebsfälle erfolgt eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs, welche mit einer ungünstigen Prognose korreliert [33].

Aufgrund dieser Erkenntnisse und Zusammenhänge soll dieses Projekt folgende Fragen beantworten:

- I) Wird in Mammakarzinomzellen die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges durch das Anti-Gestagen RU-486 reguliert?
- II) Welche Relevanz hat die Regulation der Wnt-Proteine auf die Funktion der Mammakarzinomzellen?
- III) Erfolgt die RU-486-abhängige Regulation der Wnt-Proteine über den Progesteronrezeptor?

Neben dem Wnt-Signalweg nimmt auch das RANK/RANKL/OPG-System in der ossären Metastasierung des Mammakarzinoms eine zentrale Rolle ein [15, 84]. Besonders Osteoprotegerin (OPG) interagiert mit einer Reihe von Proteinen, wodurch verschiedene Mechanismen wie die Apoptose und die ossäre Migration von Brustkrebszellen beeinflusst werden [88]. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkung von Osteoprotegerin auf das Zellschicksal ist die Interaktion mit Syndecan-1 besonders interessant. Für Myelomzellen wurde bereits gezeigt, dass Syndecan-1 das Osteoprotegerinmolekül bindet, diesen Komplex internalisiert und anschließend lysosomal degradiert [70]. Die Rolle von Syndecan-1 beim Mammakarzinom ist noch nicht geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass es wichtige Funktionen bei einer Vielzahl von zellbiologischen Prozessen, wie Apoptose, Proliferation, Invasion und der epithelialen-mesenchymalen Transition von Zellen aufweist [64, 65, 71]. Da das Proteoglykan Syndecan-1 sowohl in löslicher

als auch membranständiger Form vorliegen kann, werden unterschiedliche zelluläre Mechanismen wie Invasion und Proliferation beeinflusst [64].

Aus diesem Kontext heraus ergeben sich folgende weitere Fragestellungen:

- IV) Welche Substanzen regulieren die Expression von Syndecan-1 in Mammakarzinomzellen?
- V) Welche Form von Syndecan-1 (löslich oder membranständig) wird dabei im Wesentlichen reguliert?
- VI) Wie wirken sich diese Veränderungen funktionell auf die Vitalität, Apoptose, Migration und Invasion der Mammakarzinomzellen aus?
- VII) Wird durch die Syndecan-1-Regulation die Interaktion mit Osteoprotegerin beeinflusst?

3 MATERIALIEN & METHODEN

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die Durchführung der einzelnen Experimente erfolgte nach folgendem Arbeitsablauf (Tabelle 3.1), um eine standardisierte Vorgehensweise bei den verschiedenen Experimenten zu gewährleisten.

Tabelle 3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau.

Zeit	Arbeitsschritt
Tag 1 vormittags	Aussäen der Zellen in Kulturmedium mit 10 % FKS
Tag 2	/
Tag 3 vormittags nachmittags	Transfektion (wenn erforderlich) Mediumwechsel auf Kulturmedium ohne FKS
Tag 4 vormittags	Behandlung der Zellen
Tag 5, 6, 7 vormittags	Stopp der Behandlung nach 24 h, 48 h, 72 h ⇒ Zellyse für RNA- oder Protein-Extraktion ⇒ funktionelle Analysen: Messung der Vitalität, Apoptose, Caspase-Aktivierung, Invasion, Migration

3.2 Zellbiologische Methoden

Zellkulturen sind *in vitro*-Modelle, welche für Analysen verschiedenster Fragestellungen genutzt werden. Dies erfordert die Vermehrung, Konservierung, Behandlung etc. von Zellen bzw. Zelllinien unter sterilen Bedingungen, was im Allgemeinen unter dem Begriff Zellkulturtechniken zusammengefasst wird [89].

Die Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank HERA Safe (Heraeus, Bonn, Deutschland). Es wurde stets mit auf 37 °C temperierten Medien (siehe 3.2.3) bzw. PBS (*Phosphate-buffered saline*, siehe 3.2.4) gearbeitet. Die Lagerung der für die Zellkultur notwendigen Medien, Medienzusätze und Lösungen erfolgte bei 4 °C. Einzige Ausnahme ist das fötale Kälberserum (FKS, Serum Supreme, Lonza, Köln, Deutschland) welches bei - 20 °C gelagert wurde.

3.2.1 Die Brustkrebszelllinien

Die humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 bezog die AG Hofbauer von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig,

Deutschland). Die humane Brustkrebszelllinie T-47D wurde beim Cell Lines Service erworben (Eppelheim, Deutschland).

3.2.2 Ansetzen einer Zellkultur aus gefrorenen Zellen

Die in Kryoröhrchen gefrorenen humanen Brustkrebszellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen, in welchem vorgewärmtes Kulturmedium (siehe 3.2.3) vorgelegt wurde, überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation (3K10, Sigma, Osterode am Harz, Deutschland) bei 300 g wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 2 – 3 ml Kulturmedium (siehe 3.2.3) resuspendiert und anschließend in Zellkulturflaschen überführt.

3.2.3 Kultivierung der Brustkrebszelllinien

Zur Kultivierung und Vermehrung der adhärenenten Zellen wurde **Kulturmedium** verwandt, welches sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte: DMEM/ Ham's F-12 (PAA, Pasching, Österreich), 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 100 x (PAA, Pasching, Österreich), 10 % FKS (Serum Supreme, Lonza, Köln, Deutschland).

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid im Brutschrank (HERA cell, Heraeus, Bonn, Deutschland). Jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, indem das verbrauchte Medium durch frisches Medium ersetzt wurde.

3.2.4 Passage der Brustkrebszelllinien

Bei 80-90% Konfluenz der Zellen wurden die Zellen passagiert, indem das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen wurden. Nachfolgend wurde eine 1 x Trypsinlösung (PAA, Pasching, Österreich) zu den Zellen gegeben und für 5 – 10 min. bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid inkubiert (HERA cell, Heraeus, Bonn, Deutschland). Das Ablösen der Zellen wurde visuell überprüft. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit Kulturmedium (siehe 3.2.3). Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min. bei 300 g (3K10, Sigma, Osterode am Harz, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Kulturmedium (siehe 3.2.3) resuspendiert und 1:2 bis 1:6 geteilt, indem sie in neue Zellkulturflaschen ausgesät wurden.

Für die Herstellung des **1 x PBS** wurden 2 Tabletten Trockensubstanz (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit ddH₂O entsprechend den Herstellerangaben aufgefüllt und anschließend autoklaviert (15 min. bei 121 °C).

3.2.5 Herstellung von Kryoröhrchen zur Konservierung der Zellen

Nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin (siehe 3.2.4) wurden diese für 5 min. bei 300 g zentrifugiert (3K10, Sigma, Osterode am Harz, Deutschland) und anschließend das Pellet in Einfriermedium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt, wobei Zelllinie, Passagenzahl, Medium und Datum des Einfrierens auf dem Röhrchen dokumentiert wurden. Anschließend erfolgte eine langsame Abkühlung in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Nalgene™Cryo 1°C Freezing Container, über Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) für zwei Tage auf -80 °C, bevor diese in flüssigen Stickstoff überführt und für längere Zeit gelagert wurden.

Das **Einfriermedium** setzte sich aus 70 % Kulturmedium (siehe 3.2.3), 20 % FKS und 10 % DMSO zusammen.

3.2.6 Behandlung der Brustkrebszelllinien

Für die Behandlung der Zellen wurden diese 12 Stunden vor der Behandlung auf DMEM/ Hams's F-12 mit 1 % Penicillin/ Streptomycin gesetzt. Die Behandlungsdauer betrug 24 – 72 Stunden (siehe 3.1.). Die verwandten Substanzen, deren eingesetzte Konzentration und Lösungsmittel sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Kontrollzellen wurden mit der entsprechenden Trägersubstanz behandelt, um Effekte durch das Lösungsmittel selbst auszuschließen. Die gelösten Substanzen wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.2 Verwandte Substanzen zur Behandlung der Zellen.

Substanzen	Firma	Konzentrationen	Lösungsmittel
Aromataseinhibitor (4-(Imidazolyl)-1-nitro-9H-9-xanthenone)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	75 – 100 nM	DMSO
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	10^{-9} – 10^{-6} M	EtOH
RU-486	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	10^{-7} – 10^{-5} M	EtOH
WNT1, rekombinantes	BioVision, Kalifornien, USA	1,5 µg/ ml	dd H ₂ O
Zoledronat	Wurde von der Firma Novartis, Nürnberg, Deutschland zur Verfügung gestellt	10^{-10} – 10^{-6} M	PBS

3.2.7 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Arbeit mit Zellen erfordert u.a. die Ermittlung der Zellzahl, z.B. wenn eine bestimmte Anzahl von Zellen ausgesät werden soll. Die Auszählung der Zellen kann mittels Neubauer-Zählkammer erfolgen. Zur Analyse der Lebendzellzahl wurde Trypanblau (Trypan Blue Solution 0,4 %, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) eingesetzt. Das Farbstoff-Anion bindet an zytosolische Proteine toter Zellen, welche dadurch unter dem Mikroskop blau erscheinen [89].

Nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin wurden diese in 2 – 3 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und 20 µl dieser Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurde diese Suspension 1:2 mit einer 0,2 %igen Trypanblau-Lösung verdünnt, für 5 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Lebendzellzahl bestimmt, indem die farblosen Zellen von vier Großquadraten unter dem Mikroskop (Te Laval 31, Carl Zeiss SMT, München, Deutschland) bei geeigneter Vergrößerung ausgezählt wurden. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet und die Zellzahl pro ml nach folgender Formel bestimmt.

$$\text{Zellzahl/ ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \quad (1)$$

3.2.8 Transfektion

Die Transfektion wird genutzt um Fremd-DNA in Zellen einzubringen. Eine Methode ist die Lipofektion. Dabei handelt es sich um eine Liposomen-vermittelte Transfektion, welche jedoch durch verschiedenste Parameter, wie das Lipid-zu-DNA-Verhältnis, An- oder Abwesenheit von Serum, die Zellzahl-zu-DNA-Verhältnis, die Inkubationszeit, der Proliferationszustand der Zielzellen usw. beeinflusst wird [89].

Für den *knock-down* von Syndecan-1 (SDC1), dem Progesteronrezeptor (PGR) und dem Glukokortikoidrezeptor (NR3C1) wurde die entsprechende siRNA mittels DharmaFECT 1 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) in die Zielzellen eingebracht. Die Endkonzentration an siRNA im Medium betrug 50 nM (SDC1) bzw. 150 nM (PGR, NR3C1). Die siRNA wurde mit serumfreiem Medium (OPTI-MEM® I + GlutaMAX™-I, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und für 5 min. inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Inkubation von Transfektionsreagenz DharmaFECT 1 und serumfreiem Medium. Anschließend wurden beide Gemische vereinigt und für weitere 20 min. bei RT inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz mit DMEM/ Ham's F-12, welches 10 % FKS jedoch kein Penicillin/ Streptomycin enthielt entsprechend der

Konzentration aufgefüllt. Nachdem die Zellen mit 1x PBS (3.2.4) gewaschen wurden erfolgte die Zugabe des Transfektionsgemisches, welches für 5 Stunden auf den Brustkrebszellen verblieb. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Transfektionsgemisch gegen Kulturmedium ausgetauscht. Die siRNA wurde von der Firma Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bezogen. Folgende siRNAs wurden für die Versuche verwandt: Syndecan-1 – siRNA ID: 12527, Progesteronrezeptor – siRNA ID: s10416, Glukokortikoidrezeptor – siRNA ID: s6186, *scramble control* (Silencer Select Negative Control #1 siRNA)- Part Number: 4390843.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* von Roche entsprechend der Angaben des Herstellers. Dieses Verfahren basiert auf der Verwendung von Silica-Säulen wobei die gesamte RNA isoliert wird. Bei diesem System ist ein Schritt zum Verdau der DNA integriert [90]. Zur Kontrolle, inwieweit die isolierte RNA intakt war, wurde ein Agarose-Kontrollgel (1 %) angefertigt und die 28 S- und 18 S-Banden mittels UV-Licht detektiert (siehe 3.3.5).

3.3.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde am Nano Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf einem patentierten *Sample Retention System*, welches sich der Glasfasertechnologie bedient und die Oberflächenspannung von wässrigen Lösungen ausnutzt [91]. Die photometrische Messung erfolgte bei Wellenlängen von 260 nm (RNA/ DNA) bzw. 280 nm (Proteine).

3.3.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde mRNA mittels reverser Transkriptase (SuperScript, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 500 ng RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 11 µl eingestellt und anschließend mit 4 µl *Random Hexamer*-Primer (Konzentration: 3 µg/ µl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Es folgte eine dreiminütige Inkubation bei 72 °C und ein Herunterkühlen auf

4 °C. Anschließend wurden 10 µl des folgenden Reaktionsansatzes (Tabelle 3.3) zur DNA-verdauten Probe pipettiert.

Tabelle 3.3 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese einer Probe.

Reagenzien	Menge in µl
DEPC-H ₂ O (Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,55
5 x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	5,00
dNTPs (10 mM, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	1,25
DTT (0,1 M, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	2,50
Super Script (200 U/ml, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	0,20
RNase OUT Inhibitor 40 U/ ml, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	0,50
Gesamtvolumen	10,00

Dieser Ansatz wurde für 45 min. bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen anschließenden Hitzeschritt bei 95 °C für 1 min. abgestoppt. Nachfolgend wurde die Probe 1:2 mit ddH₂O verdünnt und die cDNA-Synthese mittels PCR kontrolliert (siehe 2.3.4). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Für die Herstellung des **DEPC-Wassers** wurde einem Liter A. bidest. 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugegeben. Die Lösung wurde in Flaschen abgefüllt. Die Flaschen blieben über Nacht unter dem Abzug bis sie für 15 min. bei 121 °C autoklaviert wurden.

3.3.4 PCR

Kontroll-PCRs dienten der Überprüfung der erfolgreichen cDNA-Synthese und wurden mit den Primern für das *housekeeping gene* 18 S (siehe 3.3.7) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Wasser statt cDNA mitgeführt. Für den Test einer Probe wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert, welcher in Tabelle 3.4 dargestellt ist. Die Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen. Für den Nachweis der erfolgreichen cDNA-Synthese wurden die PCR-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.3.5) nachgewiesen.

Tabelle 3.4 Reaktionsansatz für die Kontroll-PCR einer Probe.

Reagenzien	Mengen in μl
ddH ₂ O	13,45
10 x NH ₄ Reaction Buffer (Invitex, Berlin, Deutschland)	2,50
MgCl ₂ (50 mM, Invitex, Berlin, Deutschland)	0,75
dNTPs (0,1 mM, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland))	5,00
Primer s (10 μM , Sigma-Aldrich, München, Deutschland)	0,50
Primer as (10 μM , Sigma-Aldrich, München, Deutschland)	0,50
Taq Polymerase (5 U/ μl , Invitex, Berlin, Deutschland)	0,30
cDNA	2,00
Gesamtvolumen	25

Tabelle 3.5 PCR-Bedingungen.

Zyklus	Verweilzeit	Temperatur	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	1 min.	95 °C	
Denaturierung	30 sek.	95 °C	} 9
Annealing	30 sek.	60 °C	
Elongation	30 sek.	72 °C	
Finale Elongation	2 min.	72 °C	
Kühlung	for ever	4 °C	

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde genutzt, um die Qualität der RNA-Isolation bzw. die Größe der PCR-Fragmente und somit die erfolgreiche cDNA-Synthese zu überprüfen. Das Verfahren basiert darauf, dass das Ethidiumbromid in Nukleinsäuren interkaliert, was mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden kann [90].

Dazu wurde für ein 1 %iges Gel 1,5 g Agarose (Serva, Heidelberg, Deutschland) mit 1 x TAE auf 150 ml aufgefüllt, gemischt und in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Flüssigkeit unter Rühren auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden 1,5 μl Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg, Deutschland) hinzugefügt, gut gemischt und sofort in Gelkammern gefüllt. Für die Überprüfung der RNA wurden 500 ng der Nukleinsäure mit DEPC-Wasser auf 11 μl aufgefüllt und mit 2 μl 6 x Ladepuffer versetzt und der komplette Ansatz in die Geltaschen pipettiert.

Zur Analyse der PCR-Fragmente wurde nach der PCR 4 μl des 6 x Ladepuffer zugegeben und 12 μl in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte ca. 30 min. bei 120 Volt. Zur Detektion der Banden mittels UV-Licht wurde der UV-Transluminator (LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland) genutzt.

Der **50 x TAE-Puffer** enthielt 2 M Tris, 57,1 ml Eisessig und 0,5 M EDTA. Aufgefüllt wurde mit A. bidest. Für die Herstellung des 1 x TAE wurde der 50 x TAE entsprechend mit A. bidest. verdünnt.

Der **6 x Ladepuffer** enthielt 2 M Tris-HCl (pH 7,6), 60 M EDTA, 60 % (v/v) Glycerol, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau und 0,3 % (w/v) Xylencyanol. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.3.6 *Real-time* PCR

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation einer bestimmten Gensequenz, durch den Einsatz spezifisch bindender Primer. Bei der *real-time* PCR kann dieser Prozess mittels Fluoreszenzfarbstoff z.B. Sybr®Green, der sich unspezifisch in dsDNA einlagert, in Echtzeit verfolgt werden. Um Unterschiede hinsichtlich der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen, wird die gleichzeitige Analyse eines so genannten *housekeeping genes* durchgeführt. Für die Auswertung der Genexpressionsanalysen mittels *real-time* PCR wurde die relative mRNA-Expression ermittelt. Dies erfolgte, indem die Mittelwerte (MW) der Doppelbestimmung für jedes Gen und Probe ermittelt wurden. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode mit Hilfe folgender Formeln [92].

$$\Delta\text{ct} = \text{MW}_{\text{Gen x}} - \text{MW}_{\text{housekeeping gene}} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct}_{\text{Probe behandelt}} - \Delta\text{ct}_{\text{Probe Negativkontrolle}} \quad (3)$$

Abschließend wurde für jede Probe der $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ Wert ermittelt.

Die *real-time* PCRs wurden am LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. In Tabelle 3.6 sind der Reaktionsansatz für eine Probe und in Tabelle 3.7 die Reaktionsbedingungen der *real-time* PCR angegeben.

Tabelle 3.6 Reaktionsansatz für *real-time*-PCR einer Probe.

Reagenzien	Mengen in μl
ddH ₂ O	1,5
Light Cycler ® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)	5,0
Primer s (10 μM)s	0,75
Primer as (10 μM)	0,75
cDNA	2,00
Gesamtvolumen	10

Tab. 3.7 *real-time*-PCR-Bedingungen

Zyklus	Verweilzeit	Temperatur	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	10 min.	95 °C	
Denaturierung	10 sek.	95 °C	} 45
Annealing	10 sek.	56 °C	
Elongation	30 sek.	72 °C	
Schmelzkurve		95 °C → 60 °C	
Kühlung	for ever	40 °C	

3.3.7 Primer

Primer sind Oligonukleotide, welche zur Amplifikation von zu untersuchenden Sequenzen benötigt werden.

Das **Design der Primer** erfolgte mit Hilfe der Datenbank „UCSC Genome Bioinformatics“ (URL: <http://genome.ucsc.edu/>) und der Programme “Primer3“ (URL: <http://frodo.wi.mit.edu/>) und “OligoAnalyzer 3.0“ (URL: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). In Tabelle 3.8 sind die für die PCR verwandten Primer aufgelistet. Grau unterlegte Primer waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

Tabelle 3.8 Primer für die Genexpressionsanalysen.

Gene	Sequenz der Primer (3'-5'-Richtung)
<i>ACTB</i> (β-Aktin)	CCAACCGCGAGAAGATGA CCAGAGGCGTACAGGGATAG
<i>CCND1</i> (Cyclin D1)	AGAGGCGGAGGAGAACAAAC AGCGTGTGAGGCGGTAGTAG
<i>CDH1</i> (E-Cadherin)	CTCTCTCACCACCTCCACAG GGCAGTGTCTCTCCAAATCC
<i>DKK1</i> (Dickkopf-1)	AGCACCTTGGATGGGTATTC CACACTTGACCTTCTTTCAGGAC
<i>ESR1</i> (Östrogenrezeptor-α)	ACCGAAGAGGAGGGAGAATG AACAAGGCACTGACCATCTG
<i>ESR2</i> (Östrogenrezeptor-β)	AGTCCCTGGTGTGAAGCAAG TGAGCATCCCTCTTTGAACC
<i>GAPDH</i> (Glyceraldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase)	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAATCC
<i>HPSE</i> (Heparanase)	ATCAATGGGTGCGAGTTAGG TCACTTCTCCACCAGCCTTC
<i>LDHA</i> (Laktatdehydrogenase A)	ATTCAGCCCCGATTCCGTTAC TTCAGAGAGACACCAGCAACA
<i>NR3C1</i> (Glukokortikoidrezeptor-α)	GGCAGCGGTTTTATCAACTG CAGCTAACATCTCGGGGAAT
<i>NR3C1</i> (Glukokortikoidrezeptor-β)	GGCAGCGGTTTTATCAACTG TGTGTGAGATGTGCTTTCTGG
<i>OPG</i> (Osteoprotegerin)	GAACCCCAGAGCGAAATACAG TAGCAGGAGACCAAAGACACTG
<i>PGR</i> (Progesteronrezeptor)	AGCCAGAGCCCACAATACAG GCAGTCATTTCTTCCAGCAC
<i>PLAUR</i> (Plasminogen activator, urokinase receptor)	GCATTTCTGTGGCTCATCA GAAGGTGTCGTTGTTGTGGA
<i>SDC1</i> (Syndecan-1)	TGGACAGGAAAGAGGTGCTG GTTTGGTGGGCTTCTGGTAG
<i>SOST</i> (Sclerostin)	CACAGCCTTCCGTGTAGTGG ATTTCCGTGGCATCATTCTTG
<i>TIMP1</i> (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1)	ACTTCCACAGGTCCCACAAC ATTCCTCACAGCCAACAGTG
<i>WNT1</i> (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 1)	CGCTGGAAGTGTCCCACT AACGCCGTTTCTCGACAG
<i>WNT5A</i> (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 5A)	GGACCACATGCAGTACATCG CCTGCCAAAAACAGAGGTGT

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinlyse

Die Zellen wurden zum entsprechenden Zeitpunkt mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Proteinlysepuffer lysiert. Der **Proteinlysepuffer** setzte sich zusammen aus TrisHCl, pH 7,4 (Endkonzentration 20 mM), 1 % (w/v) SDS und 1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), welcher erst kurz vor der Zellyse zugegeben wurde.

Das Zellysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Scheren der DNA erfolgte mit Hilfe einer Spritze (Omnifix, Braun, Melsungen, Deutschland) und Kanüle (BD Microlance™ 3, BD, Heidelberg, Deutschland) indem das Zellysat mehrmals auf- und abgezogen wurde. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 6000 g für 10 min. bei 4 °C (3K30, Sigma, Osterode am Harz, Deutschland) an. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.4.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Bonn, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben. Der Test basiert auf der Biuret-Reaktion bei der die Proteine in alkalischer Lösung mit zweiwertigen Kupferionen einen Komplex bilden. Dadurch werden die Kupferionen reduziert und bilden zusammen mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Dies kann anschließend kolorimetrisch gemessen werden. Dabei wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt [93].

3.4.3 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die entsprechende Menge an Proteine wurden mit 4 x Proteinladepuffer versetzt und für 5 min. auf 98 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung (Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad, München, Deutschland) im Polyacrylamidgel (10 %) nach ihrer Größe. Die Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels können den nachfolgenden Tabellen 3.9 und 3.10 entnommen werden.

Tabelle 3.9 Polyacrylamidgel – Trenngel (Angaben für ein Gel)

Komponenten	ml
destilliertes Wasser	1,9
30 % Acryl-Bisacrylamid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	1,7
1,5 M Tris (pH 8,8, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	1,3
10 % SDS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,05
10 % APS	0,05
TEMED (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,002

Tabelle 3.10 Polyacrylamidgel – Sammelgel (Angaben für ein Gel)

Komponenten	ml
destilliertes Wasser	0,68
30 % Acryl-Bisacrylamid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,17
1,5 M Tris (pH 6,8, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,13
10 % SDS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,01
10 % APS	0,01
TEMED (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,001

Für das 10 %ige **APS** wurden 1 g Ammoniumpersulfat mit A. bidest auf 10 ml aufgefüllt. Aliquots wurden bei -20 °C gelagert. Für die Herstellung der **1,5 mM Tris**-Lösung wurden 90,86 g Tris auf 500 ml mit A. bidest. aufgefüllt. Die pH-Wert-Einstellung auf 6,8 erfolgte mit rauchender HCl unter dem Abzug.

Der **4 x Proteinladepuffer** (Lämmli-Puffer) enthielt Tris-HCl (Endkonzentration: 250 mM, pH 6,8), Dithiothreitol (DTT, Endkonzentration: 400 mM), 60 % Glycerol, 4 % SDS und 2 % Bromphenolblau. Diesem wurde vor der Zugabe zur Probe noch Reducing Reagenz (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) zugegeben. Für den **5 x Laufpuffer** (pH 8,8) wurden 15,1 g Tris, 72 g Glycin und 5 g SDS mit A. bidest auf 1 L aufgefüllt. Für die Verwendung in der Gelelektrophorese wurde 1 x Laufpuffer verwandt, welcher

aus dem 5 x Laufpuffer in entsprechender Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt wurde.

3.4.4 Western Blot

Beim Blotten wurden die Proteine elektrophoretisch (1 h, 0,35 mA) vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose Transfer Membran (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) übertragen. Dazu wurden Blot-Kammern der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) benutzt, die nach dem *Tank-Blot*-Verfahren arbeiten. Im Anschluss wurde die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran mittels Ponceaurot-S-Färbelösung kontrolliert.

Für den 5 x **Transferpuffer** wurden 15,1 g Tris, 72 g Glycin und 5 ml 10 %ige SDS-Lösung mit A. bidest. auf 1 L aufgefüllt. Für die Verwendung während des Blot-Vorgangs wurde 1 x Transferpuffer verwandt, welcher aus 200 ml 5 x Transferpuffer, 200 ml Methanol und 600 ml destilliertem Wasser hergestellt wurde.

Die **Ponceaurot-S-Färbelösung** setzte sich zusammen aus Ponceaurot (0,5 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Essigsäure (1 %) in Wasser.

3.4.5 Proteinnachweis

Für den Nachweis der Proteine wurden die Membranen zuerst in 5 %igen Milchpulver in 1 x TBS-T für mindestens 30 min. inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Membranen mit den primären Antikörpern (siehe Tabelle 3.11) in 5 %igem Milchpulver (in 1 x TBS-T). Am darauf folgenden Tag wurden die Membranen mit 1 x TBS-T gewaschen. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörper in 1 %igem Milchpulver in 1 x TBS-T an. Danach folgte erneut ein Waschschrift (1 x TBS-T). Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Reagenz (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Bonn, Deutschland). Das Verfahren beruht auf einer Chemolumineszenzreaktion, bei der das Substrat durch die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase enzymatisch umgesetzt wird [93]. Für die Detektion wurden Amersham Hyperfilm™ECL (GE Healthcare Limited, München, Deutschland) und Kodak GBX Fixierer und Entwickler für Autoradiografie (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwandt.

Tabelle 3.11 Antikörper. Primäre Antikörper sind grau unterlegt. Sekundäre Antikörper waren für die Detektion im Western Blot HRP-gekoppelt.

Antikörper	Firma
ACTB (β -Aktin)	#4970, Cell Signaling
GAPDH (Glyceraldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase)	#2118, Cell Signaling
ESR1 (Östrogenrezeptor- α)	#2512, Cell Signaling
NR3C1 (Glukokortikoidrezeptor)	sc-8992, Santa Cruz
PGR (Progesteronrezeptor)	#3172, Cell Signaling
WNT1 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 1)	Ab62703, Abcam
Anti-mouse IgG	HAF007, R&D
Anti-rabbit IgG	HAF008, R&D

Für den 10 x **TBS-T-Puffer** wurden 24,2 g Tris und 87,6 g NaCl in A. bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Danach wurden 10 ml 1 %iges Tween 20 hinzugefügt und mit A. bidest. auf 1 L aufgefüllt.

3.4.6 Immunfluoreszenz

Für die Analyse verschiedener Proteine mittels Immunfluoreszenz wurden die Brustkrebszellen auf Deckgläschen kultiviert und behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (3.2.4) gewaschen und mit eiskaltem Methanol für mindestens 1h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Anschließend wurde mit PBS für 10 min. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln rehydriert. Nachfolgend wurden unspezifische Bindungen mit einer 1 %igen BSA-Lösung (BSA in 1 x PBS) geblockt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Schüttler. Am darauf folgenden Tag wurde mindestens drei Mal für 5 min. mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären fluoreszierenden Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln unter ständigem Schütteln. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift (3 x 5 min. mit 1 x PBS) an. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen für 5 min. mit einer DAPI-Lösung ($2,5\text{ }\mu\text{g/ml}$) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln der Deckgläschen wurde Dako Fluoreszent Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg,

Deutschland) verwandt. Die Auswertung erfolgte am Axio M1 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei geeigneter Vergrößerung und den entsprechenden Filtern.

3.4.7 Syndecan-1-ELISA

Der Syndecan-1-ELISA wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Mit diesem ELISA wurden Zellkulturüberstände auf den Gehalt an löslichem Syndecan-1 getestet.

Das Nachweisverfahren des ELISAs basiert auf einer Antikörperreaktion und nachfolgender enzymatischer Farbreaktion. Spezifische monoklonale Antikörper sind dabei in den Wells der Mikrotiter-Platten aufgebracht, woran das Antigen binden kann und so immobilisiert wird. Ein weiterer spezifischer Antikörper, sog. Detektionsantikörper, gegen das Antigen wird verwandt. Daran gebundene Streptavidin-Peroxidase-Komplexe setzen das zugegebene Substrat um, was sich in einem Farbumschlag äußert und photometrisch ausgewertet werden kann [94].

3.4.8 Osteoprotegerin-ELISA

Der OPG-ELISA wurde zur Bestimmung von Osteoprotegerin in Zellkulturüberständen genutzt. Das Prinzip des ELISAs ist dasselbe wie das des Syndecan-1-ELISAs (siehe 3.4.7). Die Durchführung erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers [95].

3.5 Funktionelle Analysen

3.5.1 Vitalität

Für den Vitalitätsassay wurden die Brustkrebszellen in entsprechender Zellzahl (Tabelle 3.12) in 96-Well-Platten (schwarze Platte mit transparentem Boden) ausgesät. Pro Behandlung erfolgte eine Vierfachbestimmung. Wie im Schema Arbeitsablauf Tabelle 3.1 dargestellt, wurden die Zellen auf Kulturmedium ohne FKS gesetzt und anschließend mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Vitalität zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72 Stunden) mit dem CellTiter-Blue® Cell Viability Assay von Promega (Mannheim, Deutschland). Der Test wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip des Assays basiert auf der Umsetzung des blauen Redoxfarbstoffes Resazurin zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin durch metabolisch aktive Zellen (Abb. 3.1). Das

Fluoreszenzsignal verhält sich dabei direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen [96].

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 590 nm. Die Anregungswellenlänge betrug 560 nm.

Tabelle 3.12 Ausgesäte Zellzahl pro Well einer 96-Well-Platte.

Zelllinien	Zellzahl pro Well
MCF-7	12.900
T-47D	14.000
MDA-MB-231	4.300

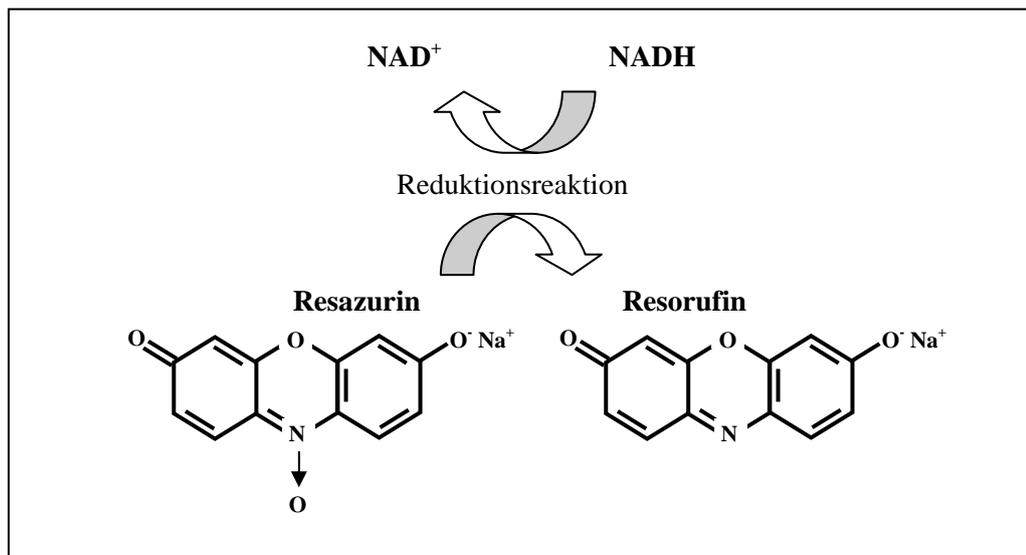


Abbildung 3.1 Testprinzip des Vitalitätsassays von Promega. Abbildung verändert nach Technical Bulletin CellTiter-Blue Cell Viability Assay von Promega [96].

3.5.2 Apoptose

Für den Apoptoseassay wurden die Brustkrebszellen in entsprechender Zellzahl (Tabelle 2.13) in 12-Well-Platten ausgesät. Wie im Schema Arbeitsablauf Tabelle 3.1 wurden die Zellen auf Kulturmedium ohne FKS gesetzt und anschließend mit den entsprechenden Substanzen für 24, 48 oder 72 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptose mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Der Test wurde entsprechend der

Herstellerangaben durchgeführt. Zur Analyse der Nekrose wurden der Zellüberstand der verwandt.

Tabelle 3.13 Ausgesäte Zellzahl pro Well einer 12-Well-Platte.

Zelllinien	Zellzahl pro Well
MCF-7	65.000
T-47D	70.000
MDA-MB-231	22.000

Das Prinzip des ELISAs basiert auf dem Nachweis zytoplasmatischer histonassoziierter DNA-Fragmente. Diese binden an einen Anti-Histon-Biotin-Antikörper, der über Streptavidin an die Wand der Mikrotiterplatte gebunden ist. Ein HRP- (*horse radish peroxidase*) gekoppelter Antikörper bindet an Einzel- und Doppelstrang-DNA. Durch Zugabe des Substrats, welches durch die HRP umgesetzt wird, erfolgt die photometrische Quantifizierung der gebundenen Nukleosomen (Abb. 3.2).

Die Messung erfolgte am FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 405 nm und 490 nm. Für die Auswertung wurden die Blank-korrigierten Daten für beide gemessenen Wellenlängen ermittelt. Die Berechnung der Apoptose erfolgte mit Hilfe folgender Formeln.

$$mU_{\text{Probe}} = 405 \text{ nm} - 490 \text{ nm} \quad (4)$$

$$\text{relative Apoptose} = \frac{mU_{\text{behandelte Zellen}}}{mU_{\text{Kontrollzellen}}} \quad (5)$$

$$mU = \text{Absorption} [10^{-3}]$$

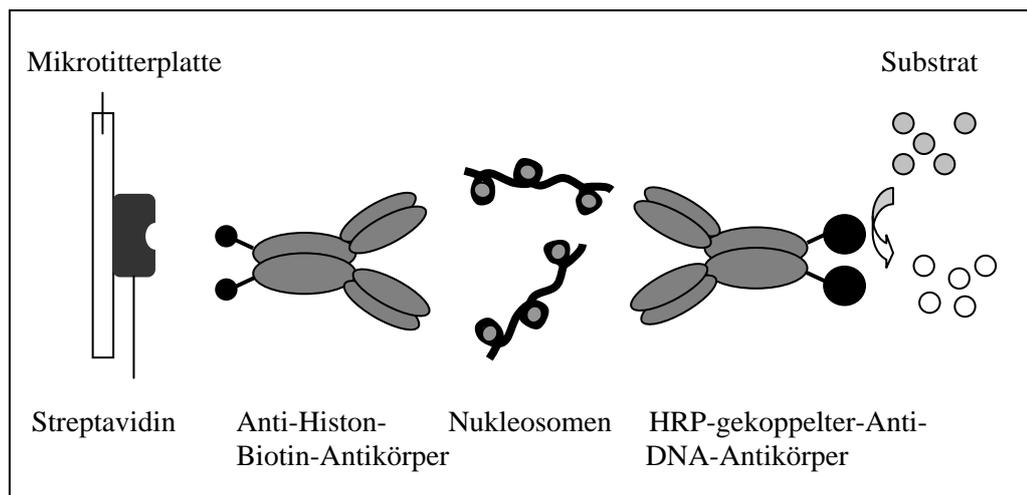


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Funktionsweise des Apoptose-ELISAs von Roche. Abbildung verändert nach Manual Cell Death Detection ELISA von Roche [97].

3.5.3 Caspase-Aktivierung/Apoptose

Zur Bestimmung der Apoptose wurde der Caspase-Glo®3/7 Assay von Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet. Das Prinzip des Assays basiert auf der Umsetzung des Substrates Z-DEVD-Aminoluciferin durch die aktivierten Caspasen-3 und -7. Das dabei freigesetzte Aminoluciferin dient als Substrat für die Ultra Glow™-Luciferase. Das Lumineszenzsignal kann anschließend gemessen werden und ist proportional zur Menge aktiver Caspasen [98].

Für den Apoptose-Assay wurden die Brustkrebszellen in entsprechender Zellzahl (Tabelle 3.12) in 96-Well-Platten ausgesät. Wie im Schema Arbeitsablauf Tabelle 3.1 wurden die Zellen auf Kulturmedium ohne FKS gesetzt und anschließend mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Pro Behandlung erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Messung der Lumineszenz erfolgte am FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

3.5.4 Invasion

Für die Untersuchung der Invasion wurde das BD Falcon™ HTS FluoroBlok™96-Multiwell Insert System BD Biosciences (Bedford, USA) verwendet. Das Testprinzip basiert darauf, dass die *Inserts* mit einem Matrigel ausgekleidet sind, welches von invasiven Zellen durchdrungen werden kann. Am Boden des *Inserts* befinden sich

weiterhin Poren durch welche die Zellen hindurch wandern können. Anschließend können gefärbte Zellen, die sich am Boden des *Inserts* befinden mittels Fluoreszenz detektiert werden. Für das Markieren der Zellen stehen verschiedene Farbstoffe, die ein *pre-* bzw. *postlabelling* ermöglichen, zur Verfügung (Abb. 3.3). Aufgrund der lichtundurchlässigen Membran werden auch nur die lebenden Zellen detektiert, die aktiv durch die Membran/ Poren gewandert sind [99].

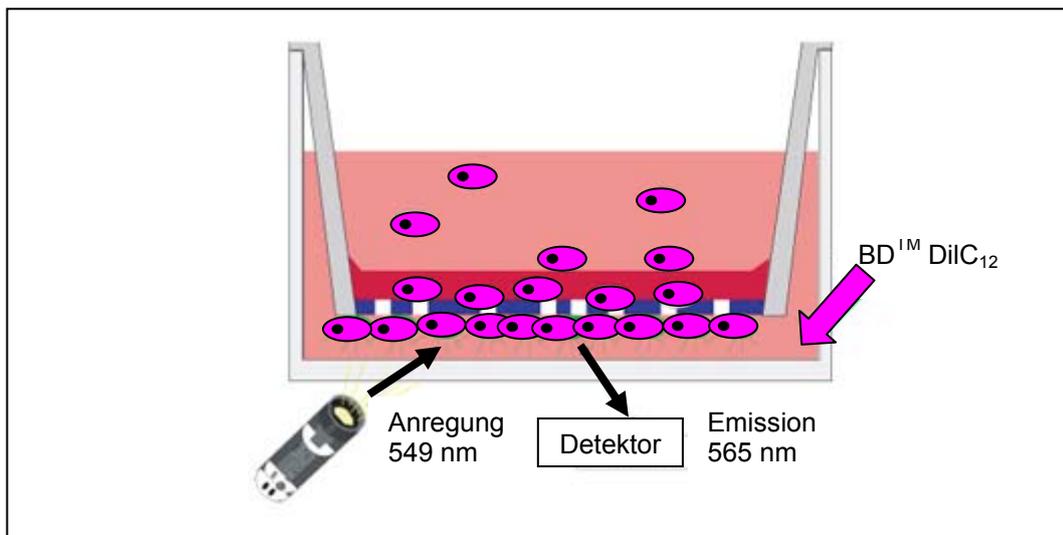


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Funktionsweise des BD Falcon™ HTS FluoroBlok™96-Multiwell Insert System von BD Biosciences (Bedford, USA).

Abbildung verändert nach: <http://www.bdbiosciences.com/cellculture/endothelialcells/index.jsp>

Für die Untersuchung der Invasion wurden die MCF-7-Zellen in 6-Well-Platten (300.000 Zellen/ Well) ausgesät. Die weitere Vorgehensweise der Experimente kann der Tabelle 3.14 entnommen werden.

Tabelle 3.14 Versuchsaufbau zur Bestimmung der Invasion.

Zeit	Arbeitsschritt
Tag 1 vormittags	Aussäen der Zellen in Kulturmedium mit 10 % FKS
Tag 2 nachmittags	Färbung der Zellen mit BD™ DiIC ₁₂ (3) (BD Biosciences, Bedford, USA)
Tag 3 vormittags nachmittags	Transfektion (wenn erforderlich) Mediumwechsel auf Kulturmedium ohne FKS
Tag 4 vormittags	Behandlung der Zellen
Tag 6 vormittags	Ablösen der Zellen mit steriler 1,5 mM EDTA-Lösung und Beginn des Invasionsassays (siehe Herstellerangaben)
Tag 7 vormittags	Messung der Invasion

Für das Ablösen der Zellen am Tag 6 wurde sterile 1,5 M EDTA-Lösung (in 1 x PBS) verwendet, da dies im Gegensatz zu Trypsin nicht das Syndecan-1 von der Zelloberfläche abspaltet [100]. Pro Behandlung erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bei den Wellenlängen 544 nm (*excitation*) und 590 nm (*emission*).

3.5.5 Migration

Für die Untersuchung der Migration wurden die Zellen in *Culture-Inserts* der Firma ibidi (ibidi GmbH, Martinsried, Germany) ausgesät. Dies ermöglichte die Erzeugung eines konstanten Abstands zwischen zwei Zellflächen. Die *Culture-Inserts* wurden zum Zeitpunkt der Behandlung entfernt, so dass die Zellen in den Spalt hineinwandern konnten (Abb. 3.4). Zum Zeitpunkt 0 (direkt nach der Entfernung der *Culture-Inserts*) und 72 h später erfolgte die Ausmessung des Spaltes. Dazu wurde der Spalt fotografiert und anschließend an 10 Stellen mittels des Programms ImageJ Software (National Institute of Health, Bethesda, USA) vermessen und der Mittelwert gebildet.

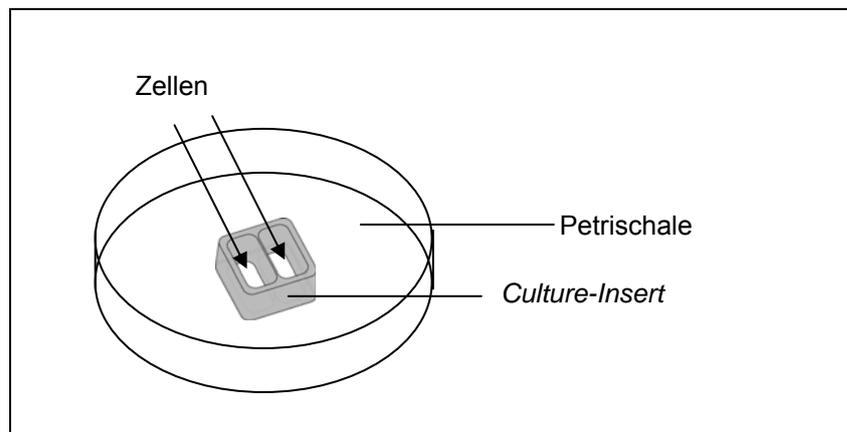


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der *Culture-Inserts* (ibidi, Martinsried, Deutschland). Abbildung verändert nach:

http://www.ibidi.com/products/disposables/E_802XX_CI_family.html

3.6 Statistische Auswertungen der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (STABW). Mittels Grubbs-Test wurden Ausreißer innerhalb eines Experimentes ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test für den Vergleich einzelner Gruppen und der one-way analysis of variance (ANOVA) für Zeit- und Dosisreihen sowie Ko-Behandlungen. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Expression der Steroidhormonrezeptoren in den Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231

Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene Brustkrebszelllinien verwendet, welche entweder Hormonrezeptor-positiv (MCF-7, T-47D) oder Hormonrezeptor-negativ (MDA-MB-231) sind [85].

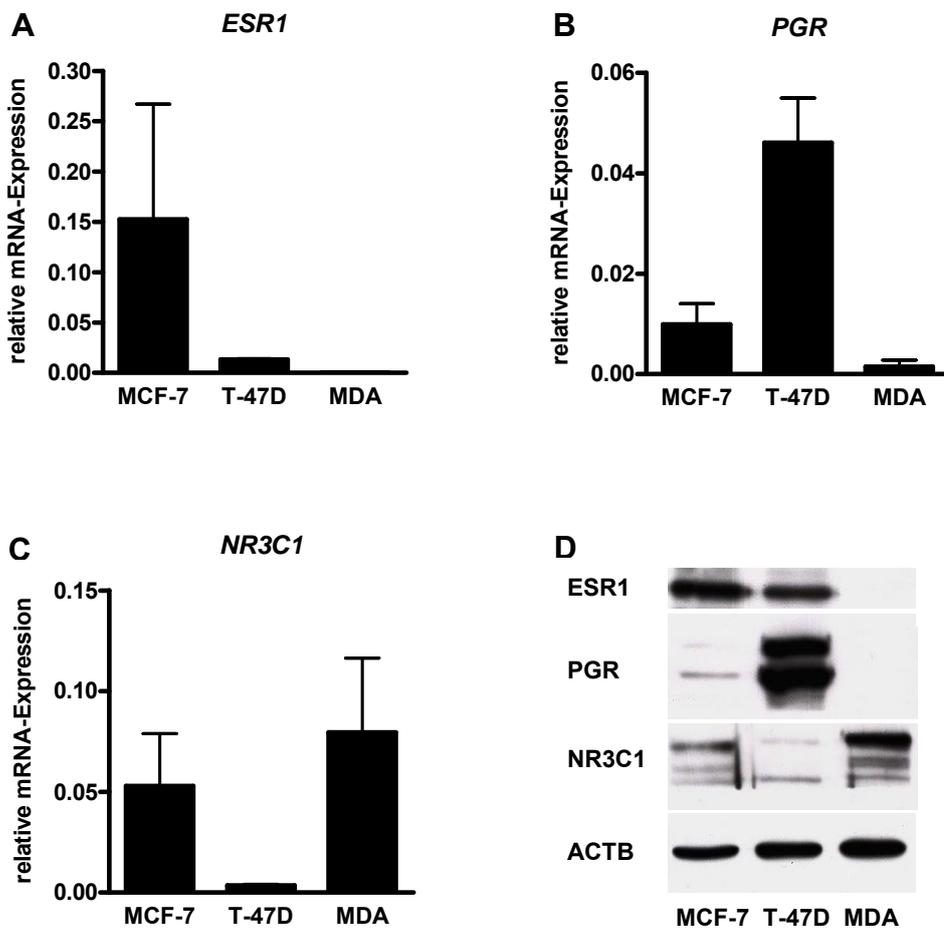


Abb. 4.1 Expression der Steroidhormonrezeptoren der Brustkrebszelllinien. Mittels *real-time PCR* (A-C) und *Western Blot* (D) wurde die basale Expression des (A) *ESR1*, des (B) *PGR* und des (C) *NR3C1* in den Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231 analysiert. Die Normalisierung erfolgte zum *housekeeping gene* *ACTB*. Sowohl die MCF-7 als auch die T-47D-Zellen exprimierten alle drei Steroidhormonrezeptoren in einem unterschiedlichen Ausmaß. Die Zelllinie MDA-MB-231 hingegen exprimierte ausschließlich den NR3C1. Die Analyse der (D) Proteinexpression der Steroidhormonrezeptoren bestätigen die mRNA-Daten. N=3, ACTB – β -Aktin, ESR1 – Östrogenrezeptor- α , MDA – MDA-MB-231, PGR – Progesteronrezeptor, NR3C1 – Glukokortikoidrezeptor- α .

Mittels *real-time PCR* (Abb. 4.1 A-C) und *Western Blot* (Abb. 4.1 D) wurde die Expression des Östrogen-, Progesteron- und Glukokortikoidrezeptors in den drei Zelllinien überprüft.

MCF-7-Zellen exprimierten im Vergleich zur T-47D-Zelllinie den Östrogenrezeptor- α (Abb. 4.1 A, D) stärker und den Progesteronrezeptor schwächer (Abb. 4.1 B, D). In MDA-MB-231-Zellen konnte die Expression dieser beiden Hormonrezeptoren jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.1 A, B, D). Die Analyse des Glukokortikoidrezeptors zeigte, dass sowohl MDA-MB-231 als auch MCF-7 höhere Level dieses Steroidhormonrezeptors exprimierten als T-47D-Zellen (Abb. 4.1 C, D). Die Analyse der β -Isoformen für den Östrogen- und Glukokortikoidrezeptor erfolgte ebenfalls. Keine der drei Zelllinien exprimierte jedoch diese Isoformen (Daten im Anhang 8.1 A-B).

4.2 Einfluss von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges und dessen funktionelle Relevanz

4.2.1 RU-486 hemmt die Vitalität der Progesteronrezeptor-positiven Brustkrebszellen

Für dieses Projekt wurde als erstes der Einfluss von RU-486 auf die Vitalität der Brustkrebszelllinien untersucht. Dazu erfolgte eine 72-stündige Behandlung der Zelllinien mit verschiedenen Dosen (10^{-7} – 10^{-5} M) dieses Antigestagens.

Es zeigte sich, dass RU-486 die Vitalität der Progesteronrezeptor-positiven Brustkrebszellen signifikant hemmte (Abb. 4.2.1 A, B). Der größte Effekt wurde bei der höchsten Konzentration von RU-486 (10^{-5} M) beobachtet, wobei die Vitalität der MCF-7-Zellen um 47% ($p < 0,05$) und der T-47D-Zellen um 17% ($p < 0,01$) gemindert wurden. Im Gegensatz dazu blieb die Vitalität der Progesteronrezeptor-negativen Zelllinie MDA-MB-231 nach Behandlung mit RU-486 unbeeinflusst (Abb. 4.2.1 C).

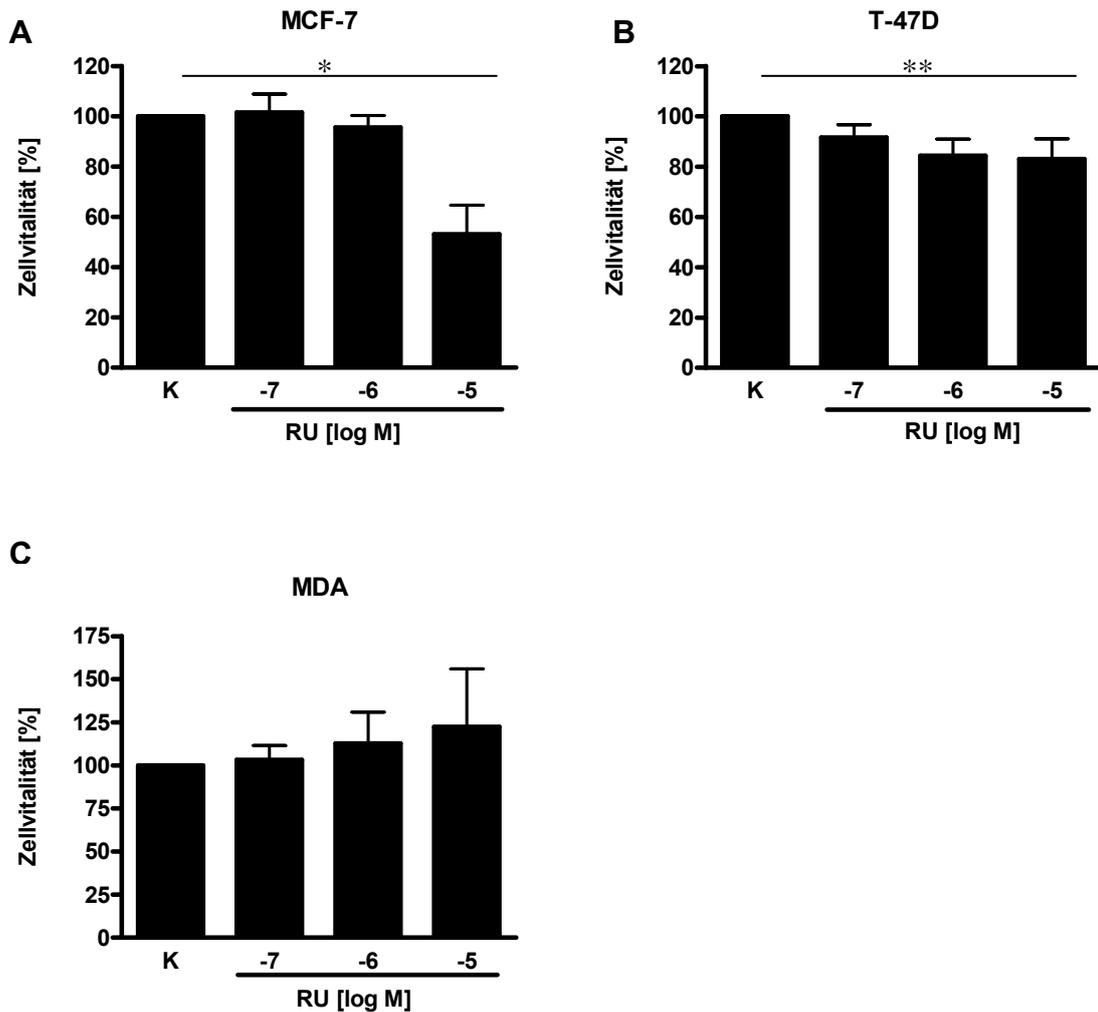


Abb. 4.2.1 Effekt von RU-486 auf die Vitalität der Brustkrebszelllinien. Alle Zelllinien wurden in Medium ohne FKS kultiviert, mit RU-486 (10^{-7} – 10^{-5} M) für 72 h behandelt und anschließend die Zellvitalität (CellTiter-Blue®Cell Viability Assay, Promega) analysiert. Sowohl **(A)** MCF-7 als auch **(B)** T-47D zeigten eine signifikant verminderte Zellvitalität bei der Behandlung mit der höchsten Konzentration von RU-486 (10^{-5} M). Die **(C)** Zellvitalität der MDA-MB-231- Zellen blieb nach RU-486-Behandlung unbeeinflusst. N=3, *p<0,05, **p<0,01, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, MDA – MDA-MB-231, RU – RU-486.

4.2.2 Einfluss von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges

Aufgrund der Verbindung zwischen Progesteron und dem Wnt-Signalweg erfolgte die Analyse der mRNA-Expression verschiedener am Wnt-Signalweg beteiligter Proteine (WNT1, SOST, CTNNB1, DKK1 und WNT5A) nach RU-486-Behandlung (72 h, 10^{-5} M).

Der stärkste Effekt zeigte sich in MCF-7-Zellen für das Protoonkogen WNT1, bei welchen die mRNA-Expression durch das Antiprogestin RU-486 fast vollständig gehemmt wurde (-99%, $p < 0,001$). Dieses Ergebnis konnte auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 4.2.2 A). In MDA-MB-231-Zellen wurde die WNT1-Expression durch RU-486 nicht beeinflusst (Abb. 4.2.2 C). Die Analyse der WNT1-Expression in T-47D-Zellen (Abb. 4.2.2 B) war nur begrenzt möglich, da die Expression etablierter *housekeeping genes* (*ACTB*, *GAPDH*, *LDHA*) durch RU-486 in unterschiedlichem Ausmaß reguliert wurde. Letztendlich wurde für die Auswertung β -Aktin herangezogen, da diese am wenigsten einer Regulation durch RU-486 unterlag.

Die Analyse der anderen am Wnt-Signalweg beteiligten Gene zeigten keine so deutliche Regulation der mRNA-Expression wie WNT1 in MCF-7-Zellen (Daten im Anhang 8.2.1 A-C)

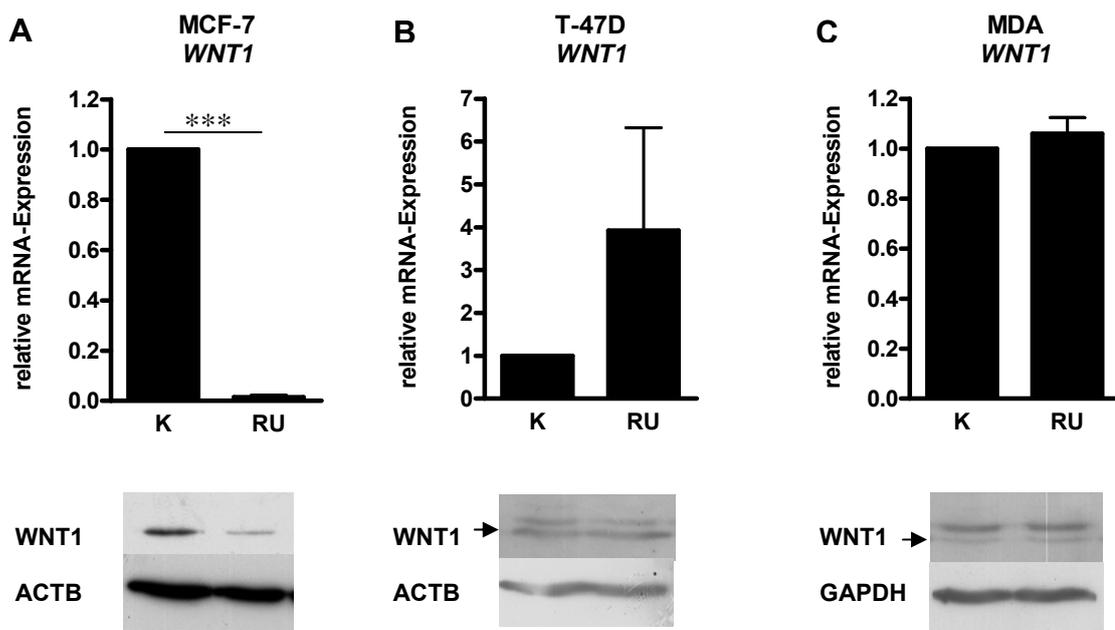


Abb. 4.2.2 Effekte von RU-486 auf die Expression von WNT1 in den Brustkrebszelllinien. Die Zellen wurden in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend für 72 h mit RU-486 (10^{-5} M) behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der WNT1-Expression mittels *real-time PCR* und *Western Blot* (A-C). In (A) MCF-7-Zellen hemmte RU-486 signifikant die WNT1-Expression. Im Gegensatz dazu erfolgte keine signifikante Änderung der WNT1-Expression in (B) T-47D und (C) MDA-MB-231-Zellen. N=3, *** $p < 0,001$, ACTB – β -Aktin, FKS – fötales Kälberserum, GAPDH – Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase, K – Kontrolle, MDA – MDA-MB-231, WNT1 – *wingless-type MMTV integration site family member 1*.

4.2.3 Analyse des WNT1 *downstream targets* Cyclin D1

Um die WNT1-Expression in den Brustkrebszelllinien zu validieren, wurde zusätzlich die Genexpression des *downstream targets* Cyclin D1 (CCND1) analysiert. Dabei zeigte sich, dass es ausschließlich in MCF-7-Zellen zu einer signifikanten Hemmung von Cyclin D1 (-48 %, $p < 0,001$) kam, nicht jedoch in T-47D und MDA-MB-231-Zellen (Abb.4.2.3).

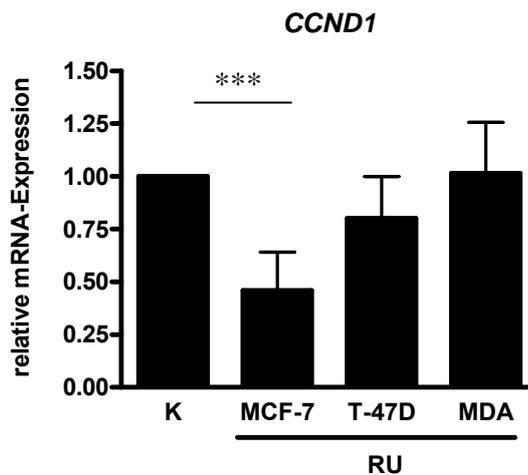


Abb. 4.2.3 Analyse des WNT1 *downstream targets* CCND1. In demselben Probenatz wie unter 4.2.2 erfolgte die Analyse des WNT1 *downstream targets* CCND1 mittels *real-time* PCR. Eine signifikante Hemmung der Genexpression erfolgte ausschließlich in MCF-7-Zellen. N=4, *** $p < 0,001$, CCND1 – Cyclin D1, K – Kontrolle, MDA – MDA-MB-231, RU – RU-486, WNT1 – *wingless-type MMTV integration site family member 1*.

4.2.4 WNT1-Expression und Sensitivität der Brustkrebszelllinien

Aufgrund der drastischen Hemmung des Protoonkogens WNT1 in den MCF-7-Zellen durch RU-486 folgte eine detaillierte Untersuchung dieses Effekts. Dazu wurde die basale Expression von WNT1 sowie die Bedeutung von WNT1 als Überlebensfaktor für die Brustkrebszelllinien untersucht.

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte eine WNT1-Expression in allen drei Brustkrebszelllinien detektiert werden (Abb. 4.2.4 A). Die höchste Expression des Protoonkogens zeigte sich bei den MCF-7-Zellen, gefolgt von den T-47D. Die MDA-MB-231-Zellen wiesen die niedrigste Expression von WNT1 auf.

Um die Rolle von WNT1 als Überlebensfaktor für die Brustkrebszellen zu definieren, wurden alle drei Zelllinien mit 1,5 µg/ml rekombinanten WNT1 für 72 h behandelt und anschließend deren Zellvitalität analysiert (Abb. 4.2.4 B). Eine signifikant gesteigerte Vitalität konnte bei den MCF-7-Zellen ($p < 0,001$) nach WNT1-Behandlung detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den MDA-MB-231-Zellen eine signifikant verminderte Zellvitalität nach WNT1-Exposition um 7 % ($p < 0,01$). In den T-47D-Zellen wurde keine veränderte Zellvitalität nachgewiesen.

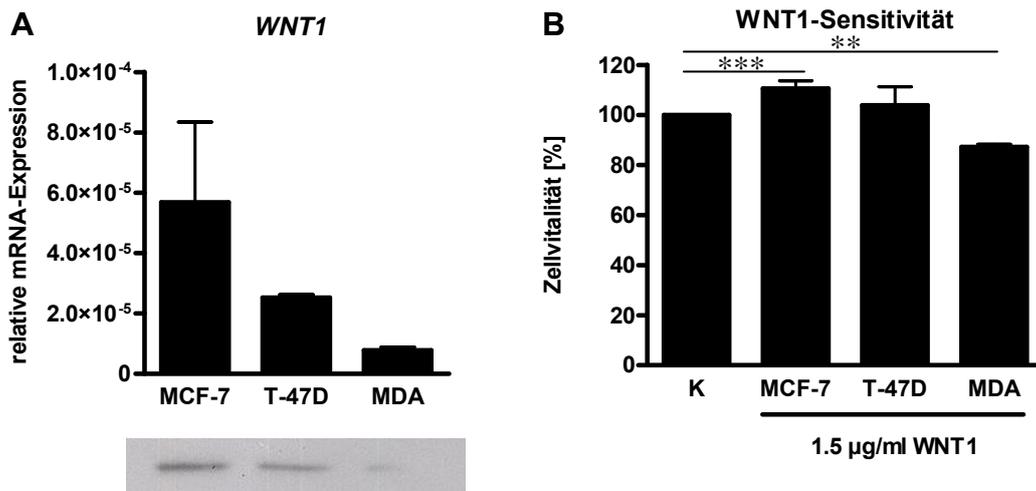


Abb. 4.2.4 WNT1-Status und WNT1-Sensitivität der Brustkrebszelllinien. Die basale Expression von WNT1 wurde in den Brustkrebszellen sowohl auf (A) mRNA-Ebene (*real-time* PCR) als auch auf Proteinebene (*Western Blot*) analysiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Medium mit 10% FKS. Alle drei Zelllinien exprimierten das Protoonkogen wobei die MCF-7-Zellen die höchsten und MDA-MB-231-Zellen die niedrigsten Level aufwiesen. Für die Untersuchung der (B) Zellvitalität (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, Promega) wurden die Zellen in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend für 72 h mit 1,5 µg/ml rekombinanten WNT1 behandelt. MCF-7-Zellen zeigten eine gesteigerte Vitalität wohingegen in MDA-MB-231-Zellen ein gegenteiliger Effekt detektiert wurde. T-47D-Zellen zeigten keine veränderte Vitalität nach WNT1-Exposition. N=5, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, MDA-MDA-MB-231, WNT1 – *wingless-type MMTV integration site family member 1*.

4.2.5 WNT1 blockiert partiell die RU-486-abhängige Hemmung der Zellvitalität in MCF-7-Zellen

Da die WNT1-Expression in MCF-7-Zellen nach RU-486-Behandlung so deutlich gehemmt wurde, erfolgten anschließend *rescue* Experimente. Dabei sollte überprüft werden, ob die RU-486-abhängige Hemmung der Zellvitalität auf die verminderte

Expression des Protoonkogens WNT1 zurückzuführen ist. Dazu wurden die RU-486-sensitiven Zelllinien MCF-7 und T-47D mit RU-486 (10^{-5} M) allein oder in Kombination mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantem WNT1 für 72 h behandelt.

Der hemmende Effekt von RU-486 auf die Zellvitalität konnte in MCF-7-Zellen durch die Zugabe von rekombinantem WNT1 um 23% ($p < 0,05$) verhindert werden (Abb. 4.2.5 A). In T-47D-Zellen konnten hingegen die Effekte von RU-486 durch Zugabe von rekombinantem WNT1 nicht blockiert werden (Abb. 4.2.5 B)

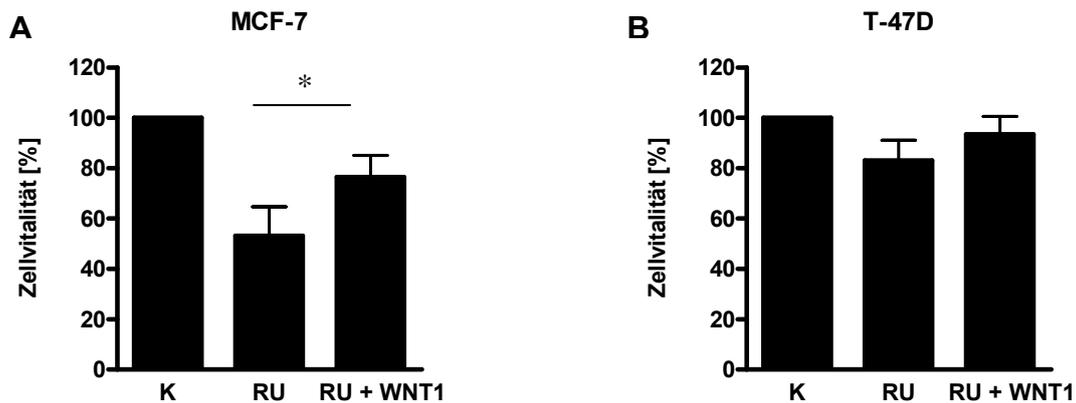


Abb. 4.2.5 WNT1 blockiert partiell die RU-486-abhängige Hemmung der Zellvitalität in MCF-7-Zellen. Die RU-486-sensitiven Zelllinien MCF-7 und T-47D wurden in FKS-freiem Medium kultiviert und mit RU-486 (10^{-5} M) allein oder in Kombination mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantem WNT1 behandelt. Anschließend wurde mittels CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) die Zellvitalität bestimmt. In (A) MCF-7-Zellen konnten die inhibitorischen Effekte von RU-486 durch die Zugabe von WNT1 partiell gehemmt werden. Die kombinierte Behandlung von RU-486 und rekombinanten WNT1 hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die (B) Zellvitalität in T-47D-Zellen im Vergleich zur RU-486-Behandlung. N=4, * $p < 0,05$, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486, WNT1 – *wingless-type MMTV integration site family member 1*.

4.2.6 RU-486 induziert in MCF-7- und T-47D-Zellen Apoptose

Da die RU-486-abhängigen Effekte auf die Zellvitalität in MCF-7-Zellen nur partiell und in T-47D-Zellen nicht gehemmt werden konnten, erfolgte die Analyse der Apoptose mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} von Roche.

Die Zellen wurden dafür in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend für 72 h mit RU-486 (10^{-5} M) allein oder in Kombination mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinanten WNT1 behandelt. In MCF-7-Zellen stieg nach RU-486-Behandlung die Apoptose signifikant ($p < 0,01$) auf das 1,76-fache an (Abb. 4.2.6 A). Auch in T-47D-Zellen erfolgte durch RU-

486 eine signifikante Induktion der Apoptose ($p < 0,01$) um 46 % (Abb. 4.2.6 B). Durch Zugabe von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantem WNT1 konnte weder in MCF-7- noch in T-47D-Zellen die Induktion der Apoptose gehemmt werden.

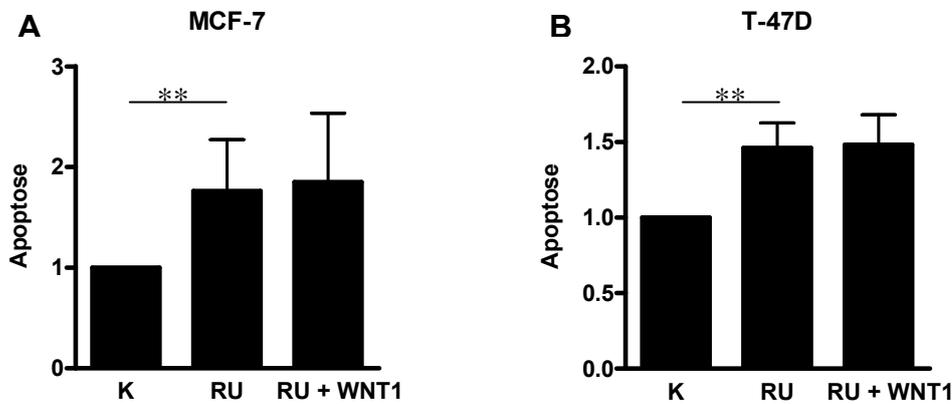


Abb. 4.2.6 RU-486 induziert in MCF-7- und T-47D-Zellen Apoptose. MCF-7 und T-47D-Zellen wurden in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend für 72 h mit RU-486 (10^{-5} M) allein oder in Kombination mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantem WNT1 behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptose mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} von Roche. RU-486 induziert sowohl in (A) MCF-7- als auch (B) T-47D-Zellen signifikant die Apoptose wobei diese durch Zugabe von rekombinantem WNT1 nicht gehemmt werden konnte. N=5, ** $p < 0,01$, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486, WNT1 – *wingless-type MMTV integration site family member 1*.

4.2.7 RU-486 moduliert die Expression der Steroidhormonrezeptoren in MCF-7-Zellen

Um zu klären, über welchen Steroidrezeptor die RU-486-abhängige Hemmung der WNT1-Expression in MCF-7-Zellen erfolgte, wurden die Expressionen des Progesteron- und des Glukokortikoidrezeptors nach RU-486-Behandlung (72 h, 10^{-5} M) untersucht. Die Analyse erfolgte auf mRNA-Ebene mittels *real-time* PCR (Abb. 4.2.7 A) und auf Proteinebene mittels *Western Blot* (Abb. 4.2.7 B). Die Expression des Progesteronrezeptors wurde durch RU-486 um 41% ($p < 0,001$) gehemmt, wohingegen der Glukokortikoidrezeptor auf das 4-fache ($p < 0,01$) aufreguliert wurde. Zur Bestätigung dieser Daten wurde zusätzlich entweder der Glukokortikoid- oder der Progesteronrezeptor mittels siRNA in seiner Expression gehemmt. Anschließend wurden die Zellen mit RU-486 behandelt und die WNT1-Expression analysiert. Da die Kombination von *knock-down* der Steroidhormonrezeptoren und RU-486-Behandlung zu einer Regulation

bekannter etablierter *housekeeping genes* führte, konnten diese Daten für die Klärung dieses Sachverhaltes nicht herangezogen werden (Daten im Anhang 8.2.2 A-C).

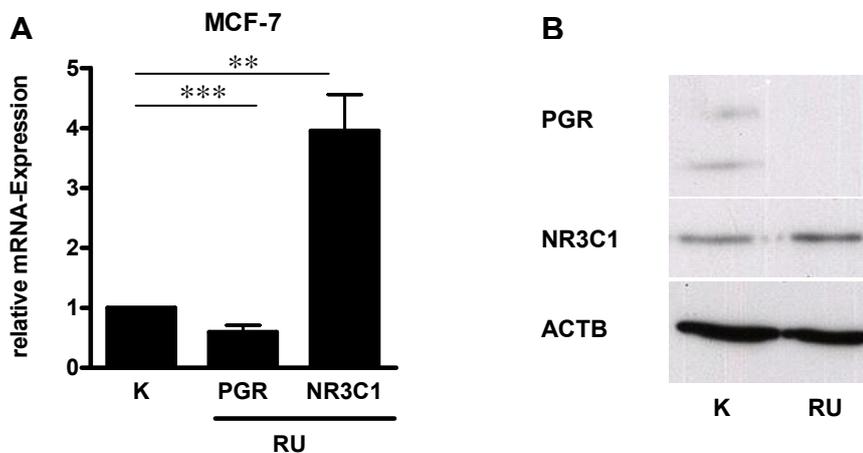


Abb. 4.2.7 RU-486 moduliert die Expression der Steroidhormonrezeptoren in MCF-7-Zellen. Die Expression der Steroidhormonrezeptoren PGR und NR3C1 wurde in MCF-7-Zellen nach 72-stündiger RU-486-Behandlung (10^{-5} M) analysiert. (A) In der Brustkrebszelllinie zeigte sich eine signifikante Hemmung ($p < 0,001$) der PGR-mRNA. Im Gegensatz dazu erfolgte eine signifikante Aufregulation des NR3C1 ($p < 0,01$). Die Analyse der (B) Proteinlevel bestätigten die mRNA-Daten. $N=4$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, ACTB – β -Aktin, K – Kontrolle, NR3C1 – Glukokortikoidrezeptor- α , PGR – Progesteronrezeptor, RU – RU-486.

4.2.8 Dexamethason hemmt die WNT1-Expression in MCF-7-Zellen.

Da sowohl die Expression des Progesteron- als auch des Glukokortikoidrezeptors durch RU-486 moduliert wurde, erfolgte zusätzlich die Behandlung der MCF-7-Zellen mit dem spezifischen Glukokortikoidrezeptor-Liganden Dexamethason (10^{-6} M) für 72 h (Abb. 4.2.8 A-B). Die anschließende Analyse der WNT1-Expression ergab, dass das Protoonkogen durch Dexamethason auf mRNA-Ebene signifikant um 47% ($p < 0,001$) gehemmt wurde (Abb. 4.2.8 A). Auch im *Western Blot* (Abb. 4.2.8 B) zeigte sich eine verminderte WNT1-Expression nach Behandlung mit Dexamethason. Die Kombination von Dexamethason (10^{-6} M) und RU-486 (10^{-5} M) zeigte eine ähnlich starke Hemmung der WNT1-Expression (-98%, $p < 0,001$) wie die alleinige RU-486-Behandlung.

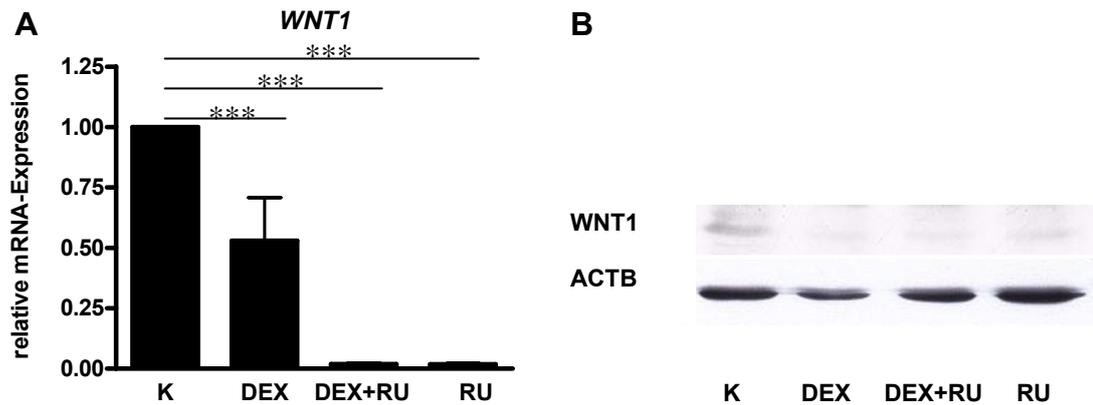


Abb. 4.2.8 Dexamethason hemmt die WNT1-Expression in MCF-7-Zellen. MCF-7-Zellen wurden in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend mit DEX (10^{-6} M) und/oder RU-486 (10^{-5} M) für 72 h behandelt. Anschließend wurde mittels **(A)** *real-time* PCR und **(B)** *Western Blot* die WNT1-Expression analysiert. Beide Substanzen führten zu einer signifikanten Hemmung der WNT1-Expression wobei die Effekte bei RU-486 stärker waren. N=3, *** $p < 0,001$, ACTB – β -Aktin, DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486, WNT1 – *wingless-type MMTV integration site family member 1*.

4.3 Syndecan-1-Expression, Regulation und Funktion in Brustkrebszellen

4.3.1 Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231

Zu Beginn dieses Projekts wurde als erstes die basale Expression von Syndecan-1 in den drei Mammakarzinomzelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231 analysiert (Abb. 4.3.1 A-B).

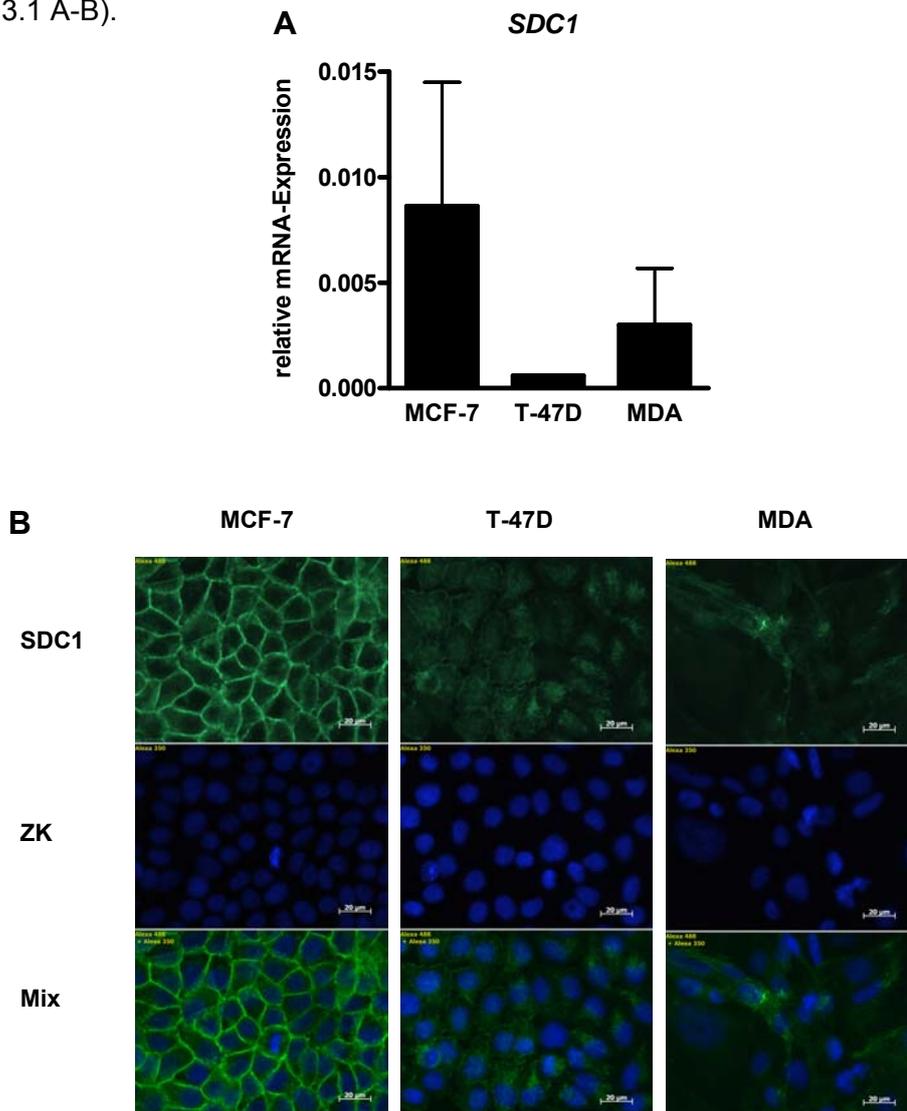


Abb. 4.3.1 Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien. Analysen der SDC1-Expression der Brustkrebszelllinien auf (A) mRNA-Ebene mittels *real-time* PCR und (B) Proteinebene mittels Immunfluoreszenz. Alle drei Zelllinien exprimierten SDC1 wobei MCF-7-Zellen das höchste Expressionslevel aufwiesen. Die Lokalisation des Proteoglykans ist zellmembranständig (MCF-7) oder zytoplasmatisch (T-47D, MDA-MB-231). N=3, MDA-MB-231, SDC1 – Syndecan-1, ZK – Zellkern, Vergrößerung 40 x.

Die höchste Expression an Syndecan-1 wies die MCF-7-Zelllinie auf wobei das Protein hauptsächlich an der Zellmembran lokalisiert war. Im Gegensatz dazu exprimierten T-47D- und MDA-MB-231-Zellen weniger Syndecan-1, welches sich vor allem im Zytoplasma befand.

4.3.2 Syndecan-1-Regulation in MCF-7-Zellen

Die Rolle von Syndecan-1 beim Brustkrebs ist derzeit noch nicht vollständig geklärt und über die Regulation dieses Proteins beim Brustkrebs nur wenig bekannt [65]. Aufgrund dessen wurden die Zellen mit verschiedenen, für die Therapie des Mammakarzinoms relevanten Substanzen wie Zoledronsäure, Dexamethason und einem Aromataseinhibitor behandelt um anschließend die Expression von Syndecan-1 zu analysieren. Von diesen Substanzen zeigte Dexamethason ausschließlich in MCF-7-Zellen deutliche Effekte auf die Syndecan-1-Regulation, was nachfolgend ausführlicher dargestellt wird. Die Behandlungen mit Zoledronsäure und dem Aromataseinhibitor hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation des Proteoglykans. Die Daten zu diesen Behandlungen sind im Anhang unter 8.3.1 A-D aufgeführt.

In MCF-7-Zellen wurde die Syndecan-1-Expression nach Dexamethason-Behandlung sowohl zeit- als auch dosisabhängig signifikant induziert ($p < 0,01$, Abb. 4.3.2 A-B). Dieser Effekt konnte durch Zugabe des Rezeptorantagonisten RU-486 signifikant gehemmt ($p < 0,05$, Abb. 4.3.2 C) werden.

In einer Studie wurden bereits die gegensätzlichen Wirkungen von löslichem und membranständigen Syndecan-1 auf die Proliferation und Invasivität der Brustkrebszelllinie MCF-7 näher analysiert [64]. Daher folgte eine detaillierte Untersuchung, welche der beiden Formen durch Dexamethason verstärkt exprimiert wird.

Mittels Immunfluoreszenz wurde die membranständige Form von Syndecan-1 in MCF-7-Zellen nachgewiesen. Dexamethason-behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen ein stärkeres Signal für Syndecan-1 an der Membran (Abb. 4.3.2 E). Die gleichzeitige Behandlung der MCF-7-Zellen mit Dexamethason und RU-486 führte zu einer deutlich geringeren Intensität des Syndecan-1-Signals im Vergleich zu den Dexamethason-behandelten Zellen. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Syndecan-1 bei der Ko-Behandlung und bei der ausschließlichen RU-486-Behandlung vor allem intrazellulär lokalisiert war. Auffällig war dabei das punktförmige Muster der Syndecan-1-Färbung. Bei der Analyse der löslichen Syndecan-1-Form mittels ELISA (Abb.4.3.2 D) konnte keine signifikante Regulation des Proteins durch Dexamethason detektiert werden.

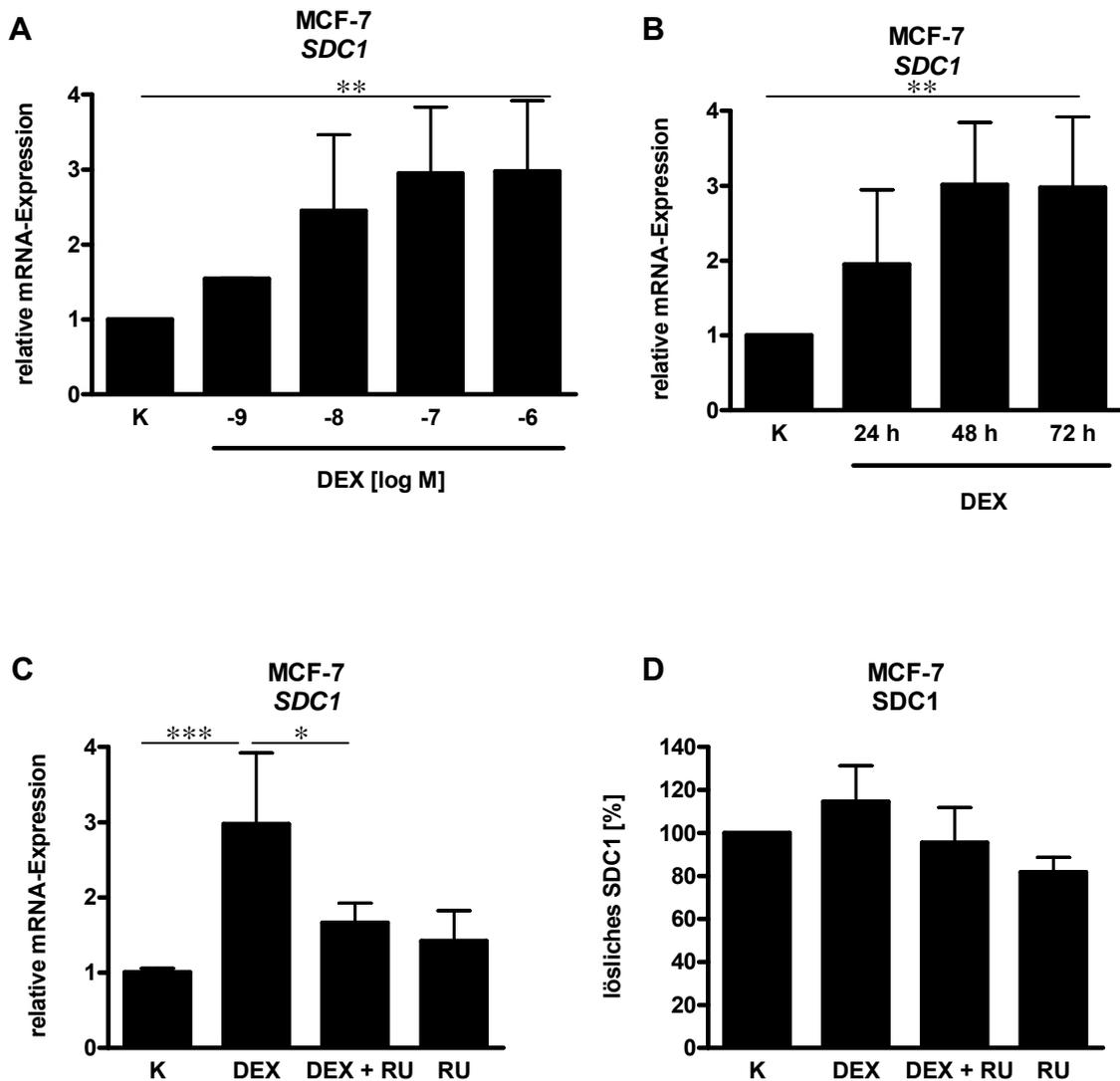


Abb. 4.3.2 A-D Dexamethason-abhängige Regulation von Syndecan-1 in MCF-7-Zellen. MCF-7-Zellen wurden in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend mit (A) verschiedenen Dosen von DEX oder mit (B) DEX 10⁻⁶ M für 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der SDC1-mRNA-Expression mittels *real-time* PCR. DEX steigerte sowohl dosis- als auch zeitabhängig die SDC1-mRNA-Expression in MCF-7-Zellen. Zur Hemmung der DEX-Effekte wurden die Zellen mit (C) DEX (10⁻⁶ M) und dem Rezeptorantagonist RU-486 (10⁻⁵ M) gleichzeitig behandelt. RU-486 konnte die DEX-abhängige Stimulation von SDC1 in MCF-7-Zellen signifikant hemmen. Für die Analyse der (D) löslichen Form des SDC1 wurden die Zellkulturüberstände der einzelnen Behandlungen mittels SDC1-ELISA analysiert. Dabei zeigte sich keine signifikante Änderung von SDC1 durch die DEX-Behandlung. N=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486, SDC1 – Syndecan-1.

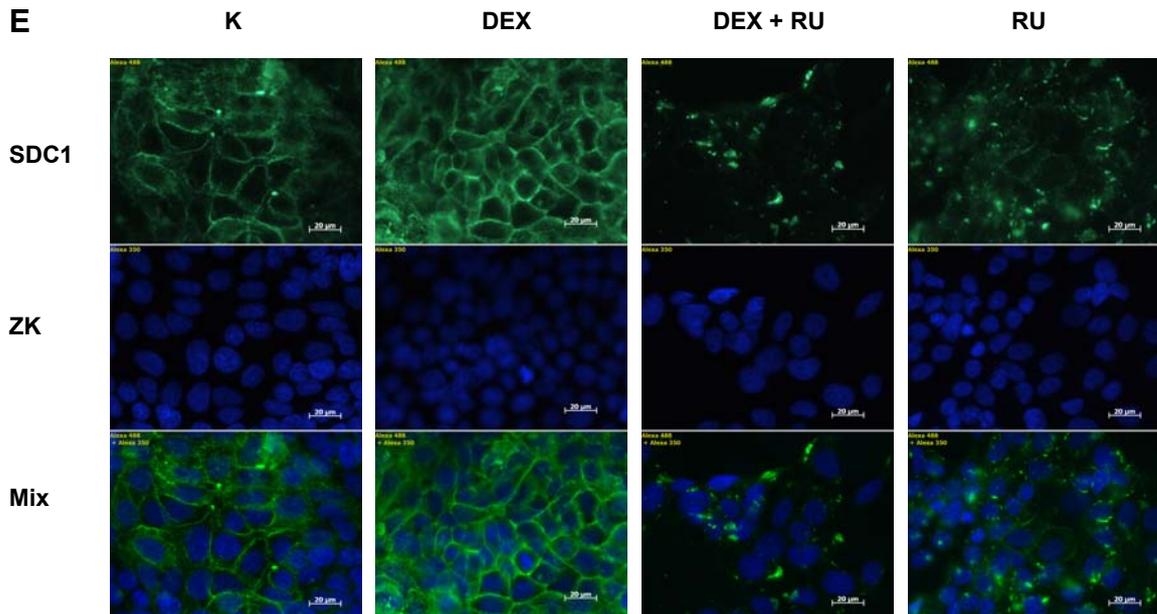


Abb. 4.3.2 E Dexamethason-abhängige Regulation von Syndecan-1 in MCF-7-Zellen.

Die MCF-7-Zellen wurden in FKS-freiem Medium auf Deckgläschen kultiviert und anschließend für 72 h mit DEX (10^{-6} M) und/ oder RU-486 (10^{-5} M) behandelt. Die Analyse des membranständigen SDC1 erfolgte anschließend mittels Immunfluoreszenz. DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486, SDC1 – Syndecan-1, ZK – Zellkern, Vergrößerung 40 x.

In T-47D-Zellen und MDA-231-Zellen hatte Dexamethason keinen relevanten Einfluss auf die Syndecan-1-Regulation (siehe Anhang 8.3.2 A-E), weshalb die nachfolgenden Experimente hauptsächlich mit der MCF-7-Zelllinie durchgeführt wurden.

4.3.3 Regulation der mRNA-Expression Matrix-modulierender und Zell-Zell-Kontakt-vermittelnder Proteine in MCF-7-Zellen

Wie in einer Studie bereits gezeigt, vermag Syndecan-1 die Expression Matrix-modulierender Proteine wie Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor (PLAUR, Abb. 4.3.3 A-B) und *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (TIMP1, Abb. 4.3.3 C-D) sowie das Zell-Zell-Kontakte-vermittelnde E-Cadherin (Abb. 4.3.3 G-H), in ihrer Expression zu beeinflussen [64]. Aufgrund der Dexamethason-abhängigen Regulation von Syndecan-1 wurde die Expression dieser Proteine in denselben Probensätzen wie unter 4.3.2 hinsichtlich einer Regulation untersucht. Ferner wurde die Expression der Heparanase (Abb. 4.3.3 E-F) untersucht, welche durch Degradierung von Syndecan-1 zur Freisetzung kürzerer Oligosaccharide führt. Dies wiederum fördert die Freisetzung von

Wachstumsfaktoren [57]. Die mRNA-Analyse dieser Proteine sollte weitere Hinweise auf die funktionelle Relevanz der Dexamethason-abhängigen Syndecan-1-Regulation liefern.

Nach 24-stündiger Behandlung mit Dexamethason kam es sowohl zu einer gesteigerten Expression des Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptors (1,5-fache) als auch von *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (1,57-fache). Bei einer längeren Dexamethason-Exposition nahm dieser Effekt ab und nach 72 Stunden zeigte sich eine Verringerung der mRNA-Expression um 20 % bei dem Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor bzw. um 25 % bei dem *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (Abb. 4.3.3 B, D). Durch den Rezeptorantagonisten RU-486 konnte bei Dexamethason-behandelten MCF-7-Zellen nur die verminderte Expression des *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* gehemmt werden (Abb. 4.3.3 C). Bei Analysen der Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor-mRNA hingegen kam es zu einer weiteren Verminderung der Expression, bei der gleichzeitigen Behandlung mit Dexamethason und RU-486 ($p < 0,05$) im Vergleich zur alleinigen Dexamethason-Behandlung (Abb. 4.3.3 A). Die alleinige Behandlung mit RU-486 zeigte eine deutliche Hemmung der mRNA-Expression (-45 %, $p < 0,001$), die im Ausmaß ähnlich der Ko-Behandlung war (Abb. 4.3.3 A).

Nach 72-stündiger Behandlung der MCF-7-Zellen mit Dexamethason wurde die Expression der Heparanase-mRNA um 22 % ($p < 0,01$) gehemmt (Abb. 4.3.3 F). Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von RU-486 nicht aufgehoben werden. Im Gegenteil, die Behandlung mit dem Rezeptorantagonisten führte zu einer weiteren signifikanten Reduktion der mRNA-Expression im Vergleich zur Dexamethason-Behandlung ($p < 0,05$). Die Behandlung mit RU-486 zeigte eine drastische Hemmung der Heparanase-mRNA-Expression wobei es zu einer Hemmung von 57 % ($p < 0,001$) kam (Abb. 4.3.3 E-F).

Die Analyse von E-Cadherin ergab, dass die Expression der mRNA erst nach 72 Stunden um 28 % ($p < 0,001$, Abb. 4.3.3 H) gehemmt wurde. Dieser Effekt konnte durch RU-486 wieder aufgehoben werden ($p < 0,001$) wobei die Expression der mRNA auf das 1,38-fache anstieg (Abb. 4.3.3 G).

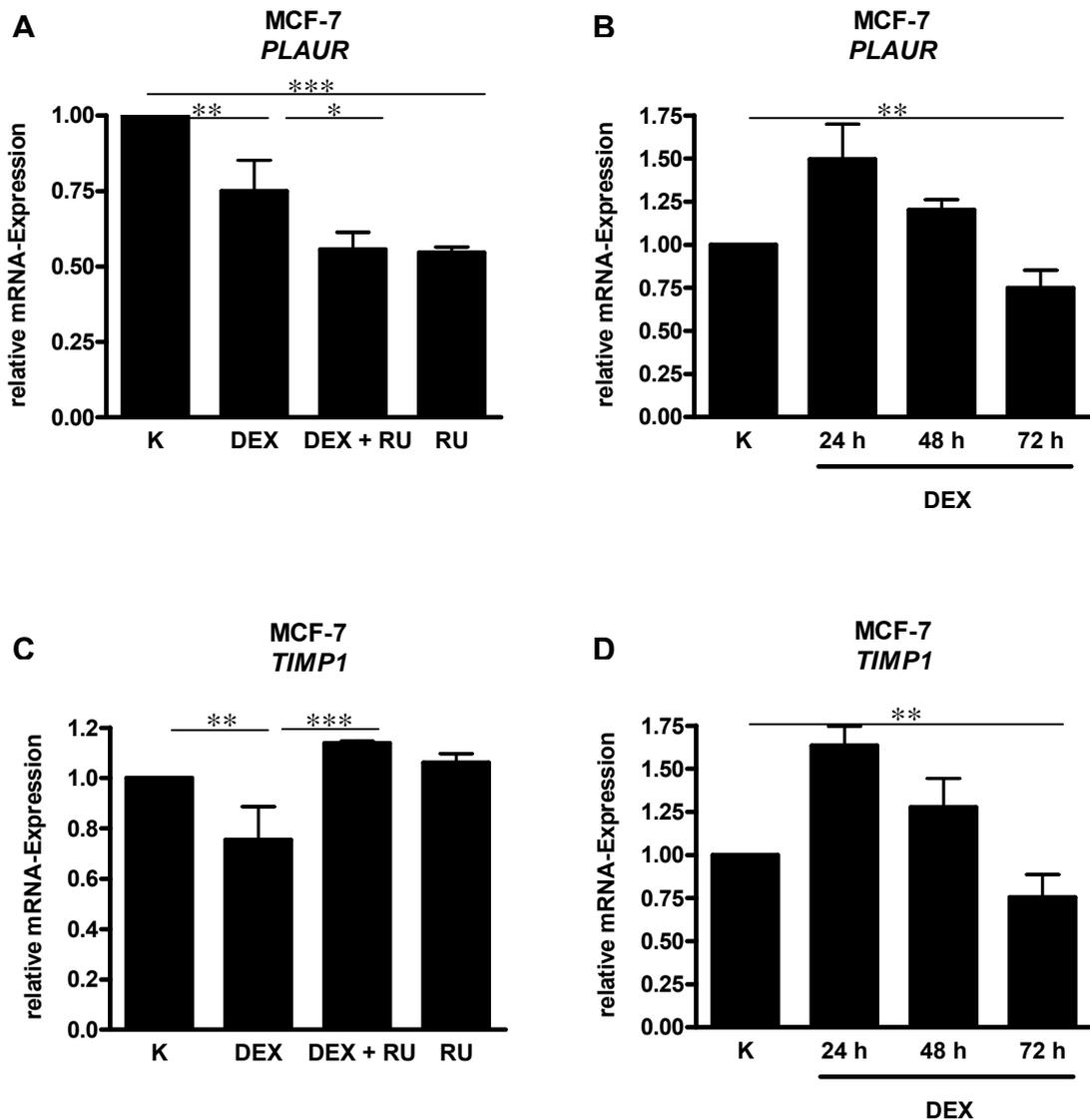


Abb. 4.3.3 A-D Analyse der mRNA-Expression Matrix-modulierenden Proteine *PLAUR* und *TIMP1* in MCF-7-Zellen. MCF-7-Zellen wurden in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend für 24, 48 und 72 h mit DEX (10^{-6} M) und/ oder RU-486 (10^{-5} M) behandelt. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels *real-time* PCR. Sowohl die Expression von (A-B) *PLAUR* als auch (C-D) *TIMP1* stieg nach 24-stündiger Dexamethason-Behandlung an und wurde nach längerer Exposition (72 h) gehemmt. Die gleichzeitige Behandlung der MCF-7-Zellen mit DEX und RU-486 für 72 h konnte ausschließlich die Hemmung der *TIMP1*-mRNA-Expression wieder aufheben, nicht jedoch die von *PLAUR*. N=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, *PLAUR* – Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor, RU – RU-486, *TIMP1* – *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1*.

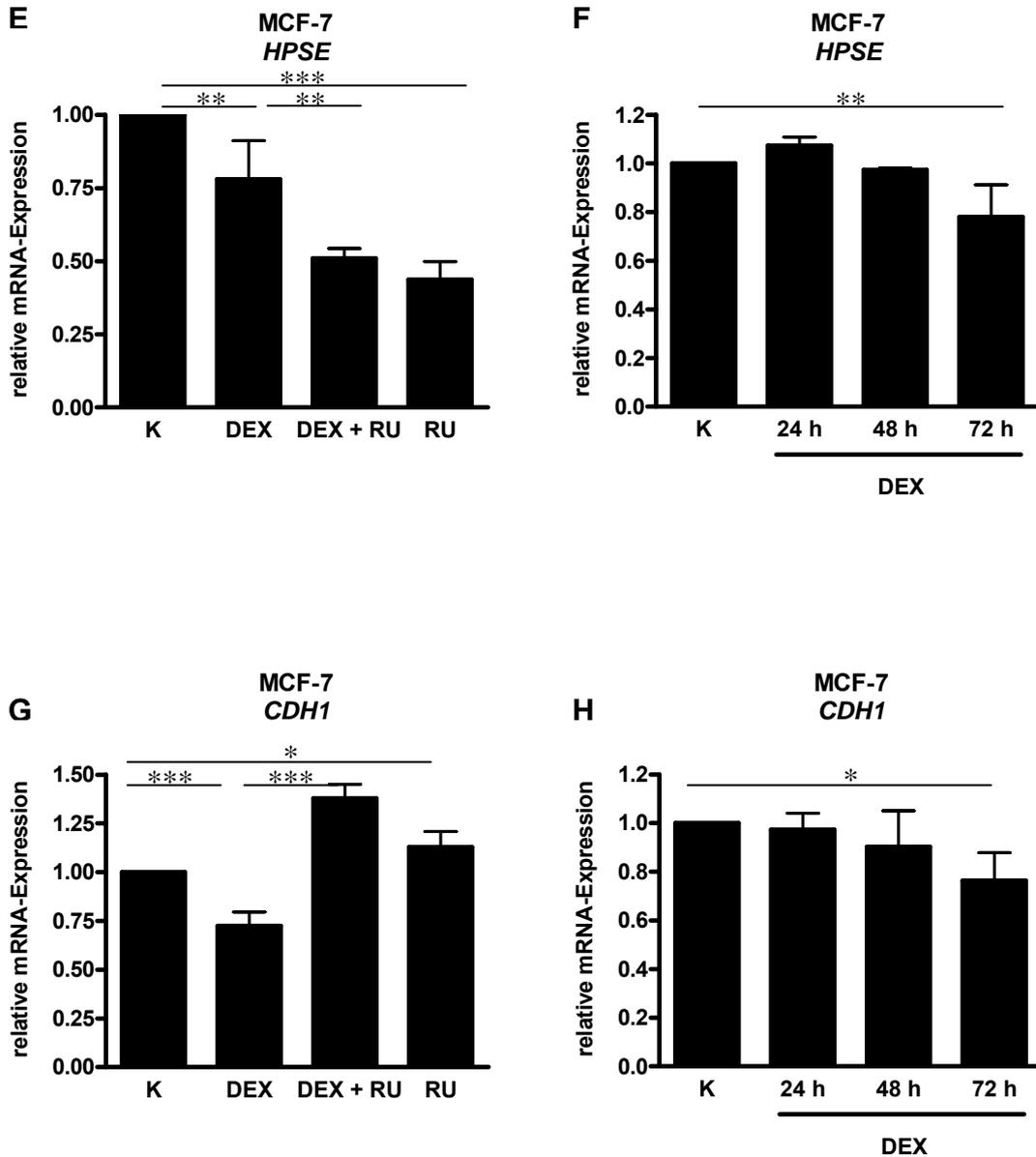


Abb. 4.3.3 E-H Analyse von *HPSE* und *CDH* in MCF-7-Zellen. MCF-7-Zellen wurden in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend für 24, 48 und 72 h mit DEX (10^{-6} M) und/ oder RU-486 (10^{-5} M) behandelt. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels *real-time* PCR. Sowohl die Expression der (E-F) Heparanase- als auch der (G-H) *CDH1*-mRNA wurde nach 72-stündiger Behandlung mit Dexamethason signifikant gehemmt. Im Gegensatz zur Heparanase konnte dieser Effekt bei E-Cadherin durch Zugabe des Rezeptorantagonisten RU-486 wieder aufgehoben werden. N=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, CDH – E-Cadherin, DEX – Dexamethason, FKS – Fötales Kälberserum, HPSE – Heparanase, K – Kontrolle, RU – RU-486.

4.3.4 Funktionelle Relevanz der Dexamethason-abhängigen Syndecan-1-Regulation in MCF-7-Zellen

Als nächstes stellte sich die Frage nach der funktionellen Relevanz der Dexamethason-abhängigen Induktion der Syndecan-1-Expression. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Originaldaten können dem Anhang entnommen werden (8.3.3 A-E) Erste Hinweise zur funktionellen Relevanz lieferten die Analysen der Syndecan-1-Formen (4.3.2). Da verstärkt membranständiges Syndecan-1 exprimiert wurde, was laut Nikolova et al. [64] die Proliferation der Zellen fördern soll, wurde als erstes die Vitalität der Zellen nach 72-stündiger Dexamethason-Behandlung untersucht. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Vitalität der MCF-7-Zellen um 11 % gehemmt wurde. Eine gleichzeitige Behandlung mit Dexamethason und RU-486 bewirkte eine weitere Hemmung der Vitalität der Zellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nachfolgend untersucht, inwieweit die Behandlung mit Dexamethason und/ oder RU-486 die Apoptose der Zellen beeinflusst. Nach 72-stündiger Dexamethason-Behandlung kam es zu einer geringfügigen Hemmung der Apoptose. Durch die Zugabe des Rezeptorantagonisten RU-486 (10^{-5} M) wurde die Apoptoserate signifikant auf das 1,86-fache erhöht.

Tabelle 4 Funktionelle Relevanz der Dexamethason-abhängigen Syndecan-1-Regulation in MCF-7-Zellen. Die Ergebnisse der funktionellen Analysen wurden in der Tabelle kurz zusammengefasst. Die Originaldaten können dem Anhang entnommen werden. Die Pfeile zeigen eine signifikante Hemmung (\downarrow), eine Steigerung (\uparrow) bzw. keine Veränderung (\rightarrow) der einzelnen Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle. Folgendes Zeichen „/“ verweist darauf, dass keine zuverlässigen Aussagen bezüglich der Ergebnisse getroffen werden konnten.

	DEX	DEX + RU	n	Originaldaten im Anhang/ Bemerkung
Vitalität (CellTiter-Blue® Assay)	\downarrow	$\downarrow\downarrow$	4	Anhang 8.3.3 A
Apoptose (Caspase-Glo® 3/7 Assay)	\downarrow	$\uparrow\uparrow$	4	Anhang 8.3.3 B
Invasion (HTS FluoroBlok™ System)	/	/	6	Anhang 8.3.3 C Assay für MCF-7 nicht geeignet
Migration	\rightarrow	\rightarrow	4	Anhang 8.3.3 D-E

Nachdem die Effekte bei der Dexamethason-Behandlung bezüglich der Vitalität und der Apoptose der Zellen so gering waren, wurden nachfolgend die Migration und Invasion der Zellen näher untersucht. Diese Analysen erbrachten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen. Der Invasionsassay wurde insgesamt sechs Mal nach standardisiertem Protokoll durchgeführt. Jedoch schien dieser Assay für MCF-7-Zellen ungeeignet, da bei verschiedenen Versuchen die Leerwerte im Vergleich zu den Behandlungen höher waren.

4.3.5 Relevanz von Syndecan-1 für die Vitalität der MCF-7-Zellen

Da die Ergebnisse zur funktionellen Relevanz der Dexamethason-abhängigen Induktion der Syndecan-1-Expression mittels verschiedener Assays zu keinem eindeutigen Ergebnis führten, sollte die Relevanz von Syndecan-1 für die Vitalität der MCF-7-Zelllinie näher untersucht werden. Dazu wurde mittels siRNA die Expression von Syndecan-1 um circa 70 % gehemmt (Abb. 4.3.5 A, Immunfluoreszenz im Anhang 8.3.4), woran sich die Analyse der Zellvitalität anschloss. Dabei zeigte sich, dass die Vitalität der MCF-7-Zellen signifikant gehemmt wurde (Abb. 4.3.5 B).

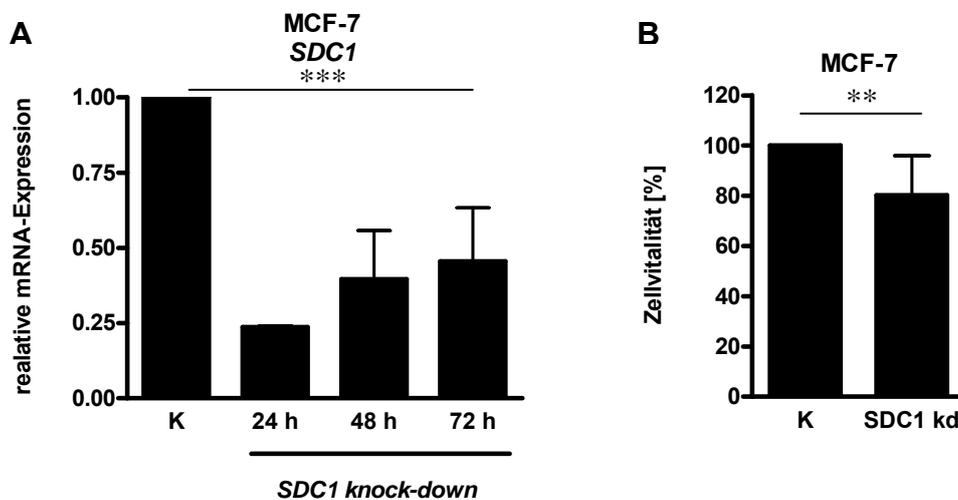


Abb. 4.3.5 A-B Syndecan-1 *knock-down* und dessen Einfluss auf die Vitalität der MCF-7-Zellen. Die (A) Expression von SDC1 wurde mittels Transfektion von siRNA in den MCF-7-Zellen gehemmt und anschließend die Auswirkung auf die (B) Vitalität der Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die die *SDC1*-Expression signifikant gehemmt werden konnte und dies zu einer signifikanten Hemmung der Vitalität der MCF-7-Zellen führte. N=6, **p<0,01, ***p<0,001, SDC1 – Syndecan-1, K – Kontrolle, kd – *knock-down*.

4.3.6 Interaktion von Syndecan-1 und Osteoprotegerin

Für das multiple Myelom wurde bereits die Interaktion der Proteine Syndecan-1 und Osteoprotegerin beschrieben. Dabei bindet Osteoprotegerin an die Heparansulfat-Seitenketten von Syndecan-1 und wird anschließend in den Myelomzellen internalisiert und degradiert [70]. Weitere Experimente sollten klären, ob in Brustkrebszellen ähnliche Mechanismen wirksam sind. Die Untersuchungen wurden vor allem in MCF-7-Zellen durchgeführt, da diese Zelllinie die höchste Syndecan-1-Expression aufwies und diese durch Dexamethason noch gesteigert werden konnte.

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Kolokalisation von Syndecan-1 (grün) und Osteoprotegerin (rot) untersucht (Abb. 4.3.6 A-C). In den Kontrollzellen (Abb. 4.3.6 A) war ein deutlich gelbes Signal (überlagertes Bild) an der Membran der MCF-7-Zellen zu detektieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Dexamethason-behandelten Zellen eine schwächere Färbung für Osteoprotegerin (rot) und bei dem überlagerten Bild ein eher grünes Signal (Abb. 4.3.6 B). Zellen die mit Dexamethason und RU-486 gleichzeitig behandelt wurden, wiesen eine höhere Signalstärke für Osteoprotegerin (rot) im Vergleich zu den Dexamethason-behandelten Zellen auf. Sowohl das Signal für Syndecan-1 als auch Osteoprotegerin war eher punktförmig und nicht wie in den Kontrollzellen an der Membran lokalisiert (Abb. 4.3.6 C).

Neben den Analysen zur Kolokalisation wurde zusätzlich untersucht ob sich diese Proteine auch auf transkriptioneller Ebene gegenseitig beeinflussen. Wie unter 4.3.5 beschrieben wurde die Syndecan-1-Expression in den MCF-7-Zellen mittels siRNA gehemmt. Anschließend wurde mittels *real-time* PCR und ELISA die Osteoprotegerin-Expression untersucht (4.3.6 D-E). Nach Syndecan-1 *knock-down* wurde eine signifikante Steigerung der Osteoprotegerin-mRNA auf das 2,6-fache ($p < 0,05$) ermittelt. Bei der Analyse der Proteinlevel zeigte sich ebenfalls eine signifikante Steigerung von Osteoprotegerin (1,7-fache, $p < 0,001$).

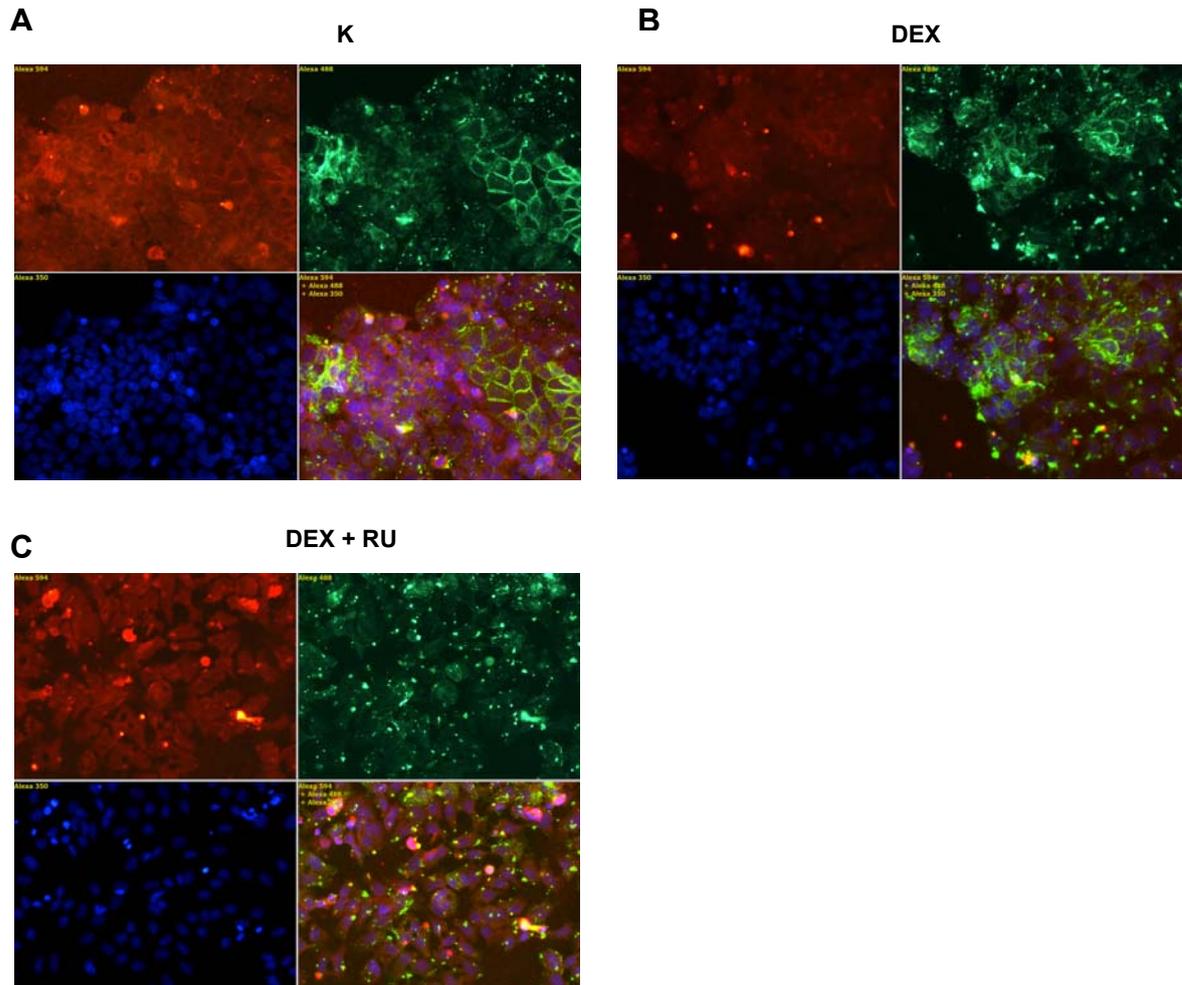


Abb. 4.3.6 A-C Kolokalisation von Syndecan-1 und Osteoprotegerin in MCF-7-Zellen.

Die MCF-7-Zellen wurden in FKS-freiem Medium auf Glasplättchen kultiviert und anschließend für 72 h mit **(A)** DEX (10^{-6} M), **(B)** DEX (10^{-6} M) + RU-486 (10^{-5} M) oder **(C)** RU-486 (10^{-5} M) behandelt. Die Analyse von SDC1 (grün) und OPG (rot) erfolgte anschließend mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. Die Kontrollzellen zeigten ein deutlich gelbes Signal an der Membran der MCF-7-Zellen (A). Bei Dexamethason-behandelten Zellen (B) war die Immunfluoreszenzfärbung für OPG (rot) schwächer und bei der Überlagerung von OPG und SDC1 war die Färbung im Vergleich zu den Kontrollzellen eher grün als gelb. Bei einer gleichzeitigen Behandlung mit Dexamethason und RU-486 zeigten die Zellen ein punktförmiges Muster für SDC1 (grün). Das Signal für OPG war im Vergleich zu den Dexamethason-behandelten Zellen auch wieder stärker (rot). DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, OPG – Osteoprotegerin, RU – RU-486, SDC1 – Syndecan-1, Vergrößerung 20 x.

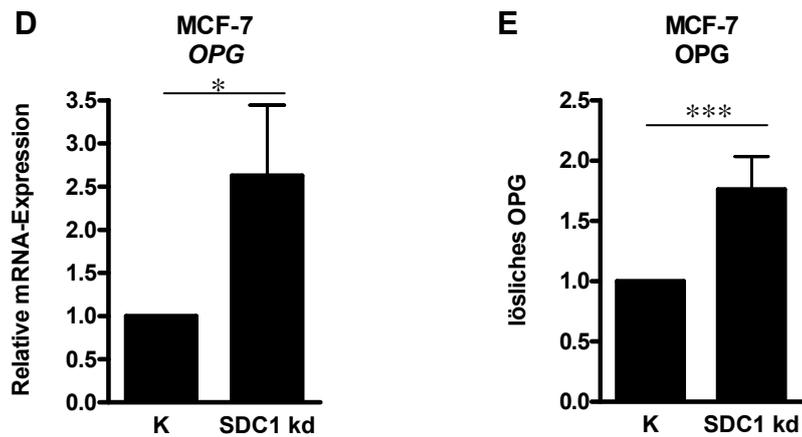


Abb. 4.3.6 D-E Osteoprotegerin-Expression in MCF-7-Zellen nach Syndecan-1 *knock-down*. In MCF-7-Zellen wurde die Expression von Syndecan-1 mittels siRNA gehemmt und die Zellen anschließend in FKS-freiem Medium kultiviert. Das Medium wurde für ca. 36 h konditioniert. Nachfolgend wurde die OPG-Expression in den Zellen auf (A) mRNA-Ebene mittels *real-time* PCR und im Zellkulturüberstand auf (B) Proteinebene mittels OPG-ELISA untersucht. Die Analyse ergab eine signifikante Steigerung der OPG-Expression nach Syndecan-1-*knock-down*. N=3, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, SDC1 – Syndecan-1, K – Kontrolle, kd – *knock-down*, OPG - Osteoprotegerin.

5 DISKUSSION

5.1 Einfluss von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges und dessen funktionelle Relevanz

Basierend auf neuen Erkenntnissen, dass sowohl Progesteron als auch Progestine die Tumorprogression beim Mammakarzinom fördern [18, 20, 21], rücken diese Substanzen als therapeutische Ziele in den Fokus der Forschung. In diesem Zusammenhang wurden bereits Antigestagene diskutiert, welche antitumorale Effekte besitzen [44-46]. In diesem Projekt sollten die Effekte von RU-486 auf den Wnt-Signalweg näher untersucht werden, da dieser in über 50% der Brustkrebsfälle aktiviert [33] und somit für diese Krebserkrankung von großer Bedeutung ist.

Die **Hypothese** lautete, dass RU-486 Proteine des Wnt-Signalweges moduliert und dadurch potenziell antitumorale Effekte auf Brustkrebszellen besitzt.

Um diese Hypothese zu testen, wurden drei verschiedene **Brustkrebszelllinien** verwandt, welche den duktaalen Phänotyp des Brustkrebses repräsentieren [85, 86]. Zwei der drei Zelllinien, MCF-7 und T-47D, exprimieren sowohl den Östrogenrezeptor als auch den Progesteronrezeptor. Für die dreifach negative Zelllinie MDA-MB-231 ist das Fehlen der Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors sowie des humanen epithelialen Wachstumsfaktors 2 charakteristisch. Diese Zelllinie exprimiert jedoch den Glukokortikoidrezeptor [85, 86]. Hinsichtlich der **Steroidhormonrezeptorexpression** wurden alle drei Zelllinien überprüft und die Angaben aus der Literatur konnten bestätigt werden. Aufgrund dessen wurde in diesem Projekt die Progesteronrezeptor-negative Zelllinie MDA-MB-231 als Negativkontrolle mitgeführt.

Als nächstes sollte untersucht werden, inwieweit **RU-486** die **Vitalität der Brustkrebszelllinien** beeinflusst. Wie bereits aus der Literatur bekannt [101, 102], hemmte das Antigestagen die Vitalität ausschließlich in den Progesteronrezeptor-positiven Zelllinien MCF-7 und T-47D. Vormals konnte bereits gezeigt werden, dass die Aufnahme von RU-486 in MDA-MB-231-Zellen um das 10-fache niedriger ist als in Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Brustkrebszelllinien. Aus diesem Befund schlussfolgerte die Arbeitsgruppe um Bardon, dass die Expression der beiden Steroidhormonrezeptoren für die zelluläre Antwort auf die RU-486-Behandlung notwendig ist [102]. Ferner hemmte RU-486 in niedrigeren Konzentrationen (10^{-7} – 10^{-6} M) die Vitalität der T-47D-Zellen im Vergleich zu den MCF-7 stärker. Dieser Effekt wurde bereits im Zusammenhang mit der unterschiedlich starken Expression des Progesteronrezeptors von Gill et al. diskutiert

[103]. Dabei soll die höhere Progesteronrezeptor-Expression in den T-47D-Zellen für die größere Sensitivität bei niedrigeren RU-486-Konzentrationen verantwortlich sein [103]. Die Analyse der basalen Expression dieses Rezeptors in den beiden Brustkrebszelllinien bestätigte die unterschiedlich hohen Expressionslevel des Steroidrezeptors.

Aufgrund der Verbindung zwischen Progesteron und dem Wnt-Signalweg [19, 32], erfolgte die Analyse der **Expression verschiedener Wnt-Signalmoleküle nach RU-486-Behandlung**.

Untersucht wurden die Wnt-Liganden WNT1, WNT5A, Inhibitoren des Wnt-Signalweges Dickkopf-1 und Sklerostin, sowie das WNT1 *downstream target* β -Catenin.

Der stärkste Effekt wurde in MCF-7-Zellen für das Protoonkogen **WNT1** detektiert, welches in seiner Expression durch RU-486 fast vollständig gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu hatte RU-486 keine Auswirkung auf die Expression dieses Protoonkogens in MDA-MB-231-Zellen. In T-47D-Zellen war die Analyse der Genexpression nach RU-486-Behandlung limitiert, da verschiedene etablierte *housekeeping genes* (ACTB, GAPDH, LDHA) reguliert waren. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass das Antigestagen die Proteinsynthese in dieser Zelllinie dosisabhängig hemmt [103], ein Prozess der wahrscheinlich für die Regulation der *housekeeping genes* verantwortlich ist. Um die WNT1-Regulation in den einzelnen Brustkrebszelllinien zu verifizieren, wurde in demselben Probensatz die mRNA-Expression des WNT1 *downstream targets* *Cyclin D1* analysiert. Ausschließlich in MCF-7-Zellen erfolgte die Hemmung der Cyclin D1-mRNA-Expression durch RU-486-Behandlung, was die WNT1-Daten untermauert und somit bekräftigt, dass WNT1 nur in MCF-7-Zellen durch RU-486 gehemmt wird.

Die starke Unterdrückung der WNT1-Expression in MCF-7-Zellen ist im Hinblick auf die Bedeutung des Wnt-Signalweges [33] von besonderem Interesse. Aus diesem Grund folgte eine detaillierte Untersuchung der RU-486-abhängigen Hemmung der WNT1-Expression in den MCF-7-Zellen.

Da in der Literatur unterschiedliche Angaben zur **WNT1-Expression in den Brustkrebszelllinien** MCF-7, T-47D und MDA-MB-231 existieren [35, 104], folgte die Überprüfung dieses Sachverhaltes. Für alle drei Zelllinien konnte die Expression des Protoonkogens nachgewiesen werden, wobei die WNT1-Spiegel variierten. Als nächster wichtiger Punkt wurde die **funktionelle Relevanz von WNT1 für die Brustkrebszelllinien** untersucht. Es stellte sich heraus, dass ausschließlich MCF-7, die Zellen mit der höchsten WNT1-Expression, mit einer gesteigerten Vitalität auf die WNT1-Exposition antworteten. Völlig gegensätzlich reagierte die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231. Eine Erklärung für diese Beobachtung liefert die Studie von Lustig und Kollegen.

Diese zeigte, dass MDA-MB-231-Zellen den negativen Wnt-Regulator AXIN2 exprimieren, welcher WNT1-abhängig aufreguliert wird und auf dessen Signal hin einen negativen *feedback-loop* initiiert. MCF-7-Zellen dagegen fehlt die Expression des Wnt-Regulators, wodurch eine Rückkopplung dieses Signalweges mittels AXIN2 nicht erfolgen kann [105]. Sowohl die Daten dieser Experimente als auch Ergebnisse früherer Studien weisen darauf hin, dass WNT1 nur für bestimmte Brustkrebszellen als autokriner bzw. parakriner Überlebensfaktor fungiert [35, 106, 107].

Um zu belegen, dass der **Vitalitäts-hemmende Effekt von RU-486** auf die stark verminderte WNT1-Expression zurückzuführen ist, wurden *rescue* Experimente in den RU-486-sensitiven Zelllinien durchgeführt. Ausschließlich in MCF-7-Zellen konnte durch Zugabe von rekombinantem WNT1 die Hemmung der Vitalität partiell aufgehoben werden, nicht jedoch in T-47D-Zellen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass RU-486 ausschließlich in MCF-7-Zellen durch Hemmung der WNT1-Expression die Vitalität beeinflusst. Überraschend war, dass die Zugabe von rekombinantem WNT1 die RU-486-abhängige Hemmung der Vitalität von MCF-7-Zellen nur teilweise und nicht vollständig aufheben konnte.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Antigestagen in MCF-7- und T-47D-Zellen auch **Apoptose** induziert, welche durch Zugabe von rekombinantem WNT1 nicht gehemmt werden konnte. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass RU-486 zwei verschiedene Mechanismen in MCF-7-Zellen beeinflusst: die Zellvitalität und Apoptose. Da die Apoptose mittels RU-486 in MCF-7-Zellen WNT1-unabhängig erfolgt, wurden durch Zugabe von rekombinantem WNT1 wahrscheinlich nur Zellen wieder reaktiviert, die in ihrer Vitalität beeinträchtigt, nicht jedoch apoptotisch waren. Dies würde auch die partielle Hemmung der RU-486-Effekte mittels rekombinantem WNT1 in MCF-7-Zellen erklären. In T-47D-Zellen beruhte die Hemmung der Vitalität durch RU-486 wahrscheinlich auf der Induktion der Apoptose, die ebenfalls WNT1-unabhängig war. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der WNT1-Expression nach RU-486-Behandlung in T-47D-Zellen unterstützt. Im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen kam es zu keiner Hemmung des Protoonkogens in T-47D-Zellen. Auch die funktionelle Analyse mit rekombinantem WNT1, bei der es zu keiner Steigerung der Vitalität in T-47D-Zellen kam, deutet darauf hin, dass WNT1 als Überlebensfaktor in MCF-7-Zellen eine größere Bedeutung hat, als in T-47D-Zellen.

Im Folgenden stellte sich die Frage, **über welchen Steroidhormonrezeptor die RU-486-abhängige WNT1-Regulation** in MCF-7-Zellen vermittelt wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Substanz sowohl als Antiprogesteron als auch als Antiglukokortikoid wirken kann, je nachdem wie die Steroidhormonrezeptoren in dem

jeweiligen Organ/ Zelle exprimiert werden. Beide RU-486-sensitiven Zelllinien, MCF-7 und T-47D, exprimieren sowohl den Progesteron- als auch den Glukokortikoidrezeptor. Für die Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors spricht, dass WNT1 sowohl durch RU-486 als auch durch den puren Glukokortikoidrezeptor-Liganden Dexamethason gehemmt wurde, wobei erstere Substanz effektiver war. Im Gegensatz dazu wurde in einer früheren Studie bereits gezeigt, dass die WNT1-Expression mittels Progesteronrezeptor durch ein Progestin induziert und dass dieser Effekt durch Zugabe von RU-486 wieder aufgehoben werden konnte [32]. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des Progesteronrezeptors ist die Liganden-abhängige Hemmung dieses Steroidrezeptors [32]. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass an der RU-486-abhängigen WNT1-Hemmung in MCF-7-Zellen sowohl der Progesteron- als auch der Glukokortikoidrezeptor beteiligt sind.

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigen, dass 1.) WNT1 in MCF-7-Zellen, verglichen mit T-47D- und MDA-MB-231-Zellen, am stärksten exprimiert wird, dass 2.) das Protoonkogen WNT1 für MCF-7-Zellen als autokriner bzw. parakriner Überlebensfaktor von großer Bedeutung ist, 3.) dass WNT1 durch RU-486 in MCF-7-Zellen stark gehemmt wird und 4.) somit partiell die Vitalität der Zellen hemmt und 5.) dass an der Vermittlung dieses Effektes sowohl der Progesteron- als auch der Glukokortikoidrezeptor beteiligt sind.

Limitiert wurde die Studie durch die Regulation etablierter *housekeeping genes* wie β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Lactatdehydrogenase A in den T-47D-Zellen, wodurch die Analyse der WNT1-Expression in dieser Zelllinie nur begrenzt möglich war. Des Weiteren wurde dieser Effekt für β -Aktin auch in MCF-7-Zellen beobachtet wobei der RU-486-Behandlung ein *knock-down* eines Steroidrezeptors voran gegangen war. Somit konnte dieses Experiment nicht zur Klärung der Frage, über welchen Steroidrezeptor die RU-486-abhängige WNT1-Hemmung vermittelt wird, herangezogen werden.

Abschließend lässt sich hervorheben, dass in dieser Studie erstmals gezeigt werden konnte, dass RU-486 seine antitumoralen Effekte auf Brustkrebszellen über die Hemmung von WNT1 entfaltet (Abb. 5.1). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird die Relevanz von RU-486 zur Behandlung von WNT1-überexprimierenden Brustkrebsfällen verstärkt. Die Beteiligung sowohl des Progesteron- als auch des Glukokortikoidrezeptors bei der Regulation der WNT1-Expression, bietet weitere Ansatzpunkte für Therapieoptionen, wie z.B. den Einsatz von HSP90-Inhibitoren. Detaillierte Untersuchungen zur

Wirkung von Rezeptorantagonisten und HSP90-Inhibitoren auf die Regulation von Proteinen des Wnt-Signalweges wären in diesem Zusammenhang interessant und sinnvoll.

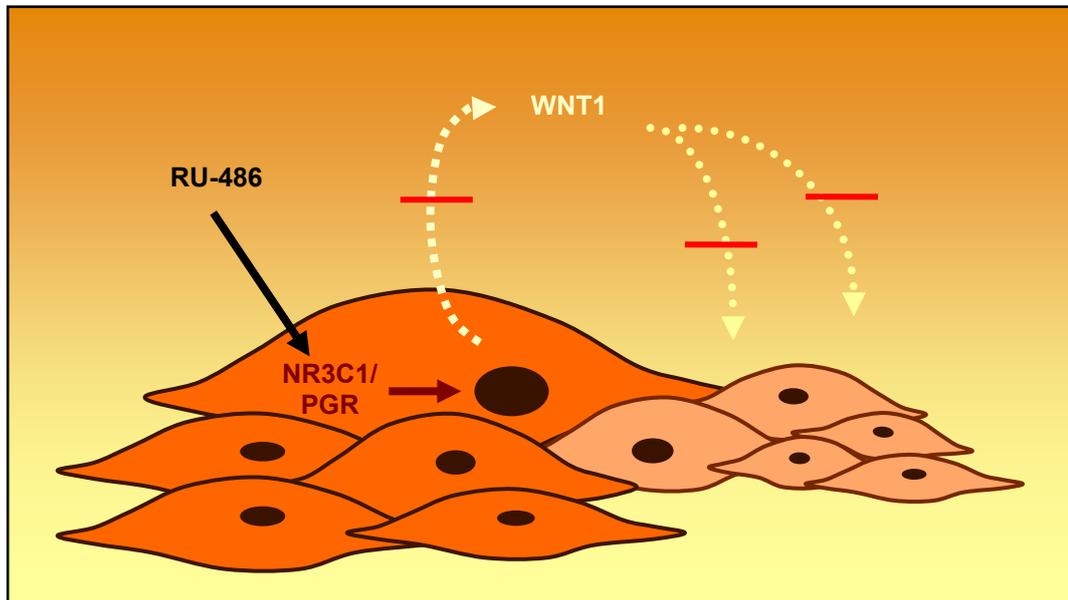


Abb. 5.1 Mechanismus der RU-486-vermittelten Hemmung der Vitalität in MCF-7-Zellen via WNT1-Regulation. RU-486 bindet in MCF-7-Zellen an den Progesteron- und den Glukokortikoidrezeptor und führt zu einer Hemmung der WNT1-Expression. Das Fehlen des Protoonkogens WNT1 als autokriner bzw. parakriner Überlebensfaktor führt somit zu einer verminderten Vitalität der MCF-7-Zellen. PGR – Progesteronrezeptor, NR3C1 – Glukokortikoidrezeptor, WNT1 – *Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 1*.

5.2 Syndecan-1-Expression, Regulation und Funktion in Brustkrebszellen

Das Proteoglykan Syndecan-1 (CD138) fungiert beim multiplen Myelom als prognostischer Marker und korreliert mit einer ungünstigen Prognose [60]. Beim Brustkrebs hingegen ist die Rolle von Syndecan-1 nicht vollständig geklärt [61-63]. Bekannt ist jedoch, dass Syndecan-1 verschiedene zelluläre Mechanismen wie z.B. Apoptose, Proliferation und Invasion beeinflusst, je nachdem welche der Syndecan-1-Form – löslich oder membranständig – vorliegt [64].

Der Fokus dieses Teilprojektes lag auf der Regulation von Syndecan-1 in Brustkrebszellen sowie deren funktionelle Relevanz und Auswirkung auf die Interaktion zum Osteoprotegerin.

Für die Untersuchungen wurden die Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231 hinsichtlich ihrer **basalen Syndecan-1-Expression** verglichen. Wie bereits in der Literatur beschrieben [100, 108], konnte in allen drei Zelllinien die Expression von Syndecan-1 nachgewiesen werden, wobei MCF-7-Zellen im Vergleich zu den T-47D und MDA-MB-231-Zellen die höchsten Level des Proteoglykans aufwiesen. Analysen der Arbeitsgruppe um Burbach [100] wiesen jedoch eine ähnlich starke Syndecan-1-Expression in den MDA-MB-231-Zellen wie in den MCF-7-Zellen nach. Ferner zeigten T-47D-Zellen ebenfalls eine starke Färbung für Syndecan-1 an der Zellmembran wie MCF-7-Zellen. Dies konnte in den für diese Untersuchungen eingesetzten T-47D-Zellen nicht bestätigt werden. Die Anwendung anderer Nachweisverfahren bzw. Antikörper könnte ein Grund für diese Detektionsunterschiede sein. Eine weitere Studie analysierte ebenfalls die basale Syndecan-1-Expression, jedoch auf mRNA-Ebene, und konnte ein geringes Expressionslevel für MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu den MCF-7-Zellen nachweisen, was mit den Ergebnissen dieser Studie übereinstimmt.

Nachdem die Expression von Syndecan-1 in Brustkrebszellen bestimmt wurde, folgte eine Analyse von potentiellen Regulatoren von Syndecan-1. Dazu wurden Substanzen ausgewählt, welche für die Therapie des Brustkrebses relevant sind. Eine signifikante Steigerung der Syndecan-1-Expression erfolgte ausschließlich in MCF-7-Zellen nach Dexamethason-Exposition, was durch den Rezeptorantagonisten RU-486 gehemmt werden konnte. Die Regulation via Dexamethason wird untermauert durch die Existenz zweier Bindungsstellen für den Glukokortikoidrezeptor innerhalb des Syndecan-1-Gens, welche durch die Verwendung der Software EpiTect ChiP qPCR Primers erfolgte (<http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?app=TFBS&q=1317390419>).

Die Analysen auf Proteinebene zeigten, dass vor allem die membranständige Form von Syndecan-1 durch Dexamethason verstärkt exprimiert wurde. Auffällig war auch das Syndecan-1-Muster in RU-486-behandelten Zellen, welches im Gegensatz zu den Kontrollzellen kaum ein membranständiges Signal für Syndecan-1 aufwies. Die Lokalisation von Syndecan-1 war bei dieser Behandlung im Zytoplasma lokalisiert und wies ein punktförmiges Muster auf. Dies verweist auf eine vesikuläre Lokalisation von Syndecan-1. Für Brustkrebszellen wurde bereits von Burbach et al. eine Akkumulation dieses Proteoglykans in perinukleären Lysosomen beschrieben, was den Abbau von Syndecan-1 ermöglicht [100].

Nikolova et al. veröffentlichten 2009 eine umfangreiche Studie zur funktionellen Relevanz der beiden Syndecan-1-Formen in Brustkrebszellen [64]. Diese Autoren konnten zeigen, dass die Überexpression von löslichem Syndecan-1 die Expression des *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* und E-Cadherin hemmt und Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptors steigert. Die Überexpression von membranständigen Syndecan-1 hingegen steigerte die Expression des *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* und hatte keinen signifikanten Einfluss auf die E-Cadherin- und Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor-Expression. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Expression dieser Gene in Dexamethason-behandelten MCF-7-Zellen untersucht.

Analysen zur Expression von **Heparanase** und dem Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor (**PLAUR**) zeigten eine signifikante Hemmung der mRNA nach Dexamethason-Behandlung, die durch den Rezeptorantagonist RU-486 noch weiter verstärkt wurde. In diesem Zusammenhang ist nicht auszuschließen, dass RU-486 eine agonistische Wirkung entfaltet oder Aufgrund seiner hohen Affinität zum Progesteronrezeptor [49-51, 53] über diesen wirkt. Des Weiteren ist bekannt, dass Heparanase die Expression des Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptors direkt beeinflusst. Purushothaman et al. konnten zeigen, dass eine geringe Heparanase-Expression mit niedrigen Spiegeln des Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptors korrelieren [58], so dass ein Einfluss von Heparanase auf die Expression des Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptors hier ebenfalls möglich ist.

Des Weiteren beeinflusst Heparanase auch indirekt das Vorhandensein der beiden Syndecan-1-Formen. Eine niedrige Heparanase-Expression geht mit einer verminderten Expression der Matrixmetalloprotease-9, einem Syndecan-1-spaltenden Enzym, einher [58]. Dieser Fakt unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Studie, bei der nach Dexamethason-Behandlung eine geringere Heparanase- und eine stärkere Expression des membranständigen Syndecan-1 gezeigt werden konnte.

Die Analyse der Expression des *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (**TIMP1**) in MCF-7-Zellen ergab, entgegen der Erwartung, dass die mRNA-Expression nach 72-stündiger Dexamethason-Behandlung signifikant gehemmt wurde. Die Hemmung der Expression des *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* konnte durch die Behandlung mit RU-486 wieder aufgehoben werden. Aufgrund der Dexamethason-abhängigen Steigerung der Syndecan-1-Expression in diesen Brustkrebszellen und der Erkenntnisse von Nikolova et al. [64], sollte die TIMP1-Expression eher ansteigen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass die Regulation dieses Gens durch Dexamethason vermittelt wird und weniger mit Syndecan-1 korreliert bzw. assoziiert ist. Auch in diesem Gen befinden sich Bindungsstellen für den Glukokortikoidrezeptor, was eine Dexamethason-abhängige Regulation erklären würde. Die Bindestellen wurden ebenfalls mittels EpiTect ChiP qPCR Primers Software (siehe oben) ermittelt.

Detaillierte Analysen der **E-Cadherin**-mRNA-Level in MCF-7-Zellen zeigten nach 72-stündiger Dexamethason-Behandlung eine Hemmung der Expression, welche durch Zugabe von RU-486 wieder aufgehoben werden konnte. Leppä et al. fanden heraus, dass die Syndecan-1-Expression E-Cadherin-abhängig reguliert wird. Die Arbeitsgruppe konnte unter Verwendung einer murinen Brustepithelzelllinie zeigen, dass nach einem *knock-down* von E-Cadherin auch die Expression von Syndecan-1 vermindert bzw. nach Transfektion von E-Cadherin in die Zellen eine gesteigerte Expression des Proteoglykans zu detektieren war [11]. Durch eine weitere Studie konnte die Koexpression der beiden Proteine bekräftigt werden. Dabei resultierte eine Hemmung der Syndecan-1-Expression in einer verminderten Expression von E-Cadherin [10]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Koexpression der beiden Proteine nicht bestätigt werden. Die Analyse der Genexpression zeigte eine verringerte E-Cadherin-Expression bei gleichzeitiger Steigerung der Syndecan-mRNA-Spiegel auf das 3-fache. Mögliche Erklärungen für diese Unterschiede wären, dass einerseits die Koexpression der beiden Proteine von der jeweiligen Zelllinie abhängig ist bzw. dass die Gene unterschiedlich durch Dexamethason reguliert werden und dies gegenüber anderen Regulationsmechanismen dominiert. Bei der umfangreichen Studie zur Expression der beiden Proteine von Nikolova et al. zeigte sich, dass eine Überexpression von löslichem Syndecan-1 die E-Cadherin-Expression hemmt.

Ein weiteres wichtiges Motiv für die Untersuchung der Expression dieser Gene war es, Hinweise zur **funktionellen Relevanz der gesteigerten Syndecan-1-Expression** zu erhalten. Dies sollte eine effiziente Klärung des Sachverhaltes ermöglichen.

Aufgrund der gesteigerten Expression von membranständigen Syndecan-1, was laut Nikolova et al. mit einer gesteigerten Proliferation der Zellen korreliert [64], wurde

zunächst die Vitalität der Zellen untersucht. Entgegen der Erwartung kam es nach Dexamethason-Behandlung zu keiner gesteigerten Vitalität der Zellen, sondern einer Hemmung dieser um 11 %. Möglich wäre, dass eine gesteigerte Proliferation der Zellen nur bis zu einer bestimmten Expression von Syndecan-1 einhergeht und wenn dieses Niveau erreicht ist, Syndecan-1 keinen weiteren Einfluss auf die Proliferation der Zellen ausübt. Mittels *knock-down*-Versuche konnte die bereits beschriebene Rolle von Syndecan-1 für die Vitalität der MCF-7-Zellen bestätigt werden. Eine Verminderung der Syndecan-1-Expression um etwa 70 % führte zu einer signifikanten Hemmung der Zellvitalität. Ein Grund für die geringere Vitalität der MCF-7-Zellen trotz gesteigerter Syndecan-1-Expression könnte sein, dass hemmende Effekte von Dexamethason wirksam wurden. Eine Studie konnte bereits zeigen, dass Dexamethason in einem Brustkrebsmodell als Chemosensitizer wirkt und die antitumorale Wirkung eines Chemotherapeutikum potenzierte [28].

Aufgrund dieses unerwarteten Ergebnisses wurde als nächstes untersucht, inwieweit die **Apoptose** der Zellen beeinflusst wird. In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Inkubation von MCF-7-Zellen mit löslichem Syndecan-1 zu einer gesteigerten und der *knock-down* des Proteoglykans zu einer Hemmung der Apoptose führte [65]. Die Analyse der Apoptose zeigte jedoch auch hier nur einen geringen Effekt. Möglicherweise spielt eine Steigerung der Expression von membranständigem Syndecan-1 im Gegensatz zur löslichen Form eher keine Rolle bei der Induktion der Apoptose.

Als nächstes folgten Untersuchungen zur **Invasion und Migration** der Zellen nach Dexamethason-Behandlung, da auch bei diesen Mechanismen Syndecan-1 eine bedeutende Rolle zukommt. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine gesteigerte Expression von membranständigen Syndecan-1 zu einer geringeren Invasivität der Brustkrebszellen führt [64]. Die in diesen Untersuchungen ermittelte geringere Expression von Heparanase nach Dexamethason-Behandlung verweist auf eine Hemmung der Invasivität der Zellen, da eine hohe Expression dieses Enzyms mit einer gesteigerten Invasion korreliert [58]. Dagegenem entgegen spricht jedoch die verringerte Expression des *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* und von E-Cadherin nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason. Dies deutet eher auf eine gesteigerte Invasion der Zellen hin, so dass anhand dieser Parameter keine eindeutige Hypothese zum Invasionsverhalten der Zellen getroffen werden konnte. Die Analysen zur Invasion waren jedoch limitiert, da trotz standardisierter Vorgehensweise in den meisten Versuchen keine auswertbaren Ergebnisse generiert werden konnten. Die Ergebnisse der Migration ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen

Behandlungen. Vermutlich sind MCF-7-Zellen für Migrations- und Invasionsstudien nicht das geeignete Modell, da sie im Gegensatz zu MDA-MB-231-Zellen stärkere Zell-Zell-Kontakte besitzen und nicht aktiv in den Knochen migrieren können [109]).

Als letzter Punkt dieses Teilprojektes wurde die Syndecan-1/OPG-Interaktion näher untersucht. Standal et al. konnten für das Multiple Myelom zeigen, dass diese Interaktion zu einer Imbalance des RANKL/OPG-Verhältnisses führt [70]. Dies würde sowohl Auswirkung auf die Krebszellen als auch den Knochenstoffwechsel haben [77, 81, 110, 111].

Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung von Osteoprotegerin und Syndecan-1 konnte eine Kolo-kalisation dieser beiden Proteine in MCF-7-Zellen nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Dexamethason zeigte eine gegenteilige Regulation beider Proteine, so dass bei der Überlagerung beider Färbungen eine deutlichere Grünfärbung der MCF-7-Zellen zu detektieren war, was auf eine gesteigerte Syndecan-1 und eine verringerte Osteoprotegerin-Expression hindeutet. Rachner et al. konnten bereits 2009 eine dosisabhängige Regulation von Osteoprotegerin nach Dexamethason-Behandlung nachweisen [88], was mit diesen Immunfluoreszenzdaten übereinstimmt. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob neben dieser Proteininteraktion auch auf transkriptioneller Ebene eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteine besteht. Es stellte sich in *knock-down* Versuchen heraus, dass eine verminderte Syndecan-1-Expression mit einer signifikant gesteigerten Osteoprotegerin-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene einhergeht. Eine gesteigerte Osteoprotegerin-Expression in Kombination mit einer Verschiebung des RANKL/OPG-Verhältnisses kann durch Neutralisierung von RANKL einen bedeutenden Einfluss auf das Knochenkompartiment ausüben. Des Weiteren scheint Syndecan-1 in Kombination mit einer hohen Heparanase-Expression selbst auf den Knochen Auswirkungen zu besitzen, was eine neuere Studie von Kelly et al. zeigen konnte. Dabei steigerte eine hohe Expression an Heparanase die Osteoklastogenese, wobei dies jedoch nur in Anwesenheit von Syndecan-1 möglich war [68].

Inwieweit die Dexamethason-abhängige Regulation von Syndecan-1 und die gesteigerte Osteoprotegerin-Expression nach Syndecan-1 *knock-down* die Osteoklastogenese beeinflussen, bedarf weiterführender Experimente (Abb. 5.2).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass 1.) alle drei Zelllinien Syndecan-1 bilden, wobei MCF-7-Zellen die höchste Expression aufwiesen, 2.) Syndecan-1 in MCF-7-Zellen Dexamethason-abhängig reguliert wird, 3.) die funktionelle Relevanz dieser

Regulation noch nicht vollständig geklärt ist, jedoch 4.) die Expression von Syndecan-1 für die Vitalität der MCF-7 von Bedeutung ist und 5.) Syndecan-1 auch auf transkriptioneller Ebene mit OPG interagiert.

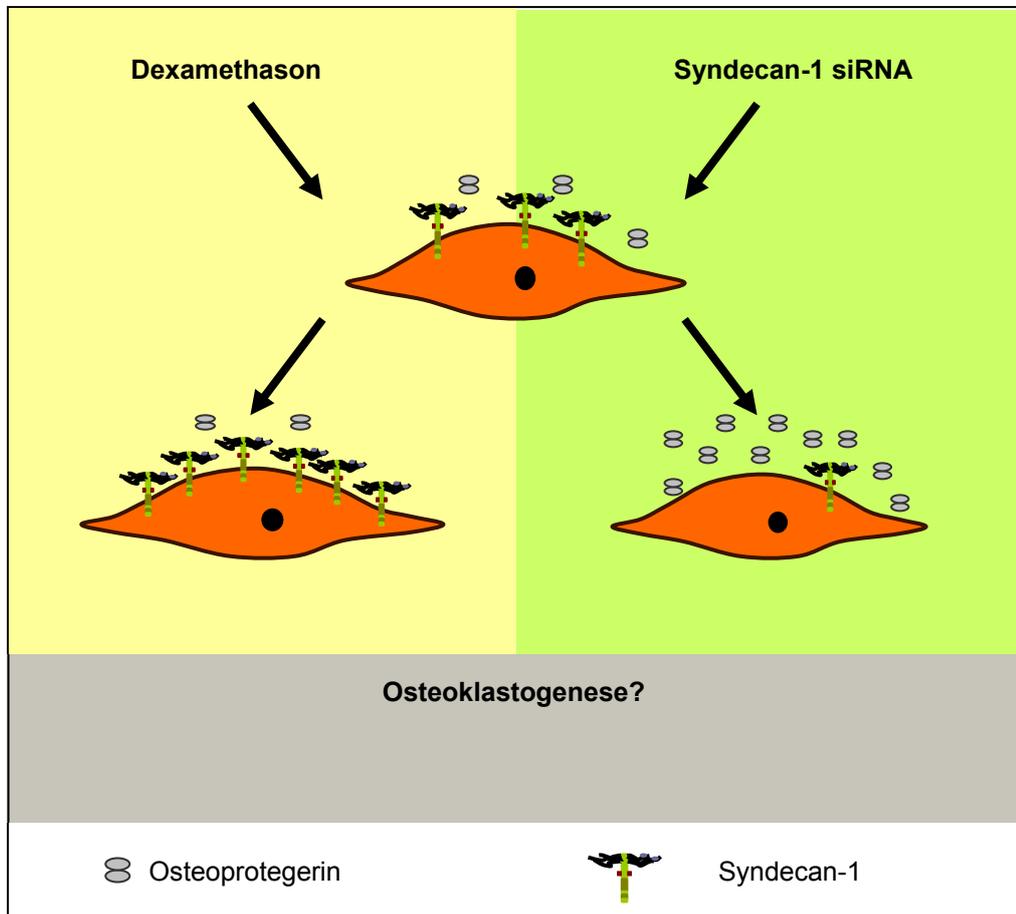


Abb. 5.2 Regulation von Syndecan-1 und Osteoprotegerin. In MCF-7-Zellen erfolgt Dexamethason-abhängig eine Steigerung des membranständigen Syndecan-1 und eine Hemmung der Osteoprotegerin-Expression. Wird die Syndecan-1-Expression mittels siRNA in MCF-7-Zellen gehemmt so wird die Expression von Osteoprotegerin gesteigert.

Auch dieses Teilprojekt unterlag Limitationen. So blieb die Frage zur funktionellen Relevanz der Dexamethason-abhängigen Syndecan-1-Regulation für die Brustkrebszellen derzeit noch unbeantwortet. Des Weiteren stellte die Analyse der Invasion eine Herausforderung dar, die mittels des verwandten Systems nicht beantwortet werden konnte.

Im Hinblick auf die Relevanz des OPG/RANK/RANKL-Systems für den Knochen könnten weiterführende Experimente folgende Fragestellungen näher untersuchen: Wird die Osteoklastogenese durch die Syndecan-1-vermittelte gesteigerte Osteoprotegerin-Expression gehemmt? Die Beantwortung dieser Fragestellung kann

mittels Zellkulturexperimente erfolgen, bei denen Osteoklasten in konditioniertem Medium von MCF-7-Zellen kultiviert werden. Dazu würde konditioniertes Medium von Kontrollzellen und von MCF-7-Zellen nach Syndecan-1 *knock-down* benötigt. Um den speziellen Beitrag der gesteigerten Osteoprotegerin-Expression zu untersuchen, könnten osteoklastäre Effekte durch Zugabe von Osteoprotegerin-Antikörper oder RANKL neutralisiert bzw. gehemmt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In Europa und den USA stellt das **Mammakarzinom** die **häufigste Krebserkrankung der Frau** dar. Zwei Signalwege scheinen bei der Persistenz des Brustkrebses von besonderer Bedeutung zu sein – der Wnt-Signalweg und der Syndecan-1-Signalweg.

Der **Wnt-Signalweg** ist in über 50 % der Brustkrebsfälle aktiviert, wobei die Ursachen für diese Aktivierung noch nicht vollständig geklärt sind. Bisher konnten Studien zeigen, dass Progesteron sowohl in den kanonischen als auch nicht-kanonischen Wnt-Signalweg regulatorisch eingreift. Die Rolle der Gestagene wurde, im Gegensatz zu den Östrogenen, bei der Karzinogenese des Mammakarzinom längere Zeit kontrovers diskutiert. Neuere Studien belegen jedoch deren funktionelle Relevanz in frühen Stadien der Karzinogenese. Aufgrund dieser Erkenntnisse und ihrer mehrfach nachgewiesenen antitumoralen Wirkung rücken Antigestagen-wirkende Substanzen als Therapieansätze wieder in den Fokus der Forschung.

Innerhalb dieses Teilprojekts sollte die Wirkung des Antigestagens **RU-486** auf die Regulation der am Wnt-Signalweg beteiligten Proteine untersucht werden sowie dessen funktionelle Relevanz für Brustkrebszellen. Hierfür wurden drei verschiedene Brustkrebszelllinien, MCF-7, T-47D und MDA-MB-231, verwandt. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte ein neuer Wirkmechanismus von RU-486 auf Brustkrebszellen belegt werden. Dabei hemmte RU-486 die Expression von WNT1 in MCF-7-Zellen. Für diese Zelllinie scheint WNT1 ein entscheidender Überlebensfaktor zu sein, da sie einerseits die höchste WNT1-Expression aufwies und andererseits mit einer gesteigerten Vitalität auf die WNT1-Behandlung reagierte. Weitere Versuche zeigten, dass RU-486 über die Hemmung der WNT1-Expression zu einer verminderten Vitalität der MCF-7-Zellen führte. An dieser antitumoralen Wirkung von RU-486 scheint sowohl der Progesteron- als auch der Glukokortikoidrezeptor beteiligt zu sein. Da der Wnt-Signalweg in einem Großteil der Brustkrebsfälle aktiviert ist, sind in diesem Zusammenhang weitere Untersuchungen zur Wirkung von Antigestagenen auf diesen Signalweg sinnvoll. Auch der Einsatz von HSP90-Inhibitoren, welche die Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren hemmen, wäre in diesem Kontext ein möglicher Ansatz. Diese Substanzklasse wird derzeit präklinisch und klinisch untersucht.

Das zweite Teilprojekt beschäftigte sich mit der Regulation von **Syndecan-1** und dessen Auswirkung auf Brustkrebszellen und der Interaktion mit dem Osteoprotegerin. Die Rolle von Syndecan-1 beim Brustkrebs ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Jedoch konnten zahlreiche Studien den Einfluss dieses Proteoglykans auf physiologische und pathophysiologische Prozesse belegen. Aufgrund der vielfältigen Interaktionen von

Syndecan-1 mit anderen Proteinen und dem Vorliegen zweier verschiedener Formen – membranständig und löslich, erlangt diese Thematik eine hohe Komplexität.

Innerhalb dieser Arbeit sollte die Expression und Regulation von Syndecan-1 in den schon im ersten Teilprojekt verwandten Brustkrebszellen untersucht werden. Zur Behandlung wurden für die Therapie des Mammakarzinoms relevante Substanzen ausgewählt (Zoledronsäure, Dexamethason, Aromataseinhibitor). Nachfolgend sollte der Einfluss der Syndecan-1-Regulation auf das Zellschicksal sowie die Interaktion mit Osteoprotegerin, einem bedeutenden Regulator des Knochenstoffwechsels, untersucht werden. Die Analysen zeigten, dass alle drei Zelllinien Syndecan-1 exprimierten. Eine starke Induktion der Syndecan-1-Expression erfolgte bei MCF-7-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason. Die Frage zur funktionellen Relevanz dieser Dexamethason-abhängigen Syndecan-1-Stimulation für das Zellschicksal dieser Brustkrebszelllinie blieb, trotz der umfangreichen Untersuchungen verschiedenster Funktionen (Vitalität, Apoptose, Migration und Invasion), unbeantwortet.

Von besonderer funktioneller Bedeutung sind jedoch die Ergebnisse zur Syndecan-1/Osteoprotegerin-Interaktion. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Osteoprotegerin über die Heparansulfatseitenketten von Syndecan-1 gebunden, internalisiert und abgebaut werden kann. Neu ist jedoch, dass auch auf transkriptioneller Ebene eine Regulation von Osteoprotegerin durch Syndecan-1 erfolgt. So konnte anhand von Untersuchungen innerhalb dieses Teilprojekts gezeigt werden, dass die Hemmung der Syndecan-1-Expression mittels siRNA mit einer gesteigerten Expression von Osteoprotegerin einhergeht. Aufgrund der Bedeutung von Osteoprotegerin für den Knochenstoffwechsel können weitere Untersuchungen zur Osteoklastogenese angeschlossen werden. Mittels Osteoklastenassays sollte untersucht werden, inwieweit die erhöhten Osteoprotegerinkonzentrationen im konditionierten Brustkrebszellmedium die Reifung der Osteoklasten hemmt. Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten zum Verständnis beitragen, inwieweit die Syndecan-1-Osteoprotegerin-Wechselwirkungen zur Entstehung von Knochenmetastasen beitragen.

Zusammenfassend lässt sich hervorheben, dass durch diese Arbeit neue Erkenntnisse über zwei für das Mammakarzinom bedeutende Signalwege, den Wnt- und Syndecan-1-Signalweg, erbracht wurden. Im ersten Teilprojekt konnte ein neuer Mechanismus der antitumoralen Wirkung von RU-486, welche über die Hemmung des Protoonkogens WNT1 erfolgt, auf Brustkrebszellen belegt werden. Im zweiten Teilprojekt wurde Dexamethason als ein Regulator von Syndecan-1 identifiziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich Syndecan-1 und Osteoprotegerin nicht nur auf Protein- sondern auch auf der transkriptionellen Ebene beeinflussen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol* 2010;223(2):307-17.
- [2] Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46(4):765-81.
- [3] Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 2007;7(9):659-72.
- [4] Kreienberg R, Jonat W, Volm T, Möbus V, Alt D. Management des Mammakarzinoms. Springer Medizin Verlag 2006.
- [5] Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64(2):235-48.
- [6] Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, et al. In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 2004;36(9):984-8.
- [7] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
- [9] Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res* 2003;1(5):362-75.
- [10] Kato M, Saunders S, Nguyen H, Bernfield M. Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Mol Biol Cell* 1995;6(5):559-76.
- [11] Leppa S, Vleminckx K, Van Roy F, Jalkanen M. Syndecan-1 expression in mammary epithelial tumor cells is E-cadherin-dependent. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 6):1393-403.
- [12] Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol* 2008;3:221-47.
- [13] Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796(2):293-308.
- [14] Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature* 2001;410(6824):24-5.
- [15] Hofbauer LC, Rachner T, Singh SK. Fatal attraction: why breast cancer cells home to bone. *Breast Cancer Res* 2008;10(1):101.
- [16] Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol*;28(35):5132-9.
- [17] Brisken C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;2(12):a003178.
- [18] Beleut M, Rajaram RD, Caikovski M, Ayyanan A, Germano D, Choi Y, et al. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(7):2989-94.
- [19] Brisken C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK, et al. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* 2000;14(6):650-4.
- [20] Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, Miller R, Roudier-Meyer MP, Erwert R, et al. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 2010;468(7320):103-7.
- [21] Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature* 2010;468(7320):98-102.
- [22] Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81(4):1535-65.
- [23] Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(3):270-82.

- [24] Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, et al. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86(3-5):477-86.
- [25] Herr I, Ucur E, Herzer K, Okouoyo S, Ridder R, Krammer PH, et al. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res* 2003;63(12):3112-20.
- [26] Moutsatsou P, Papavassiliou AG. The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *J Cell Mol Med* 2008;12(1):145-63.
- [27] Pang D, Kocherginsky M, Krausz T, Kim SY, Conzen SD. Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2006;5(8):933-40.
- [28] Wang H, Wang Y, Rayburn ER, Hill DL, Rinehart JJ, Zhang R. Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of cytokine expression, and pharmacokinetics. *Int J Oncol* 2007;30(4):947-53.
- [29] Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003;362(9382):419-27.
- [30] Moore MR, Spence JB, Kiningham KK, Dillon JL. Progesterin inhibition of cell death in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;98(4-5):218-27.
- [31] Skildum A, Faivre E, Lange CA. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 2005;19(2):327-39.
- [32] Faivre EJ, Lange CA. Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2007;27(2):466-80.
- [33] Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, et al. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(8):4262-6.
- [34] Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 1988;55(4):619-25.
- [35] Wieczorek M, Paczkowska A, Guzenda P, Majorek M, Bednarek AK, Lamparska-Przybysz M. Silencing of Wnt-1 by siRNA induces apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2008;7(2):268-74.
- [36] Kumar R, Balasenthil S, Pakala SB, Rayala SK, Sahin AA, Ohshiro K. Metastasis-associated protein 1 short form stimulates Wnt1 pathway in mammary epithelial and cancer cells. *Cancer Res* 2010;70(16):6598-608.
- [37] Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, et al. Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int J Oncol* 2004;25(5):1337-42.
- [38] Watanabe O, Imamura H, Shimizu T, Kinoshita J, Okabe T, Hirano A, et al. Expression of twist and wnt in human breast cancer. *Anticancer Res* 2004;24(6):3851-6.
- [39] Wong SC, Lo SF, Lee KC, Yam JW, Chan JK, Wendy Hsiao WL. Expression of frizzled-related protein and Wnt-signalling molecules in invasive human breast tumours. *J Pathol* 2002;196(2):145-53.
- [40] Brown AM. Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast Cancer Res* 2001;3(6):351-5.
- [41] Lamb R, Harrison H, Clarke RB. Mammary development, carcinomas and progesterone: role of Wnt signalling. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2007(1):1-23.
- [42] Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14(15):1837-51.

- [43] Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z. Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* 2006;73(5):213-23.
- [44] Bakker GH, Setyono-Han B, Portengen H, De Jong FH, Foekens JA, Klijn JG. Treatment of breast cancer with different antiprogestins: preclinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37(6):789-94.
- [45] Gaddy VT, Barrett JT, Delk JN, Kallab AM, Porter AG, Schoenlein PV. Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):5215-25.
- [46] Klijn JG, de Jong FH, Bakker GH, Lamberts SW, Rodenburg CJ, Alexieva-Figusch J. Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49(11):2851-6.
- [47] Klijn JG, Setyono-Han B, Foekens JA. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 2000;65(10-11):825-30.
- [48] Engman M, Skoog L, Soderqvist G, Gemzell-Danielsson K. The effect of mifepristone on breast cell proliferation in premenopausal women evaluated through fine needle aspiration cytology. *Hum Reprod* 2008;23(9):2072-9.
- [49] Sarkar NN. Mifepristone: bioavailability, pharmacokinetics and use-effectiveness. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;101(2):113-20.
- [50] Winkler M, Rath W. Anwendungsbereiche von RU 486 in Gynäkologie und Geburtshilfe. *Deutsches Ärzteblatt* 96, Heft 30 1999.
- [51] Pollow K, Grill HJ, Elger W, Christmann P, Manz B, Juchem M. Vergleichende Untersuchungen der synthetischen Antigestagene RU 38 486, ZK 98734 und ZK 98299 auf der Rezeptorebene. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 1989;245:929-30.
- [52] Baulieu EE. RU 486 (mifepristone). A short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996. *Ann N Y Acad Sci* 1997;828:47-58.
- [53] Schaff EA. Mifepristone: ten years later. *Contraception* 2010;81(1):1-7.
- [54] Beauvais DM, Rapraeger AC. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:3.
- [55] Delehedde M, Lyon M, Sergeant N, Rahmoune H, Fernig DG. Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6(3):253-73.
- [56] Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *Febs J* 2010;277(19):3876-89.
- [57] Chen L, Sanderson RD. Heparanase regulates levels of syndecan-1 in the nucleus. *PLoS One* 2009;4(3):e4947.
- [58] Purushothaman A, Chen L, Yang Y, Sanderson RD. Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma. *J Biol Chem* 2008;283(47):32628-36.
- [59] Sanderson RD, Yang Y, Suva LJ, Kelly T. Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biol* 2004;23(6):341-52.
- [60] Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* 2000;95(2):388-92.
- [61] Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, et al. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer* 2003;98(3):474-83.
- [62] Loussouarn D, Champion L, Sagan C, Frenel JS, Dravet F, Classe JM, et al. Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas. *Br J Cancer* 2008;98(12):1993-8.
- [63] Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncology* 2004;67(1):11-8.

- [64] Nikolova V, Koo CY, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, et al. Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis* 2009;30(3):397-407.
- [65] Sun H, Berquin IM, Owens RT, O'Flaherty JT, Edwards IJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2008;68(8):2912-9.
- [66] Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, et al. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* 2000;25(3):329-32.
- [67] Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 1998;91(8):2679-88.
- [68] Kelly T, Suva LJ, Nicks KM, MacLeod V, Sanderson RD. Tumor-derived syndecan-1 mediates distal cross-talk with bone that enhances osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2010;25(6):1295-304.
- [69] Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch JR, et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(5):2964-71.
- [70] Standal T, Seidel C, Hjertner O, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002;100(8):3002-7.
- [71] Sun D, McAlmon KR, Davies JA, Bernfield M, Hay ED. Simultaneous loss of expression of syndecan-1 and E-cadherin in the embryonic palate during epithelial-mesenchymal transformation. *Int J Dev Biol* 1998;42(5):733-6.
- [72] Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103(1):41-50.
- [73] Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, Cross NA, Balasubramanian SP, Croucher PI, et al. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? *Breast Cancer Res Treat* 2005;92(3):207-15.
- [74] Van Poznak C, Cross SS, Saggese M, Hudis C, Panageas KS, Norton L, et al. Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. *J Clin Pathol* 2006;59(1):56-63.
- [75] Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat* 2002;74(3):255-69.
- [76] Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Koziarzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440(7084):692-6.
- [77] Canon JR, Roudier M, Bryant R, Morony S, Stolina M, Kostenuik PJ, et al. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(2):119-29.
- [78] Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006;12(20 Pt 2):6213s-16s.
- [79] Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):584-93.
- [80] Roodman GD, Dougall WC. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat Rev* 2008;34(1):92-101.
- [81] Sangai T, Fujimoto H, Miyamoto S, Maeda H, Nakamura M, Ishii G, et al. Roles of osteoclasts and bone-derived IGFs in the survival and growth of human breast

- cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Metastasis* 2008.
- [82] Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kuhne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003;101(6):2094-8.
- [83] Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999;140(10):4451-8.
- [84] Benad P, Hofbauer LC, Rachner TD. Einfluss des RANKL/RANK/OPG-Systems auf Knochenmetastasen des Mammakarzinoms. UNI-MED Verlag AG 2009.
- [85] Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83(3):249-89.
- [86] Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006;10(6):515-27.
- [87] Nakamura H, Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Fujisaki N, Yoneda T, et al. Involvement of cell-cell and cell-matrix interactions in bone destruction induced by metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice. *J Bone Miner Metab* 2008;26(6):642-7.
- [88] Rachner TD, Benad P, Rauner M, Goettsch C, Singh SK, Schoppet M, et al. Osteoprotegerin production by breast cancer cells is suppressed by dexamethasone and confers resistance against TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2009;108(1):106-16.
- [89] Schmitz S. *Der Experimentator Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag 2009;2. Auflage.
- [90] Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag 2009;6. Auflage.
- [91] Thermo FS. V3.7 User's Manual NanoDrop 1000 Spectrophotometer. Thermo Fisher Scientific Inc 2008.
- [92] Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004;1/04.
- [93] Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator Proteinbiochemie / Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag 2010;6. Auflage.
- [94] Diaclone. Manual sCD138 (Syndecan-1) ELISA KIT 2004(3).
- [95] Immundiagnostik. Arbeitsanleitung/ Manual Osteoprotegerin (human) ELISA Kit. 2011.
- [96] Promega. Technical Bulletin CellTiter-Blue(R) Cell Viability Assay. 2006.
- [97] Roche DG. Manual Cell Death Detection ELISA PLUS. 2010.
- [98] Promega. Technical Bulletin Caspase-Glo(R) 3/7 Assay. 2009.
- [99] BD B. Guidelines for Use BD BioCoat™ Tumor Invasion System (96-Multiwell Format). 2006.
- [100] Burbach BJ, Friedl A, Mundhenke C, Rapraeger AC. Syndecan-1 accumulates in lysosomes of poorly differentiated breast carcinoma cells. *Matrix Biol* 2003;22(2):163-77.
- [101] Bardon S, Vignon F, Chalbos D, Rochefort H. RU486, a progestin and glucocorticoid antagonist, inhibits the growth of breast cancer cells via the progesterone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60(4):692-7.
- [102] Bardon S, Vignon F, Montcourrier P, Rochefort H. Steroid receptor-mediated cytotoxicity of an antiestrogen and an antiprogestin in breast cancer cells. *Cancer Res* 1987;47(5):1441-8.
- [103] Gill PG, Vignon F, Bardon S, Derocq D, Rochefort H. Difference between R5020 and the antiprogestin RU486 in antiproliferative effects on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1987;10(1):37-45.
- [104] Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep* 2006;15(3):701-7.

- [105] Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 2002;22(4):1184-93.
- [106] He B, You L, Uematsu K, Xu Z, Lee AY, Matsangou M, et al. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 2004;6(1):7-14.
- [107] Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A, Hynes NE. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):R63.
- [108] Gotte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wulfing P. An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res* 2007;9(1):R8.
- [109] Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1994;31(2-3):325-35.
- [110] Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273(23):14363-7.
- [111] Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, Kostenuik PJ. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 2001;61(11):4432-6.

8 ANHANG

8.1 Expression der Isoformen der Steroidhormonrezeptoren in den Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231

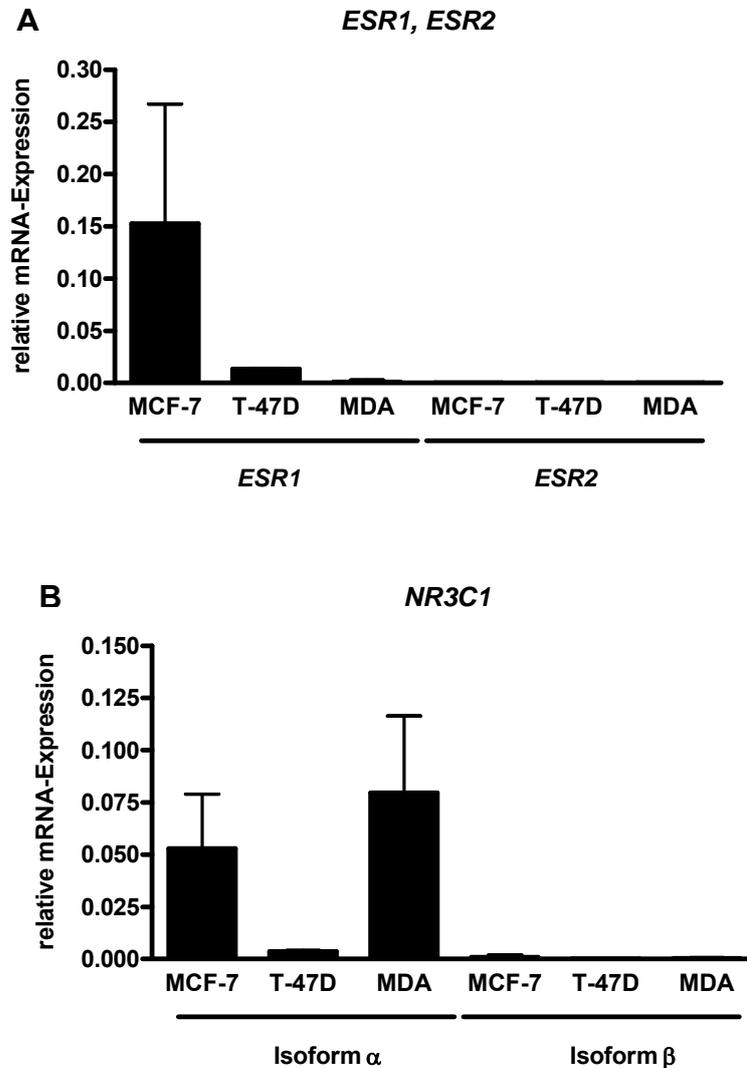


Abb. 8.1 Expression der Isoformen der Steroidrezeptoren in den Brustkrebszelllinien. Mittels *real-time* PCR wurde die basale Expression der Steroidrezeptorisoformen des (A) Östrogen-, und des (B) Glukokortikoidrezeptors in den Brustkrebszelllinien analysiert. Die α -Isoformen sind im Vergleich dargestellt. Keine der drei Zelllinien exprimiert eine der beiden β -Isoformen. N=3, ACTB – β -Aktin, ESR1 – Östrogenrezeptor- α , ESR2 – Östrogenrezeptor- β , MDA – MDA-MB-231, NR3C1 – Glukokortikoidrezeptor- α .

8.2 Einfluss von RU-486 auf die Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges und dessen funktionelle Relevanz

8.2.1 Einfluss von RU-486 auf die Expression von DKK1, SOST und WNT5A in MCF-7-Zellen

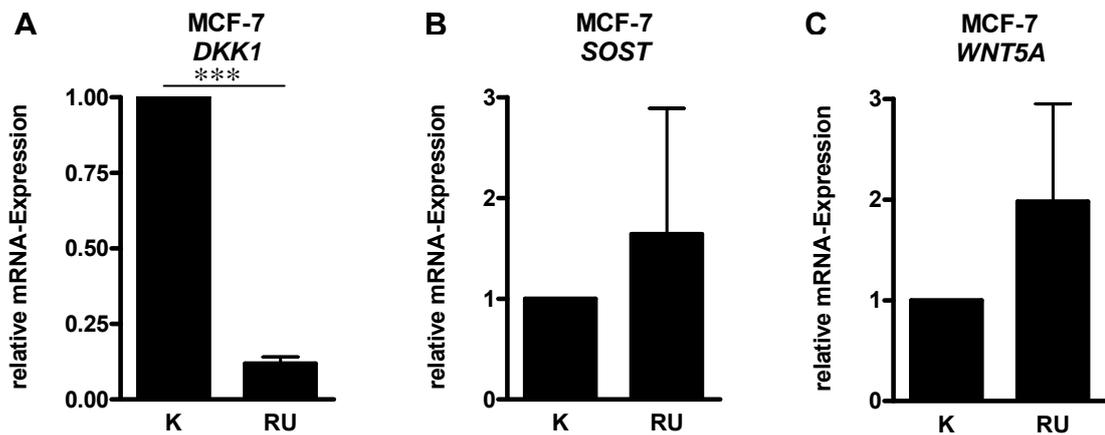


Abb. 8.2.1 Expression der am Wnt-Signalweg beteiligten Proteine in MCF-7-Zellen nach RU-486-Behandlung. MCF-7-Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert, mit RU-486 (10^{-5} M) für 72 h behandelt und anschließend mittels *real-time* PCR die Expression von (A) DKK1, (B) SOST und (C) WNT5A analysiert. Ausschließlich die Expression von DKK1 wurde durch die RU-486-Behandlung in MCF-7-Zellen signifikant gehemmt. N=3, *** $p < 0,001$, DKK1 – Dickkopf-1, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486, SOST – Sklerostin, WNT5A – *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5A*.

8.2.2 *Knock-down* der Steroidhormonrezeptoren und Expression von β -Aktin in MCF-7-Zellen

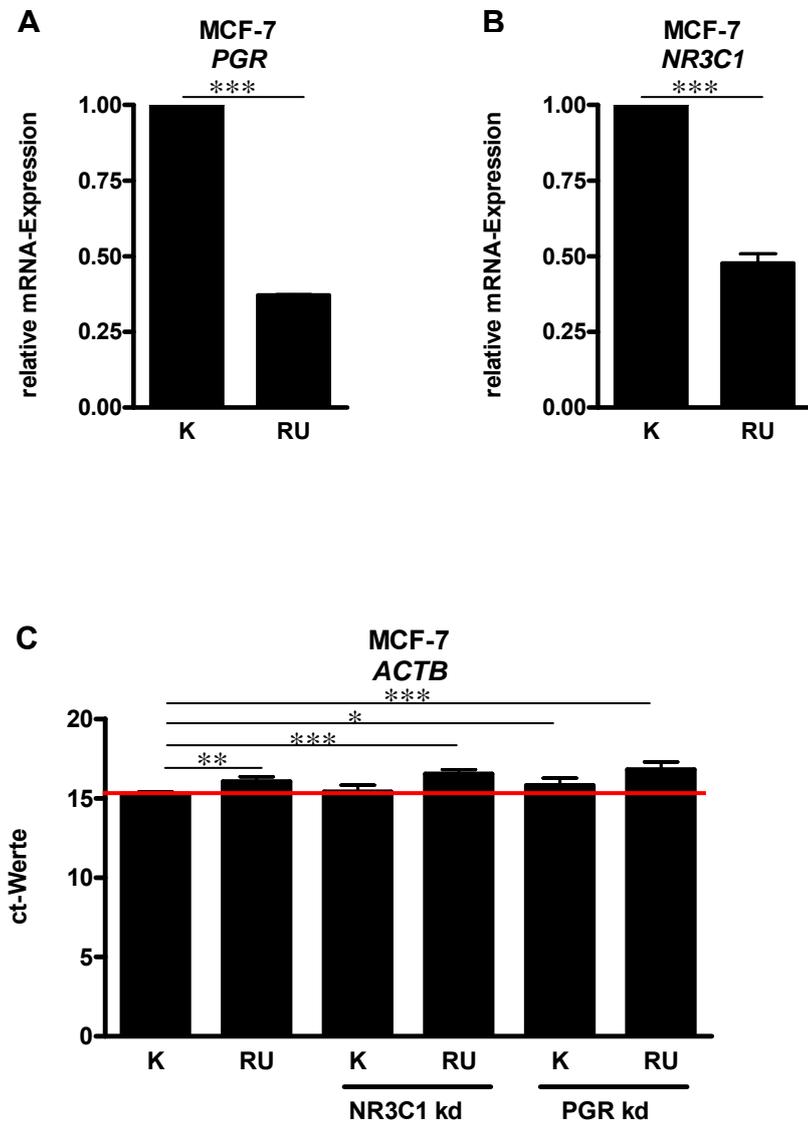


Abb. 8.2.2 *Knock-down* der Steroidhormonrezeptoren und Expression von β -Aktin in MCF-7-Zellen. MCF-7-Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert und anschließend wurde ein *knock-down* des (A) PGR oder des (B) NR3C1 mittels siRNA vorgenommen. Sowohl die Expression des PGR als auch des NR3C1 konnten signifikant gehemmt werden. Für die Untersuchung der WNT1-Regulation wurden die Zellen nach dem *knock-down* des Steroidhormonrezeptors für 72 h mit RU-486 (10^{-5} M) behandelt. Dabei zeigte sich, dass vor allem RU-486-behandelte Zellen in Kombination mit dem *knock-down* eines der beiden Steroidhormonrezeptoren signifikant höhere (C) ct-Werte des *housekeeping genes* ACTB aufwiesen als Kontroll-behandelte Zellen. N=5, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ACTB – β -Aktin, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, NR3C1 – Glukokortikoidrezeptor, PGR – Progesteronrezeptor, RU – RU-486.

8.3 Syndecan-1-Expression, Regulation und Funktion in Brustkrebszellen

8.3.1 Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien nach Behandlung mit Zoledronsäure und Aromataseinhibitor

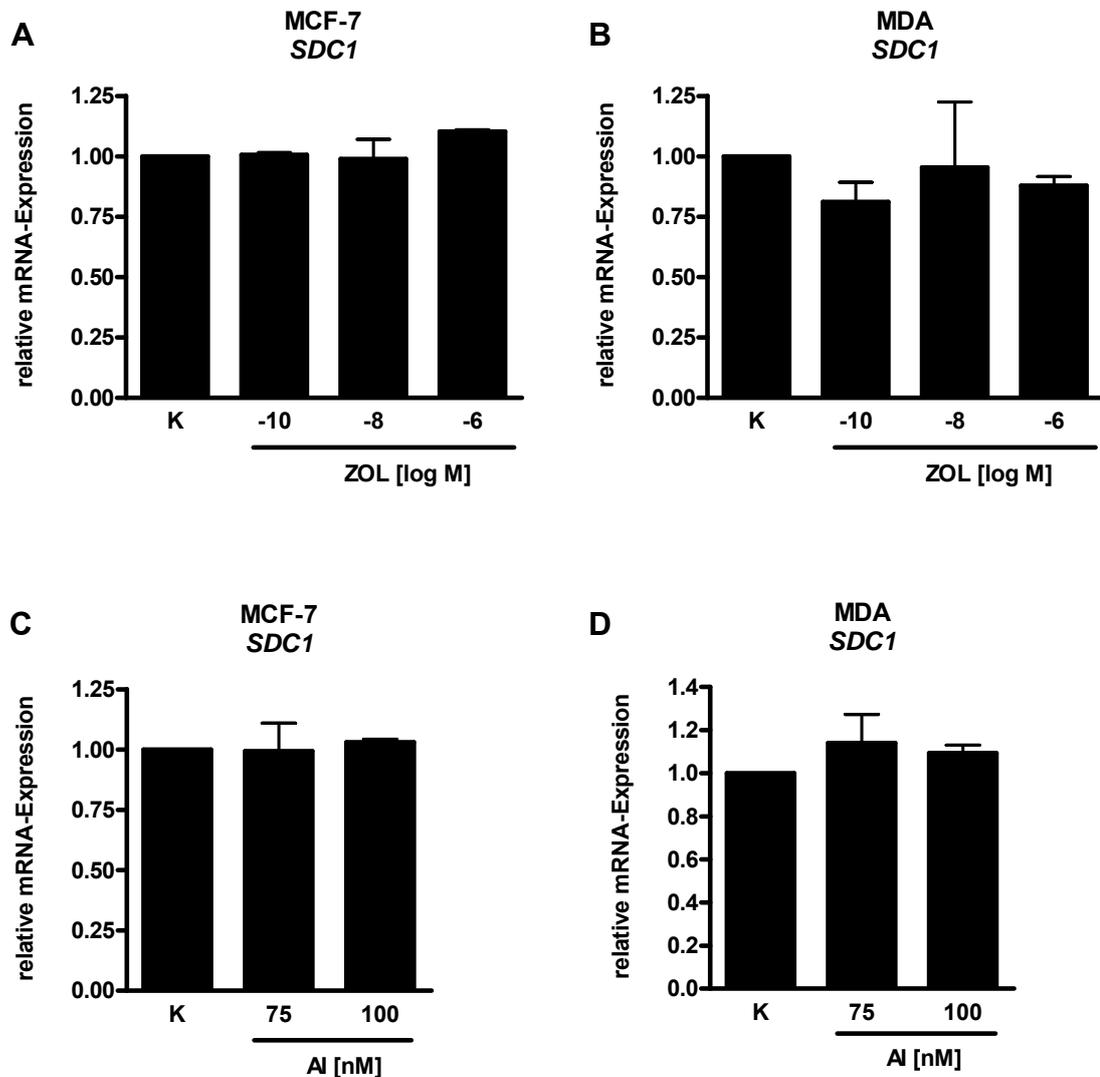


Abb. 8.3.1 Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien nach Behandlung mit Zoledronsäure und Aromataseinhibitor. Die Brustkrebszelllinien wurden in Medium ohne FKS kultiviert und anschließend für 72 h (MCF-7, **A**) oder 48 h (MDA-MB-231, **B**) mit verschiedenen Dosen Zoledronsäure (10^{-10} – 10^{-6} M) oder für 24 h mit dem (**C-D**) Aromataseinhibitor behandelt. Die Analyse der *SDC1*-mRNA erfolgte mittels *real-time* PCR. Weder in MCF-7-Zellen noch in MDA-MB-231-Zellen fand eine signifikante Regulation der *SDC1*-Expression nach Behandlung mit Zoledronat oder dem Aromataseinhibitor statt. N=4 (ZOL) N=2 (AI), AI – Aromataseinhibitor, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, MDA – MDA-MB-231, SDC1 – Syndecan-1, ZOL – Zoledronat.

8.3.2 Syndecan-1-Expression in den Brustkrebszelllinien T-47D und MDA-MB-231 nach Behandlung mit Dexamethason

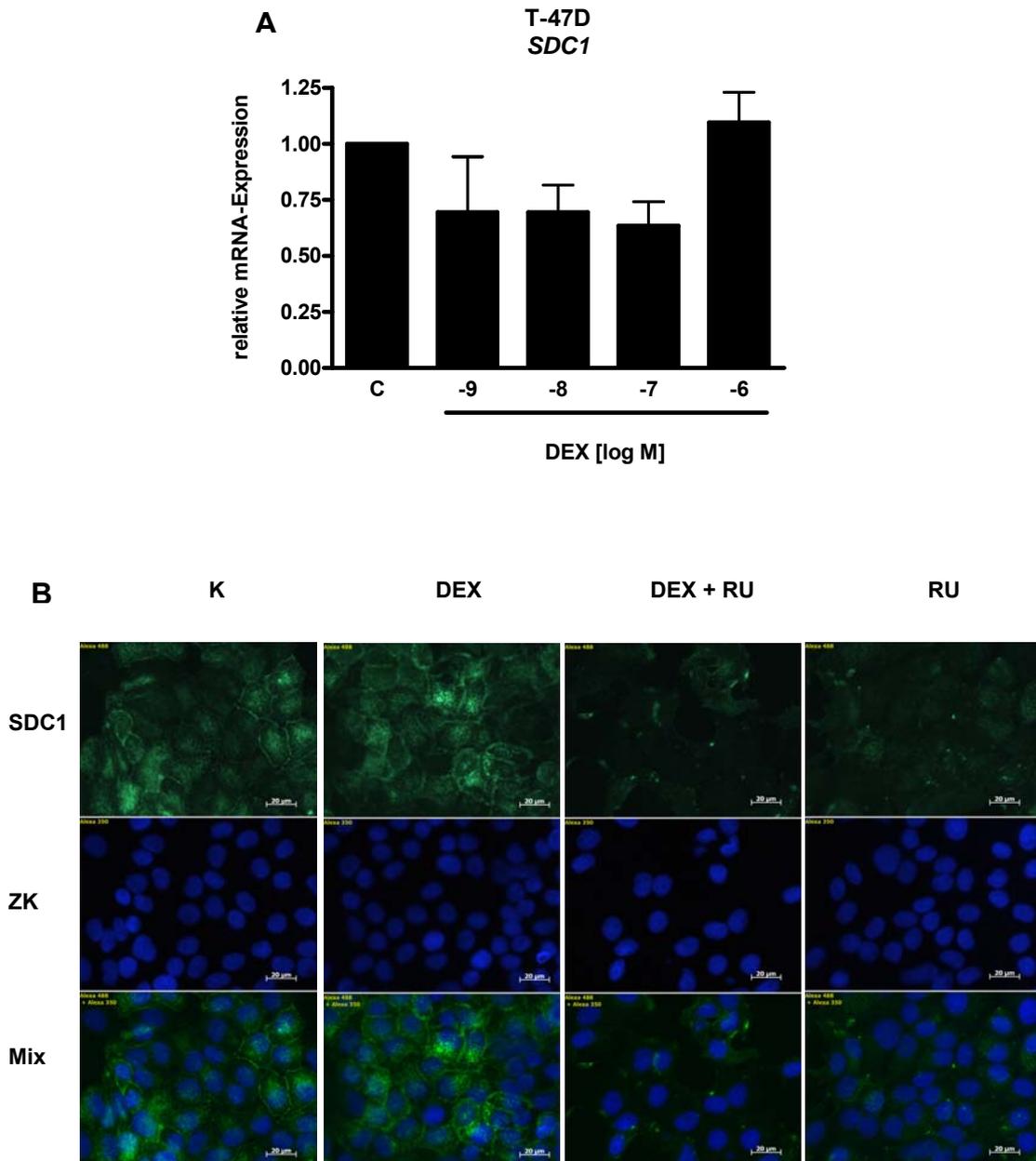


Abb. 8.3.2 A – B Syndecan-1-Expression in T-47D-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason. T-47D-Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert und anschließend mit verschiedenen Dosen Dexamethason (10^{-9} – 10^{-6} M) und/ oder RU-486 (10^{-5} M) für 72 h behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der (A) Syndecan-1-mRNA mittels *real-time* PCR bzw. des (B) Syndecan-1-Proteins mittels Immunfluoreszenz. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte keine Regulation der Syndecan-1-Expression detektiert werden. N=2, DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486, SDC1 – Syndecan-1, ZK – Zellkern, Vergrößerung 40 x.

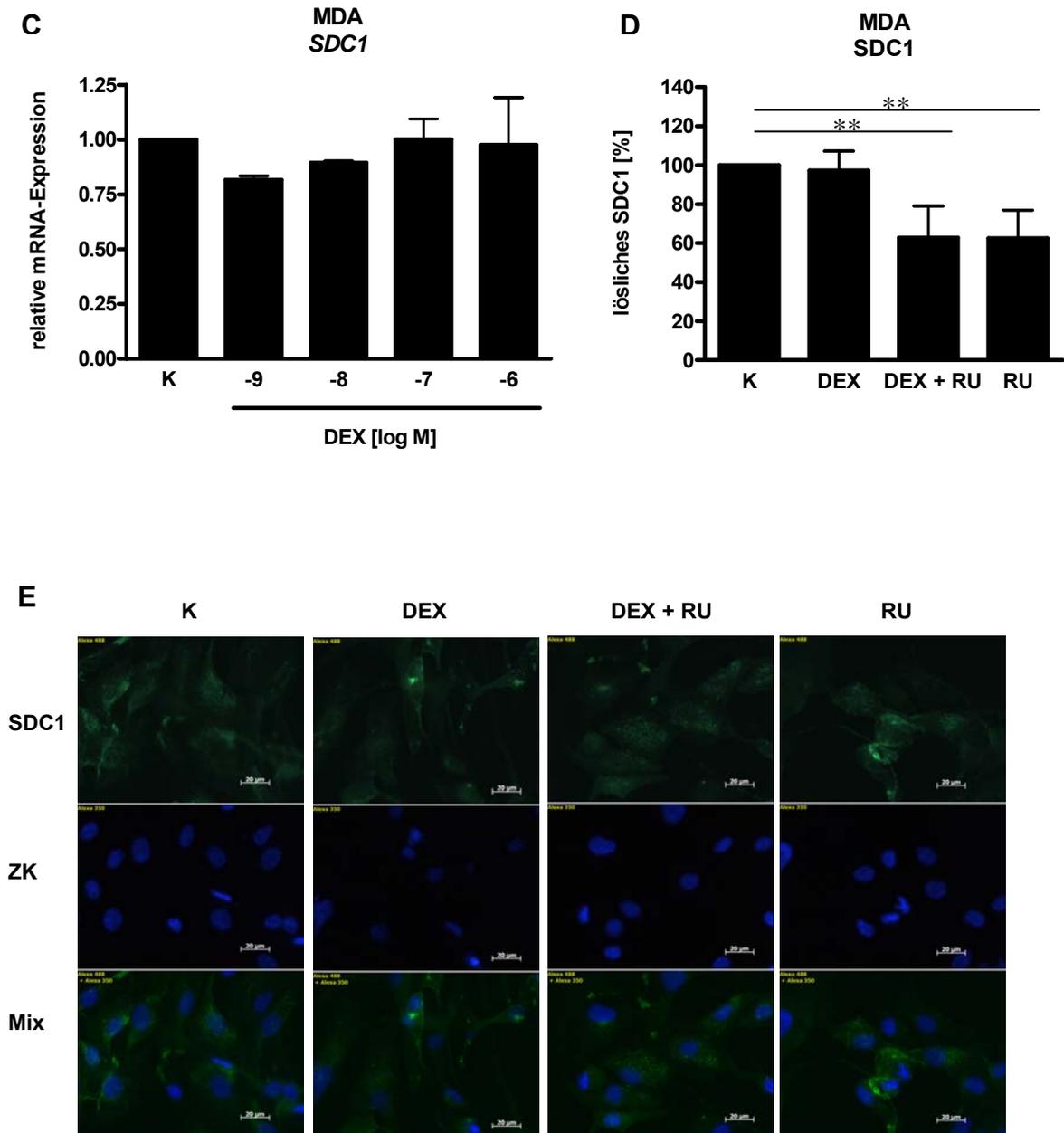


Abb. 8.3.2 C – E Syndecan-1-Expression in MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason. MDA-MB-231-Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert und anschließend mit Dexamethason (10^{-6} M) und/ oder RU-486 (10^{-5} M) für 72 h behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der (C) Syndecan-1-mRNA mittels *real-time* PCR bzw. des (D) Syndecan-1-Proteins mittels ELISA und (E) Immunfluoreszenz. Dexamethason hatte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene keinen Einfluss auf die Expression von Syndecan-1 in MDA-MB-231-Zellen. N=4, $p < 0,01$, DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, MDA – MDA-MB-231, RU – RU-486, SDC1 – Syndecan-1, ZK – Zellkern, Vergrößerung 40 x.

8.3.3 Vitalität, Apoptose, Invasion und Migration in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason

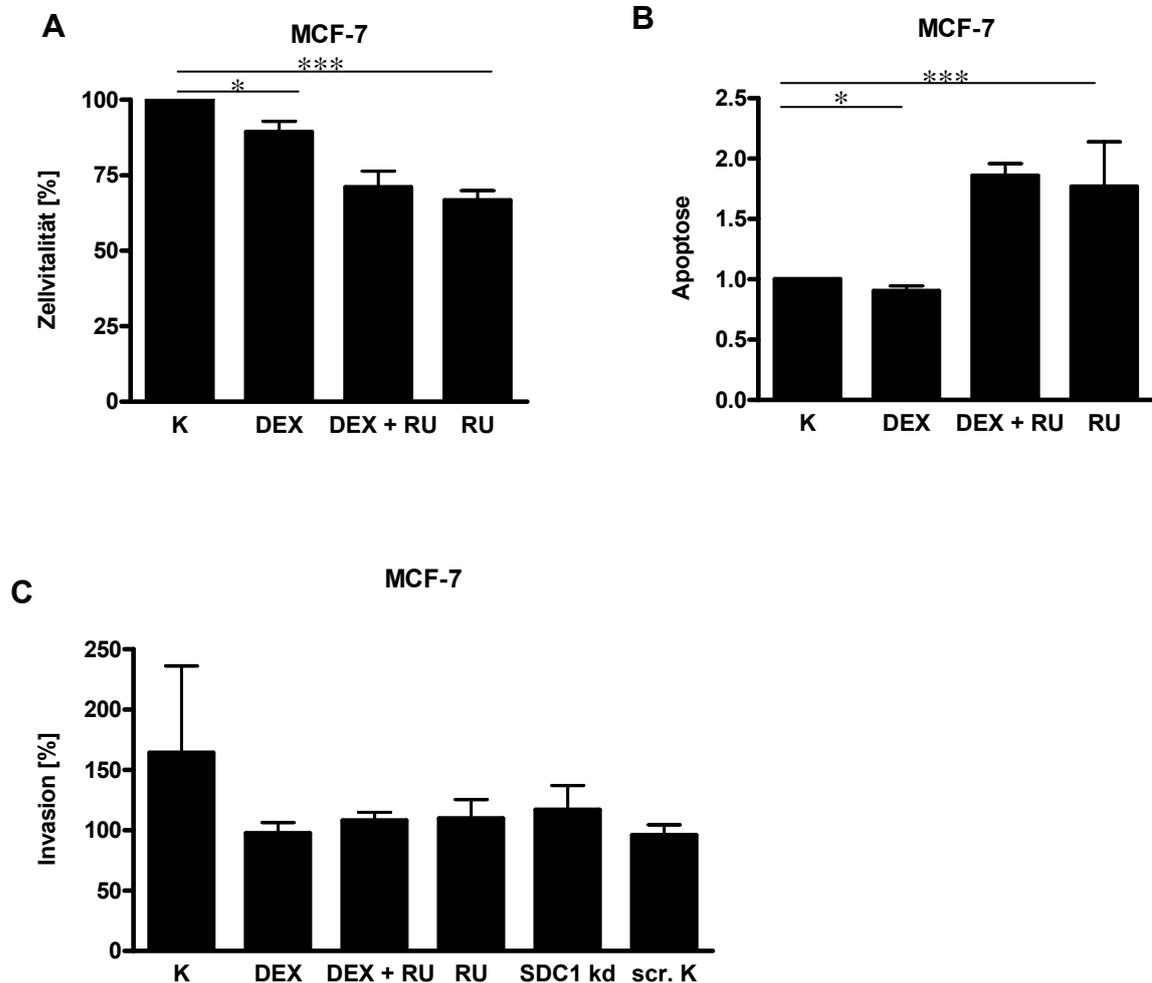


Abb. 8.3.3 A – C Vitalität, Apoptose und Invasion der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason. MCF-7-Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert und anschließend mit Dexamethason (10^{-6} M) und/ oder RU-486 (10^{-5} M) für 72 h behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der **(A)** Zellvitalität, der **(B)** Apoptose und der **(C)** Invasion. Die Behandlung mit Dexamethason zeigte keine starken Effekte auf die Zellvitalität und Apoptose der MCF-7-Zellen. Die Behandlung mit RU-486 hingegen führte zu einer signifikanten Hemmung der Zellvitalität und Steigerung der Apoptose. Die Analyse der Invasion der Zellen war limitiert, da trotz standardisiertem Protokoll es bei einigen Versuchen zu sehr hohen *Blank*-Werten kam im Vergleich zu den Behandlungen. N=4, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, kd – *knock-down*, RU – RU-486, scr. K – *scramble* Kontrolle, SDC1 – Syndecan-1.

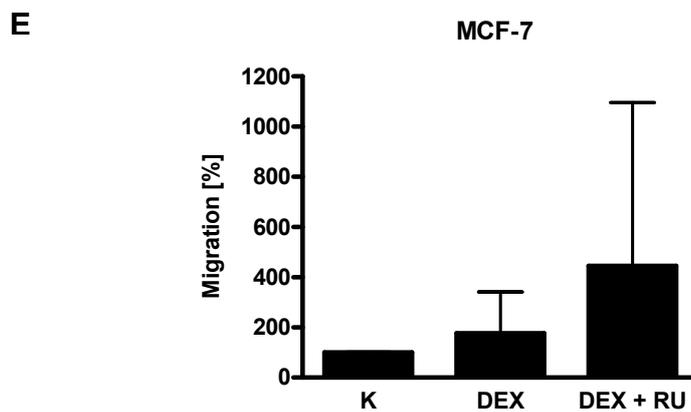
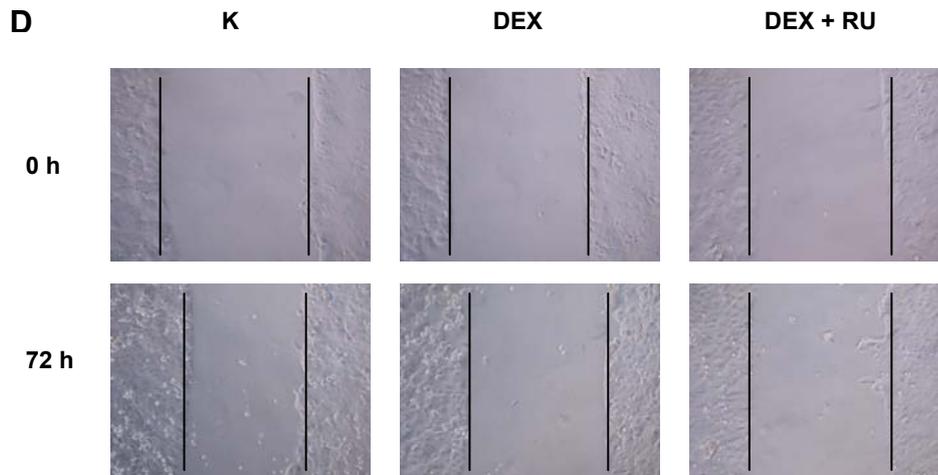


Abb. 8.3.3 D – E Migration der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason. MCF-7-Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert und anschließend mit Dexamethason (10^{-6} M) und RU-486 (10^{-5} M) für 72 h behandelt. Für die Analyse der Migration wurden wie unter Materialien und Methoden (2.5.5) beschrieben, Aufnahmen des Spaltes zu verschiedenen Zeitpunkten gemacht, welche anschließend ausgemessen wurden. Abbildung **D** zeigt exemplarisch einen Versuch. Die gewonnenen Werte sind in Abbildung **E** graphisch dargestellt. Die Migration der MCF-7-Zellen wurde durch die Behandlung mit Dexamethason nicht signifikant beeinflusst. N=4, DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, RU – RU-486.

8.3.4 Syndecan-1 *knock-down* in MCF-7-Zellen

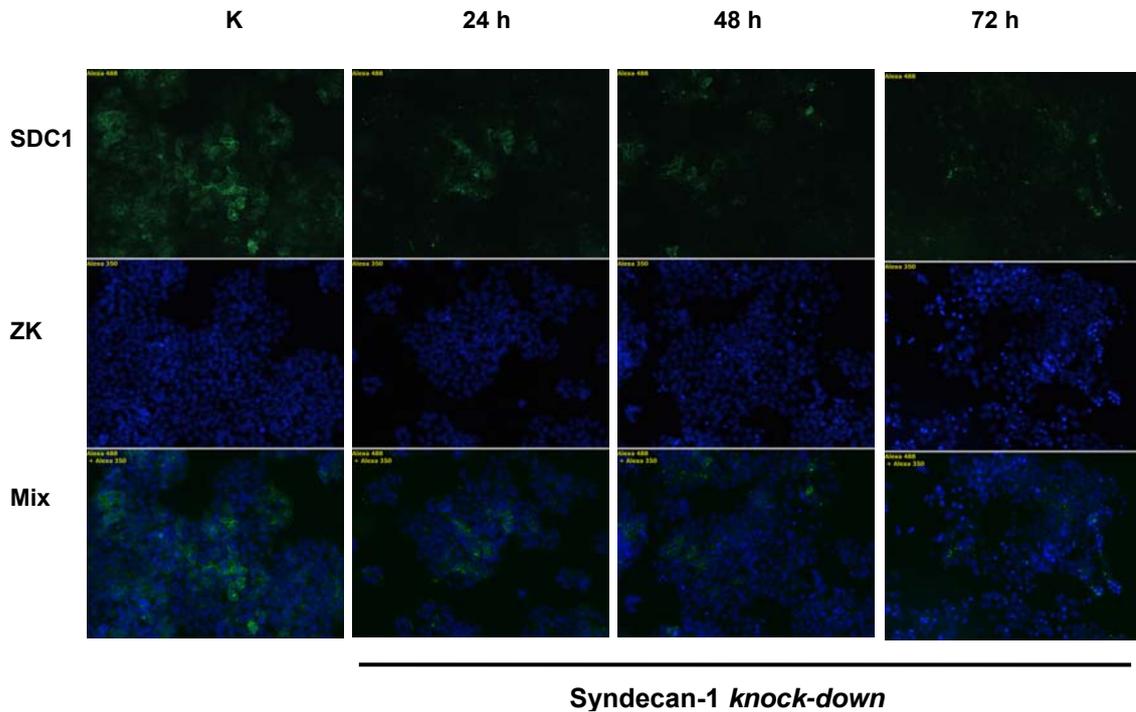


Abb. 8.3.4 Syndecan-1 *knock-down* in den MCF-7-Zellen. Mittels siRNA wurde die Expression von Syndecan-1 in den MCF-7-Zellen gehemmt. Anschließend wurden die Zellen in FKS-freiem Medium kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72 h) wurde die Effizienz des *knock-downs* auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz überprüft. DEX – Dexamethason, FKS – fötales Kälberserum, K – Kontrolle, SDC1 – Syndecan-1, ZK – Zellkern, Vergrößerung 10 x.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. bidest.	Aqua bidestilliert
ACTB	β -Aktin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CCND1	Cyclin D1
CDH1	E-Cadherin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKK1	Dickkopf-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ESR1	Östrogenrezeptor- α
ESR2	Östrogenrezeptor- β
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HPSE	Heparanase
HRP	<i>Horse radisch peroxidase</i>
LDHA	Laktatdehydrogenase A
min.	Minuten
NR3C1	Glukokortikoidrezeptor
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
PGR	Progesteronrezeptor
PLAUR	Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor
RT	Raumtemperatur
SDC1	Syndecan-1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOST	Sklerostin
TAE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween</i>
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>
UV	ultra violett
WNT1	Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 1
WNT5A	Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 5A

PUBLIKATIONEN

Ebert R, Zeck S, Meissner-Weigl J, Klotz B, Rachner TD, **Benad P**, Klein-Hitpass L, Rudert M, Hofbauer LC, Jakob F. Krüppel-like factors KLF2 and 6 and Ki-67 are direct targets of zoledronic acid in MCF-7 cells. *Bone* 2011

Benad P, Rauner M, Rachner TD, Hofbauer LC. The anti-progestin RU-486 inhibits viability of MCF-7 breast cancer cells by suppressing WNT1. *Cancer Lett.* 2011;312(1):101-8

Thiele S, Rauner M, Goettsch C, Rachner TD, **Benad P**, Fuessel S, Erdmann K, Hamann C, Baretton GB, Wirth MP, Jakob F, Hofbauer LC. Expression profile of WNT molecules in prostate cancer and its regulation by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem.* 2011 Jun;112(6):1593-600

Rachner TD, Singh SK, Schoppet M, **Benad P**, Bornhäuser M, Ellenrieder V, Ebert R, Jakob F, Hofbauer LC. Zoledronic acid induces apoptosis and changes the TRAIL/OPG ratio in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2010 Jan 1;287(1):109-16

Rachner TD, **Benad P**, Rauner M, Goettsch C, Singh SK, Schoppet M, Hofbauer LC. Osteoprotegerin production by breast cancer cells is suppressed by dexamethasone and confers resistance against TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biochem.* 2009 Sep 1;108(1):106-16

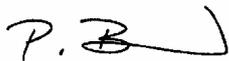
Benad P, Hofbauer LC, Rachner TD. Einfluss des RANKL/RANK/OPG-Systems auf Knochenmetastasen des Mammakarzinoms. UNI-MED Verlag AG 2009, 1. Auflage: 43-48

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

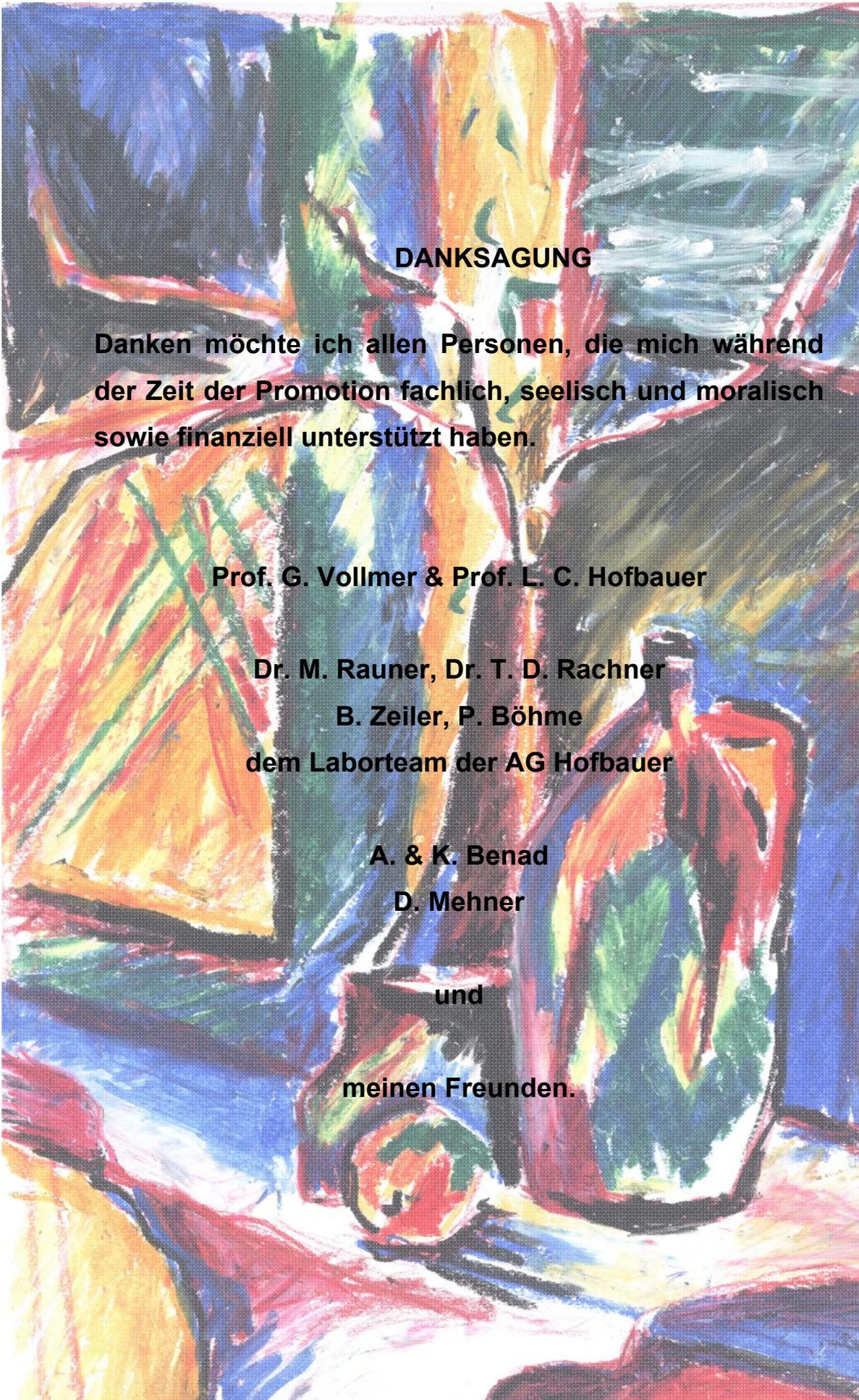
Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung vom 17.07.2008 erkenne ich in allen Teilen an.

Dresden, 24.01.2012



Peggy Benad



DANKSAGUNG

Danken möchte ich allen Personen, die mich während der Zeit der Promotion fachlich, seelisch und moralisch sowie finanziell unterstützt haben.

Prof. G. Vollmer & Prof. L. C. Hofbauer

Dr. M. Rauner, Dr. T. D. Rachner

B. Zeiler, P. Böhme

dem Laborteam der AG Hofbauer

A. & K. Benad

D. Mehner

und

meinen Freunden.