

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

Genexpression und Genregulation von LDOC1 und MTA1 in Mammakarzinomzellen

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Christina Teresa Buschmann
aus Aachen

München 2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. Julia Jückstock

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Darius Dian

Prof. Dr. Eva-Maria Grischke

Mitbetreuung durch:

Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ansgar Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2021

In Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Daten zum Mammakarzinom	6
1.2 Karzinogenese	20
1.3 Leucin zipper downregulated in cancer 1 (LDOC1)	22
1.4 Metastasis-associated protein 1 (MTA1).....	24
1.5 5-Aza-2'-Desoxycytidine (Decitabin).....	26
1.6 Ziel der Studie.....	29
2. Material und Methoden.....	30
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	31
2.2 Chemikalien und Biochemikalien	32
2.3 Medikamente	34
2.4 Primer	34
2.5 Antikörper	34
2.5.1 Antikörper für Immunfluoreszenz.....	34
2.5.2 Antikörper für Westernblot.....	35
2.6 Kommerziell erhältliche Komplettsysteme	35
2.7 Zellen und Zellkultur.....	36
2.7.1 Verwendete Zelllinien	36
2.7.2 Zellkultur.....	36
2.7.3 Behandlung der Zellen mit Decitabin.....	38
2.7.4 Blaufärbung	39
2.7.5 RNA-Präparation und cDNA-Synthese.....	39
2.7.6 gDNA-Isolierung	41
2.7.7 PCR und PCR-Bedingungen.....	43

2.7.8 Immunoblot (Westernblot)	46
2.7.9 Immunfluoreszenz	47
3. Ergebnisse	49
3.1 Charakterisierung der Mammakarzinomzelllinien	49
3.2 Expression von LDOC1 in Mammakarzinomzelllinien.....	52
3.3 Expression von MTA1 in Mammakarzinomzelllinien	54
3.4 Reexpression von LDOC1 in Mammakarzinomzelllinien nach Behandlung mit Decitabin (5-Aza-2'-deoxycytidin)	56
3.5 Expression von LDOC1 in genomischer DNA von Mammakarzinomzelllinien .	59
3.6 Zellmorphologische Analyse	60
3.7 Immunfluoreszenz.....	64
3.7.1 Immunfluoreszenz der Zelllinie MDA-MB-435S.....	64
3.7.2 Immunfluoreszenz der Zelllinie MDA-MB-468	66
3.7.3 Immunfluoreszenz der Zelllinie MCF-7	67
3.8 Westernblot	68
4. Diskussion	70
4.1 Ausblick	76
5. Zusammenfassung.....	77
6. Literaturverzeichnis	78
7. Abkürzungsverzeichnis.....	85
8. Abbildungsverzeichnis.....	87
9. Tabellenverzeichnis.....	88
10. Danksagung	89
Affidativ.....	90
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1 Daten zum Mammakarzinom

Das Mammakarzinom als weltweit häufigste Krebserkrankung in der weiblichen Bevölkerung hat aufgrund seiner steigenden Inzidenz- und Mortalitätsrate einen hohen Stellenwert in der gegenwärtigen Wissenschaft. Aktuelle Forschungsansätze versuchen zum einen, den Prozess der Karzinogenese weiter aufzuklären sowie zum anderen zielgerichtete Therapieansätze für den klinischen Alltag zu entwickeln, um den an Brustkrebs erkrankten Frauen eine schonende und dennoch effektive Therapie anbieten zu können.

Inzidenz und Mortalität

Das Mammakarzinom ist in Deutschland mit ca. 69.000 Neuerkrankungen pro Jahr nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung der Frau, 1% davon betrifft Männer. Die Mortalität verzeichnete 2016 ca. 19.000 Betroffene. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 87%, die 10-Jahres-Überlebensrate bei 82%.

(https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_nod_e.html)

Die weltweite Inzidenz hat sich 2018 im Vergleich zu 2012 auf ca. 2,1 Millionen erhöht, die Mortalität wies 2018 ca. 630.000 Fälle auf.

(<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf> 2018;
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=breast 2012)

Insgesamt wurden 2018 weltweit 18,1 Millionen Krebsfälle und 9,6 Millionen Todesfälle durch Krebs geschätzt, auch hier zeigt sich ein Anstieg zum Vergleichsjahr 2012.

Das Mammakarzinom macht in der weiblichen Bevölkerung mit 24,2 % den größten Anteil aller Krebsformen aus (Torre, Bray et al. 2015).

Im geographischen Vergleich zeigen sich die höchsten Inzidenzraten in Australien, Neuseeland, Europa und Nordamerika, die höchste Mortalitätsrate in Fiji.

Die geographischen Unterschiede werden durch einen variierenden Zugang zu Screening- und Diagnosemöglichkeiten, aber auch durch regionsspezifische Risiko- und Präventionsprofile vermutet.

Zu den Risiken für die Entstehung von Brustkrebs gehören eine frühe Menarche und späte Menopause (häufige Menstruationszyklen), Nulliparität, Hormoneinnahme (orale

Kontrazeption, Hormonersatztherapie), Alkoholkonsum und Adipositas. Präventiv wirken sich Multiparität, Stillen und körperliche Aktivität aus (Bray, Ferlay et al. 2018). Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 55 bis 64 Jahre (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>).

Formen und Einteilung

Für das Mammakarzinom gibt es eine Reihe von histopathologischen und immunhistochemischen Unterteilungen. Im Folgenden wird näher auf die molekulare und die pTNM-Klassifikation eingegangen.

Die molekulare Typisierung und die mit ihr einhergehende Therapieempfehlung ist auf den St. Gallen-Konsensus zurückzuführen. Anhand des Expressionsprofils werden hier vier Karzinomsubtypen unterschieden. Es ist anzumerken, dass die Grenzwerte für den Proliferationsfaktor Ki-67 nicht einheitlich gehandhabt werden. Die in der Tabelle aufgeführten Grenzwerte für Ki-67 richten sich nach der aktuellen S3-Leitlinie und den AGO-Empfehlungen für das Mammakarzinom (Untch, Harbeck, Thomssen 2018: 67-70), (Goldhirsch, Winer et al. 2013), (Montagna, Bagnardi et al. 2011).

Molekulare Klassifikation:

	Luminal A	Luminal B Her2 negativ	Luminal B Her2 positiv	Her2	Basal-Like triplenegativ
ER	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ
PR	Positiv	Positiv/Negativ	Positiv/Negativ	Negativ	Negativ
HER2	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ
Ki-67	Niedrig (<10%)	Hoch (>25%)			
Grading	G1, G2	G2, G3	G2, G3	G2, G3	G1, G2, G3

Tabelle 1: molekulare Typisierung des Mammakarzinoms

(Untch, Harbeck, Thomssen 2018: 67-70) (Esposito, Criscitiello et al. 2015)

(<http://www.ago-online.de/de/infothek-fueraerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/>)

Die pTNM-Klassifikation ist eine anatomisch-pathologische und histopathologische Einteilung am Operationspräparat. **T** beschreibt hier die Tumorausdehnung, **N** den regionären Lymphknotenbefall und **M** das Vorliegen von Fernmetastasen. Das Präfix

y(p) wird verwendet, wenn bereits eine neoadjuvante Chemotherapie erfolgte. Tumorrezidive werden mit **r(p)** bezeichnet.

Die **R**-Klassifikation gibt den Resektionsstatus des Tumors an.

pTNM-Klassifikation:

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pTis (DCIS)	Duktales Carcinoma in situ
pTis (LCIS)	Lobuläres Carcinoma in situ
pTis (Paget) ^a	Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbaren Tumor
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	Mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b	Mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	Mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 3 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand ^b oder Haut
pT4a	Mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	Mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzerationen der Brusthaut ^b oder Satellitenmetastasen der Haut derselben Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

^a die Paget-Erkrankung, kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor, wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert

^b Die Brustwand schließt die Rippen, die intrakostalen Muskeln und den vorderen Serratusmuskel ein, nicht aber die Pektoralismuskulatur

pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
pN0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen ^c

pN1mic	Mikrometastase (größer als 0,2 mm, aber nicht größer als 2 mm in max. Ausdehnung)
pN1	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopische/en Metastase(n), die bei der Sentinel-Lymphknoten-Dissektion entdeckt wurde(n), aber nicht klinisch erkennbar ^d war(en)
pN1a	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung
pN1b	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer/en Metastase(n), die bei der Sentinel-Lymphknoten-Dissektion entdeckt wurde(n), aber nicht klinisch erkennbar war(en)
pN1c	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer/en Metastase(n), die bei der Sentinel-Lymphknoten-Dissektion entdeckt wurde(n), aber nicht klinisch erkennbar war(en)
pN2	Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ^e ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN2a	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung
pN2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbarer/en , mikroskopisch nachweisbarer/en Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

pN3a	Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest einer größer als 2 mm in max. Ausdehnung)
pN3b	Metastase(n) in klinisch erkennbarem/en Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinel-Lymphknoten-Dissektion, aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

^c Fälle, bei denen nur isolierte Tumorzellen in regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden, werden als pN0(i+) klassifiziert. Isolierte Tumorzellen sind definiert als einzelne Tumorzellen oder kleine Ansammlungen von Zellen, die in ihrer größten Ausdehnung 0,2 mm nicht überschreiten und gewöhnlich mittels Immunhistochemie oder molekularen Methoden entdeckt werden. Manchmal können sie mittels H&E-Färbung verifiziert werden. Isolierte Tumorzellen zeigen typischerweise keine Hinweise auf eine metastatische Aktivität, d.h. Proliferation oder Stromareaktion

^d nicht klinisch erkennbar = nicht entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder der bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie)

^e klinisch erkennbar = entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder der bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie) oder makroskopisch vom Pathologen erkannt

pM	Fernmetastasen
pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

(Bauernfeind 2015: 82-85)

Früherkennung

Früherkennung regulär:

Laut der aktuellen S3-Leitlinie für das Mammakarzinom von 2019 sollte neben einer ausführlichen Anamnese und einem Aufklärungsgespräch über mögliche Risikofaktoren Frauen ab einem Alter von 30 Jahren eine klinische Brustuntersuchung angeboten werden. Bei Frauen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr sollte eine Mammografie im Abstand von zwei Jahren im Rahmen des Nationalen Mammografie Screening Programms erfolgen. Ab dem 70. Lebensjahr ist die Mammografie unter Berücksichtigung des individuellen Risikos anzubieten. Eine alleinige Sonografie ist bisher nicht empfohlen, kann aber im individuellen Fall als ergänzende Diagnostik eingesetzt werden (AWMF 2019: 43-53)

Früherkennung bei erhöhtem Risiko:

Frauen mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko sind definiert als Frauen mit familiärer Belastung, Frauen mit bereits aufgetretenen Brustkrankungen und Präkanzerosen sowie Frauen im höheren Lebensalter aufgrund der Altersverteilung des Mammakarzinoms. Eine regelmäßige Anamnese und klinische Untersuchung ist in allen Risikokonstellationen unerlässlich (Bauernfeind 2015: 13).

Bei einer familiären Mammakarzinombelastung ist aufgrund einer Mutationswahrscheinlichkeit eine genetische Testung nach ausführlicher Aufklärung der Frau über möglichen Folgen zu empfehlen.

Das familiäre Risiko ist erhöht wenn:

- mindestens drei Frauen an Brustkrebs erkrankt sind
- mindestens zwei Frauen an Brustkrebs erkrankt sind, davon eine vor dem 51. Lebensjahr
- mindestens eine Frau an Brustkrebs und eine Frau an Eierstockkrebs erkrankt sind
- mindestens zwei Frauen an Eierstockkrebs erkrankt sind
- mindestens eine Frau an Brust- und Eierstockkrebs erkrankt sind
- mindestens eine Frau mit 35 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt ist
- mindestens eine Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Brustkrebs erkrankt ist
- mindestens ein Mann an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt sind

(AWMF 2019: 53)

Bei Vorliegen einer pathogenen BRCA1/2-Mutation ist eine intensivierete Früherkennung empfohlen.

Diese beginnt im Alter von 25 Jahren oder fünf Jahre vor dem frühesten Erkrankungsalter in der Familie mindestens bis zur Vollendung des 50. Lebensjahrs und längstens bis zur Vollendung des 70. Lebensjahrs oder bis zu einer sehr guten mammografischen Beurteilbarkeit. Danach ist die Entlassung in die Regelversorgung möglich.

Die intensivierete Früherkennung besteht aus einer halbjährlichen Sonografie, einer jährlichen MRT sowie einer Mammografie ab dem 40. Lebensjahr alle ein bis zwei Jahre. Vor dem 40. Lebensjahr ist die Mammografie nur nach strenger individueller Indikationsstellung zu empfehlen.

Bei Vorliegen einer pathogenen Mutation in anderen Genen als BRCA1/2 beginnt die Früherkennung bei nicht erkrankten Risikopatientinnen mit dem 30. Lebensjahr oder fünf Jahre vor dem frühesten Erkrankungsjahr in der Familie, bei bereits an Brustkrebs erkrankten Patientinnen beginnt die weitere Früherkennung ab dem Erkrankungsalter. Das Ende der Früherkennungsmaßnahmen entspricht demselben wie bei Vorliegen einer BRCA1/2 Mutation. Auch die Sonografie, Mammografie und MRT unterliegen den selben Empfehlung wie bei Trägerinnen einer BRCA-Mutation.

Risikopatientinnen ohne den Nachweis einer pathogenen Mutation in einem Hochrisikogen ist eine intensivere Früherkennung ebenfalls ab dem 30. Lebensjahr oder fünf Jahre vor dem frühesten Erkrankungsjahr in der Familie empfohlen, bei bereits an Brustkrebs erkrankten Frauen ab dem Erkrankungsalter.

Die intensivierete Früherkennung geht hier ab dem 50. Lebensjahr in das reguläre Früherkennungsprogramm über.

Die Sonografie und die MRT sind jährlich empfohlen, die Mammografie ab dem 40. Lebensjahr alle ein bis zwei Jahre (Bauernfeind 2015: 35-36).

Diagnostik

Mammografie:

Die Mammografie ist ein radiologisches Verfahren, das die Brustdrüse in zwei Ebenen (kranio-kaudal und medio-lateral) darstellt. Indiziert ist die im Rahmen der Früherkennung und der Nachsorge, bei auffälligem Sonografiebefund, und bei klinisch auffälliger Untersuchung.

Die Sensitivität der Mammografie hängt von der Dichte der Brustdrüse ab, nur in wenigen Fällen ist die Mammografie spezifisch (Bauernfeind 2015: 38-39).

Die Brustdrüsendichte wird anhand des American College of Radiology (ACR) angegeben.

ACR-Klassifikation

ACR	Beurteilung
A	Die Brust besteht nahezu vollständig aus Fettgewebe
B	Es finden sich verstreut fibroglanduläre Verdichtungen
C	Das Brustgewebe ist von heterogener Dichte. Die Sensitivität der Mammografie ist verringert
D	Das Brustgewebe ist extrem dicht. Die Sensitivität der Mammografie ist deutlich verringert.

Tabelle 3: ACR-Klassifikation des Mammakarzinoms

(Monticciolo, Rebner et al. 2013) (Bauernfeind 2015: 39)

Anhand der BI-RADS-Klassifikation (Breast Imaging Reporting and Data System) wird eine Malignomwahrscheinlichkeit des Mammografiebefunds gegeben. Diese beinhaltet ebenso eine Abklärungsempfehlung.

BI-RADS-Klassifikation

BI-RADS	Final assessment meaning	Likelihood of breast cancer
0	Need additional imaging evaluation and/or prior imaging for comparison	Not acceptable
1	Negative	Negligible
2	Benigne finding	Negligible
3	Probably benigne finding	< 2%
4	Suggestive of abnormality	23-34%
5	Highly suggestive of malignancy	>= 95%

6	Malignancy confirmed by biopsy	100%
---	--------------------------------	------

Tabelle 4: BI-RADS-Klassifikation des Mammakarzinoms

(Castro, Tseytlin et al. 2017)

Mammasonografie:

Indikationen für die Mammasonografie sind die Abklärung auffälliger Tastbefunde, die Untersuchung bei Hochrisikopatientinnen, die Kontrolle von Silikonimplantaten sowie ergänzend zur Mammografie bei klinisch okkulten mammografischen Befunden, differenzialdiagnostisch bei auffälligen mammografischen Befunden und bei mammografisch dichter Brustdrüse (ACR C und D). Ebenso wird die Mammasonografie bei der interventionellen Diagnostik unterstützend genutzt.

Malignomverdächtige Bildkriterien sind ein hyperechogener Randsaum, eine unscharfe, unregelmäßige Berandung, eine Unterbrechung der Umgebungsstrukturen, eine hypoechogene Binnenstruktur und eine dorsale Schallauslöschung.

Analog zur Mammografie werden die Mammasonografiebefunde ebenfalls nach der BI-RADS-Klassifikation eingeteilt (Bauernfeind 2015: 42).

Magnetresonanztomografie (MRT):

In der Mammadiagnostik ist die MRT das sensitivste diagnostische Verfahren. Sie wird zur Früherkennung bei Hochrisikopatientinnen und bei bestehenden Unklarheiten nach Durchführung aller weiteren diagnostischen Möglichkeiten eingesetzt. Außerdem dient die MRT bei gesichertem Mammakarzinom der Beurteilung der lokoregionären Ausbreitung (Bauernfeind 2015: 43-44).

Positronenemissionstomografie (PET):

Für eine PET-CT wird das Radiopharmakon ¹⁸F-Fluordesoxyglucose (FDG) intravenös verabreicht und in Kombination mit einer Computertomografie (CT) angewandt, um Gewebe und Tumore mit erhöhtem Glucosestoffwechsel zu detektieren (Bauernfeind 2015: 45-46).

Eine generelle Empfehlung zum Einsatz der PET-CT im Rahmen der Diagnostik oder Nachsorge wird laut aktueller S3-Leitlinie von 2019 nicht gegeben (AWMF 2019: 77-78).

Minimalinvasive Diagnostik:

Die minimalinvasiven Diagnosemethoden dienen der histologischen Sicherung von suspekten Läsionen (BI-RADS 4/5) zur weiteren Therapieplanung. Diese erfolgt

mammografisch-, mammasonografisch- oder MRT-gesteuert. Mit der Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie erfolgt die Entnahme von mehreren Proben sonografiegesteuert. Bei der meist mammografisch gesteuerten Vakuumbiopsie kann ein größeres Volumen abgetragen werden und ist vor allem bei der Abklärung von Mikroverkalkungen empfohlen.

Zur korrekten Befundung ist eine Korrelation von Bildgebung und Histologie notwendig. Durch eine Clipmarkierung können kleine Läsionen beziehungsweise die Biopsiehöhle für eine gegebenenfalls folgende Exzision markiert werden. Auch vor einer neoadjuvanten Chemotherapie kann das Tumorbett mit einem Clip markiert werden, um so in der Bildgebung das Ansprechen der Therapie zu evaluieren.

Bei Vorliegen von mammografisch, sonografisch oder magnetresonanztomografisch suspekten, klinisch nicht palpablen Befunden ist präoperativ eine Drahtmarkierung unter bildgebender Kontrolle zu erfolgen. Dabei wird die Drahtspitze in dem suspekten Befund verankert (Bauernfeind 2015: 46-49).

Staging:

Ein Ganzkörperstaging ist bei Frauen mit klinischem Verdacht auf Metastasierung, hohem Metastasierungsrisiko (N+, >T2) und/ oder aggressiver Tumorbilogie indiziert. Es besteht aus einer CT des Thorax und Abdomens sowie einer Skelettszintigraphie (AWMF 2019: 77).

Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms ist multimodal und besteht aus dem operativen Vorgehen, der Strahlentherapie und der adjuvanten/ neoadjuvanten Systemtherapie. Das gewählte Behandlungskonzept hängt individuell von der Patientin und der Tumorcharakteristik ab.

Operative Therapie:

Bei der operativen Entfernung eines duktales Carcinoma in situ (DCIS) sollen laut aktueller S3-Leitlinie die Resektionsränder mindestens 2 mm betragen. Eine Axilladisektion ist beim DCIS nicht nötig.

Die Möglichkeit der brusterhaltenen Therapie (BET) ist bei Vorliegen eines invasiven Mammakarzinoms bei günstiger Relation zwischen Tumorgröße und Brustvolumen gegeben. Hier schließt sich obligat eine Strahlentherapie an. Die Resektionsränder sollen frei sein, ein bestimmter Resektionsabstand ist nicht gefordert.

Indikationen für eine Mastektomie sind die inkomplette Tumorentfernung, das inflammatorische Mammakarzinom, eine Kontraindikation zur Nachbestrahlung nach BET und der Wunsch der Patientin entsprechend nach ausführlicher Aufklärung. In diesem Zuge sind ein- oder zweizeitige plastisch rekonstruktive Eingriffe zum Wiederaufbau der Brust möglich (AWMF 2019: 90-94).

Das therapeutische/ operative Vorgehen der Axillaregion ist bisher nicht eindeutig geklärt und ist weiterhin Bestandteil laufender Studien. Je nach Leitlinie gibt es Unterschiede in der Empfehlung. Die aktuelle S3-Leitlinie sieht ein axilläres Staging im Sinne einer Sentinellymphknotenbiopsie im Rahmen der operativen Therapie bei allen invasiven Mammakarzinomen vor.

Die Indikation für oder gegen die Axilladisektion ist stark von der Tumorausdehnung, dem klinischen Lymphknotenbild und der postoperativen Strahlentherapie beziehungsweise der neoadjuvanten/ adjuvanten Systemtherapie abhängig (AWMF 2019: 95-99).

Adjuvante Strahlentherapie:

Die adjuvante Strahlentherapie ist grundsätzlich im Anschluss einer brusterhaltenden operativen Therapie durchzuführen und erfolgt hypofraktioniert mit 40-50 Gy in einem Zeitraum von ca. drei bis sechs Wochen. Eine Dosisaufsättigung (Boost-Bestrahlung) senkt das lokale Rezidivrisiko und wird allen Patientinnen unter dem 50. Lebensjahr und allen Patientinnen über dem 50. Lebensjahr bei erhöhtem Rezidivrisiko verabreicht.

Die Radiatio der Brustwand nach Mastektomie ist indiziert bei pT4-Tumoren, pT3-Tumoren und dem zusätzlichen Vorliegen von Risikofaktoren (G3, L1, prämenopausaler Status, Alter unter 50 Jahren), R1-, R2- Resektionen sowie mehr als drei befallenen axillären Lymphknoten.

Auch die Radiatio des regionalen Lymphabflussgebiets spielt eine Rolle im strahlentherapeutischen Management. Sind über drei axilläre Lymphknoten befallen, ist eine Bestrahlung der supra- und infraklavikulären Lymphknoten obligat. Beim Befall von unter drei axillären Lymphknoten hängt die Bestrahlungsindikation von weiteren Zusatzkriterien ab.

Die Bestrahlung der A. mammaria interna Lymphknoten unterliegt ebenfalls besonderen Kriterien. So besteht hier beispielsweise eine Indikation zur Bestrahlung ab drei befallenen axillären Lymphknoten und zusätzlicher G2-3 Situation oder ER/ PgR-Positivität. Sind die Lymphknoten der A. mammaria interna befallen sollten diese grundsätzlich bestrahlt werden.

Die Bestrahlung der Axilla kann bei ein bis zwei positiven Sentinellymphknoten ohne weitere axilläre Therapie erfolgen.

Falls Inoperabilität vorliegt ist die Strahlentherapie nach primärer Systemtherapie und Operation empfohlen, gegebenenfalls auch als alleiniger oder präoperativer Therapieansatz zu wählen (AWMF 2019: 79-83, Kurzversion).

Auch in der Rezidivsituation zählt die Radiatio zum Therapieregime, so zum Beispiel zur Systemkontrolle in palliativer Intention (AWMF 2019: 96, Kurzversion).

Systemische Therapie:

Die systemische Therapie des Mammakarzinoms ist hoch komplex und besteht bei der lokoregionären Primärerkrankung aus den Komponenten endokrine Therapie, systemische Chemotherapie und Antikörpertherapie in der Adjuvanz und Neoadjuvanz, weiter finden auch zunehmend gezielte Therapien gegen bestimmte tumorspezifische Marker Anwendung. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird ebenfalls auf das Therapieregime in der rezidivierten und metastasierten Situation eingegangen.

Endokrine Therapie:

Eine endokrine Therapie ist bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven invasiven Karzinomen indiziert und soll nach Abschluss der Chemotherapie durchgeführt werden. Zur Verfügung stehen der selektive Östrogenrezeptor Modulator Tamoxifen, der eine antiöstrogene Wirkung im Brustgewebe hat sowie Aromataseinhibitoren, die die Östrogensynthese hemmen. Tamoxifen wird bei prämenopausalen Frauen je nach Risikoprofil für einen Zeitraum von fünf bis zehn Jahren eingesetzt. Alternativ zur Therapie mit Tamoxifen können in der Prämenopause auch GnRH-Analoga eingesetzt werden, um die Östrogenproduktion der Ovarien zu supprimieren. In der Postmenopause werden hauptsächlich Aromatasehemmer eingesetzt (AWMF 2019: 166-170).

Chemotherapie:

Eine Indikation zur adjuvanten Chemotherapie besteht bei Her2-Positivität, triplenegativen Tumoren und Luminal B-Tumoren mit hohem Rezidivrisiko.

Die Standard Chemotherapie in der Adjuvanz besteht aus einem Taxan und einem Anthrazyklin und wird in einem Zeitraum von 18 bis 24 Wochen verabreicht.

Ein neoadjuvantes Therapiekonzept ist bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen, primär inoperablen und inflammatorischen Mammakarzinomen vorgesehen. Vorteil einer neoadjuvanten präoperativen Therapie ist die höhere Rate an brusterhaltenen

Therapien. Chemotherapien in der Neoadjuvanz bestehen ebenfalls aus einem Taxan und einem Anthrazyklin und werden für 18 bis 24 Wochen eingesetzt.

Metastasierte Situation:

Liegt ein positiver Hormonrezeptorstatus vor ist die endokrine Therapie in der metastasierten Situation die Therapie der Wahl, abhängig vom Therapiedruck.

Bei Her2-Positivität ist eine Kombination aus Chemotherapie oder endokriner Therapie und Anti-Her2-Therapie empfohlen (AWMF 2019: 206).

Prämenopausal erfolgt die Ausschaltung der Ovarfunktion in Kombination mit Tamoxifen und wird gegebenenfalls mit CDK4/6-Inhibitoren ergänzt. Postmenopausal kommen hauptsächlich Aromataseinhibitoren in Kombination mit CDK4/6 Inhibitoren zum Einsatz (AWMF 2019: 207-209).

Im Falle eines Nichtansprechens bzw. einer Progression bei Ausschöpfen aller endokrinen Behandlungsmaßnahmen ist eine Therapieumstellung auf Zytostatika indiziert. Insgesamt sollte zunächst aufgrund der besseren Verträglichkeit eine zytostatische Monotherapie angestrebt werden. Zum Einsatz kommen können hier Alkylanzien, Anthrachinone, Anthrazykline, Eribulin, Fluorpyrimidine, Platinkomplexe, Taxan und Vinorelbin (AWMF 2019: 221-222).

Wird die Chemotherapie (Paclitaxel, Capeticabine) mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab kombiniert zeigen sich erhöhte Remissionsraten sowie ein erhöhtes progressionsfreies Überleben (Zielinski, Láng et al. 2016) (AWMF 2019: 213-214).

Besteht in der metastasierten Situation Her2-Positivität, ist in der Erstlinientherapie eine Kombination aus einem Taxan und der dualen Blockade mittels Trastuzumab und Pertuzumab vorgesehen, in der Zweitlinientherapie der Einsatz von T-DM1 (AWMF 2019: 223).

Liegt eine ossäre Metastasierung vor, besteht neben der analgetischen Therapie die Möglichkeit der lokalen Intervention und der systemischen Therapie.

Eine lokale Bestrahlung oder eine operative Stabilisierung kann aufgrund von Bewegungseinschränkung, Frakturgefahr oder bereits eingesetzter neurologischer Symptomatik von Nöten sein (AWMF 2019: 225).

Systemisch werden zur Osteoprotektion und Vermeidung von Komplikationen Bisphosphonate und RANK-Ligand Antikörper (Denosumab) verwendet (AWMF 2019: 228).

Im Rahmen der Metastasierung beim Mammakarzinom kommt es häufig zu zerebralen Metastasen. Hirnmetastasen können zusätzlich zur systemischen Therapie mit Hilfe

von Radiotherapie, Radiochirurgie oder chirurgischer Maßnahmen therapiert werden. Gelegentlich kommt auch eine Kombination dieser Verfahren in Betracht. Die chirurgische Resektion kann bei singulären Hirnmetastasen angewendet werden und bietet zusätzlich die Möglichkeit der histologischen Sicherung. Für das radiochirurgische Verfahren eignen sich singuläre Metastasen bis zu 3 cm und eine limitierte Anzahl von bis zu vier Einzelmetastasen. Eine Ganzhirnbestrahlung kommt bei multipler zerebraler Metastasierung zum Einsatz oder wenn ein anderes Therapieverfahren aufgrund des Allgemeinzustands der Patientin nicht möglich erscheint (AWMF 2019: 229-233).

Im Falle einer hepatischen Metastasierung können ebenso ergänzend zur systemischen Therapie lokale Interventionsmaßnahmen erfolgen. Hier gibt es neben der operativen Resektion von einzelnen Lebermetastasen die Möglichkeit der Radiofrequenzablation (RFA), der transarterielle Chemoembolisation (TACE), der stereotaktischen Bestrahlung (SBRT) und der Yttrium-90-Radioembolisation (SIRT) als lokoregionäres Verfahren (AWMF 2019: 234).

Auch einzelne pulmonale Metastasen können reseziert oder lokal mittels RFA und SBRT behandelt werden. Symptomatische Pleuraergüsse können mittels Pleurodese kontrolliert werden (AWMF 2019: 235).

Das hereditäre Mammakarzinom

In Deutschland liegt in ca 30% der Mammakarzinomfälle eine familiäre Belastung vor (AWMF 2019: 53).

Die Hochrisikogene für BRCA1 und BRCA2 wurden in den 90er Jahren entdeckt. (Wooster, Bignell et al. 1995) (Hall, Lee et al. 1990)

Hierbei handelt es sich um heterozygote Keimbahn-Mutationen. Diese Gene werden autosomal dominant vererbt. Die Mutation kann auch auf zelluläre Ebene im Sinne einer somatischen Mutation entstehen ohne dass ein Vererbungsmechanismus zugrunde liegt (Untch, Harbeck, Thomssen 2018: 96).

Geht die Heterozygotie durch einen Schaden verloren, sodass das zweite (gesunde) Allel so nicht mehr funktionsfähig ist, entsteht der Tumor (Knudson 1971).

Die Einschlusskriterien für eine genetische Untersuchung und der daraus resultierende Vorsorgealgorithmus wurden bereits oben im Text genannt.

Kommen mehrere Gene wie beim erblich bedingten Brust- und Eierstockkrebs in Frage ist eine Multi-Gen-Panel-Testung sinnvoll (Untch, Harbeck, Thomssen 2018: 104)

Bei Frauen mit einer bestätigten BRCA1- oder BRCA2-Mutation ist das durchschnittliche Erkrankungsalter ca. 20 Jahre früher als ohne nachgewiesene Mutation. Liegt eine Mutation vor, erkranken ca. 70% der Betroffenen.

Auch das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken ist erhöht. Im Falle einer BRCA1-Mutation liegt es bei ca 50%, im Falle einer BRCA2-Mutation bei 15-20% (Untch, Harbeck, Thomssen 2018: 94-95).

Auch das Auftreten von ipsi- und kontralateralen Zweitkarzinomen ist bei BRCA-Trägern erhöht (Rhiem, Engel et al. 2012).

Neben den Hochrisikogenen BRCA1 und BRCA2 konnten auch weitere Genen identifiziert werden, die mit einem erhöhten Mamma- und Ovarialkarzinomrisiko assoziiert sind (AWMF 2019: 54).

Veränderungen in den Genen BRCA1, BRCA2, CDH1, TP53, PTEN und STK11 sind hoch penetrant und führen zu einem über vierfach erhöhten Erkrankungsrisiko, Veränderungen in den Genen ATM, PALB2, CHEK2, RAD51C, RAD51D, NBN und BARD1 gelten als moderat penetrant (zwei- bis vierfach erhöhtes Erkrankungsrisiko) (Untch, Harbeck, Thomssen 2018: 93).

Aus pathologischer Sicht weisen BRCA1-mutierte Mammakarzinome häufig folgende Kriterien auf: invasives Karzinom mit medullären Eigenschaften, G3-Morphologie, Triplengativität und hoher Proliferationsindex (Ki-67).

Entwickelt eine Frau mit nachgewiesener Mutation für BRCA1/2 ein Mammakarzinom so richtet sich die Therapie nach den Prinzipien des sporadisch entstandenen Mammakarzinoms.

Zu den prophylaktischen, risikoreduzierenden Operationsverfahren zählen die beidseitige prophylaktische Mastektomie sowie die beidseitige prophylaktische Salpingo-Oophorektomie. Diese Maßnahmen reduzieren das Risiko an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken signifikant. Auch die kontralaterale Mastektomie bei bereits bestehendem Mammakarzinom reduziert die Inzidenz für ein Zweitkarzinom (AWMF 2019: 54-64).

1.2 Karzinogenese

Karzinogenese beschreibt den komplexen Entstehungsprozess eines malignen Tumors und ist bis heute einer der Schwerpunkte in der onkologischen Forschung.

Die Erkenntnis über diese Entstehungsprozesse soll die Entwicklung zielgerichteter und gut verträglicher Krebstherapien ermöglichen.

Die Krebsforscher Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg beschrieben in ihrem Artikel „Hallmarks of Cancer“ die Kennzeichen und Fähigkeiten von Krebszellen (Hanahan and Weinberg 2000).

2011 folgte ein weiterer Artikel: „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“. Hier wurden die bereits vorbeschriebenen sechs Fähigkeiten einer Zelle zur Karzinogenese auf insgesamt acht erweitert.

Diese sind:

- Das Aufrechterhalten der Proliferation
- Das Standhalten gegenüber Wachstumsfaktorinhibitoren
- Die Aktivierung von Invasion und Metastasierung
- Die Möglichkeit zur unlimitierten Replikation
- Das Einleiten von Angiogenese
- Der Widerstand gegen den programmierten Zelltod
- Die Standhaftigkeit gegenüber dem Immunsystem
- Die Reprogrammierung des Energiemetabolismus

Die vorliegende Arbeit beschreibt unter anderem die Herunterregulation des Tumorsuppressorgens LDOC1 in Krebszellen und zeigt somit eine der oben beschriebenen „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan and Weinberg 2011). Der Großteil der Krebsentstehung ist eine Folge sporadischer Mutation. In 10-30% aller Krebserkrankungen liegt jedoch eine familiär vererbte Keimbahnmutation vor, hierzu zählen zum Beispiel die Gene MSH1, MSH2, APC, BRCA1 und BRCA2.

Durch epigenetische Prozesse kann es bei genetischen Mutationen zu einer Veränderung kommen. Diese epigenetischen Prozesse führen durch DNA-Methylierung (Promoter-Hypermethylierung), Chromatinveränderungen, Histonmodifikation und gesteigerter microRNA-Expression zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Ursächlich für die epigenetischen Veränderungen können Umweltfaktoren und Kanzerogene sein. Diese sind teilweise durch die Anwendung von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und Histon-Deacetylase-Inhibitoren reversibel und bieten hier einen geeigneten therapeutischen Angriffspunkt (Peltomäki 2012) (Ducasse and Brown 2006) (Jones and Baylin 2002).

1.3 Leucin zipper downregulated in cancer 1 (LDOC1)

Nagasaki et al. identifizierten 1999 ein neues Gen, LDOC1 (Leucin zipper downregulated in cancer 1), das für ein Leucin Zipper Protein kodiert. Es wird auf Chromosom Xq27 abgebildet, trägt ein Leucin Zipper Motiv an der N-terminalen Region sowie eine prolinreiche Region, die einer SH3-Bindungsdomäne ähnlich ist.

Die Identifizierung von LDOC1 gelang durch die DD-Methode (differential display), einem Screening unterschiedlicher Gene auf mRNA-Ebene mittels PCR.

Hier wurden verschiedene Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, SK-BR3, T47D, ZR-75-1, MDA-MB-468, MDA-MB-231, BT-20) sowie Zelllinien aus Pankreas, Kolon, Lunge, Magen, Uterus, Mundhöhle, Melanom und Neuroepitheliom getestet. Es gelang der Nachweis von LDOC1 in der mRNA der Zelllinien MCF-7, BT-20, ZR-75-1, MDA-MB-231, SK-BR3, T47D, keine Expression jedoch in der Zelllinie MDA-MB-468 sowie in einigen Pankreas- und Magenkarzinomzelllinien.

Ebenso konnten weitere Eigenschaften des neu identifizierten Gens LDOC1 dargestellt werden. Die cDNA-Sequenz von LDOC1 besteht am 5'-Ende aus einer untranslatierten Region von 104 bp sowie einer open frame region von 403 bp. Das 3'-Ende besteht aus einer untranslatierten Region von 834 bp sowie dem Polyadenylationssignal AATAAA.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die Darstellung von LDOC1 im Nukleus der Zelllinie MCF-7 gezeigt werden. Somit handelt es sich um ein nukleäres Protein (Nagasaki, Manabe et al. 1999).

2003 gelang es Nagasaki et al. herauszufinden, dass LDOC1 als negativer Regulator in dem Signaltransduktionsweg von nuclear factor kappa B (NF- κ B) in Pankreaskarzinomzellen involviert ist. LDOC1 verhindert die Aktivität von NF- κ B und verstärkt somit den antiproliferativen Effekt. Dies gelingt durch das Eingreifen in die mitogen-activated protein kinase/ ERK kinase kinase 1 (MEEK)-induzierte NF- κ B-Aktivierung sowie die Aktivierung durch ligandeninduzierte Stimulierung von tumor necrosis factor- α (TNF- α) und phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Auch eine direkte Inaktivierung von NF- κ B durch LDOC1 scheint möglich (Nagasaki, Schem et al. 2003).

Auch in Zellen des papillären Schilddrüsenkarzinoms konnte dieser Effekt beobachtet werden. Mit LDOC1 infizierte Karzinomzellen zeigen eine erhöhte Apoptoserate durch eine gesteigerte Caspase3-Produktion auf. Auch hier konnte der

Signaltransduktionsweg von TNF- α und NF- κ B als häufigster Mechanismus des Zellüberlebens in Tumorzellen durch die Interaktion mit LDOC1 reduziert werden (Zhao, Wang et al. 2015).

Inoue et al. konnten 2004 einen apoptotischen Effekt von LDOC1 in den Zelllinien Jurkat und K562 nachweisen. Durch eine induzierte Überexpression von LDOC1 kommt es hier zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, zur Aktivierung von Kaspasen und so zur Apoptose. In einer weiteren Beobachtung konnte festgestellt werden, dass LDOC1 am ehesten durch eine Protein-Protein Verbindung der prolinreichen Region oder des Leucinzippers mit dem Transkriptionsfaktor MZF1 (myeolid zinc finger 1) interagiert und so den antiapoptotischen Effekt von MZF1 hemmt. Durch diese Inaktivierung kommt es somit zur Apoptose (Inoue, Takahashi et al. 2005).

2013 konnte durch Lee et. al eine wachstumshemmende Funktion der Tumorsuppressorgene LDOC1 und BEX1 (brain expressed X-linked) in oralen Plattenepithelkarzinomen (oral squamous cell carcinoma, OSCC) nachgewiesen werden. Durch DNA-Hypermethylierung sind diese Tumorsuppressoren zunächst ausgeschaltet. Nach dem Zusatz des DNA-Methyltransferaseinhibitors Azacytidin konnte eine Reaktivierung von LDOC1 und BEX1 gezeigt werden. Die wachstumshemmende Funktion von LDOC1 und BEX1 bei oralen Plattenepithelkarzinomen ergibt sich auch hier durch die Hemmung des Signaltransduktionsweg von TNF- α und NF- κ B (Lee, Wong et al. 2013).

In einer weiteren Arbeit von Lee et al. 2015 konnte gezeigt werden, dass es durch eine nur kurzzeitige Behandlung von Zellen mit CSC (cigarette smoke condensate) zu einer Steigerung der Promotermethylierung des LDOC1-Gens und somit zu einer Ausschaltung seiner Funktion als Tumorsuppressorgen kommt (Lee, Pan et al. 2015). Auch bei Zelllinien des Zervixkarzinoms und des Ovarialkarzinoms konnte herausgefunden werden, dass LDOC1 in einigen Zelllinien durch Promotormethylierung herunterreguliert ist und durch die Zugabe des DNA-Methyltransferaseinhibitors Azacytidin reexprimiert werden kann und so seine Fähigkeit als Tumorsuppressorgen gesteigert ist (Buchholtz, Juckstock et al. 2013) (Buchholtz, Bruning et al. 2014).

Bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wurde eine starke Herunterregulierung von LDOC1 in mutierten CLL-Fällen im Vergleich zu unmutierten CLL-Fällen gezeigt. Jedoch konnte hier auch herausgefunden werden, dass eine

hohes LDOC1-Level mit Biomarkern für eine schlechte Prognose korreliert (Duzkale, Schweighofer et al. 2011).

1.4 Metastasis-associated protein 1 (MTA1)

MTA1 (metastasis-associated protein 1) gehört zur Familie der MTA-Proteine und wurde 1994 von Toh et al. erstmals beschrieben. Das aus 703 Aminosäuren bestehende Protein wird sowohl in normalen Geweben, als auch in Karzinomgeweben exprimiert und kann hier mit dem Invasions- und Metastasierungspotential in Korrelation gebracht werden (Toh, Pencil et al. 1994).

Zu seinen strukturellen Eigenschaften gehören ein SH-Bindungs-Motiv am C-terminalen Ende, ein Zinkfinger-Motiv vom GATA-Typ, ein SPXX-Motiv ein Leucinzipper-Motiv, die BAH-Domäne (bromo-adjacent homology domain) und die SANT-Domäne (SWI, ADA2, N-CoR, TFIIIB-B domain) (Nawa, Nishimori et al. 2000) (Toh and Nicolson 2009).

MTA-Proteine zeigen physiologische und pathologische Funktionen. In normalen Geweben fungieren sie als Co-Aktivatoren und Co-Repressoren im Rahmen der Genexpression. Auch kommen sie in verschiedenen Organsystem wie dem Auge, dem Gehirn, der Leber und der Brustdrüse vor und spielen in physiologischen Abläufen wie der Spermio-genese, der Immunmodulation, der zirkadianen Rhythmik, der Hämatopoese und bei Entzündungsreaktionen eine Rolle. MTA1 wird besonders im Nerven-, Reproduktions-, Immun-, Urogenital-, Verdauungs-, sensorischem und endokrinologischem System exprimiert (Sen, Gui et al. 2014).

Es ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und im Vergleich zu den anderen Proteinen der MTA-Gruppe vermehrt in Karzinomgeweben nachweisbar (Liu, Wang et al. 2014). 1997 konnte durch Toh et al. gezeigt werden, dass MTA1 in gastrointestinalen Malignomen überexprimiert wird und mit einer höhergradigen Invasionstiefe und Metastasierungsrate assoziiert ist.

Durch die oben genannten strukturellen Eigenschaften sind die MTA-Proteine dazu in der Lage Protein-Protein-Bindungen und DNA-Protein-Bindungen einzugehen und sich so in Signaltransduktionswege und die Regulierung von Genexpression zu involvieren. Dies gelingt durch verschiedene molekulare Mechanismen:

- Nucleosomremodelling und Histon-Deacetylierung:

MTA1 als Bestandteil des NuRD-Komplexes (nucleosome remodelling and histone deacetylation) führt zur Transkriptionsunterdrückung und somit Regulierung von Genexpression.

- Interaktion mit dem Östrogenrezeptor:

Durch direkte Interaktion von MTA1 mit dem Östrogenrezeptor findet eine Histon-Deacetylierung statt. Dieser Vorgang unterdrückt die Funktion des Östrogenrezeptors und begünstigt die Entstehung eines östrogenrezeptornegativen, aggressiveren Phänotypen des Mammakarzinoms.

- Deacetylierung von non-histone-Proteinen:

MTA1 ist dazu in der Lage das Tumorsuppressorgen p53 durch Deacetylierung zu deaktivieren, sodass der Zellwachstumsstopp und die Apoptose verhindert werden. Durch die Deacetylierung von HIF1 α (hypoxia-inducible-factor 1 α) wird dieser stabilisiert und die damit verbundenen Angiogenese unterstützt

(Toh and Nicolson 2009) (Li, Pakala et al. 2012) (Aramaki, Ogawa et al. 2005).

In vielen Arbeiten konnte bisher gezeigt werden, dass MTA1 in unterschiedlichen Karzinomen wie dem Melanom, oralen Plattenepithelkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, diffusem B-Zell-Lymphom, Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Karzinomen des Gastrointestinaltrakts und Karzinomen des weiblichen Genitaltrakts vorkommt (Nawa, Nishimori et al. 2000) (Toh and Nicolson 2009) (Balasenthil, Broaddus et al. 2006) (Yang, Li et al. 2014). Hierbei interagiert MTA1 mit karzinomrelevanten Proteinen wie Snail, E-Cadherin, STATs (signal transducer and activator for transcriptions) und dem Östrogenrezeptor über oben genannte Mechanismen (Bruning, Blankenstein et al. 2014).

Beim Ovarialkarzinom, bei gastrointestinalen Malignomen und beim Mammakarzinom wird eine Assoziation von MTA1 mit einem höheren Tumorstadium, einer höheren Tumoraggressivität, einem größeren Metastasierungspotential und einer geringeren Prognose gesehen (Dannenmann, Shabani et al. 2008) (Jang, Paik et al. 2006). Für das Mammakarzinom besteht eine Korrelation zwischen der MTA1-Expression und der Tumorgöße und einem erhöhten Rezidivrisiko (Toh and Nicolson 2009).

1.5 5-Aza-2'-Desoxycytidine (Decitabin)

5-Azacytidine ist ein 1964 von Sorm et al. synthetisiertes nukleosidisches Molekül (Sorm, Pískala et al. 1964). Durch seine Fähigkeit zur Hemmung von DNA-, RNA- und Proteinsynthese kann es als Antimetabolit zur Therapie der akut und der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt werden (Momparker, Rivard et al. 1985) (Kantarjian, O'Brien et al. 1997). Schon 1970 konnte durch Li et al. ein inhibierender Effekt von 5-Azacytidine bei Leukämiezellen nachgewiesen werden (Li, Olin et al. 1970).

Bei seiner hydroxylierten Form 5-Aza-2'-Desoxycytidine handelt es sich um das als Zytostatikum bekannte Decitabin. Es hat bei ähnlichem Wirkmechanismus eine zehnfach zytotoxischere Wirkung als 5-Azacytidine. 2006 wurde Decitabin von der FDA zur Therapie myelodysplastischer Syndrome zugelassen (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021790s000_DacogenT OC.cfm). 2012 erteilte die Europäische Kommission eine Zulassung zur Therapie der AML bei Erwachsenen über 65 Jahren (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dacogen-epar-product-information_de.pdf).

Der Wirkmechanismus ist auf den in der Karzinogenese bedeutsamen Prozess der Methylierung zurückzuführen (Bird 2002) (Jones and Baylin 2002). Die DNA von Tumorzellen weist einen hohen Anteil an Promotormethylierungen auf. Diese findet sich gehäuft an so genannten CpG-Inseln statt, Regionen in der DNA mit erhöhtem Anteil der Basen Cytosin und Guanin in der linearen Sequenz des DNA-Strangs (Christman 2002). Etwa 1% der DNA besteht aus CpG-Sequenzen, die Hälfte des gesamten Genoms weist CpG-Sequenzen auch in ihrer Promotorregion auf, die hier aber meist unmethyliert vorkommen (Issa 2004).

DNA-Methyltransferasen (DNMT) spielen in dem Methylierungsprozess eine entscheidende Rolle. Sie katalysieren durch eine kovalente Bindung das Anfügen einer Methylgruppe an die 5'-Position des Cytosinrings einer CpG-Sequenz. Die Methylgruppe stammt von einem S-Adenosylmethionin, dieses Produkt entsteht durch eine Reaktion von Methionin und Adenosintriphosphat und fungiert im Zellstoffwechsel als Methyl donor (Oki, Aoki et al. 2007).

Decitabin wird intrazellulär zu Decitabin-Triphosphat umgebaut und so in die DNA eingebaut. Die Methyltransferase geht auch hier eine kovalente Bindung mit Decitabin ein, doch die zusätzliche N-Gruppe an der 5'-Position verhindert hier im Vergleich zum

Cytosinring das Hinzufügen einer Methylgruppe und somit die Methylierung. Dadurch wird die Methyltransferase eingeschlossen und in ihrer weiteren Funktion gehemmt.

Es resultiert der Zelltod (Christman 2002) (Issa 2003) (Oki, Aoki et al. 2007).

Diese Erkenntnis führte zu vielen weiteren Versuchsreihen, um Decitabin als Zytostatikum zu etablieren. Hierbei zeigte sich schon früh ein zytostatischer Effekt von Decitabin in hämatonokologische Erkrankungen wie der AML (Momparler, Rivard et al. 1985) (Rivard, Momparler et al. 1981), weniger Effekt jedoch bei soliden Malignomen (Aparicio and Weber 2002).

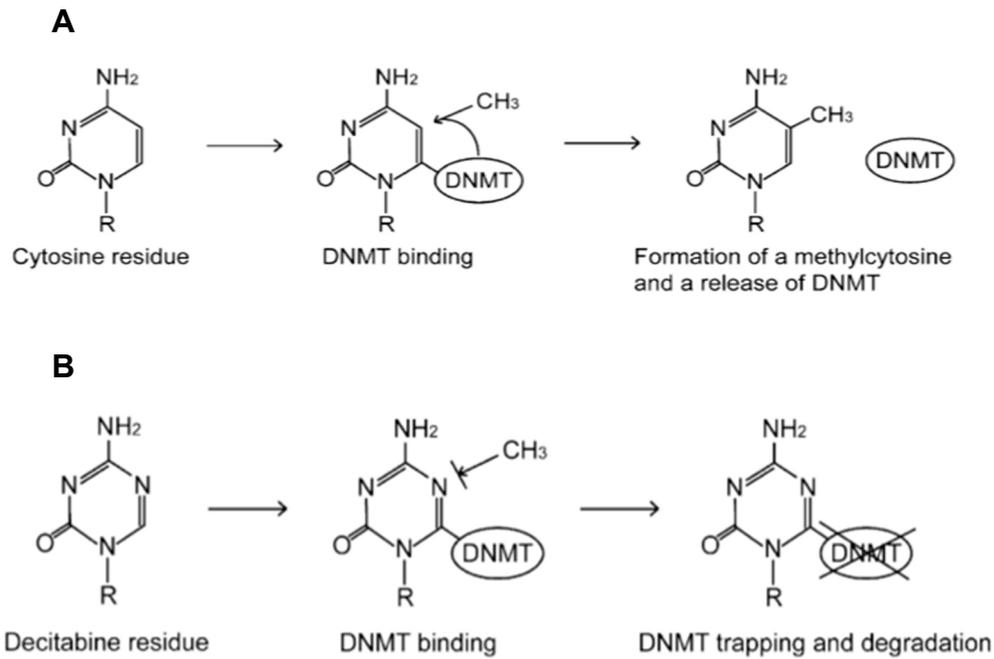


Abbildung 1: Mechanismus der DNA-Methyltransferase-Inhibition. Die Methyltransferase geht eine kovalente Bindung mit dem Cytosinring ein, überträgt eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin und wird nach Übertragung wieder frei (A). Durch den Einbau von Decitabin in die DNA geht auch hier die Methyltransferase eine kovalente Bindung mit dem Decitabinring ein, die N-Gruppe an Position 5 macht die Übertragung einer Methylgruppe jedoch unmöglich. Die Methyltransferase wird nicht wieder frei (B).

1.6 Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tumorsuppressorgen Leucin zipper down regulated in cancer 1 (LDOC1) an Zelllinien des Mammakarzinoms untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das durch sein Eingreifen in Signaltransduktionswege eine antiproliferative und apoptotische Wirkung hat. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass LDOC1 in verschiedenen Karzinomen herunterreguliert ist. In dieser Arbeit wurde das Expressionsverhalten von LDOC1 für Zelllinien des Mammakarzinoms dargestellt sowie seine Reexpression durch die Hinzugabe des DNA-Methyltransferase-Inhibitors Decitabin analysiert.

MTA-Proteine sind als Co-Aktivatoren und Co-Repressoren im Rahmen der Genexpression in pathologische und physiologische Funktionen involviert. Für metastasis associated protein 1 (MTA1) konnte bisher eine Überexpression in Karzinomzellen gezeigt und ein Zusammenhang mit der Tumoraggressivität formuliert werden.

Die Wirkung des oben erwähnten DNA-Methyltransferase-Inhibitors Decitabin ist auf den in der Karzinogenese bedeutenden Mechanismus der Methylierung zurückzuführen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit, die Regulationsmechanismen der Proteine LDOC1 und MTA1 in Zelllinien des Mammakarzinoms zu erforschen und den Effekt auf diese beiden tumorrelevanten Faktoren durch die Zugabe des in der Mammakarzinomtherapie bisher noch nicht angewandten Zytostatikums Decitabin zu beschreiben. Dieser Effekt wird zusätzlich durch morphologische Veränderungen der Zellen verdeutlicht.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

- PCR-Gerät (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- Standard PCR-Gerät, Thermo PCR-Express Hybaid, (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland)
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Brutschrank, HERAcell 150i CO₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Kühlschrank (LIEBHERR, Ochsenhausen, Deutschland)
- Kühlschrank (BOSCH, Deutschland)
- Elektrophoresestromquelle, Consort 1200V-500mA E815 (Consort, Parklaan Belgien)
- Mikroskop, Zeiss Axiophot Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad, München, Deutschland)
- Phasenkontrastmikroskop (Leitz, Deutschland)
- Elektrobloiting-Apparat, Mini Trans Blot® cell (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Filterpapier, Mini-Trans Blot® Filter Paper (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Gelkassettenhalter, Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

- PVDF Membran, Immobilon™ Transfer Membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Schüttler, Vibrax Serono Shaker (Serono, Rockland, USA)
- Sterilbank, Laminar Air Flow Sterilbank HERA Safe (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipetten (Abimed, Langenfeld, Deutschland)
- Vortexer (IKA-works, INC., Wilmington, USA)
- Heizblock (Thermo-DUX, Wertheim, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- 96-Well-Platten (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland)
- Conical Tube 50 ml (BD Falcon™ Bio Sciences, Erembodegum, Belgien)
- Cell Culture Dish 100mm x 20 mm (Corning Incorporated, Corning, New York, USA)
- Deckgläser für Mikroskopie 24x24 mm (Menzelgläser, Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- E-Gel with SYBR (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Gefriercontainer, 5100 Cryo 1°C Freezing Container "Mr. Frosty" (Nalgene®, Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark)
- Gelkassetten, Mini-PROTEAN® TGX™ Long Shelf Precast Gels, 10-well comb. (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Kryoröhrchen (1,0 ml) (Cryo Tube™ vials, nunc, Roskilde, Dänemark)
- Kulturflaschen, 25 cm² /treated, vented caps, sterile (VWR International bvba, Leuven, Belgien)
- Mikro Schraubröhre 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Mini Trans-Blot Foam pads (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

- Objektträger 76 x 26 x 1 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Pipettenspitzen 1,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Biozym, Oldendorf, Deutschland)
- Zentrifugierröhrchen 15 ml (Corning Incorporated, Corning, New York, USA)

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

- 10x Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 10x Tris/Glycin-Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- 10x Tris/Glycin/SDS-Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Auftragspuffer, Roti Load-1 Auftragspuffer, reduzierend (4-fach Konz.) (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- BCIP/NBT Color Development Substrate (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Destilliertes Wasser (Noll, München, Deutschland)
- DMSO (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- DNA-Marker, pBR 328 Mix I (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- dNTP-Mix 'Long Range' (PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland)
- Einbettmedium (ibidi, Martinsried, Deutschland)
- FBS Superior (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
- Freezing Medium (ibidi, Martinsried, Deutschland)
- MEM, Dulbecco's MEM with L-Glutamine, 3,7 g/L NaHCO₃, 1,0 g/L D-Glucose (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)

- Methanol, ≥ 99,98% Ultra LC-MS Methylalkohol (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Milchpulver Blotting Grade (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- MMVL-reverse transcriptase (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- MMVL-reverse transcriptase 5x Buffer (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- oligo(dT) Primer (Biomers, Ulm, Deutschland)
- PBS, Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
- PCR master mix (M7505, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA, Pasching, Österreich)
- Proteinmarker, peqGold Protein-Marker IV (PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland)
- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- RNase-free water (Promega, Mannheim, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
- Tween® 20 (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- PCR master mix (M7505, Promega, Mannheim, Deutschland)
- iTaq Fast Supermix with ROX (BioRad, München, Deutschland)

2.3 Medikamente

- 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabin), ein Inhibitor der DNA-Methyltransferase

2.4 Primer

Primer	vorwärts	rückwärts
Aktin	GGAGAAGCTGTGCTACGTCG	CGCTCAGGAGGAGCAATGAT
LDOC1	GGGTGGTGCCATCGAG	ATAATCATCCTTCTTC
MTA1	AGCACAACGGTGGACG	CCGGCTTGGTCATGTG

Tabelle 5: verwendete Primer

Die verwendeten Primer wurden von Biomers (Biomers.net, Ulm, Deutschland) synthetisiert.

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper für Immunfluoreszenz

Erstantikörper:

- Kanninchen-Anti-pan-Cadherin (Sigma-Aldrich, München, Deisenhofen)
- Kaninchen-Anti-MTA1 Antikörper (Bethyl, Montgomery, USA)
- Maus-Anti-pan-Cytokeratin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Maus-Anti-p53 (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)

Zweitantikörper:

- CyTM 3-konjugiertes-Ziegen-Anti-Maus IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.5.2 Antikörper für Westernblot

Erstantikörper:

- Kanninchen-Anti-pan-Cadherin (Sigma-Aldrich, München, Deisenhofen)
- Maus-Anti-pan-Cytokeratin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Maus-Anti-Aktin Antikörper (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Kaninchen-Anti-MTA1 Antikörper (Bethyl, Montgomery, USA)
- Maus-Anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Kaninchen-Anti-MTA3 Antikörper (Bethyl, Montgomery, USA)
- Maus-Anti-HSP90 (Abcam, Berlin, Deutschland)
- Maus-Anti-NF-KB (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)

Zweitantikörper:

- Alkalische Phosphatase-konjugiertes-Ziegen-Anti-Maus-IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.6 Kommerziell erhältliche Komplettsysteme

- NucleoSpin Tissue RNA Purification Kit (Machery-Nagel, Düren, Deutschland)
- NucleoSpin Tissue DNA Purification Kit (Machery-Nagel, Düren, Deutschland)

2.7 Zellen und Zellkultur

2.7.1 Verwendete Zelllinien

- Humane Mammakarzinomzelllinie T47-D (American Type Culture Collection (ATCC) HTB-133), duktales Karzinom
- Humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (ATCC HTB-22), Adenokarzinom
- Humane Mammakarzinomzelllinie BT-474 (ATCC HTB-20), duktales Karzinom
- Humane Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 (ATCC HTB-30), Adenokarzinom
- Humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-453 (ATCC HTB-131), Perikardmetastase?
- Humane Mammakarzinomzelllinie BT-20 (ATCC HTB-19)
- Humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 (ATCC-HTB 132), Adenokarzinom
- Humane Mammakarzinomzelllinie Hs 578T (ATCC-HTB 126)
- Humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435S (ATCC 129), duktales Karzinom
- Humane Mammakarzinomzelllinie HBL-100 (ATCC-HTB 124)
- Humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (ATCC-HTB 26), Adenokarzinom

Alle verwendeten Zelllinien waren im Bestand der Frauenklinik LMU München enthalten.

2.7.2 Zellkultur

Die Zellkultur dient der Anzucht bestimmter Zelllinien unter kontrollierten Bedingungen. In einem Brutschrank wurden die Zellen bei 37°C und in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ Zusatz auf Petrischalen und in Kulturflaschen in MEM Dulbecco's Medium bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte kultiviert. Die Dauer der Kultivierung unterscheidet sich je nach Zelllinie und ist abhängig von der Zellanzahl, die zu Beginn dem Medium zur Kultivierung zugesetzt wird. Das Anwachsen der Zellen am Kulturgefäßboden ist nach ca. einer Stunde Inkubation erreicht und kann unter dem

Phasenkontrastmikroskop beobachtet und kontrolliert werden. Das Medium enthält L-Glutamin, Streptomycin/Penicillin sowie Kälberserum (10%). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde unter der Sterilbank unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Mediumwechsel

In regelmäßigen Abständen muss in Abhängigkeit von Stoffwechselaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie ein Mediumwechsel vorgenommen werden, um die Vitalitätserhaltung und das Wachstum der Zellen zu garantieren, da im Verlauf Bestandteile des Mediums zerfallen und von den Zellen metabolisiert werden. Einen ersten Hinweis auf einen notwendigen Mediumwechsel zeigt die Trübung des Mediums. Unter dem Phasenkontrastmikroskop konnte die Zelldichte verifiziert werden. Zeigten sich Konfluenz der Zellen, abgestorbene Zellen und Zellbestandteile wurde ein Mediumwechsel durch Abpipettieren des alten Mediums und Hinzufügen von frischem Medium durchgeführt. Eine Kulturflasche von 25 cm² erhält 5 ml Medium, eine Petrischale 10 ml Medium.

Subkultivierung und Passagieren

Haben die Zellen eine maximale Zelldichte erreicht, wurden sie durch den Vorgang des Passagierens ausgedünnt und subkultiviert. Das Medium wurde dazu aus den Kulturgefäßen entfernt und diese mit PBS gespült. Anschließend folgte die Lösung adhärenter Zellen durch die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA. Dabei handelt es sich um eine Endopeptidase, die Peptidbindungen am Carboxylende von Lysin oder Arginin spaltet. Es folgte eine kurze Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Unter dem Phasenkontrastmikroskop konnte durch das 10er Objektiv die Lösung der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes beobachtet werden. Ein Indikator hierfür ist die Änderung der Morphologie in Form von Abrundung. Die Zellen erscheinen nach Ablösung kugelig und verkleinert. Zudem sind sie nicht mehr am Kulturgefäßboden fixiert, sondern „schwimmen“ in der Trypsinlösung umher. Durch Abschlagen des Kulturgefäßes konnte die Loslösung der Zellen beschleunigt werden (shake-off).

Im nächsten Schritt wurde die Trypsinlösung, die nun einen Großteil der losgelösten Zellen enthielt, abpipettiert. Das Kulturgefäß wurde wieder mit frischem Medium aufgefüllt und der Inhalt auf weitere Kulturgefäße verteilt.

Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von Zellen dient ihrer Langzeitlagerung. Zum Zeitpunkt des Einfrierens sollten die Zellen ein hohes Maß an Vitalität aufweisen. Während des Prozesses des Einfrierens und Auftauens besteht die Gefahr, dass einige Zellen zugrunde gehen. Das hohe Maß an Vitalität zum Zeitpunkt des Einfrierens bietet demzufolge eine höhere Wahrscheinlichkeit des Überlebens während der Rekultivierung der Zellen.

Der erste Schritt bestand aus der Trypsinierung der Zellen mit Trypsin-EDTA zur Loslösung der adhärennten Zellen vom Kulturgefäßboden. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und mit der Handzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 800 µl Freezing Medium resuspendiert. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren erzielte eine gute Durchmischung von Zellpellet und Freezing Medium. Es folgte die Überführung der Suspension in sterile Kryoröhrchen. Um einen stufenweisen Einfrierprozess zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen zunächst für 24 h bei -80°C gelagert und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei -210°C konserviert.

2.7.3 Behandlung der Zellen mit Decitabin

Decitabin (5-Aza-2'-desoxycytidin) ist ein Zytostatikum, das klinisch in der Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie bei Patientin ab dem 65. Lebensjahr angewendet wird. Biochemisch ist es ein Aza-Derivat des Desoxycytidins und wirkt als DNA-Methyltransferase-Inhibitor.

Zellen der Zelllinien T47-D, MCF7, BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-453, BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435S und HBL-100 wurden auf einer 6-Well Platte oder auf einem Chamber Slide Decitabin in den Konzentrationen 10 µg/ml und 25 µg/ml zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen nach Zugabe von Decitabin zunächst unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Es folgte die cDNA-Gewinnung der mit Decitabin behandelten Zelllinien MCF7, MDA-MB-435S, MDA-MB-468, HBL-100 aus dem für diesen Schritt vorgesehenen Chamber Slide. Die Sichtbarmachung der morphologischen Veränderungen durch Fixierung und Färbung der Zelllinien T47D, MCF7, BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-453, BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435S und HBL-100 auf Objektträgern erfolgte aus der Inkubation auf einem anderen für diesen Schritt vorgesehenen Chamber Slide.

2.7.4 Blaufärbung

Coomassie Brilliant Blue ist ein Trimethylmethanfarbstoff, der zur Zellanfärbung verwendet wird. Durch Komplexbildung werden auf diese Weise unspezifisch alle Zellproteine visualisiert. Dazu wurden zunächst Zellen der Zelllinien T47-D, MCF7, BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-453, BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435S und HBL-100 auf Chamber Slides inkubiert. Es folgte die Fixierung der Zellen durch Verwerfen des Mediums, mehrmaliges Waschen mit PBS und Hinzufügen von 70% Ethanol für 15 Minuten. Der nächste Schritt bestand aus dem Entfernen des Ethanols und dem Hinzufügen von verdünntem Coomassie-Farbstoff. Eine Einwirkzeit von mindestens zwei Stunden gewährleistete gute Färbeargebnisse. Nach erfolgter Einwirkzeit wurde der Farbstoff verworfen und die Kammern mit destilliertem Wasser gespült. Nach einer Trocknungszeit von ca. 10 Minuten konnten die gefärbten Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und ausgewertet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methodik verwendet, um morphologische Merkmale und Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien und innerhalb der Zelllinien vor und nach der Behandlung mit Decitabin festzustellen.

2.7.5 RNA-Präparation und cDNA-Synthese

RNA-Präparation

RNA (ribonucleic acid) ist eine Nukleinsäure, die aus einer Kette von Nukleotiden besteht und die organischen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil enthält. Im Gegensatz dazu besteht DNA (desoxyribonucleic acid) aus den Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin. Die gesamte RNA setzt sich aus ribosomaler RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) und messenger RNA (mRNA) zusammen. rRNA ist am Aufbau des Ribosoms und an der Knüpfung von Peptidbindungen beteiligt, mRNA kopiert die auf einem Gen liegende Information und trägt sie zum Ribosom, tRNA nimmt einzelne Aminosäuren aus dem Cytoplasma auf und transportiert sie zum Ribosom. Insgesamt ist RNA sehr instabil und anfällig für den Abbau durch RNAsen.

Die RNA-Präparation aus Zellen der Mammakarzinomzelllinien gelang in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des NucleoSpin Tissue RNA Purification Kit (Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Nach Protokoll des Herstellers besteht der Vorgang der RNA-Präparation aus den Schritten Lysierung, Filtration und Elution. Das Endprodukt besteht ausschließlich aus in RNase-freiem Wasser eluierter RNA.

1	Lyse cells	
	+350 μL RA1 +3,5 μL β-mercaptoethanol	Add 350 μL Buffer RA1 and 3.5 μL β-mercaptoethanol to the cell pellet or to ground tissue and vortex vigorously.
2	Adjust RNA binding condtions	
	+350 μL 70% ethanol Mix	Transfer flow-through into a new 1.5 mL microcentrifuge tube, add 350 μ L ethanol (70%) and mix by vortexing (2 x 5s)
3	Bind RNA	
	Load lysat 11,000 x g, 30s	For each preparation take one NucleoSpin RNA Column (light blue ring) placed in a Collection Tube. Pipette lysate up and down 2-3 times and load the lysate to the column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g . Place the colum in a new Collection Tube (2 mL)
4	Desalt silica membrane	
	+350 μL MDB 11,000 x g, 1 min	Add 350 μL MDB (Membrane Desalting Buffer) and centrifuge at 11,000 x g for 1 min to dry the mambrane
5	Wash and dry silica membrane	
	+200 μL RAW2 11,000 x g, 30 s +600 μL RA3 11,000 x g, 30 s +250 μL RA3 11,000 x g, 2 min	1st wash Add 200 μL Buffer RAW2 to the NucleoSpin RNA Columne. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g . Place the column into a new Collection Tube (2 mL) 2ndwash Add 600 μL Buffer RA3 to the NucleoSoin RNA Column. Centrifuge for 30 s

		<p>at 11,000 x g. Discard the flow-through and place the column back into the Collection Tube.</p> <p>3rdwash</p> <p>Add 250 µL Buffer RA3 to the NucleoSpin RNA Column. Centrifuge for 2 min at 11,000 x g to dry the membrane completely. Place the column into a nuclease-free Collection Tube (1,5 mL, supplied)</p>
6	Elute highly pure RNA	
	<p>+60 µL RNase free H₂O 11,000 x g, 1 min</p>	<p>Elute the RNA in 60 µL RNase-free H₂O, (supplied) and centrifuge at 11,000 x g for 1 min.</p>

Tabelle 6: Präparation von RNA mit dem NucleoSpin Tissue Purification Kit

cDNA-Synthese

Nach Präparation der RNA aus Zellen von Mammakarzinomzelllinien erfolgte die Umschreibung in die der RNA komplementäre cDNA. Die komplementäre cDNA zeigt eine höhere Stabilität, da sie nicht anfällig für RNAsen ist.

Im ersten Schritt wurden zu 16,5 µl der RNA 0,75 µl Oligo-dT-Nukleotid hinzugegeben. Oligo-dT dient als Primer und ist komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 70°C, um die Anheftung der Oligonukleotide zu ermöglichen. Zur Verhinderung der Renaturierung wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und 10 µl M-MLV reverse transcriptase 5 x reaction buffer (#M531A, Promega), 1,25 µl PCR nucleotide mix (#C114H, Promega), 0,5 µl recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (#N2511, Promega) sowie 1µl M-MLV reverse transcriptase (#M170B, Promega) hinzugefügt. In der weiteren Prozessierung erfolgte die Inkubation bei 42°C für eine Stunde und somit die Umschreibung von RNA in die zugehörige cDNA durch das Enzym reverse Transkriptase.

2.7.6 gDNA-Isolierung

Die Isolierung genomischer DNA aus der Zellkultur wurde mit Hilfe des NucleoSpin Tissue DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) praktiziert. Wie

vom Hersteller empfohlen erfolgten nacheinander die Schritte der Zellyse und Proteindenaturierung, DNA-Bindung an eine Nucleospin Tissue Column, mehrfaches Waschen und DNA-Eluierung nach Protokoll.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Isolierung an Zellen der Zelllinien BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435S und HBL-100 durchgeführt.

1	Prepare sample	
	+200 µL Buffer T1 + 25 µL Proteinase K + 200 µL Buffer B3 70°C, 10-15 min	Resuspend up to 10 ⁷ cells in a final volume of 200 µL Buffer T1. Add 25 µL Proteinase K solution and 200 µL Buffer B3. Incubate the sample at 70°C for 10-15 min.
2	Adjust DNA binding conditions	
	+210 µL ethanol Vortex	Add 210 µL ethanol (96-100%) tot he sample and vortex vigorously.
3	Bind DNA	
	Load samples 11,000 x g 1 min	For each sample, place a NucleoSpin Tissue Column into a Collection Tube. Apply the sample to the column. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g . Discard the flow-through and place the columne back into the Collection Tube.
4	Wash silica membrane	
	+ 500 µL BW 11,000 x g, 1 min + 600 µL B5 11,000 x g, 1 min	1st wash Add 500 µL Buffer BW . Centrifuge for 1 min at 11,000 x g . Discard the flow-through and place the column back into the Collection Tube. 2nd wash Add 600 µL Buffer B5 to the column and centrifuge for 1 min at 11,000 x g . Discard the flow-through and place the column back into the Collection Tube.
5	Dry silica membrane	

	11,000 x g, 1 min	Centrifuge the column for 1 min at 11,000 x g. Residual ethanol is removed during this step.
6	Elute highly pure DNA	
	+100 µL BE (70°C) RT, 1 min 11,000 x g, 1 min	Place the NucleoSpin Tissue Column into a 1,5 mL microcentrifuge tube (not provided) and add 100 µL prewarmed Buffer BE (70°C) . Incubate at room temperature for 1 min . Centrifuge 1 min at 11,000 x g .

Tabelle 7: Präparation von DNA mit dem NucleoSpin Tissue Purification Kit

2.7.7 PCR und PCR-Bedingungen

Die PCR (polymerase chain reaction) stellt eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA mit Hilfe des hitzestabilen Enzyms DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) in vitro dar. Die DNA-Polymerase nimmt die Synthese des komplementären Strangs am freien 3'-OH-Ende der template-DNA vor. Dies geschieht in einem Thermocycler, der die Proben in mehreren Zyklen auf bestimmte Temperaturen erhitzt und abkühlt. Je nach Primer ist die Zyklenzahl unterschiedlich zu wählen.

Quantitative PCR

Die quantitative PCR (Realtime PCR) dient dem Nachweis von PCR-Produkten in Echtzeit. Der Reaktionsverlauf kann über die Lichtemission von Fluoreszenzsonden verfolgt werden. Das generierte Signal ist proportional zur amplifizierten Menge der DNA und wird während der exponentiellen Phase gemessen. In dieser Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen für die korrekte Quantifizierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich für die Quantifizierung der DNA-Produkte der Taq-Man-Methode, etabliert durch die Firma Roche (Basel, Schweiz), bedient. Diese Methode verwendet für die komplementäre Bindung an die zu vervielfältigende DNA-Sequenz eine Sonde, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (zum Beispiel FAM oder TAMRA) und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert ist. Der Quencher führt zur Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporters. Während des

Ablesevorgangs durch die Taq-Polymerase wird aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde abgebaut, sodass sich Reporter und Quencher voneinander trennen und die Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Analyse der detektierten Signale gelang über die Messung des CT-Werts (Cyclus Threshold). Dieser gibt an, ab welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal erstmals über eine definierte Schwelle gelangt und damit ausreichend PCR-Produkte gebildet hat. Die Berechnung erfolgte durch die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$, die durch den Einschluss des Zielgens und einer Referenz ermittelt wurde. Bei der Referenz handelte es sich hier um β -Aktin, der ΔCT wurde aus der Subtraktion des CT-Werts des Zielgens (zum Beispiel LDOC1) und des CT-Werts von der Referenz β -Aktin gebildet. Folgende Komponenten wurden für die quantitative PCR pro 20 μ l Ansatz in eine 96-Well PCR Platte pipettiert:

Reagenz	Menge
Taq-Polymerase	10 μ l
H ₂ O	8 μ l
cDNA	1 μ l
Primer	1 μ l
Ansatzmenge	20 μl

Tabelle 8: Ansatz für die quantitative PCR

Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR zeigt die Anwesenheit spezifischer Gensequenzen auf. Jeder Zyklus besteht aus den Schritten Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation.

Während der Denaturierung wird die DNA auf 94-96°C für 5 Minuten erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen zu trennen. Es folgt eine Abkühlung auf 65°C, um die Rückbildung in eine Doppelhelix zu verhindern. Die Primerhybridisierung beschreibt den Vorgang der Primeranlagerung. Dieser findet bei 55-65°C für 1 Minute statt. Bei dieser Temperatur erfolgt die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge. Die genaue Temperatur ist abhängig von der Länge und der Sequenz der Primer.

Die Elongation beinhaltet die Anheftung der Nukleotide an den freien Strang durch das Enzym DNA-Polymerase in 5'→3' Richtung. Eine Temperatur von 68-72°C und eine Dauer von 1 Minute werden für diesen Prozess benötigt.

Nach Ablauf aller Zyklen wird auf eine Temperatur von 4°C heruntergekühlt und diese Temperatur konstant beibehalten.

Um den Vorgang der PCR vorzubereiten wurden folgende Komponenten auf Eis für einen 25 µl Ansatz in ein 100 µl PCR Cup gegeben:

Reagenz	Menge
2x PCR Master Mix (enthält Taq-Polymerase und dNTP)	12,5 µl
H ₂ O	10,5 µl
cDNA	1 µl
Primer	1 µl
Ansatzmenge	25 µl

Tabelle 9: Ansatz für die semiquantitative PCR

Nach Ablauf der PCR folgte die Elektrophorese auf Agarosegel.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Anordnung von Nukleinsäuresträngen nach ihrer Größe. Es wurde ein 2% E-Gel mit SYBR von Invitrogen verwendet. 16 µl der zuvor amplifizierten cDNA wurden mit etwa einem Tropfen 10x Probenpuffer (Blue Juice) versetzt und in die Kammervorrichtung des Gels pipettiert. Durch eine Stromquelle wurde ein elektrisches Feld erzeugt, was zur Auftrennung der DNA-Fragmente führt. Je kleiner das Molekül, desto schneller die Laufzeit durch das Gel. Es entstand ein charakteristisches Bandenmuster, das anschließend mit dem Molecular Imager Gel Doc XR+ von BioRad in einem UV-Bereich von 470 nm bis 530 nm fotografisch dokumentiert und mit der Image Lab 2.0 Software analysiert werden konnte.

2.7.8 Immunoblot (Westernblot)

Das Ziel des Immunoblotverfahrens ist der Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper in ausgewählten Zelllinien. Hier wurden die Zelllinien HBL-100, MDA-MB-435S und MCF-7 verwendet. Der Ablauf dieser Methodik besteht aus der Herstellung von Zelllysaten, der Gelelektrophorese sowie abschließend des Westernblots.

Zelllysat

Während des Herstellungsvorgangs von Zelllysaten wird die Zellstruktur aufgebrochen und Proteine für die Gelelektrophorese eluiert. Der erste Schritt bestand darin, das Medium aus den Petrischalen zu verwerfen und diese mehrmals mit PBS zu waschen. Der Großteil der Zellen ist durch Adhärenz am Kulturgefäßboden befestigt, sodass die Zellen zur weiteren Prozessierung erhalten bleiben. Es wurden dann 300 µl RIPA-Puffer hinzugefügt und die Schalen für ca. 10 Minuten bei -20°C eingefroren. Das Einfrieren dient der Bildung von Eiskristallen, was zu einem besseren Ablösen der Zellen und dem Aufbrechen der Zellmembranen führt. Das RIPA-Homogenisat wurde nach dem Auftauen bei Raumtemperatur von den Schalen abpipettiert, in 1,5 ml Safe-Lock-Gefäße überführt und mit der Handzentrifuge zentrifugiert. Der sich bildende Überstand enthielt die für den Westernblot benötigten Proteine. Dieser wurde abpipettiert und in ein weiteres 1,5 ml Safe-Lock-Gefäß mit 100 µl 4x Sample Buffer gegeben.

Gelelektrophorese

Mit dieser Methode werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts und ihrer Ladung aufgetrennt. Zwei Gelkassetten mit Polyacrylamidgelen und mit jeweils zehn Kammern wurden mit Tris/Glycin/SDS-Puffer in einer Konzentration von 1:10 in den dazugehörigen Kassettenhalter gebracht. Um Luftblasen zu entfernen, wurden die Kammern mit einer Spritze gespült. Anschließend wurde 20 µl des Lysats in die Kammern gegeben, eine Kammer erhielt 10 µl eines Proteinmarkers. Es wurde eine Spannung von 200 V und eine Stromstärke von 100 mA angelegt. Während des Laufs trennte sich der Proteinmarker auf und gab somit die richtige Laufdauer an. Auf diese Weise lässt sich die Größe von Molekülen im Vergleich zur bereits bekannter Größe anderer Moleküle abschätzen.

Westernblot

Nach Ablauf der Gelelektrophorese findet der Blottingvorgang statt. Im Schichtungsverfahren werden die Gele aus der Gekassette mit den negativ geladenen Proteinen zwischen verschiedenen Schichten in Transpuffer bestehend aus 10% von 10x Tris/Glycin-Puffer und 10% Methanol in destilliertem Wasser in eine vorgesehene Kassette gespannt. Dabei liegt das Gel auf einer PDVF-Membran, umgeben von Filterpapier und Schwamm auf jeder Seite. Die PDVF-Membran ist zuvor in Methanol getränkt worden. Die Kassette wurde in einen Blottingapparat gebracht, ebenso der Transferpuffer und ein Eisblock. Für die Dauer von einer Stunde wurde eine Stromstärke von 200 mA angebracht. Während dieses Vorgangs findet die Übertragung der Proteine des Gels auf die PDVF-Membran statt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz mit PBS gewaschen.

Im Anschluss erfolgte das Blockieren der Membran über zwei Stunden auf dem Schüttler mit Blottingpuffer. Dieser bestand aus 4% Milchpulver in PBS mit 0,05% Azid und 0,01% Tween. Ziel dieses Vorgangs ist es, die Bindung der darzustellenden Proteine an unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu verhindern. Die Blots wurden über Nacht mit dem Erstantikörper in einer Konzentration von 1:1000 auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde er Erstantikörper entfernt und nach einem Waschgang mit PBS von dreimal fünf Minuten der Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:1000 hinzugegeben. Dieser wurde nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf dem Schüttler entfernt. Nach Entfernung des Zweitantikörpers erfolgte die Sichtbarmachung der Proteine auf der Membran durch die Zugabe von 15 ml Entwicklungspuffer bestehend aus 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ mit 50µl BCIP und 100µl NBT. Zuletzt wurde die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

2.7.9 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode aus dem Bereich der Immunhistochemie. Unter Verwendung von fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern werden die Antigene spezifischer Proteine (zum Beispiel MTA1) intra- oder extrazellulärer Strukturen nachgewiesen. In der indirekten Immunfluoreszenz wird zunächst ein primärer Antikörper verwendet, der nicht selbst an einen Farbstoff gekoppelt ist, erst ein zweiter Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet und führt somit zu einer wesentlichen Fluoreszenzverstärkung. Wenn der Antikörper an das

entsprechende Antigen gebunden hat, kann dies durch Nachweis des Fluoreszenzlichts unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

Zuvor wurden die Zellen auf Chamber Slides in Medium inkubiert. Haben sie durch Kontrolle unter dem Phasenkontrastmikroskop die gewünschte Konfluenz erreicht, wurde das Medium verworfen, die Chamber Slides mit PBS gewaschen und in Ethanol fixiert. Nach Fixierung erfolgte die Rehydratation durch Waschen mit PBS. Anschließend wurde der erste Antikörper für eine Dauer von zwei Stunden hinzugefügt. Nach Entfernung des ersten Antikörpers und dreimaligem Waschen mit PBS wurde der zweite Antikörper für 45 Minuten aufgetragen. Auch dieser wurde wieder entfernt. Der letzte Waschvorgang wurde erneut dreimal mit PBS und zuletzt mit H₂O durchgeführt, um die Bildung von Kristallen zu verhindern. Nach Entnahme der Kammern und kurzer Trocknungszeit konnte der Slide mit einigen Tropfen Einbettmedium fixiert und anschließend die Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Mammakarzinomzelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden neun etablierte Mammakarzinomzelllinien gewählt, um sie auf das Vorhandensein der Genprodukte LDOC1, MTA1, ER, LALBA, EMA und ESA zu untersuchen. Die Zelllinie HBL-100 ist eine nicht-maligne Myoepithelzelllinie und wird nach gegenwärtigem Kenntnisstand als Ausgangszelltypus für basale Mammakarzinome angesehen. HBL-100 wurde hier als Kontrollzelllinie verwendet. β -Aktin wurde im semiquantitativen PCR-Verfahren zur Qualitätskontrolle der cDNA eingesetzt. Bei β -Aktin handelt es sich um ein Protein des Zytoskeletts, das an der Beweglichkeit und der Formgebung der Zelle beteiligt ist. Das Vorhandensein von β -Aktin in allen ausgewählten cDNAs bestätigt ausreichende Qualität für valide Aussagen.

Die Selektion dieser neun etablierten Zelllinien wurde unter anderem aufgrund ihrer histopathologischen Kriterien als typische Vertreter der Untergruppen Luminal A, Luminal B, HER2-Überexpression, Claudin-low und Basal gewählt. Auch im klinischen Alltag erfolgt die Unterteilung der Mammakarzinome in diese Kategorien.

Klassifikation	ER	PR	HER2	Mammakarzinomzelllinie
Luminal A	+	+	-	MCF-7, T47-D
Luminal B	+	+	+	BT474
Basal	-	-	-	MDA-MB-468, MDA-MB-435S
Claudin-low	-	-	-	BT549, Hs578T
HER2	-	-	+	SK-BR-3, MDA-MB-453

Tabelle 10: Übersicht der Klassifikation von Mammakarzinomzelllinien anhand des Rezeptorstatus.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen zeigten einen Expressionsverlust des Genprodukts LDOC1 in den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-435S. Diese beiden Zelllinien werden der Gruppe der triple-negativen beziehungsweise basalen Mammakarzinomzellen zugeordnet. Eine schwache Expression von MTA1 wird in den Zelllinien T47-D, SK-BR-3 und MDA-MB-453 deutlich. Zusätzlich zu MTA1 und LDOC1

wurden noch die beim Mammakarzinom häufig beschriebenen Gewebs- bzw. Differenzierungsmarker ER, LALBA, ESA und EMA auf ihre Expression hin untersucht. Der Nachweis des Östrogenrezeptors (ER) gelang in der vorliegenden Arbeit für die Zelllinien T47-D, BT474 und MCF-7. Diese Mammakarzinomzelllinien gehören zur Untergruppe Luminal A beziehungsweise Luminal B.

Bei Lactalbumin Alpha (LALBA) handelt es sich um ein für ein Milchprotein kodierendes Gen, das an der Regulierung der Lactosesynthetase und somit Lactoseproduktion beteiligt ist. Die Expression von LALBA ist assoziiert mit Krankheitsbildern wie Mastitis und kutanen adenocystischen Karzinomen der Mamma. Der Nachweis von LALBA gelang in der vorliegenden Arbeit für die Mammakarzinomzelllinien MCF7, BT474, MDA-MB-453, BT20, MDA-MB-468, Hs578 und MDA-MB-435.

Das Epithelial Surface Antigen (ESA) ist ein Glykoprotein, das in vielen epithelialen Krebszelllinien vorkommt, so auch beim Mammakarzinom.

Das Epithelial Membrane Antigen (EMA) befindet sich im glandulären Epithel normaler Zellen und ist hier an physiologischen Prozessen wie Adhäsion beteiligt. Aber auch in malignen Zellen ist EMA verstärkt ausgeprägt. In der Versuchsreihe dieser Arbeit zeigen sich ESA und EMA für eine Vielzahl der Mammakarzinomzelllinien.

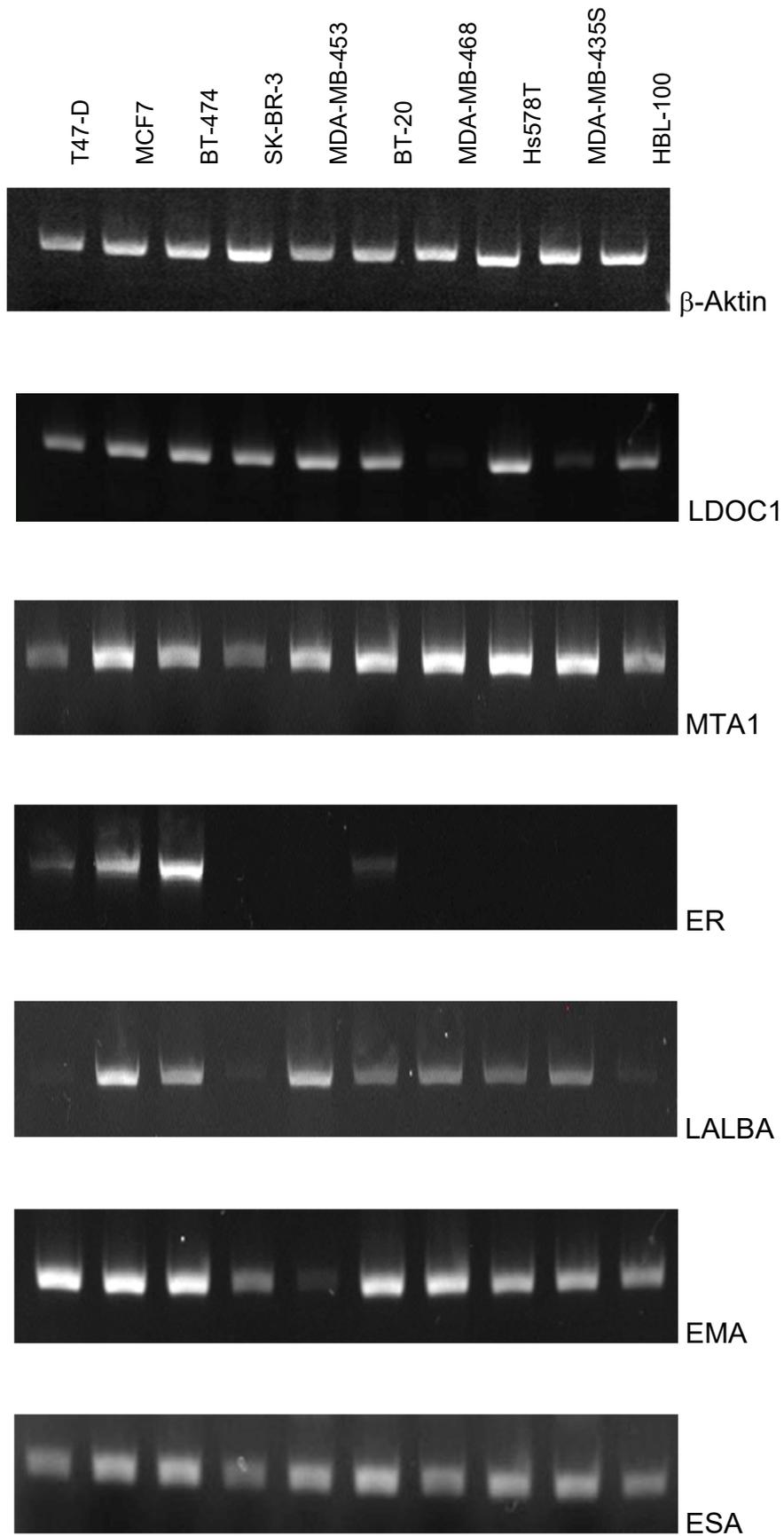


Abbildung 2: Expression von β -Aktin, LDOC1, MTA1, ER, LALBA, EMA und ESA in neun Mammakarzinomzelllinien.

3.2 Expression von LDOC1 in Mammakarzinomzelllinien

Die Expression von LDOC1 wurde mit Hilfe des Standard-PCR-Verfahrens (Abbildung 3A) und des Realtime-PCR-Verfahrens (Abbildung 3B) in neun etablierten Mammakarzinomzelllinien dargestellt. In den triple-negativen Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-435S konnte in beiden PCR-Verfahren kein Signal für das Genprodukt LDOC1 detektiert werden, womit ein vollständiger Expressionsverlust gezeigt werden konnte.

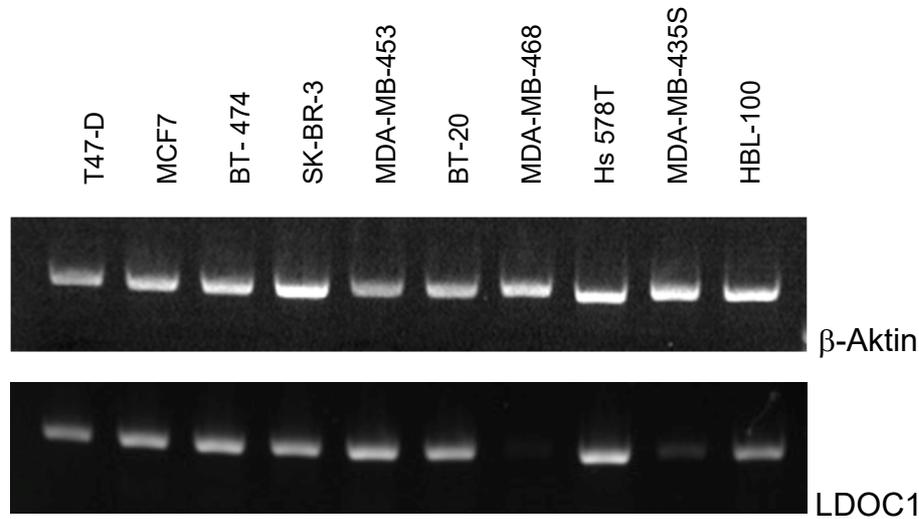
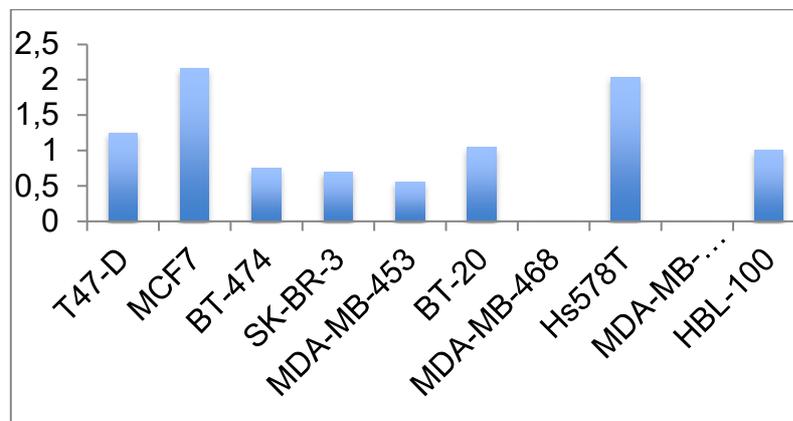
A**B**

Abbildung 3: Expression von LDOC1 in Mammakarzinomzelllinien. Neun Mammakarzinomzelllinien wurden mittels semiquantitativer PCR (A) auf die Expression von LDOC1 untersucht. Zur Qualitätskontrolle der cDNA der Mammakarzinomzelllinien wurde die Expression von β -Aktin in der semiquantitativen PCR (A) überprüft. Zusätzlich erfolgte die Analyse der LDOC1-Expression mittels quantitativer Realtime-PCR (B).

3.3 Expression von MTA1 in Mammakarzinomzelllinien

Um die Expression des Genprodukts MTA1 zu untersuchen, wurde das Standard-PCR-Verfahren durchgeführt (Abbildung 4A). Die cDNA der Mammakarzinomzelllinien T47-D, SK-BR-3 und MDA-MB-453 zeigten hier im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine geringere Expression von MTA1. Zur Bestätigung erfolgte die Analyse der MTA1-Expression mit Hilfe des Realtime-PCR-Verfahrens (Abbildung 4B). Dieses erbrachte korrespondierende Ergebnisse.

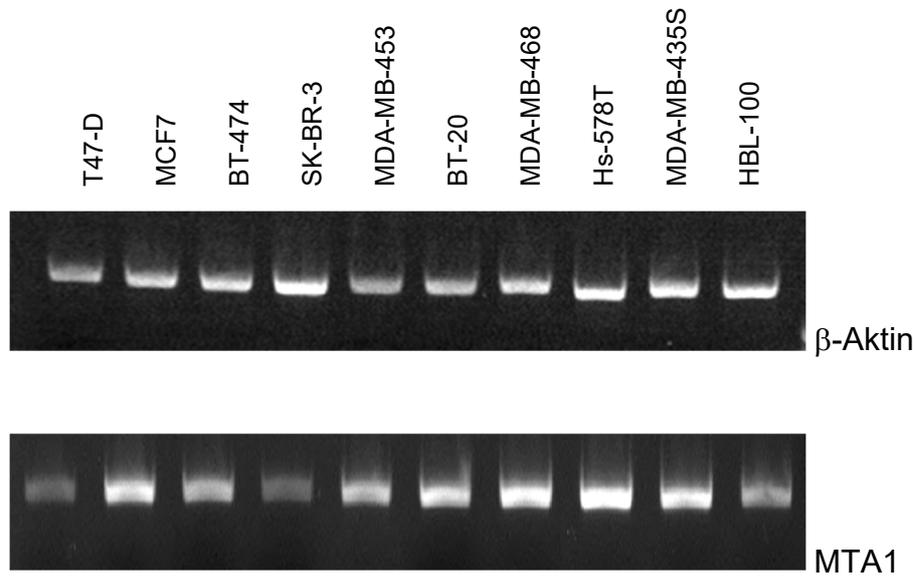
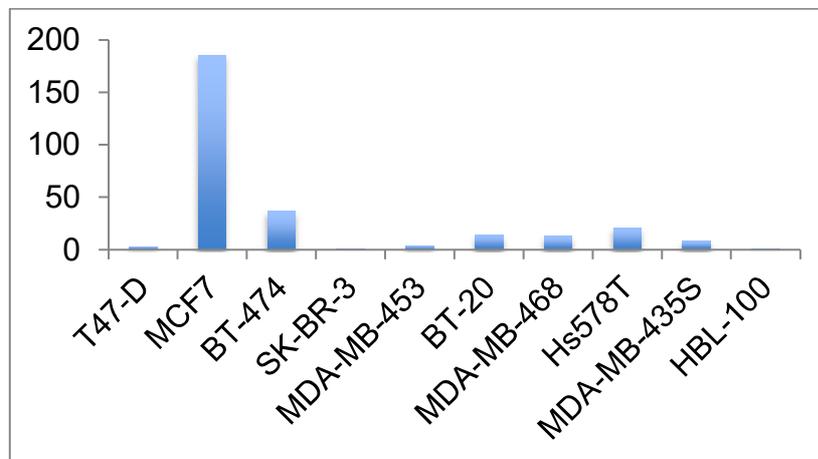
A**B**

Abbildung 4: Expression von MTA1 in Mammakarzinomzelllinien. Die cDNA von neun Mammakarzinomzelllinien wurden mittels semiquantitativer Standard-PCR (A) und quantitativer Realtime-PCR (B) auf die Expression von MTA1 untersucht. Die Expression von β -Aktin im Standard-PCR-Verfahren (A) galt der Qualitätskontrolle der verwendeten cDNAs.

3.4 Reexpression von LDOC1 in Mammakarzinomzelllinien nach Behandlung mit Decitabin (5-Aza-2'-deoxycytidin)

Die Zelllinien MDA-MB-435S und MDA-MB-468 wurden mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin behandelt, um die Regulierung der LDOC1-Ausschaltung zu überprüfen. Decitabin verhindert wie bereits beschrieben die weitere Methylierung der Promotorregion auf epigenetischer Ebene, sodass es zur Reexpression von durch Methylierung ausgeschalteten Genen kommt.

Nach zweitägiger Inkubation der Zelllinien MDA-MB-435S und MDA-MB-468 mit 10µg/ml Decitabin wurde erneut cDNA hergestellt und mittels quantitativer und semiquantitativer PCR analysiert. Beide Analyseverfahren zeigen deutlich, dass in beiden untersuchten Zelllinien die Expression von LDOC1 durch die Behandlung mit Decitabin wieder hergestellt werden konnte (Abbildungen 5 und 6).

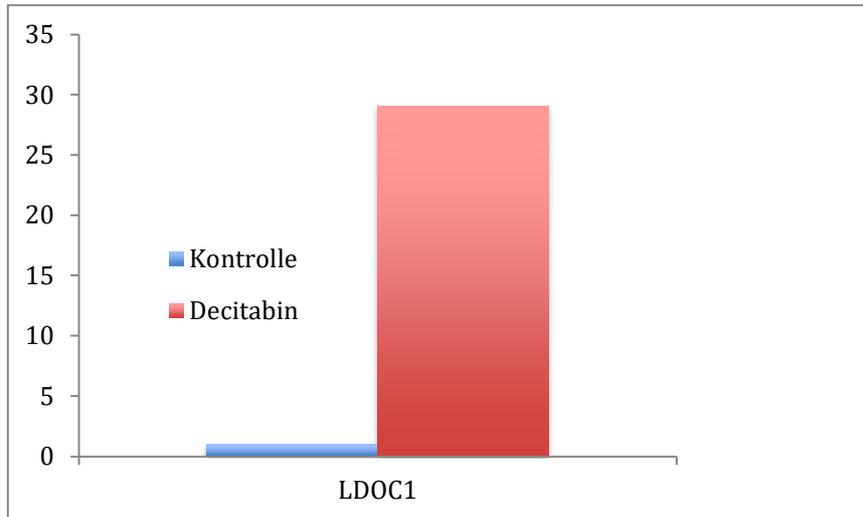
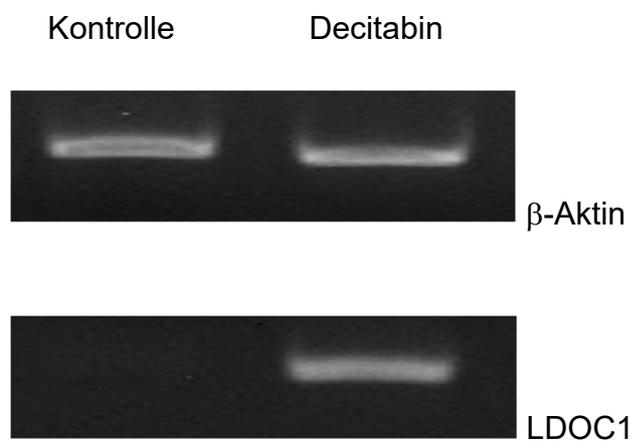
A**B**

Abbildung 5: Reexpression von LDOC1 in der Zelllinie MDA-MB-435S durch die Behandlung mit 10 μ g/ml Decitabin. Die cDNA der Zelllinie MDA-MB-435S wurde hinsichtlich der Expression von LDOC1 vor und nach der Behandlung mit 10 μ g/ml Decitabin überprüft. In der quantitativen PCR zeigt sich eine deutliche Reexpression von LDOC1 nach Decitabinzugabe gegenüber der Kontrolle (A). Korrespondierende Ergebnisse erbringt die Analyse mittels semiquantitativer PCR (B), hier zeigt sich ebenso eine deutliche Signalverstärkung für LDOC1 nach Zugabe von 10 μ g/ml Decitabin.

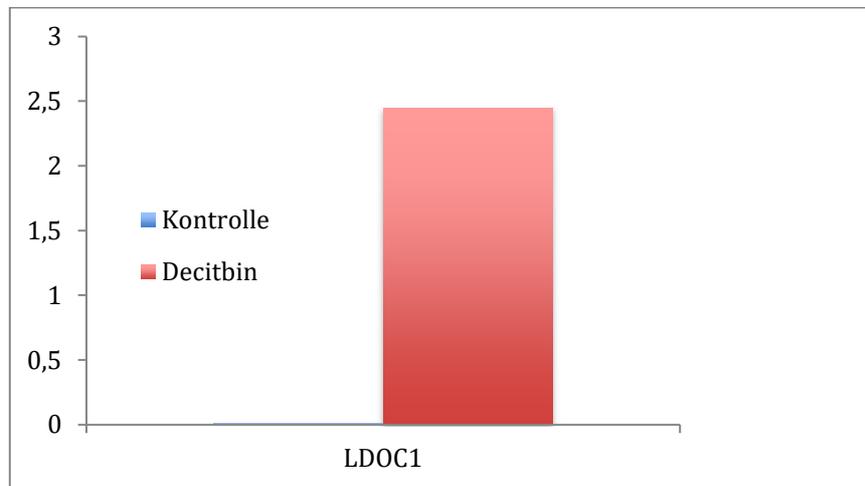
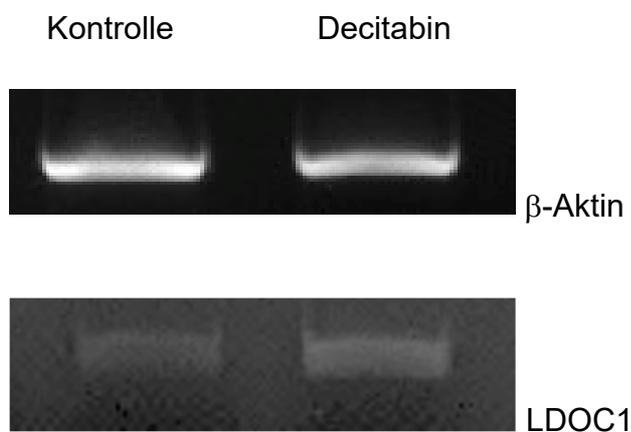
A**B**

Abbildung 6: Reexpression von LDOC1 in der Zelllinie MDA-MB-468 durch die Behandlung mit 10 μ g/ml Decitabin. Die Expression von LDOC1 in der cDNA der Zelllinie MDA-MB-468 wurde mittels quantitativer PCR und semiquantitativer PCR überprüft. In der quantitativen PCR (A) konnte in der cDNA eine Reexpression von LDOC1 nach zweitägiger Inkubation mit 10 μ g/ml Decitabin nachgewiesen werden. Die semiquantitative PCR (B) zeigt ebenso eine Signalverstärkung für die Expression von LDOC1 nach 10 μ g/ml Decitabinzugabe gegenüber der Kontrolle ohne Behandlung mit Decitabin.

3.5 Expression von LDOC1 in genomischer DNA von Mammakarzinomzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) an den Zellen der Zelllinien BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435 und HBL-100 durchgeführt. Mittels quantitativer PCR wurde in der isolierten gDNA der Nachweis von LDOC1 erbracht. Auch hier diente der Nachweis von β -Aktin in allen verwendeten Zelllinien der Qualitätskontrolle.

Es wurde beobachtet, dass LDOC1 in allen untersuchten Zelllinien vorhanden ist. Im Gegensatz zum Expressionsmuster von LDOC1 der Zelllinien MDA-MB-435 und MDA-MB-468 auf mRNA-Ebene kommt es hier zu keiner Deletion des LDOC1-Gens und somit zur Expression von LDOC1. Daher lässt sich eine epigenetische Regulation vermuten.

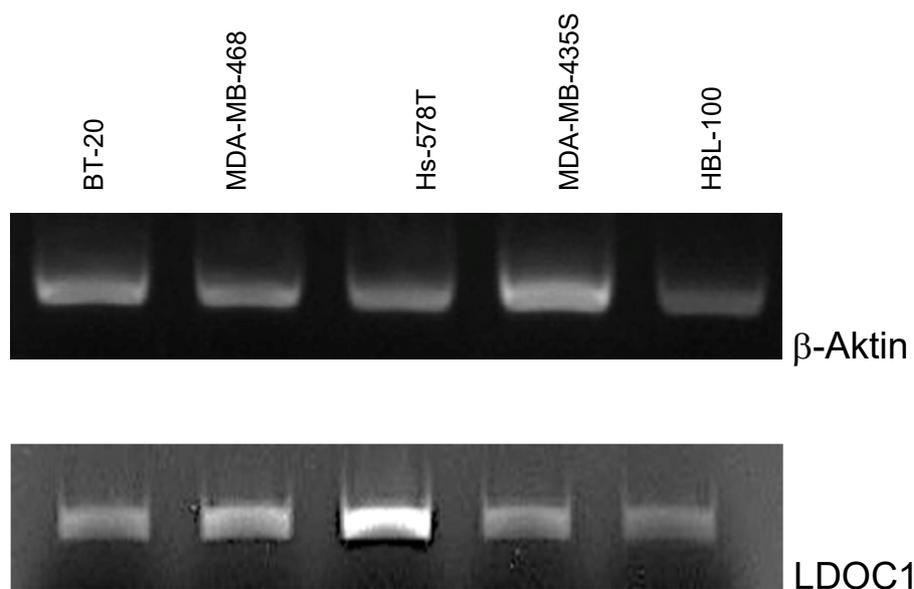


Abbildung 7: Expression von LDOC1 in genomischer DNA (gDNA) der Mammakarzinomzelllinien BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435S und HBL-100. Die gDNA genannter Zelllinien wurde auf die Expression von LDOC1 überprüft. β -Aktin wurde zur Qualitätskontrolle der gDNA verwendet. Es zeigte sich eine LDOC1-Expression in allen untersuchten Zelllinien. Dies lässt eine epigenetische Regulation der LDOC1-Expression auf gDNA-Ebene vermuten.

3.6 Zellmorphologische Analyse

Für die vorliegende Arbeit diente der Trimethylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue der Anfärbung unspezifischer Proteine durch Komplexbildung. Auf diese Weise konnten morphologische Veränderungen in den Zelllinien T47-D, MCF-7, BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-453, BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435S, MDA-MB-231 und HBL-100 vor und nach zweitägiger Inkubation mit dem Methyltransferaseinhibitor Decitabin visualisiert werden.

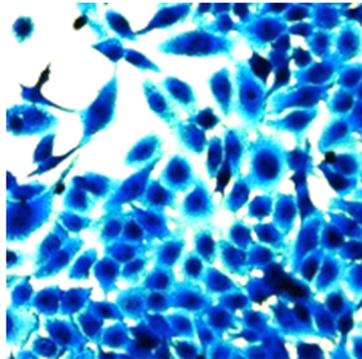
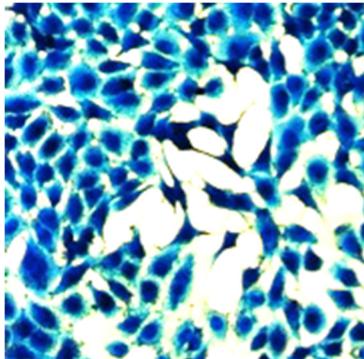
Kenny et al. unterteilten eine Reihe von Mammakarzinomzelllinien aufgrund ihrer morphologischen Unterschiede in der zwei- und dreidimensionalen Darstellung in vier Untergruppen: Round, Stellate, Mass, Grape-Like. Entsprechend dieser Klassifikation gehört die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 zur stellate morphology, die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 zur grape-like morphology. Die hier ebenfalls dargestellte Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435S wurde von Kenny et al. nicht eingeschlossen. Diese morphologischen Unterschiede können einen Hinweis auf das Genexpressionsprofil und die Invasivität der Zelllinien zeigen (Kenny, Lee et al. 2007). In allen untersuchten Zelllinien war deutlich zu erkennen, dass sich nach zweitägiger Inkubation mit Decitabin spindelförmige (fibroblastoide) und kugelige Zellformen in flache (epitheliale) Zellformen differenzierten. Diese Beobachtung wird als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet und gilt als typisches Charakteristikum bei der Dedifferenzierung von Epithelzellen zu Zellkontakt-unabhängigen invasiv malignen Zellen.

Hier konnte gezeigt werden, dass das epigenetisch wirksame Medikament Decitabin den Differenzierungsprozess zu epithelialen Zellformen bewirkt.

A

Kontrolle

2 Tage nach Decitabinzugabe



B

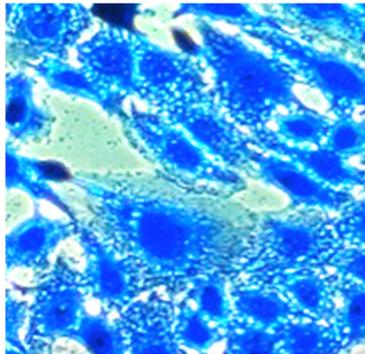
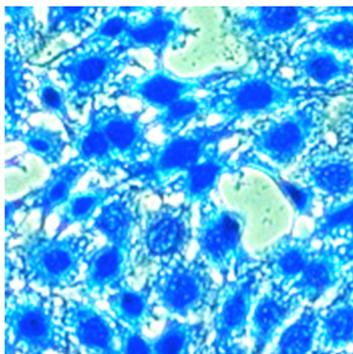
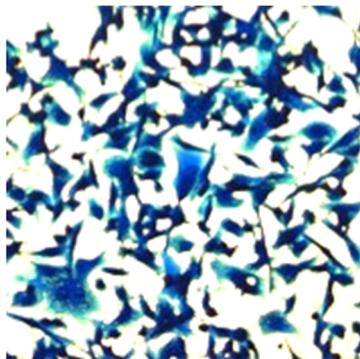
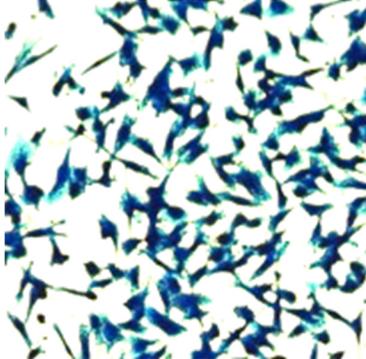


Abbildung 8: Färbung der Zelllinie MDA-MB-435S mit Coombassie Brilliant Blue vor und nach der Zugabe von 10 µg/ml Decitabin. Nach Anfärbung der Zelllinie MDA-MBA-435S vor und nach Zugabe von 10 µg/ml Decitabin wurde diese fixiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops fotodokumentiert. Durch die Vergrößerung des 10er Objektivs (A) konnten nach Zugabe von 10 µg/ml Decitabin morphologische Veränderungen in Form von Vergrößerung und Abflachung der Zellen beobachtet werden. Eine korrespondierende Beobachtung gelang durch die Vergrößerung des 40er Objektivs (B), hier war die Vergrößerung der Zellen nach Zugabe von 10 µg/ml Decitabin im Vergleich zur Kontrolle noch deutlicher zu erkennen.

A

Kontrolle

2 Tage nach Decitabinzugabe



B

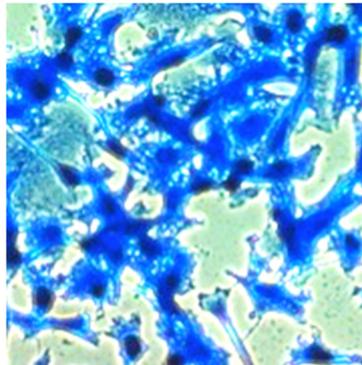
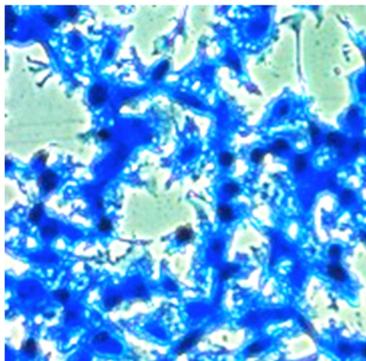
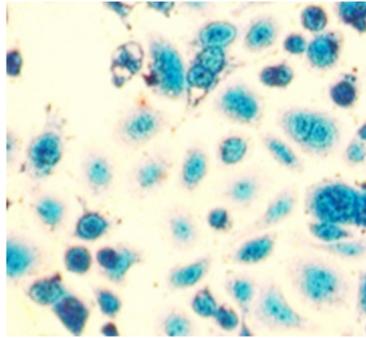
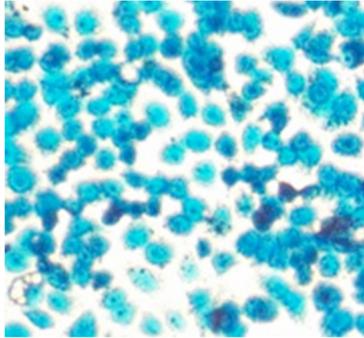


Abbildung 9: Färbung der Zelllinie MDA-MB-231 mit Coombassie Brilliant Blue vor und nach der Zugabe von 10 µg/ml Decitabin. Nach Anfärbung und Fixierung der Zelllinie MDA-MB-231 vor und nach zweitägiger Inkubation mit 10 µg/ml Decitabin konnten morphologische Veränderungen festgestellt werden. In der Vergrößerung mit dem 10er Objektiv (A) des Fluoreszenzmikroskops waren vereinzelt vergrößerte und abgeflachte Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen, was auf eine epitheliale Differenzierung der Zelllinie hinweist. Die Vergrößerung mit dem 40er Objektiv (B) zeigte eine Aufhebung der sternförmigen Zellmorphologie und ebenso eine Abflachung einzelner Zellen nach der Behandlung mit 10 µg/ml Decitabin.

A

Kontrolle

2 Tage nach Decitabinzugabe



B

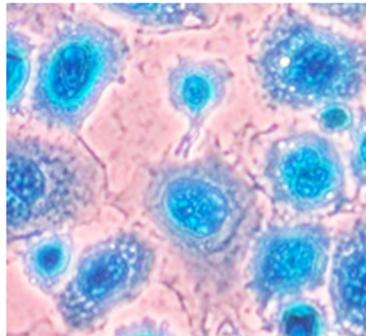
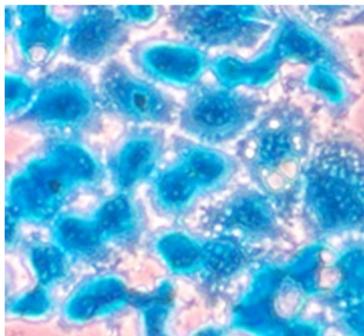


Abbildung 10: Färbung der Zelllinie MDA-MB-468 mit Coomassie Brilliant Blue vor und nach der Zugabe von 10 µg/ml Decitabin. Die Zelllinie MDA-MB-468 wird von Kelly et al., 2007 als traubenartige Zelllinie beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung ebenfalls gemacht werden. Nach Anfärbung und Fixierung der Zelllinie konnten nach Zugabe von 10 µg/ml Decitabin mit Hilfe des 10er Objektivs des Fluoreszenzmikroskops morphologische Veränderungen in Form von Abflachung und Vergrößerung beobachtet werden (A). Noch deutlicher gelang diese Beobachtung unter dem 40er Objektiv (B).

3.7 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz dient dem Nachweis spezifischer Proteine intra- und extrazellulärer Strukturen mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-435S, MCF-7 und MDA-MB-468 für die Immunfluoreszenzdarstellung verwendet. Die Phasenkontrastdarstellung diente der Visualisierung ohne Fluoreszenzlicht, um einen Überblick der Morphologie und Anordnung der Zellen zu gewinnen.

3.7.1 Immunfluoreszenz der Zelllinie MDA-MB-435S

Die Zelllinie MDA-MB-435S wurde hinsichtlich der Expression von MTA1 und Cytokeratin ohne und nach zweitägiger Inkubation mit 10µg/ml Decitabin untersucht (Abbildung 8). Cytokeratin ist ein Protein des Zytoplasmas und am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Der Nachweis von Cytokeratinen mittels eines sogenannten pan-Cytokeratin Antikörpers im Zytoplasma der Zelle gelang sowohl ohne als auch nach Decitabinbehandlung und wurde primär zur Darstellung des Zytosols genutzt.

Cytokeratin ist hier somit ein Marker für die Struktur und die Intaktheit der Zelle.

Bei der Expression von MTA1 wurde eine bemerkenswerte Beobachtung gemacht. Ohne Decitabinzugabe zeigte sich eine nukleäre Fluoreszenz, die auf eine hohe Aktivität von MTA1 in dieser Zelllinie hinweisen könnte. Diese nukleäre Fluoreszenz löst sich nach zweitägiger Behandlung mit Decitabin auf. In der nun epithelial differenzierten Zelllinie kommt es zu einer zytoplasmatischen Ansammlung von MTA1. Dies kann bedeuten, dass sich durch Decitabin sowohl die Lokalisation, als auch die lokalisationsspezifische Aktivität des Onkogens MTA1 in der Zelllinie MDA-MB-435S ändern kann.

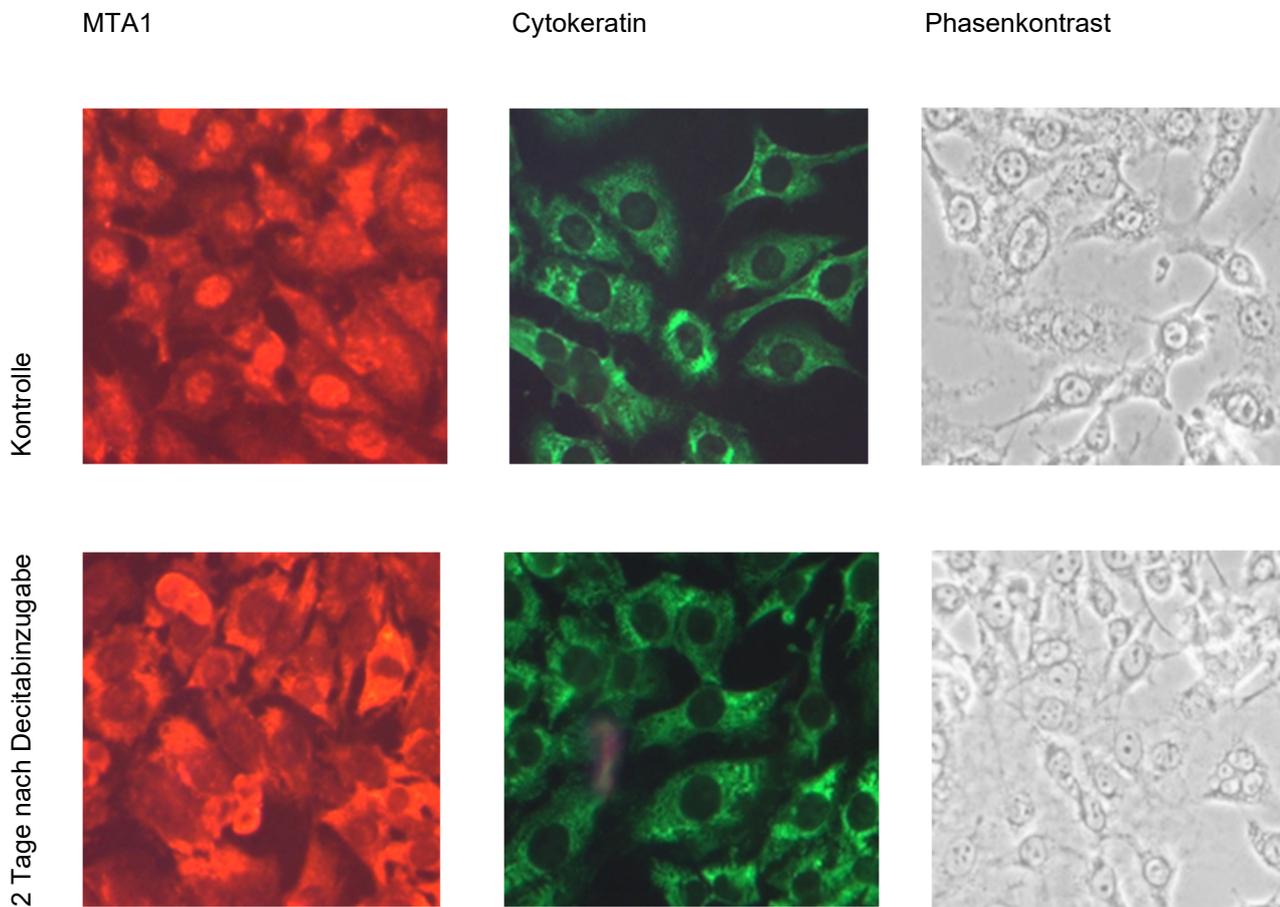


Abbildung 11: Expression von Cytokeratin und MTA1 in der Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinie MDA-MB-435S vor und nach der zweitägigen Behandlung mit 10 µg/ml Decitabin. Der Nachweis von Cytokeratin im Zytoplasma der Zellen wurde ohne (Kontrolle) und nach Inkubation von 10µg/ml Decitabin dargestellt. Die zunächst nukleäre Lokalisation von MTA1 veränderte sich nach der Behandlung mit Decitabin in eine zytoplasmatische Lokalisation. Dies weist auf eine Aktivitätsänderung der durch Decitabin epithelial differenzierten Zellen hin. Zusätzlich kann eine Abflachung der Zellen in eine epitheliale Zellform beobachten werden.

3.7.2 Immunfluoreszenz der Zelllinie MDA-MB-468

Für die Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinie MDA-MB-468 wurden Zellen für zwei Tage ohne (Kontrolle) und nach Zugabe von 10µg/ml Decitabin inkubiert. Das zytoplasmatische Vorhandensein von MTA1 ändert sich nach Decitabininkubation – anders als bei der Zelllinie MDA-MB-435S – nicht. Die Zellmorphologie ändert sich durch die Zugabe jedoch zu einer flachen, epithelialen Zellform

Der Nachweis von Cytokeratin in der Immunfluoreszenz gelang im Zytoplasma der Zellen ohne und nach Behandlung mit Decitabin. Auch hier wird die Änderung der Zellmorphologie deutlich.

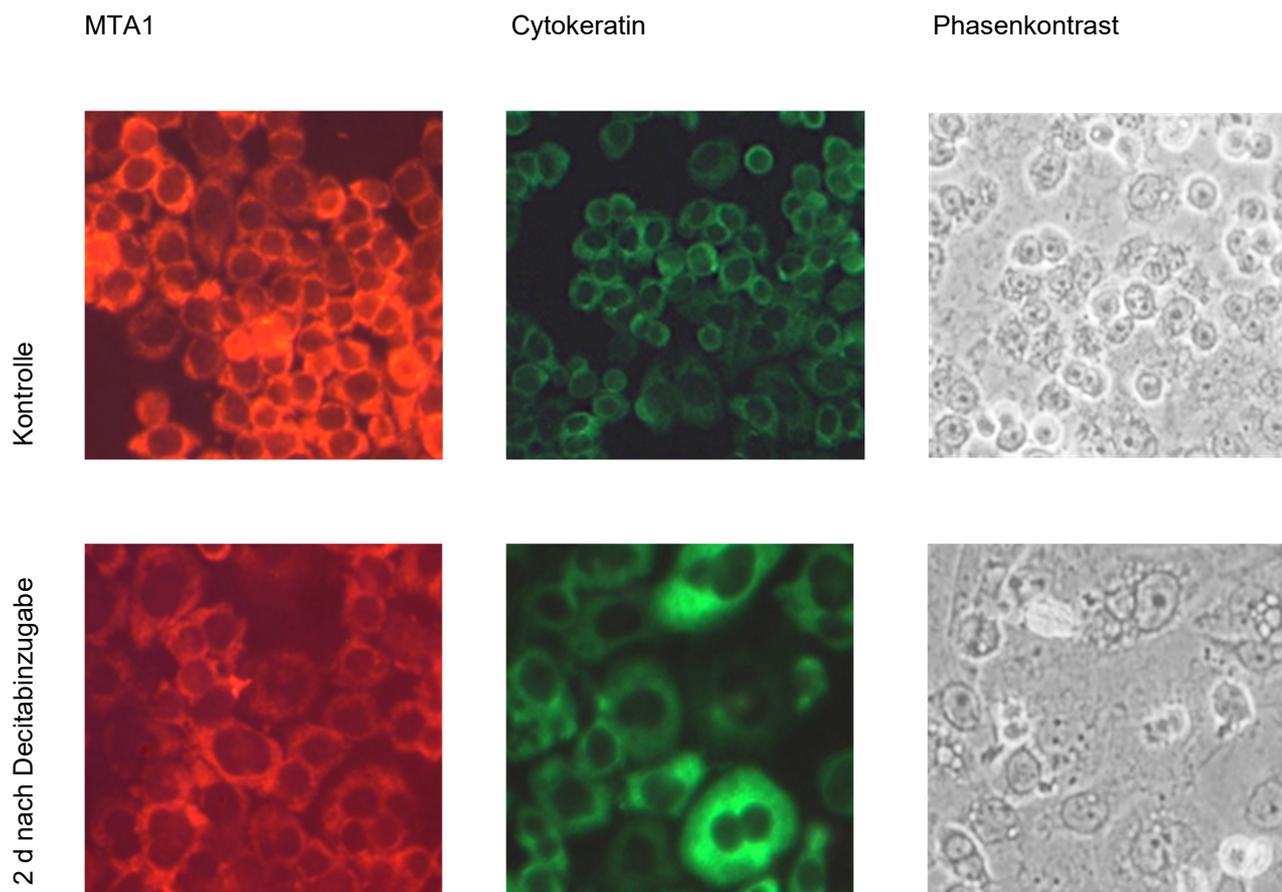


Abbildung 12: Expression von Cytokeratin und MTA1 in der Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinie MDA-MB-435S vor und nach der zweitägigen Behandlung mit Decitabin. Der Nachweis von Cytokeratin im Zytoplasma der Zelle gelingt in den Immunfluoreszenzansätzen mit und ohne Zugabe von 10µg/ml Decitabin. MTA1 zeigt bereits ohne Decitabininkubation eine

zytoplasmatische Lokalisierung, diese kann auch nach Decitabininkubation gezeigt werden. Auch hier wird deutlich, dass die Zellmorphologie sich durch Decitabin in eine epitheliale, flache Zellform differenziert.

3.7.3 Immunfluoreszenz der Zelllinie MCF-7

Die Zelllinie MCF-7 wurde ebenfalls auf das Expressionsverhalten von MTA1 und p53 in der Immunfluoreszenz untersucht.

Die vorliegende Analyse zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation von MTA1 in der Zelllinie MCF-7. Auch nach zweitägiger Inkubation mit Decitabin ist MTA1 nur im Zytoplasma der Zelle enthalten.

Bei p53 handelt es sich um ein Protein, das für ein Tumorsuppressorgen kodiert. Es reguliert nach DNA-Schädigung die Induktion der Apoptose oder DNA-Reparaturvorgänge. Ein Funktionsverlust von p53 kann zur Bildung von Tumoren führen. In der Immunfluoreszenz der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wird eine nukleäre Lokalisation von p53 mit und ohne Inkubation mit 10µg/ml Decitabin deutlich.

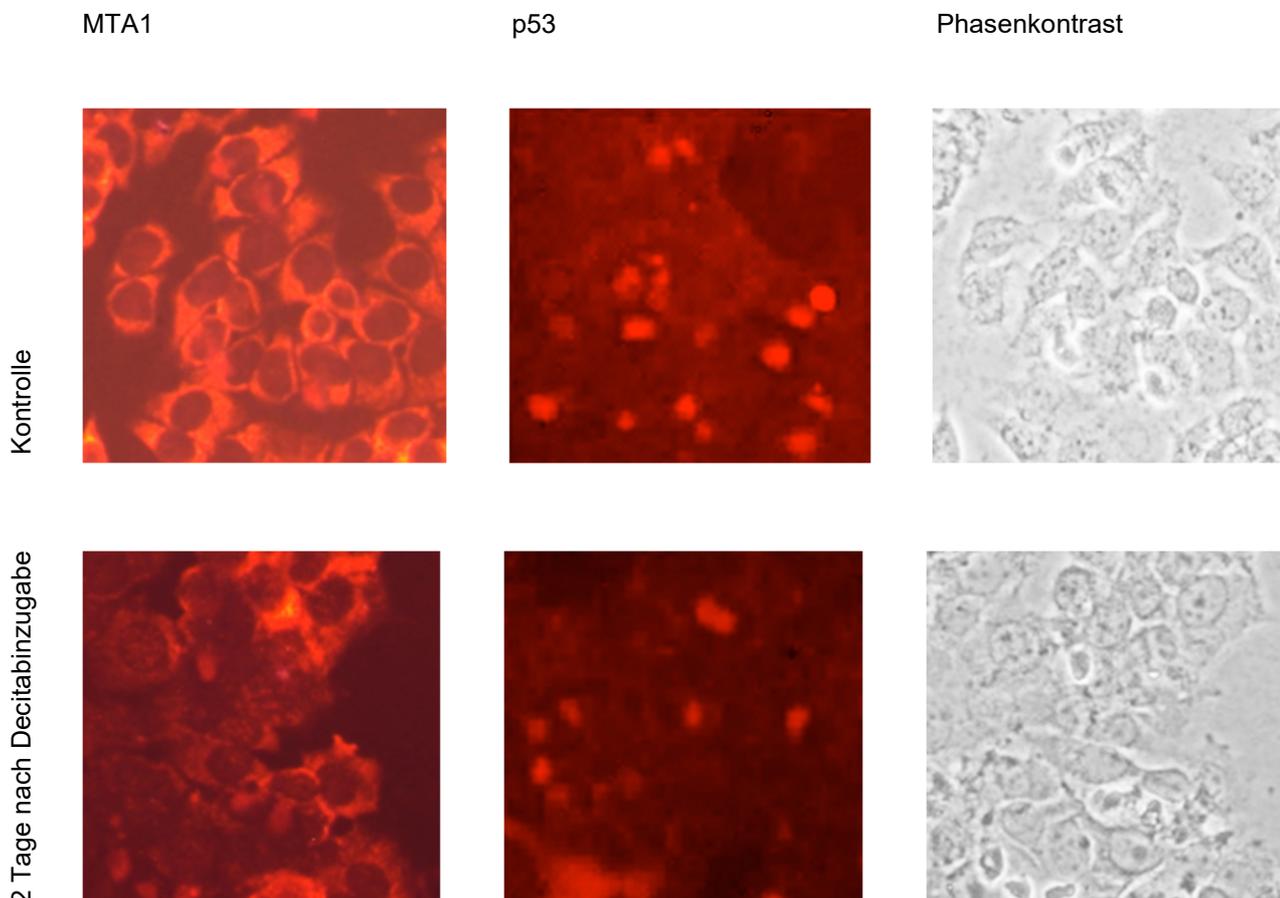


Abbildung 13: Expression von MTA1 und p53 in der Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinie MCF-7 nach und ohne zweitägige Decitabinbehandlung. Der Nachweis von MTA1 gelang in der Zelllinie MCF-7 im Zytoplasma der Zellen mit und ohne zweitägige Inkubation mit 10µg/ml Decitabin. Das Protein p53 zeigt hingegen eine konstant nukleäre Lokalisation in eine nukleäre Lokalisation.

3.8 Westernblot

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodik des Westernblots angewendet, um Proteine der Zelllinien HBL-100, MDA-MB-435S und MCF-7 durch spezifische Antikörper zu detektieren. Dazu wurden Zelllysate der genannten Zelllinien ohne Inkubation mit Decitabin (0), sowie nach zweitägiger Inkubation mit 10 µg/ml Decitabin (10) und 25 µg/ml Decitabin (25) hergestellt und dem Westernblotverfahren unterzogen. Es erfolgte der Nachweis von Pan-Cadherin, Pan-Cytokeratin, H3 (Histon H3 als interne Kontrolle für nukleäre Proteine), MTA1, MTA3 und p53. Aktin wurde hier ebenfalls zur Qualitätskontrolle der verwendeten Zelllinien angewendet.

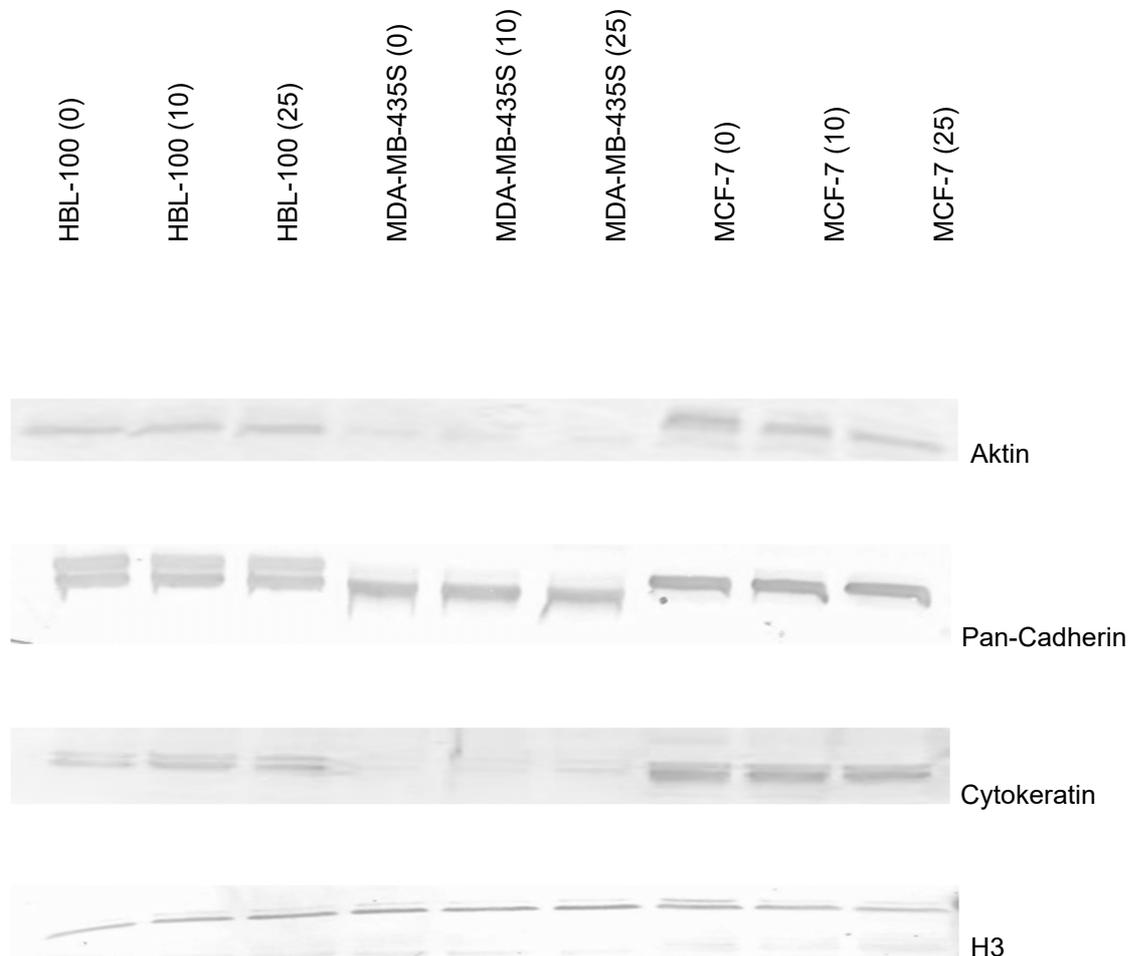




Abbildung 14: Expression von Aktin, Pan-Cadherin, Cytokeratin, H3, MTA1, MTA3 und p53 in den Zelllinien HBL-100, MDA-MB-435S und MCF-7 vor und nach Zugabe von Decitabin.

Die Western Blot Analyse zeigte bei keinem der untersuchten Faktoren eine auffällige Expressionsänderung nach Inkubation mit Decitabin, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass einer dieser Faktoren mit den beobachteten morphologischen Veränderungen durch Decitabin direkt gekoppelt ist bzw. beeinflusst wird.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Expressions- und Regulationsverhalten der Proteine LDOC1 und MTA1 in Mammakarzinomzelllinien. Anhand der durchgeführten Experimente konnte eine epigenetische Modifikation dieser Proteine nachgewiesen werden. Wie viele Studien der letzten Jahrzehnte gezeigt haben, spielen bei der Karzinogenese epigenetische Muster eine Rolle zu denen die in dieser Arbeit hervorgehobene DNA-Methylierung zählt. Der durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysierter Modifizierungsmechanismus findet in Tumorzellen gehäuft an CpG-Inseln in der Promotorregion statt (Ducasse and Brown 2006). CpG-Inseln sind Sequenzen, die durch die Basenpaarung aus Cytosin und Guanin (CG-Dinukleotide) gebildet werden. Zur Familie der DNMT gehören DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. DNMT1 wird auch als Maintenance-Methyltransferase bezeichnet und kopiert bereits bestehende Methylierungen während der DNA-Replikation. DNMT3A und DNMT3B katalysieren de-novo-Methylierungen von bisher unmethylierten CpG-Regionen und sind vielfach in embryonalen Zellen exprimiert (Bird 2002, Bogdanović and Veenstra 2009).

60-90% dieser CpG-Inseln des Genoms sind methyliert, wohingegen die Promotorregion in der Regel unmethyliert vorliegt. Die Faktoren, durch die der Verknüpfungsmechanismus von CpG-Inseln mit einer Methylgruppe nicht vollzogen wird, sind bisher noch unklar (Clouaire and Stancheva 2008, Bogdanović and Veenstra 2009). Im Methylierungsmuster zwischen Vertebraten und Nicht-Vertebraten besteht eine Vielzahl von Unterschieden. Intervertebraten wie der Nematode *Caenorhabditis elegans* und das Insekt *Drosophila melanogaster* weisen keine oder nur wenig methyliertes Cytosin auf. Die Methylierung findet hier meist an CpG-Inseln statt. Vertebraten hingegen weisen ein globales Methylierungsmuster des gesamten Genoms auf. Diese Beschreibung des unterschiedlichen Verteilungsmusters kann darauf hindeuten, dass die durch Methylierung bedingten Funktionen ebenfalls variabel sind. Die Bedeutung dessen ist letztlich noch ungeklärt. Die Erkenntnis über das Verteilungsmuster besonders in Bezug auf die Unterschiede zwischen Vertebraten und Nicht-Vertebraten bietet eine gute Grundlage für weitere Forschungsansätze (Bird 2002). Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Methylierungsprozess bei physiologischen Geschehen wie der Embryonalentwicklung, X-Chromosom-Inaktivierung, Alterungsprozessen und Imprinting sowie pathologischen Prozessen wie

Karzinogenese und genetischen Erkrankungen eine Rolle spielt (Bird 2002, Bogdanović and Veenstra 2009).

In dieser Studie wird gezeigt, dass das Protein LDOC1 (Leucin zipper downregulated in cancer 1) in Mammakarzinomzelllinien herunterreguliert ist und durch Behandlung mit dem Methyltransferaseinhibitor Decitabin reexprimiert werden kann. Dies weist nach, dass auch bei Mammakarzinomzelllinien im Rahmen der Karzinogenese eine Hypermethylierung stattgefunden hat.

LDOC1 wurde erstmals 1999 durch Nagasaki et al. in Zelllinien aus Mamma, Pankreas, Kolon, Lunge, Magen, Uterus, Mundhöhle, Melanom und Neuroepitheliom beschrieben (Nagasaki, Manabe et al. 1999). 2003 konnte dargelegt werden, dass es sich bei LDOC1 aufgrund seiner regulatorischen Eigenschaften um ein Tumorsuppressorgen handelt (Nagasaki, Schem et al. 2003). Daraufhin folgten in vielen Arbeitsgruppen weitere Studien, die die Herunterregulierung von LDOC1 beim Ösophaguskarzinom (Ogawa, Ishiguro et al. 2008) oralen Plattenepithelkarzinom (Lee, Wong et al. 2013), Zervixkarzinom (Buchholtz, Bruning et al. 2014), papillären Schilddrüsenkarzinom (Zhao, Wang et al. 2015) und bei chronisch lymphatischer Leukämie (Duzkale, Schweighofer et al. 2011) bestätigten. Die Erkenntnis über die Funktionsweise, das Vorkommen und die Regulation von LDOC1 bietet die Möglichkeit das Tumorsuppressorgen in der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten einzuordnen und einen Ansatz zu finden seiner Downregulation entgegenzuwirken.

Mit dem Antimetabolit 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabin) wurde ein Molekül synthetisiert, das als Methyltransferaseinhibitor in den Methylierungsprozess während der Karzinogenese eingreifen kann. Sein inhibierender Effekt auf Leukämiezellen wurde bereits 1970 durch Li et al. beschrieben (Li, Olin et al. 1970).

Typischerweise findet die Methylierung an Position 5 des Cytosinrings eines CG-Dinukleotids statt. Durch den Einbau von Decitabin anstelle von Cytosin in die DNA erfolgt eine kovalente Bindung mit dem Enzym Methyltransferase an den Decitabinring. Die von einem S-Adenosylmethionin stammende Methylgruppe kann im Vergleich zu einem Methylierungsprozess nicht hinzugefügt werden, da dies durch die zusätzliche N-Gruppe an der 5'-Position des Decitabins verhindert wird. Die kovalente Bindung zwischen der Methyltransferase und Decitabin bleibt bestehen, somit ist das Enzym eingeschlossen und in seiner weiteren Funktion gehemmt.

Seelan et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass es während der Karzinogenese durch epigenetische Prozesse zu Modifikationen im Methylierungsmuster kommt, wodurch

Tumorsuppressorgene ausgeschaltet werden. Die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen wurde bereits mehrfach am Beispiel der akuten myeloischen Leukämie (AML) und des Myelodysplastischen Syndroms (MDS) beschrieben.

Außerdem betonen sie in ihrer Studie, dass die Anwendung des Methyltransferaseinhibitors Decitabin nicht ausschließlich die Promotordemethylierung, sondern weitere Mechanismen zur Folge hat.

So kommt es durch Decitabin auch zu Histonmodifikationen. Diese werden unter anderem durch Histondeacetylasen getriggert und spielen bei der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine ähnliche Rolle wie Methylierungsprozesse. Ein von Seelan et al. genanntes Beispiel ist der Einfluss von Decitabin auf die herunterregulierten Tumorsuppressorgene DSC3 und MASPIN in Mammakarzinomzellen. Hier kommt es zu einer Reaktivierung der Tumorsuppressorgene durch Eingreifen in den Methylierungsprozess am Promoter des Histons H3. Eine Kombination aus Methyltransferaseinhibitor und Histon-Deacetylaseinhibitor könnte hier Wirkung zeigen und ist Bestandteil von aktuellen Studien. Ein Beispiel für die durch Decitabin beeinflusste Genexpression unabhängig der Promotordemethylierung ist die Aktivierung des Tumorsuppressors 14-3-3 σ in Zelllinien des Endometriumkarzinoms. Durch die resultierende Herunterregulierung des p53-Modulators MDM2 konnte eine gesteigerte Expression des Tumorsuppressorgens p53 bewirkt werden. Dadurch kann p53 seine Funktion der Unterbrechung des Zellzyklus entarteter Zellen und der Einleitung des programmierten Zelltods wieder aufnehmen.

Decitabin ist zur Therapie bei AML und MDS bereits zugelassen. Für die Anwendung von Decitabin bei anderen Tumorentitäten und Pathologien ist auf Grundlage der oben beschriebenen zusätzlichen Erkenntnisse zu berücksichtigen, dass es auch indirekt zu einer Genaktivierung kommen kann, die nicht durch Promotormethylierung ausgelöst ist.

Die Stoffwechsel- und Abbaumechanismen von Decitabin durch Deaminasen sind eine Erklärung für eine individuelle Resistenz gegen den Methyltransferaseinhibitor: Decitabin wird mit Hilfe eines Nukleosidtransporters in die Zelle transportiert und hier durch die Enzyme Desoxycytidinkinase, Nukleotidmonophosphatkinase Nukleotidphosphatkinase in seine biologisch aktive Form AzaD-dCTP katalysiert. Die Inaktivierung und der Abbau von Decitabin erfolgt durch die Anwesenheit der Enzyme Cytidineaminase und dCMP-Deaminase, die zu einer Konvertierung in die inaktive

Desoxyuridin-Analoga von Decitabin Aza-dU und Aza-dUMP führen (Seelan, Mukhopadhyay et al. 2018).

In dieser Arbeit gelang erstmalig der Nachweis, dass in zwei von neun getesteten Mammakarzinomzelllinien kein LDOC1 exprimiert wird. Hierbei handelt es sich um die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-435S, die aufgrund ihres Hormonexpressionsmusters in die Kategorie der triple-negativen Mammakarzinome gehören und klinisch ein hoch aggressives und schwer zu therapierendes Verhalten zeigen. Das Hinzufügen des Methyltransferaseinhibitors Decitabin führt in diesen beiden Zelllinien zur Reexpression von LDOC1 und damit zur Apoptose der entarteten Zellen. Das Expressionsverhalten von LDOC1 und seine Reexpression durch Decitabin beim Mammakarzinom wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Die durch Seelan et al. beschriebenen Faktoren in der Anwendung von Decitabin sind auch für diese Arbeit zu berücksichtigen und kritisch zu hinterfragen. Decitabin besitzt die Fähigkeit in den Vorgang der Karzinogenese auf variable Art und Weise einzugreifen. Hierzu zählen die in vielen Tumorentitäten bereits nachgewiesene Promotordemethylierung, aber auch die durch Seelan et al. erwähnte Histonmodifikation und der Einfluss auf die Reexpression weiterer Tumorsuppressorgene wie p53. Die vorliegende Arbeit fokussierte sich auf die Auswirkung der Anwendung von Decitabin auf das Tumorsuppressorgen LDOC1. Mit der Kenntnis über die Struktur von LDOC1 konnte nachgewiesen werden, dass hier der Mechanismus der Promotordemethylierung durch Decitabin gelingt. Weitere indirekte Mechanismen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht und bieten bezogen auf das Mammakarzinom eine interessante Fragestellung für weitere Untersuchungen.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der cDNA von Mammakarzinomzelllinien auf das Vorhandensein des Genprodukts MTA1 (metastasis-associated protein 1). MTA1 wird sowohl in normalen Geweben als auch in Karzinomgeweben exprimiert und hat eine Reihe von physiologischen und pathologischen Funktionen in diversen Organsystemen (Sen, Gui et al. 2014) (Liu, Wang et al. 2014). Die Interaktion von MTA1 mit karzinomrelevanten Proteinen und Proteinkomplexen wie Snail, E-Cadherin, STATs und dem Östrogenrezeptor gelingt durch Mechanismen wie dem NuRD-Komplex und direkte Interaktion (Histon-Deacetylierung) und Deacetylierung von non-histone-Proteinen (Bruning, Blankenstein et al. 2014).

Interessant ist die in mehreren Arbeiten untersuchte Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Proteinen der MTA-Familie und der Expression des Östrogenrezeptors in Mammakarzinomzelllinien. Mehrfach konnte dargestellt werden, dass es durch die Stimulierung von Wachstumsfaktoren in Brustkrebszellen zu einer Interaktion von MTA1 mit dem Östrogenrezeptor kommt. Kumar et al. beschreiben diesen Zusammenhang wie folgt: eine Überexpression von MTA1 führt in Mammakarzinomzelllinien zur einer Herunterregulierung des Östrogenrezeptors, wodurch ein hormonrezeptorunabhängiges, gesteigertes Wachstumspotential resultiert (Kumar, Wang et al. 2003).

In einer Studie von Toh et al. wird eine Korrelation zwischen der Expression von MTA1 und der Tumorgröße und dem Rezidivrisiko für Brustkrebs dargestellt. Eine Überexpression von MTA1 ist so mit einem Hochrisikoprofil des Mammakarzinoms im Sinne von Tumorgrading, Tumorgröße, Gefäßinvasion und Metastasierungs- und Rezidivpotential assoziiert (Toh and Nicolson 2009).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wiesen eine verminderte Expression von MTA1 in den Zelllinien T47-D, SK-BR-3 und MDA-MB-453 nach. Diese lassen sich im Gegenteil zu den Zelllinien mit fehlender LDOC1-Expression keiner gemeinsamen hormonrezeptorspezifischen Kategorie zuordnen. SK-BR-3 und MDA-MB-453 gehören in die Kategorie der hormonrezeptornegativen, Her2-positiven Mammakarzinome, T47-D hingegen in die Luminal A-Kategorie mit hormonrezeptorpositivem und Her2-negativem Rezeptorstatus. Die durch Triplenegativität gekennzeichneten Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-435S, MDA-MB-468 und Hs578T zeigten allesamt eine ausgeprägte Expression von MTA1.

Die hier erzielten Ergebnisse und die aufgeführten Studienergebnisse anderer Studiengruppen bieten eine interessante Grundlage für weitere Untersuchungen, um die Zusammenhänge zwischen dem Expressionsverhalten von Proteinen der MTA-Familie und der Korrelation zum Hormonrezeptorstatus weiter zu beleuchten.

Auf Proteinebene wurde MTA1 mittels Immunfluoreszenz analysiert. Hierzu wurden die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-435S, MDA-MB-468 und MCF-7 vor und nach Inkubation mit Decitabin auf die Lokalisation von MTA1 und die Morphologie der Zellen geprüft. Für die Zelllinie MDA-MB-435S zeigte MTA1 nach zweitägiger Behandlung mit Decitabin nicht wie anfangs eine nukleäre sondern eine zytoplasmatische Fluoreszenz. Verglichen hierzu zeigt das Tumorsuppressorgen p53 stets eine Anreicherung im Nukleus. Für Transkriptionsfaktoren ist eine nukleäre Lokalisation typisch. Im Nukleus

der Zelle finden DNA-Replikations- und -transkriptionsvorgänge statt. Das Zytoplasma hingegen ist für DNA-unabhängige Stoffwechselprozesse zuständig. Die Aktivität der Mitglieder der MTA-Familie im Zytoplasma ist noch nicht in vollem Umfang geklärt. Liu et al. skizzieren die Lokalisation von MTA1 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus, wobei die jeweilige Funktion Unterschiede aufweist: Im Zytoplasma bindet MTA1 am Mikrotubulusskelett. Im Nukleus erfolgt eine Interaktion mit Chromatin. Dadurch wird in malignen Zellen Einfluss auf das Invasions- und Metastasierungsverhalten von Karzinomzellen genommen, im Nukleus von benignen Zellen ist MTA1 Bestandteil der Chromatingestaltung und der transkriptionellen Regulation. Der Nachweis für eine zytoplasmatische Lokalisation von MTA 1 gelingt Liu et al. in Geweben während der Embryogenese. Dies lässt darauf schließen, dass nukleäres MTA 1 vorwiegend für zellregulatorische Funktionen verantwortlich und zytoplasmatisches MTA1 Bestandteil der Embryogenese ist (Liu, Wang et al. 2014).

In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist zu vermuten, dass die durch Decitabin induzierten Differenzierungsprozesse Einfluss auf die Lokalisation von MTA1 und die lokalisationspezifische Aktivität haben. Diese Erkenntnisse regen zu weiteren Untersuchung an, mit dem Ziel die Funktionen von MTA1 bei Zelllinien des Mammakarzinoms zu spezifizieren und ihrer Lokalisation zuzuordnen.

Zudem zeigten sich auch in anderen untersuchten Zelllinien durch die Behandlung mit Decitabin morphologische Veränderungen: Kugelige, fibroblastoide Zellformen veränderten sich zu flachen, epithelialen Zellformen. Der hier vermutete Mechanismus wird als epitheliale-mesenchymale Transition bezeichnet und spielt bei verschiedenen Aspekten maligner Geschehen wie Metastasierung, Invasionspotential und Zytostatikaresistenz eine Rolle. Dieser Vorgang findet sich auch physiologisch während der Entwicklung embryonaler Strukturen (Bastid 2012) (Meng and Wu 2012). Insgesamt lässt sich festhalten, dass es durch die Behandlung mit dem Zytostatikum Decitabin gelungen ist, eine Reexpression des Tumorsuppressorgens LDOC1 in Mammakarzinomzelllinien zu erreichen. Mittels Immunfluoreszenz ist die Lokalisation von MTA1 veranschaulicht worden. Dies lässt eine Änderung der Aktivität und der Funktion von MTA1 in Mammakarzinomzelllinien vermuten.

4.1 Ausblick

Die in vielen Versuchsreihen thematisierten Proteine LDOC1 und MTA1 wurden in dieser Arbeit zum Gegenstand bezogen auf das Mammakarzinom.

Es konnte gezeigt werden, dass das Protein LDOC1 durch die Behandlung von Mammakarzinomzellen mit dem Methyltransferaseinhibitor Decitabin reexprimiert werden kann, um so seine regulatorischen und apoptotischen Eigenschaften als Tumorsuppressoren zu reaktivieren. Es ist davon auszugehen, dass es durch epigenetische Modifikation zu einer Herunterregulierung von LDOC1 durch Promotormethylierung kommt. Die Expression von MTA1 weist eine variable Ausprägung innerhalb der verschiedenen Mammakarzinomzelllinien auf. Interessant ist hier die Erkenntnis, dass es in einer untersuchten Zelllinie durch die Behandlung mit Decitabin zu einer Verschiebung der Lokalisation vom Zellkern ins Zellzytoplasma kam und somit eine Veränderung der Aktivität vermuten lässt.

Als limitierend erweist sich der Umstand, dass es sich bei LDOC1 um kein mammakarzinomspezifisches Protein handelt, in weiteren Studien gelang der Nachweis in einer Vielzahl von Malignomen. Ebenso ist aufgrund des Vorkommens von MTA1 in physiologischen und maligne entarteten Geweben seine konkrete Funktion in Zellen des Mammakarzinoms noch unzureichend geklärt. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit LDOC1 als Biomarker zu detektieren, um Therapieoptionen zu generieren, Schlüsse auf die Aggressivität und das Metastasierungspotential zu schließen oder sogar als Screeningparameter anzuwenden. Ob der Nachweis von LDOC1 nur an aufbereiteten Gewebeproben oder auch in Blutproben der Patientinnen möglich ist, stellt eine interessante Fragestellung für folgende Untersuchungen dar.

Die klinische Anwendung von Decitabin beschränkt sich derzeit auf Therapie des myelodysplastischen Syndroms und der akut myeloischen Leukämie. Für das Mammakarzinom gelang der Nachweis der Proteine LDOC1 und MTA1 ebenso wie die Reexpression von LDOC1 bisher nur in vitro. Um Decitabin auch für das Mammakarzinom zuzulassen, bedarf es nach bestätigenden in-vitro Untersuchungen umfassende klinische Studien, um die Wirksamkeit, Verträglichkeit und Dosierung zu evaluieren. Vielleicht gelingt es so, durch das Verständnis der Promotormethylierung in malignen Geschehen Decitabin in das multimodale Therapiekonzept des Mammakarzinoms zu involvieren.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Expressions- und Regulationsmechanismen der tumorrelevanten Proteine LDOC1 und MTA1 in vitro zu untersuchen und mit dem Methyltransferaseinhibitor Decitabin einen geeigneten Kandidaten für die Reexpression des Tumorsuppressorgens LDOC1 zu beschreiben. Für die Untersuchungsreihen wurden neun etablierte Mammakarzinomzelllinien gewählt. Im PCR-Verfahren wurde die cDNA der Zelllinien auf verschiedene Genprodukte wie LDOC1 und MTA1 analysiert und klassifiziert. Nach Behandlung der Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-435S wurde mittels PCR eine Reexpression des initial herunterregulierten LDOC1 beobachtet. Diese Annahme unterstützt die Hypothese der epigenetischen Modifikation durch Promotormethylierung. Die korrespondierende Untersuchung auf das Onkogen MTA1 zeigte eine variable Ausprägung des Proteins, wobei eine geringere Expression in den Zelllinien T47-D, SK-BR-3 und MDA-MB-435 nachgewiesen werden konnte.

Ferner wurde eine zellmorphologische Analyse der Mammakarzinomzelllinien durchgeführt. Durch Anfärbung der Zellen und Fluoreszenzmikroskopie konnten morphologische Unterschiede vor und nach Behandlung mit Decitabin festgestellt werden. Spindelförmige, fibrinoide Zellen entwickeln sich zu flachen, epithelialen Zellen und verdeutlichen hier den Mechanismus der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es sich bei MTA1 um ein nukleäres Protein handelt, welches durch die Behandlung mit Decitabin einen Lokalisationswechsel in das Zellzytoplasma vornimmt. Dies bietet den Hinweis, dass Decitabin die lokalisationspezifische Aktivität von MTA1 beeinflusst.

Mit der Erkenntnis der in dieser Studie erreichten Ergebnisse gilt es die Funktion von LDOC1 und MTA1 genauer zu beleuchten und als potentielle Biomarker für das Mammakarzinom zu evaluieren. Mit Decitabin zeigt sich eine potentielle Therapiemöglichkeit im multimodalen Behandlungskonzept des Mammakarzinoms. Weitere Untersuchungen und Studien sind notwendig, um dies in der Klinik etablieren zu können.

6. Literaturverzeichnis

Aparicio, A. and J. S. Weber (2002). "Review of the clinical experience with 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumors." Curr Opin Investig Drugs **3**(4): 627-633.

Aramaki, Y., et al. (2005). "Direct interaction between metastasis-associated protein 1 and endophilin 3." FEBS Lett **579**(17): 3731-3736.

Balasenthil, S., et al. (2006). "Expression of metastasis-associated protein 1 (MTA1) in benign endometrium and endometrial adenocarcinomas." Hum Pathol **37**(6): 656-661.

Bastid, J. (2012). "EMT in carcinoma progression and dissemination: facts, unanswered questions, and clinical considerations." Cancer Metastasis Rev **31**(1-2): 277-283.

Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.

Bogdanović, O. and G. J. Veenstra (2009). "DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function." Chromosoma **118**(5): 549-565.

Bray, F., et al. (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin **68**(6): 394-424.

Bruning, A., et al. (2014). "Function and regulation of MTA1 and MTA3 in malignancies of the female reproductive system." Cancer Metastasis Rev **33**(4): 943-951.

Buchholtz, M. L., et al. (2014). "Epigenetic silencing of the LDOC1 tumor suppressor gene in ovarian cancer cells." Arch Gynecol Obstet **290**(1): 149-154.

Buchholtz, M. L., et al. (2013). "Loss of LDOC1 expression by promoter methylation in cervical cancer cells." Cancer Invest **31**(9): 571-577.

Castro, S. M., et al. (2017). "Automated annotation and classification of BI-RADS assessment from radiology reports." J Biomed Inform **69**: 177-187.

Christman, J. K. (2002). "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy." Oncogene **21**(35): 5483-5495.

Clouaire, T. and I. Stancheva (2008). "Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?" Cell Mol Life Sci **65**(10): 1509-1522.

Dannenmann, C., et al. (2008). "The metastasis-associated gene MTA1 is upregulated in advanced ovarian cancer, represses ERbeta, and enhances expression of oncogenic cytokine GRO." Cancer Biol Ther **7**(9): 1460-1467.

Ducasse, M. and M. A. Brown (2006). "Epigenetic aberrations and cancer." Mol Cancer **5**: 60.

Duzkale, H., et al. (2011). "LDOC1 mRNA is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia and predicts overall survival in untreated patients." Blood **117**(15): 4076-4084.

Esposito, A., et al. (2015). "Highlights from the 14(th) St Gallen International Breast Cancer Conference 2015 in Vienna: Dealing with classification, prognostication, and prediction refinement to personalize the treatment of patients with early breast cancer." Ecancermedicalsecience **9**: 518.

Goldhirsch, A., et al. (2013). "Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013." Ann Oncol **24**(9): 2206-2223.

Hall, J. M., et al. (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." Science **250**(4988): 1684-1689.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Inoue, M., et al. (2005). "LDOC1, a novel MZF-1-interacting protein, induces apoptosis." FEBS Lett **579**(3): 604-608.

Issa, J. P. (2003). "Decitabine." Curr Opin Oncol **15**(6): 446-451.

Issa, J. P. (2004). "CpG island methylator phenotype in cancer." Nat Rev Cancer **4**(12): 988-993.

Jang, K. S., et al. (2006). "MTA1 overexpression correlates significantly with tumor grade and angiogenesis in human breast cancers." Cancer Sci **97**(5): 374-379.

Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-428.

Kantarjian, H. M., et al. (1997). "Decitabine studies in chronic and acute myelogenous leukemia." Leukemia **11 Suppl 1**: S35-36.

Kenny, P. A., et al. (2007). "The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression." Mol Oncol **1**(1): 84-96.

Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.

Kumar, R., et al. (2003). "Emerging roles of MTA family members in human cancers." Semin Oncol **30**(5 Suppl 16): 30-37.

Lee, C. H., et al. (2015). "LDOC1 silenced by cigarette exposure and involved in oral neoplastic transformation." Oncotarget **6**(28): 25188-25201.

Lee, C. H., et al. (2013). "Epigenetic regulation of the X-linked tumour suppressors BEX1 and LDOC1 in oral squamous cell carcinoma." J Pathol **230**(3): 298-309.

Li, D. Q., et al. (2012). "Metastasis-associated protein 1/nucleosome remodeling and histone deacetylase complex in cancer." Cancer Res **72**(2): 387-394.

Li, L. H., et al. (1970). "Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia." Cancer Res **30**(11): 2760-2769.

Liu, J., et al. (2014). "Subcellular localization of MTA proteins in normal and cancer cells." Cancer Metastasis Rev **33**(4): 843-856.

Meng, F. and G. Wu (2012). "The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis." Cancer Metastasis Rev **31**(3-4): 455-467.

Momparler, R. L., et al. (1985). "Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia." Pharmacol Ther **30**(3): 277-286.

Montagna, E., et al. (2011). "Immunohistochemically defined subtypes and outcome in occult breast carcinoma with axillary presentation." Breast Cancer Res Treat **129**(3): 867-875.

Monticciolo, D. L., et al. (2013). "The ACR/Society of Breast Imaging Resident and Fellowship Training Curriculum for Breast Imaging, updated." J Am Coll Radiol **10**(3): 207-210.e204.

Nagasaki, K., et al. (1999). "Identification of a novel gene, LDOC1, down-regulated in cancer cell lines." Cancer Lett **140**(1-2): 227-234.

Nagasaki, K., et al. (2003). "Leucine-zipper protein, LDOC1, inhibits NF-kappaB activation and sensitizes pancreatic cancer cells to apoptosis." Int J Cancer **105**(4): 454-458.

Nawa, A., et al. (2000). "Tumor metastasis-associated human MTA1 gene: its deduced protein sequence, localization, and association with breast cancer cell proliferation using antisense phosphorothioate oligonucleotides." J Cell Biochem **79**(2): 202-212.

Ogawa, R., et al. (2008). "Identification of candidate genes involved in the radiosensitivity of esophageal cancer cells by microarray analysis." Dis Esophagus **21**(4): 288-297.

Oki, Y., et al. (2007). "Decitabine--bedside to bench." Crit Rev Oncol Hematol **61**(2): 140-152.

Peltomäki, P. (2012). "Mutations and epimutations in the origin of cancer." Exp Cell Res **318**(4): 299-310.

Rhiem, K., et al. (2012). "The risk of contralateral breast cancer in patients from BRCA1/2 negative high risk families as compared to patients from BRCA1 or BRCA2 positive families: a retrospective cohort study." Breast Cancer Res **14**(6): R156.

Rivard, G. E., et al. (1981). "Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia." Leuk Res **5**(6): 453-462.

Seelan, R. S., et al. (2018). "Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression." Drug Metab Rev **50**(2): 193-207.

Sen, N., et al. (2014). "Physiological functions of MTA family of proteins." Cancer Metastasis Rev **33**(4): 869-877.

Sorm, F., et al. (1964). "5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic." Experientia **20**(4): 202-203.

Toh, Y. and G. L. Nicolson (2009). "The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications." Clin Exp Metastasis **26**(3): 215-227.

Toh, Y., et al. (1994). "A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses." J Biol Chem **269**(37): 22958-22963.

Torre, L. A., et al. (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **65**(2): 87-108.

Wooster, R., et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**(6559): 789-792.

Yang, Q. Y., et al. (2014). "MTA1 promotes cell proliferation via DNA damage repair in epithelial ovarian cancer." Genet Mol Res **13**(4): 10269-10278.

Zhao, S., et al. (2015). "LDOC1 inhibits proliferation and promotes apoptosis by repressing NF-kappaB activation in papillary thyroid carcinoma." J Exp Clin Cancer Res **34**: 146.

Zielinski, C., et al. (2016). "Bevacizumab plus paclitaxel versus bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer (TURANDOT): primary endpoint results of a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial." Lancet Oncol **17**(9): 1230-1239.

Internetseiten

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

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=breast

<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>

<http://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/>

https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dacogen-epar-product-information_de.pdf

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021790s000_DacogenTOC.cfm

Bücher

Untch M, Harbeck N, Thomssen C (2018) Colloquium Senologie 2018/2019. Berlin, München, Halle: LUKON Verlagsgesellschaft mbH

Baurnerfeind I (2015) Mammakarzinome Manual. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge 2015, 15. Auflage, München: Tumorzentrum München

7. Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Radiology
ADA2	Adenosine deaminase 2
AML	Akut myeloische Leukämie
APC	Ademomatous plyposis coli
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BAH	Bromo-adjacent homology domain
BARD1	BRCA1 associated ring domain protein 1
BET	Brusterhaltene Therapie
BEX1	Brain expressed X-linked 1
BI-RADS	Breast Imaging Reporting and Data System
BRCA 1, 2	Breast Cancer gene 1,2
cDNA	Complementary DNA
CDH1	Cadherin1-Gen
CDK	Cyclin-dependent kinases
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CSC	Cigarette smoke condensate
CT	Computertomografie
DMNT	DNA-Methyltransferase
DNA	Desoxyribonucleic acid
EMA	Epithelial membrane antigen
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
ESA	Epithelomolial surface antigen
FDA	Food and drug administration
FDG	Fluorsdesoxyglucose
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
HSP90	Hitzeschockprotein
Ki-67	Antigen KI-67, MKI67 (Ki - Kiel)
LALBA	Lactalbumin alpha
LDOC1	Leucin zipper downregulated in cancer 1

mRNA	messanger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH	MutS Homolog
MTA	Metastasis associated protein
MZF1	myeolid zinc finger 1
NBN	Nibrin
N-CoR	Nuclear receptor co-repressor
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NuRD	Nucleosome remodelling and histone deacetylation
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronenemissionstomografie
PgR	Progesteronrezeptor
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomale RNA
SANT	SWI, ADA2, N-CoR, TFIIIB-domain
SBRT	Stereotactic body radiation therapy
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
STK11	Serin Threonin Kinase 11
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
T-DM1	Trastuzumab-Emtansin
TFIIIB	Transcriptionfactor IIIB
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TP53	Tumor protein 53, Name aufgrund seiner scheinbaren Molekularmasse von 53 kDa auf einem SDS-PAGE Gel
tRNA	Transfer RNA

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Mechanismus der DNA-Methyltransferase-Inhibition
- Abbildung 2 Expression von β -Aktin, LDOC1, MTA1, ER, LALBA, EMA und ESA in neun Mammakarzinomzelllinien
- Abbildung 3 Expression von LDOC1 in Mammakarzinomzelllinien
- Abbildung 4 Expression von MTA1 in Mammakarzinomzelllinien
- Abbildung 5 Reexpression von LDOC1 in der Zelllinie MDA-MB-435S durch die Behandlung mit 10 μ g/ml Decitabin
- Abbildung 6 Reexpression von LDOC1 in der Zelllinie MDA-MB-468 durch die Behandlung mit 10 μ g/ml Decitabin
- Abbildung 7 Expression von LDOC1 in genomischer DNA (gDNA) der Mammakarzinomzelllinien BT-20, MDA-MB-468, Hs-578T, MDA-MB-435S und HBL-100
- Abbildung 8 Färbung der Zelllinie MDA-MB-435S mit Coomassie Brilliant Blue vor und nach der Zugabe von 10 μ g/ml Decitabin
- Abbildung 9 Färbung der Zelllinie MDA-MB-231 mit Coomassie Brilliant Blue vor und nach der Zugabe von 10 μ g/ml Decitabin
- Abbildung 10 Färbung der Zelllinie MDA-MB-468 mit Coomassie Brilliant Blue vor und nach der Zugabe von 10 μ g/ml Decitabin
- Abbildung 11 Expression von Cytokeratin und MTA1 in der Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinie MDA-MB-435S vor und nach der zweitägigen Behandlung mit 10 μ g/ml Decitabin
- Abbildung 12 Expression von Cytokeratin und MTA1 in der Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinie MDA-MB-435S vor und nach der zweitägigen Behandlung mit Decitabin
- Abbildung 13 Expression von MTA1 und p53 in der Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinie MCF-7 nach und ohne zweitägige Decitabinbehandlung
- Abbildung 14 Expression von Aktin, Pan-Cadherin, Cytokeratin, H3, MTA1, MTA3 und p53 in den Zelllinien HBL-100, MDA-MB-435S und MCF-7 vor und nach Zugabe von Decitabin

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Molekulare Typisierung des Mammakarzinoms
Tabelle 2	pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms
Tabelle 3	ACR-Klassifikation des Mammakarzinoms
Tabelle 4	BI-RADS-Klassifikation des Mammakarzinoms
Tabelle 5	verwendete Primer
Tabelle 6	Präparation von RNA mit dem NucleoSpin Tissue Purification Kit
Tabelle 7	Präparation von DNA mit dem NuceoSpin Tissue Purification Kit
Tabelle 8	Ansatz für die quantitative PCR
Tabelle 9	Ansatz für die semiquantitative PCR
Tabelle 10	Übersicht der Klassifikation von Mammakarzinomzelllinien anhand des Rezeptorstatus

10. Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München erstellen zu dürfen, danke ich dem Direktor, Herrn Professor Dr. med. Sven Mahner.

Meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Julia Jückstock gebührt ein besonderer Dank. Sie motivierte mich eine experimentelle Doktorarbeit zu beginnen und war mir in jeder Phase dieser Arbeit und darüber hinaus durch ihre Kompetenz, Empathie und Geduld eine außerordentliche Hilfestellung.

Herr Dr. rer. nat. Ansgar Brüning begleite mich bei jedem Schritt der Versuchsreihen für diese Dissertation. Er brachte mir nicht nur das experimentelle Arbeiten bei, auch seine einzigartige Sicht der Dinge regte mich stets zum Nachdenken an und bleibt unvergessen. Dafür danke ich ihm sehr.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie. Mit Kraft, Energie und Zuversicht habt ihr mich nicht nur während der Höhen und Tiefen dieser Arbeit unterstützt, sondern steht ihr mir in jeder Lebenslage bedingungslos zur Seite.

Affidativ



Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname: Buschmann, Christina Teresa

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

Genexpression und Genregulation von LDOC1 und MTA1 in Mammakarzinomzellen

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

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

München, 23.12.2021

Christina Teresa Buschmann

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand