

**Identifizierung von *Synemin (SYNM)* als einen neuen
DNA Methylierungsmarker und Charakterisierung des
putativen Onkogens *Karyopherin α2 (KPNA2)* für das
humane Mammakarzinom**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe Erik Alexander Noetzel

aus Mönchengladbach

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Edgar Dahl
Universitätsprofessor Dipl. Ing. Dr. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meiner Familie gewidmet

Zusammenfassung

Die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Tumorsuppressorgen und Onkogenen für das humane Mammakarzinom ist ein bedeutsames Ziel der molekularen Onkologie. Das Verständnis für die tumorbiologischen Folgen aberrant exprimierter Gene sowie die Identifizierung von neuen DNA-Methylierungsmarkern sind fundamentale Voraussetzungen für die Entwicklung zukünftiger Krebstherapien und für die Verbesserung der Prognose- und Prädiktionsabschätzung von Brustkrebspatientinnen. Diese Arbeit beschreibt die Identifizierung eines neuen DNA-Methylierungsmarkers (Synemin) und die funktionelle Charakterisierung eines putativen Onkoproteins (KPNA2) für das humane Mammakarzinom. Das Intermediärfilament Synemin (SYNM) ist für die Verbindung zwischen der Extrazellulärmatrix und dem Intermediärfilamentnetzwerk von entscheidender Bedeutung. Eine veränderte Expression von Intermediärfilamenten gilt als wichtiger Mechanismus für die Kanzerogenese und Tumorinvasion. Die Rolle von SYNM für das humane Mammakarzinom wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Initial durchgeführte RNA Expressionsanalysen belegten einen hochsignifikanten SYNM Verlust in invasiven Brusttumoren und eine abundante Expression in gesunden Brustgeweben. Die immunhistochemische SYNM Proteinexpressionsanalyse belegte ein myoepithiales Expressionsmuster in gesunden Brustgeweben. Das SYNM Protein war hingegen in 70% der invasiven Mammakarzinome drastisch reduziert bzw. ging in 56% vollständig verloren. Die Promotoranalyse offenbarte eine CpG Insel in einer transkriptionsrelevanten SYNM Promotorsequenz. Eine Promotor-methylierungsanalyse mit methylierungsspezifischer PCR (MSP) ergab eine SYNM Promotormethylierung in 26.7% der 195 untersuchten invasiven Tumore, jedoch in keinem der getesteten Brustnormalgewebe (n=14). Durch Pyrosequenziertechnik konnte zudem eine durchgehende Methylierung aller CpG Dinukleotide des untersuchten Promotorbereichs nachgewiesen werden. Es bestand eine hochsignifikante Assoziation zwischen der SYNM Promotormethylierung und dem SYNM Expressionsverlust in invasiven Brusttumoren und humanen Brustkrebszelllinien. Diese Assoziation wurde funktionell bestätigt, da die *in vitro* Demethylierung von Brustkrebszelllinien, durch 5'-Aza-2'-Deoxycytidin, in einer signifikanten SYNM Re-Expression resultierte. Somit war die tumorspezifische SYNM Promotormethylierung als ein kardinaler Mechanismus für das SYNM *gene-silencing* im Brustkrebs bestätigt. Patientinnen mit SYNM Methylierung hatten ein signifikant verkürztes rezidivfreies Überleben, eine schlechte Tumorgraduierung und eine fortgeschrittene Metastasierung. Die SYNM Methylierung konnte als prognostisch unabhängiger Marker für ein 2.9 fach erhöhtes Rezidivrisiko identifiziert werden. Interessanterweise hatten Hochrisikopatientinnen (Nodal-positiv) ohne SYNM Methylierung eine unerwartet gute Prognose. Die SYNM Methylierung könnte somit als neuer prognostischer Methylierungsmarker für den Brustkrebs dienen und die Risikoabschätzung von Nodal-positiven Patientinnen verbessern. Mit Bezug auf seine

biologische Funktion für Brust-Myoepithelzellen könnte das Intermediärfilament SYNM zudem eine tumorsuppressive Wirkung besitzen.

Eine Störung der Kerntransportmaschinerie auf Ebene der löslichen Import- und Exportrezeptoren (Karyopherine) ist mit der Tumorgenese und der Tumorprogression assoziiert. In retrospektiven Studien wurde die tumorspezifische Überexpression des Kernimportfaktors Karyopherin $\alpha 2$ (KPNA2) als neuer Prognosemarker für das humane Mammakarzinom bereits vorgeschlagen. Darauf aufbauend sollte eine detaillierte, funktionelle Charakterisierung der phänotypischen Auswirkungen der differenziellen KPNA2 Expression auf Brustkrebszellen durchgeführt werden. Voraussetzung hierfür war die Etablierung von KPNA2 überexprimierenden Zelllinien. In malignen MCF7 Zellen erfolgte die stabile Integration eines induzierbaren (Tet-On) KPNA2 Expressionssystems (MCF7/TR/KPNA2). Benigne nicht-transformierte MCF10A Zellen wurden transient mit einem konstitutiven KPNA2 Expressionsvektor transfiziert (MCF10A/KPNA2). MCF7 Wildtypzellen (WT) verfügten über eine stärkere KPNA2 Expression ($\times 5.1$) als MCF10A WT Zellen und proliferierten schneller (+16%). Eine KPNA2 Überexpression führte in MCF7/TR/KPNA2 Klonen zu einer weiteren Proliferationssteigerung von +15%. Ein siRNA induzierter KPNA2 Verlust resultierte in einer vollständigen Proliferationsinhibierung von MCF7 Zellen und einer gleichzeitig gesteigerten spontanen Apoptose bzw. Apoptosesensibilität gegenüber TNF α . MCF10 WT Zellen zeigten im Vergleich zu MCF7 WT Zellen eine hochsignifikant höhere Adhäsionsrate von +36%. Eine KPNA2 Überexpression führte in MCF10A/KPNA2 Zellen jedoch zu einer drastischen Verminderung der Adhäsionsfähigkeit von -21%, die der von malignen MCF7 WT Zellen ähnlich war. Im Gegensatz dazu war die Migrationsfähigkeit von KPNA2 überexprimierenden MCF10A/KPNA2 Zellen (+68.9%) und MCF7/TR/KPNA2 Klonen (+25.5%) deutlich gesteigert. MCF10A/KPNA2 Zellen näherten sich demnach der Migrationsfähigkeit von malignen MCF7 WT Zellen an. Konsequenterweise mündeten die gezeigten Einzeleffekte auf die Proliferation, Adhäsion und Migration in einer gesteigerten Koloniebildungsfähigkeit von KPNA2 überexprimierenden MCF10A/KPNA2 (+190%) und MCF7/TR/KPNA2 (+41%) Tumorzellen. Die hier beschriebenen phänotypischen Effekte können das Invasions- und Metastasierungspotenzial von Brusttumorzellen begünstigen. Somit konnte die onkogene Wirkung von KPNA2 *in vitro* bestätigt werden. Ein möglicher KPNA2-Wirkungsmechanismus wäre die forcierte nukleäre Translokation von RAC-1 und NF κ B (p65). Diese Onkogene sind nachgewiesene KPNA2 Interaktionspartner und für die Zellzykluskontrolle, die Adhäsion und die Apoptose von entscheidender Bedeutung.

In dieser Arbeit ist es gelungen, die SYNM Promotormethylierung als neuen DNA-Methylierungsmarker für das humane Mammakarzinom zu identifizieren und als putatives Tumorsuppressorgen vorzuschlagen. Zudem konnte KPNA2 als neues Onkogen für das humane Mammakarzinom funktionell charakterisiert werden.

Summary

The identification and characterization of novel tumor suppressor genes and oncogenes for the human mamma carcinoma is an important objective of molecular oncology. The understanding of tumor biological consequences of aberrantly expressed genes and the identification of novel DNA methylation markers are fundamental prerequisites for the development of future cancer therapies as well as for the improvement of prognosis and prediction assessment of breast cancer patients. This work describes the identification of a novel DNA methylation marker (Synemin) and the functional characterization of a putative oncoprotein (KPNA2) for human breast cancer. The intermediate filament Synemin (SYNM) is crucial for the linkage of the extracellular matrix and the intermediate filament network. Altered expression of intermediate filaments is an important mechanism for carcinogenesis and tumor invasion. In this study the role of SYNM for human breast cancer was investigated for the first time. Initially performed RNA expression analysis demonstrated a highly significant *SYNM* loss in invasive breast tumors and abundant expression in normal breast tissues. Immunohistochemical SYNM protein expression analysis revealed a myoepithelial expression pattern in normal breast tissues. SYNM protein was drastically reduced in 70% and completely lost in 56% of all investigated invasive breast cancers. Promoter analysis revealed a CpG island in a *SYNM* promoter sequence relevant for transcription. Promoter methylation analysis using methylation-specific PCR (MSP) revealed a *SYNM* promoter methylation in 26.7% of the 195 invasive tumors examined, but in none of the tested breast normal tissues (n=14). Pyrosequencing technique revealed CpG methylation in the entire promoter sequence analyzed. We found a highly significant association between *SYNM* promoter methylation and *SYNM* expression loss in invasive breast tumors and human breast cancer cell lines. This association was confirmed functionally, since the *in vitro* demethylation of breast cancer cell lines by 5'-aza-2'-deoxycytidine resulted in significant *SYNM* re-expression. Therefore, tumor-specific *SYNM* promoter methylation was confirmed as a cardinal mechanism for *SYNM* gene silencing in breast cancer. Patients with *SYNM* methylation had a significantly shortened disease-free survival, poor tumor differentiation and advanced metastatic disease. *SYNM* methylation was identified as independent prognostic marker for a 2.9-fold increased risk of tumor recurrence. Interestingly, high-risk patients (nodal-positive) without *SYNM* methylation had an unexpectedly good prognosis. *SYNM* methylation could therefore serve as a new prognostic methylation marker for breast cancer and improve the risk assessment of nodal positive patients. The intermediate filament SYNM could also have a tumor suppressive effect with respect to its biological function in breast myoepithelial cells.

Dysfunction of the nuclear transport machinery at the level of soluble import and export receptors (karyopherins) is associated with tumorigenesis and tumor progression.

Retrospective studies already proposed the tumor-specific overexpression of the nuclear import factor karyopherin $\alpha 2$ (KPNA2) as a new prognostic marker for human breast cancer. On this basis a detailed, functional characterization of the phenotypic effects of the differential KPNA2 expression on breast cancer cells was performed. Prerequisite for this was the establishment of KPNA2 overexpressing cell lines. An inducible (Tet-On) KPNA2 expression system was stably integrated into malignant MCF7 cells (MCF7/TR/KPNA2). Benign non- transformed MCF10A cells were transiently transfected with a constitutive KPNA2 expression vector (MCF10A/KPNA2). MCF7 wild type cells (WT) had a stronger KPNA2 expression (x 5.1) than MCF10A WT cells and proliferated faster (+16%). KPNA2 overexpression in MCF7/TR/KPNA2 clones further increased cell proliferation (+15%). A siRNA induced KPNA2 expression loss resulted in a complete inhibition of MCF7 cell proliferation and in increased spontaneous apoptosis and apoptosis sensitivity to TNF. MCF10A WT cells showed a highly significant higher adhesion rate of 36% compared to MCF7 WT cells. KPNA2 overexpression in MCF10A/KPNA2 cells resulted in a drastic reduction of adhesion (-21%), which was similar to that of malignant MCF7 WT cells. In contrast, migration ability was significantly increased in KPNA2 overexpressing MCF10A/KPNA2 cells (+68.9%) and MCF7/TR/KPNA2 clones (+25.5%). MCF10A/KPNA2 cells almost achieved the migration ability of malignant MCF7 WT cells. In Consequence, the demonstrated individual effects on proliferation, adhesion and migration led to an increased colony forming ability in KPNA2 overexpressing MCF10A/KPNA2 (+190%) and MCF7/TR/KPNA2 (+41%) tumor cells. The phenotypic effects described here may facilitate the invasion and metastatic potential of breast tumor cells. Thus, the oncogenic value of KPNA2 could be confirmed *in vitro*. One possible mechanism could be the KPNA2 forced nuclear translocation of RAC-1 and NF κ B (p65). These oncogenes are proven KPNA2 interaction partners and crucial for cell cycle control, adhesion and apoptosis. The work presented here successfully identified SYNM promoter methylation as a new DNA methylation marker for human breast cancer and proposes SYNM as a putative tumor suppressor gene. Furthermore, KPNA2 could be functionally characterized as a novel oncogene for human breast cancer.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	X

1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des humanen Mammakarzinoms.....	1
1.2 Die Anatomie der weiblichen Brust	2
1.3 Die Histologie und die Klassifizierung des humanen Mammakarzinoms	3
1.4 Allgemeine Tumorgenese.....	5
1.5 Genetische Ursachen des Mammakarzinoms	7
1.5.1 Tumorsuppressorgene	7
1.5.2 Onkogene.....	8
1.6 Diagnose-, Prognose-, und Prädiktionsmarker für das Mammakarzinom	9
1.6.1 Diagnosemarker	9
1.6.2 Prognosemarker.....	10
1.6.3 Prädiktionsmarker	11
1.7 Epigenetik	11
1.7.1 Grundlagen der Epigenetik.....	11
1.7.2 DNA-Methylierung	12
1.7.3 DNA-Methylierung in der Tumorgenese	15
1.7.4 DNA-Methylierung im humanen Mammakarzinom.....	17
1.8 Intermediärfilamente in der Tumorgenese.....	18
1.8.1 Das Intermediärfilament Synemin	18
1.8.2 <i>Synemin</i> als putatives Tumorsupressoren der humanen Brust.....	19
1.9 Der eukaryotische Kerntransport	19
1.9.1 Die Nomenklatur und Struktur der Karyopherine	20
1.9.2 Der Kernimportzyklus	22
1.9.3 Kerntransport und Krebsentstehung	23
1.9.4 Karyopherin $\alpha 2$ als putatives Onkogen des humanen Mammakarzinoms	25
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	28

2	Material und Methoden	30
2.1	Klinisches Patientenmaterial	30
2.1.1	Kryokonserviertes humanes Frischgewebe	30
2.1.2	Formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe (FFPE)	30
2.2	Humane Brustzelllinien	30
2.3	Geräte, Software, Chemikalien und Lösungsmittel	31
2.3.1	Geräte	31
2.3.2	Software und Datenbanken	32
2.3.3	Chemikalien	33
2.3.4	Lösungsmittel	34
2.4	Puffer und Lösungen	35
2.4.1	Lösungen für Gelelektrophoresen	35
2.4.2	Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.4.3	Lösungen für diskontinuierliche Gelelektrophoresen und Westernblot	36
2.4.4	Lösungen für die Lowicryl Einbettung	36
2.4.5	Lösungen für die β -Galaktosidase (<i>lacZ</i>) Färbung	36
2.5	Detektionskit für die Immunhistochemie	36
2.6	Monoklonale und Polyklonale Antikörper	36
2.7	Medien für die Anzucht von <i>E.coli</i>	37
2.8	Medien für die Zellkultur	37
2.9	Molekularbiologische Kits und Reagenzien	38
2.10	Oligonukleotide	38
2.10.1	Oligonukleotide für die semiquantitative <i>Real-Time</i> PCR	38
2.10.2	Oligonukleotide für die methylierungsspezifische PCR (MSP)	38
2.10.3	Oligonukleotide für die Pyrosequenzierung	39
2.10.4	Oligonukleotide für die RNA Interferenz	39
2.11	Vektoren	39
2.12	Molekularbiologische Methoden	39
2.12.1	DNA-Isolation aus Frischgewebe und humanen Brustzelllinien	39
2.12.2	Gesamt-RNA Isolation aus Frischgewebe und humanen Zelllinien	40
2.12.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
2.12.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	41
2.12.5	Polymerase-Kettenreaktion	41
2.12.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten	42
2.12.7	Semi-quantitative <i>Real-Time</i> PCR	43
2.12.8	Bisulfit-Umwandlung von genomischer DNA aus humanem Gewebe	46
2.12.9	Methylierungsspezifische PCR (MSP)	47

2.12.10 Pyrosequenzierung	48
2.12.11 DNA-Amplifikation für die Pyrosequenzierung	51
2.12.12 DNA-Einzelstrangpräparation und Formulierung des Pyrosequenzieransatzes	52
2.12.13 Transformation von <i>E. coli</i>	52
2.12.14 Flüssig-Übernachtkultur transformierter <i>E. coli</i>	53
2.12.15 Plasmidisolation	53
2.12.16 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	53
2.12.17 Brustkrebs cDNA <i>Dot Blot Array</i>	54
2.13 Proteinchemische Methoden.....	55
2.13.1 Herstellung von Gewebeschnitten aus humanem Paraffinmaterial.....	55
2.13.2 Gewebeschnitt-Herstellung aus humanem kryokonserviertem Frischmaterial	55
2.13.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gewebeschnitten	55
2.13.4 Immunhistochemie mit paraffinfixiertem Gewebe	55
2.13.5 Herstellung von Proteinlysaten für die SDS-Gelelektrophorese.....	57
2.13.6 Probenvorbereitung für die SDS-Page	57
2.13.7 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay	58
2.13.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	58
2.13.9 Westernblotting	58
2.13.10 Ponceau S Färbung	60
2.14 Zellbiologische Methoden	60
2.14.1 Kryokonservierung von Mammakarzinomzelllinien	60
2.14.2 Die Kultivierung von humanen Zelllinien	60
2.14.3 Die Ernte von humanen Zelllinien	61
2.14.4 Zellzahlbestimmung	61
2.14.5 DNA Demethylierung.....	62
2.14.6 RNA Interferenz.....	63
2.14.7 Transiente Transfektion von Mammakarzinomzelllinien	63
2.14.8 Stabile Transfektion von Mammakarzinomzelllinien	64
2.14.9 Lowicryl Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	68
2.14.10 Immunogold-Markierung von humanen Brustkrebszelllinien.....	69
2.15 Funktionelle <i>in vitro</i> Experimente	69
2.15.1 β -Galaktosidase (<i>lacZ</i>) Färbung von MCF10A/TR und MCF7/TR Klonen	69
2.15.2 Apoptosemessung mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	70
2.15.3 Caspase 3/7-Aktivitätsmessung	71
2.15.4 XTT Proliferationstest.....	71
2.15.5 Adhäsionstest.....	72
2.15.6 Wundheilungstest.....	72

2.15.7 Kolonienbildungstest (<i>Colony Formation Assay</i>).....	73
2.16 Statistische Methoden	74
3 Ergebnisse	75
3.1 Der SYNM Expression geht im humanen Brustkrebs häufig verloren	75
3.2 Die Charakterisierung der SYNM Proteinexpression im Brustepithel	76
3.3 Die SYNM Hypermethylierung und Expression in Brustkrebszelllinien	78
3.4 SYNM Re-Expression nach <i>in vitro</i> Demethylierung	81
3.5 Die SYNM Promotormethylierung im primären Brustkrebs	82
3.6 SYNM Methylierung assoziierter SYNM Verlust im Brustkrebs	84
3.7 SYNM Methylierung in Bezug zu klinisch-pathologischen Parametern	85
3.8 Die univariate Überlebensanalyse in Bezug zur SYNM Methylierung	87
3.9 Die multivariate Überlebensanalyse in Bezug zur SYNM Methylierung	89
3.10 Die Generierung von KPNA2 überexprimierenden Brustkrebszelllinien	91
3.10.1 Die KPNA2 Überexpression in Brustkrebszelllinien	91
3.10.2 Funktionstest des pT-REx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektors	93
3.10.3 Stabile Transfektion mit dem Tet-Repressor Expressionsvektor	94
3.10.4 Stabile Transfektion mit dem KPNA2 Expressionsvektor.....	96
3.10.5 Optimierung der KPNA2 Induktion in MCF7/TR/KPNA2 Klonen.....	98
3.10.6 Validierung der KPNA2 Proteininduktion in MCF7/TR/KPNA2 Klonen	100
3.10.7 Elektronenmikroskopischer Nachweis von KPNA2 in MCF7/TR/KPNA2 Klonen.....	101
3.11 Der induzierte KPNA2 Expressionsverlust in MCF7 WT Zellen	104
3.12 Die funktionelle Analyse der KPNA2 Expression in Brustkrebszellen	106
3.12.1 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Zellproliferation	106
3.12.2 Der Einfluss des KPNA2 Verlusts auf die Zellproliferation	110
3.12.3 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Apoptose	111
3.12.4 Der Einfluss des KPNA2 Verlusts auf die Apoptose	117
3.12.5 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Zelladhäsion.....	118
3.12.6 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Zellmigration	121
3.12.7 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Kolonienbildung	126
4 Diskussion	129
4.1 Die Rolle des putativen Tumorsuppressorgens SYNM für den Brustkrebs	129
4.2 Schlussfolgerungen für SYNM	133
4.3 Ausblick für SYNM	134

4.4	Die funktionelle Analyse des putativen Onkogens <i>KPNA2</i> im Brustkrebs	135
4.5	Die Generierung von <i>KPNA2</i> überexprimierenden <i>in vitro</i> Modellen	135
4.6	Die Generierung eines <i>KPNA2</i> defizienten <i>in vitro</i> Modells	139
4.7	Phänotypische Konsequenzen der <i>KPNA2</i> Expression auf Tumorzellen	139
4.8	Schlussfolgerung für <i>KPNA2</i>	146
4.9	Ausblick für <i>KPNA2</i>	146
5	Literaturverzeichnis	148
6	Anhang	167
6.1	Eigenschaften der verwendeten Mammakarzinomkohorte	167
6.2	Abbildungen 6.1 und 6.2	168
6.3	Klassifikation von malignen Tumoren nach dem TNM-System	169
6.4	Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms	170
6.5	Auswertesystem des histologischen Summenscores	170
6.6	Abbildungsverzeichnis	171
6.7	Tabellenverzeichnis	173
6.8	Veröffentlichungen	174
6.9	Eidesstattliche Erklärung	176
6.10	Lebenslauf	177
6.11	Danksagung	178

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BRE	Tumograd nach Bloom-Richardson-Ellis
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
DCIS	Duktales Carcinoma <i>in situ</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMA	<i>DNA Micro Array</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FC	<i>fold change</i>
x g	Gravitationsfaktor
G	Guanin
HE	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
IDC	Invasiv dutales Karzinom
ILC	Invasiv lobuläres Karzinom
IRS	Immunreaktiver Score (nach Remmele und Stegner)
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
KPNA2	Karyopherin $\alpha 2$
LCIS	Lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
MBD	Methyl-CpG-bindendes Protein

MCF7 WT	MCF7 Wildtypzellen
MCF7/TR	MCF7 mit pcDNA6/TR transfiziert
MCF7/TR/KPNA2	MCF7 mit pcDNA6/TR und pT-REx-DEST30/KPNA2 transfiziert
MCF10A WT	MCF10A Wildtypzellen
MCF10A/TR	MCF10A mit pcDNA6/TR transfiziert
MCF10A/TR/KPNA2	MCF10A mit pcDNA6/TR und pT-REx-DEST30/KPNA2 transfiziert
MeOH	Methanol
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	Boten RNA
MSP	Methyl-spezifische Polymerase Kettenreaktion
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SYNM	Synemin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TDLU	Terminale duktulobuläre Einheit
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamin
TMA	Tissue Micro Array
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
WHO	<i>World Health Organisation</i>
XIST	<i>X-inactive-specific-transcript-Gen</i>

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des humanen Mammakarzinoms

Weltweit erkranken jährlich 1.2 Millionen Frauen an Brustkrebs, wobei die Mortalitätsrate bei 34.2% liegt (Parkin et al., 2005). In Deutschland erleidet durchschnittlich jede zehnte bis zwölftte Frau im Laufe ihres Lebens eine bösartige Erkrankung der Brustdrüse. Damit stellt das humane Mammakarzinom mit 29.3% Inzidenz die häufigste Form der Krebsneuerkrankungen bei Frauen dar (Abb. 1-1). Für das aktuelle Jahr (2010) wird die Neuerkrankung von insgesamt 59510 Frauen prognostiziert. Die Häufigkeit der jährlichen Neuerkrankungen ist in den letzten 25 Jahren kontinuierlich gestiegen, während die Mortalitätsrate seit 1990 nahezu konstant geblieben ist (Abb. 1-2).

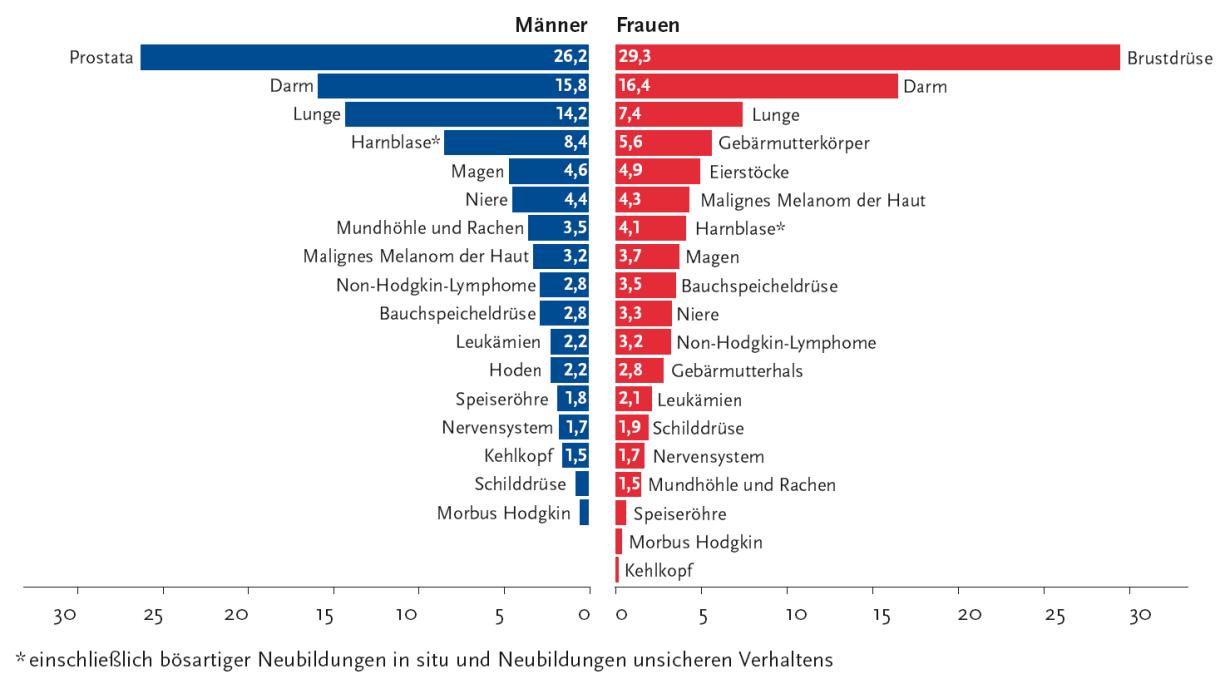


Abb. 1-1: Verteilung der Krebsneuerkrankungen in Deutschland.

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisierungen aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2006 [verändert nach Bertz et al., 2010]

Ein in der Bevölkerung zunehmendes Lebensalter, eine frühere Menarche, der spätere Beginn der Wechseljahre, eine späte Schwangerschaft sowie das Rauchen und regelmäßiger Alkoholkonsum gelten als Risikofaktoren für Brustkrebs und spiegeln sich in der steigenden Inzidenz wider. Die Einnahme oraler Kontrazeptiva hingegen wird als potentieller Risikofaktor kontrovers diskutiert (Pathak et al., 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor für die steigende Brustkrebsinzidenz sind verbesserte Vorsorgeprogramme, wie z.B. das Mammo-

graphie-Screening, welches flächendeckend und bundesweit für Frauen zwischen 50 und 64 Jahren etabliert wurde (Bertz et al., 2010).

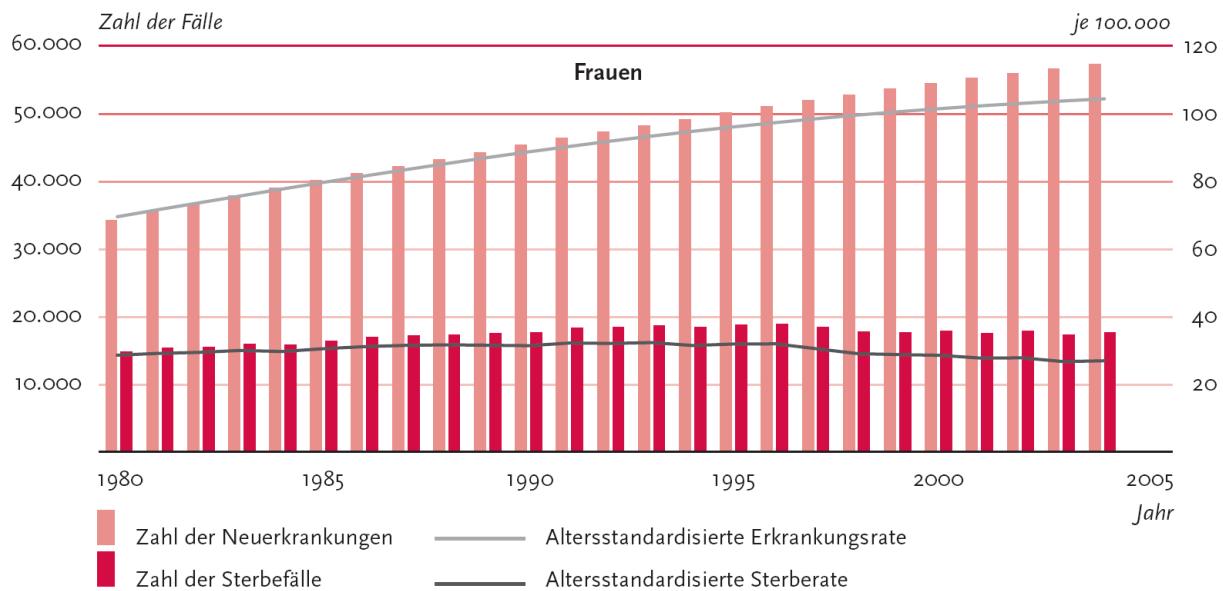


Abb. 1-2: Jährliche Krebsneuerkrankungen und Sterbefälle in Deutschland.
Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten von 1980 bis 2004 [verändert nach Bertz et al., 2010]

Das mittlere Erkrankungsalter von 64 Jahren liegt fünf Jahre unter dem für Krebs-erkrankungen im Allgemeinen (Bertz et al., 2010). Vor allem in der Altersgruppe von 50-69 Jahren ist die Zunahme der 10-Jahres-Prävalenz mit über 50% am größten (Bertz et al., 2010). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Brustkrebspatientinnen ist seit 1980 mit anfänglich 69% stetig gestiegen und wird zurzeit auf 83% bis 87% geschätzt (Bertz et al., 2010).

1.2 Die Anatomie der weiblichen Brust

Die weibliche Brust besteht hauptsächlich aus Bindegewebe, Lymph- und Blutgefäßen sowie duktalen und lobulären Strukturanteilen. Die duktalen Strukturen bilden größere und kleinere Milchgänge (*Ductus lactiferi*), die in die Brustwarze (*Mamilla*) münden. Die lobulären Anteile bilden zusammen mit den terminalen duktolobulären Einheiten (TDLE) die milch-produzierenden Strukturen (Drüsenläppchen) der Brustdrüse (*Glandula mammaria*) (Abb. 1-3A). Drüsenläppchen sind aus einem inneren einschichtigen, luminalen Epithel aufgebaut und sind vom umgebenden Bindegewebe durch die Basalmembran räumlich getrennt. Zusätzlich sind zwischen den luminalen Epithelzellen und der Basalmembran basale Epithelzellen lokalisiert. Dieser basale Zelltyp wird als Myoepithel bezeichnet und hat eine entscheidende Funktion für die Kontraktibilität der Milchdrüsen. Die kleineren

Milchgänge besitzen ebenfalls ein einschichtiges Epithel. Die größeren Milchgänge zeichnen sich durch ein- oder zweischichtige Epithelien sowie glatter Muskelzellen aus, was für den Milchfluss während der Schwangerschaft und Stillzeit notwendig ist. Während der Schwangerschaft nehmen die Größe des Drüsengangsystems sowie die Drüsenkörper durch den Einfluss von Östrogen erheblich zu. Die Epithelgewebe der Dukti und Lobuli sind von stützendem Bindegewebe sowie von inter- und intralobulären Stromagewebe (Mantelgewebe) umgeben (Faller, 1999) (Abb. 1-3B).

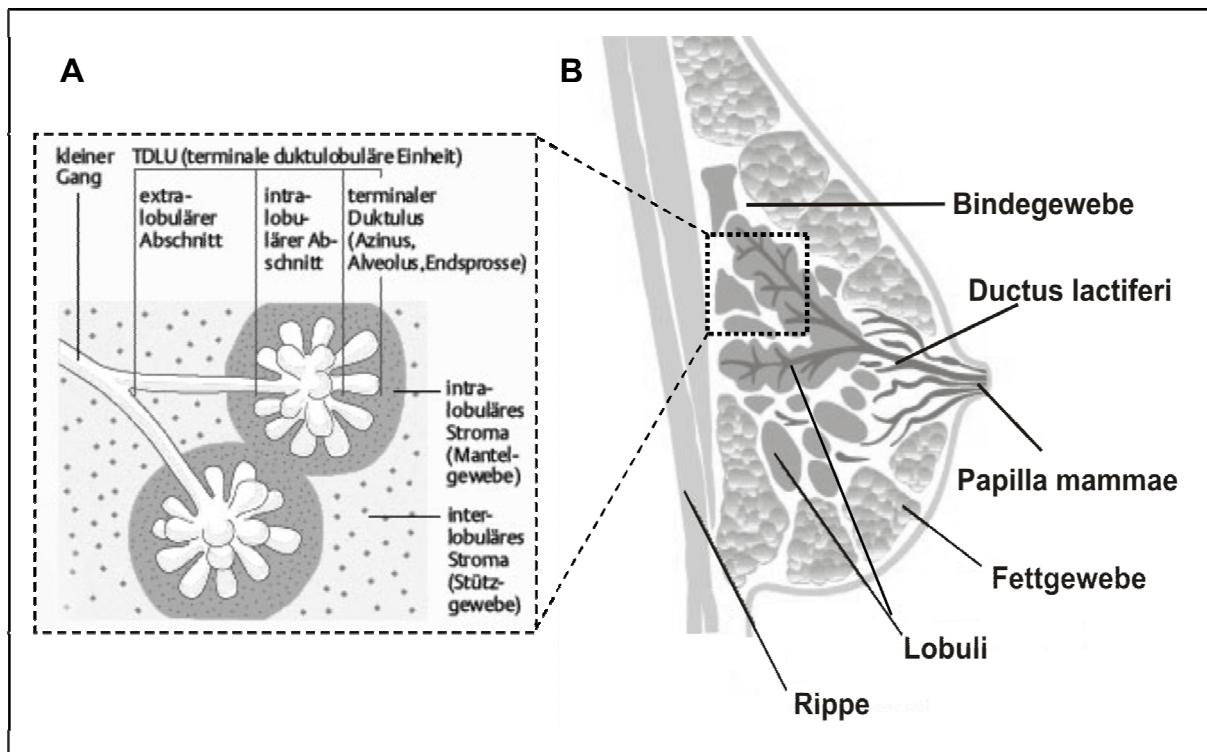


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der weiblichen Brustanatomie. A: Ansicht einer Terminalen Duktolobulären-Einheit (TDLE); B: Querschnitt durch die weibliche Brust [Verändert nach: Gynäkologie und Geburtshilfe kompakt, 3., kompl. Aufl. 2006]

Die Epithelzellen der weiblichen Brustdrüsen unterliegen, auf Grund der monatlichen Periode, der Menopause sowie Schwangerschaften, ständigen hormonellen Schwankungen (Lüllmann-Rauch, 2003). Dies ist ein Grund dafür, warum die häufigsten Mamakarzinom-Typen dieser Epithelschicht entspringen. Eine weitere Evidenz hierfür ist das seltene Auftreten von Mamakarzinomen bei Männern, deren Brust wesentlich geringeren hormonellen Veränderungen unterliegt.

1.3 Die Histologie und die Klassifizierung des humanen Mammakarzinoms

Bei gesundem Brustgewebe sind die Myoepithelzellen und die luminalen Epithelzellen durch eine Basalmembran von umliegendem Bindegewebe (Stroma) getrennt. Bei invasiven Mamakarzinomen kommt es in Folge von Hyperplasien zu einer Auflösung der Basal-

membranen, so dass die Tumorzellen in direktem Kontakt zum umgebenden Stroma-gewebe stehen. Abgesehen von dieser typischen Strukturveränderung, erscheinen invasive Mammakarzinome histologisch sehr heterogen. Je nach dem histologischen Ursprung unterscheidet man Milchgangkarzinome (duktale Karzinome) von Läppchenkarzinomen (lobuläre Karzinome). Sie bilden die zwei häufigsten Formen des Mammakarzinoms: Das invasiv-duktale Carcinoma (IDC) betrifft 70-80% und das invasiv-lobuläre Carcinoma (ILC) 10-20% aller Brustkrebspatientinnen. Seltener Formen (5-10%) sind die muzinösen, die medullären und die fibrozystischen Karzinome (Mallon et al., 2000). Die Mehrheit der Mammakarzinome scheint ihren Ursprung in den TDLE zu haben (Wellings et al., 1975). Die TDLE unterliegen, gemäß ihrer Funktion, einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung und sind somit statistisch betrachtet einer erhöhten Mutationswahrscheinlichkeit ausgesetzt, die letztlich in eine Neoplasie münden kann (Tavassoli, 1992). Die detaillierte Beschreibung der Histologie von verschiedenen Formen und Stadien von gesundem bis tumorösem Brustdrüsengewebe hat zu der Vorstellung eines *in vivo multi-step*-Modells geführt (Russo et al., 1998). Dieses Modell vereinigt atypische Hyperplasien, *in situ* Karzinome, invasive Karzinome und Metastasierung zu einer Progressionsreihe, deren Fortschreiten sich über 30 Jahre erstrecken kann (Abb. 1-4).

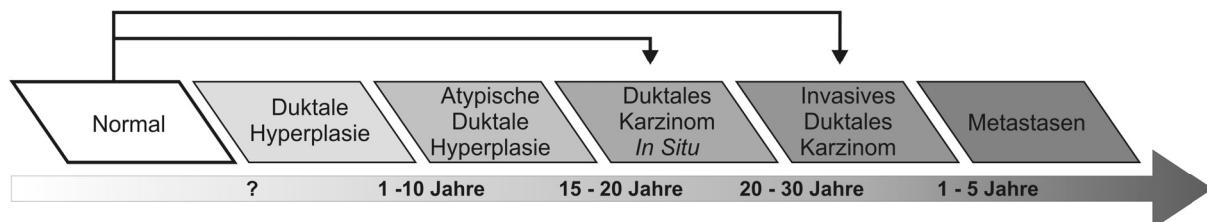


Abb. 1-4: Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinom.

Die Entstehung von Brustkrebs als *multi-step*-Modell mit definierten Zwischenstadien. In der humanen Brust stellen die duktale Hyperplasie und die atypische duktale Hyperplasie zwar die initialen Stufen des neoplastischen Wachstums dar, können jedoch von gesunden Zellen übersprungen werden. [Verändert nach Russo et. al., 1998]

Die Entstehung und die Progression von Mammakarzinomen beruht auf einer Häufung von genetischen Modifikationen, die sich anfangs in benignen Läsionen der Epithelien äußern. Diese Hyperplasien sind meist schlecht diagnostizierbar und können sich zu den malignen *in situ* Karzinomen entwickeln, welche als Präkanzerose von invasiven Karzinomen eingestuft werden. Das duktale Karzinom *in situ* (DCIS) konnte bei 30% aller Patientinnen mit malignem Mammakarzinom als Vorstufe diagnostiziert werden (Fonseca et al., 1997). Bei dem invasiv-lobulären Karzinom (IDC) wird jedoch weiterhin diskutiert, ob diese aus lobulären Carcinoma *in situ* (LCIS) entstehen (Buerger et al., 2000). Die *in situ* Formen zeichnen sich dadurch aus, dass die entarteten Zellen noch auf die topologischen Kompo-

nenten der Duktuli bzw. der Lobuli begrenzt, jedoch nicht in das benachbarte Gewebe infiltriert sind. Für die Abschätzung der Prognose und die Therapieentscheidung ist eine möglichst differenzierte Bestimmung des individuellen Erkrankungsstadiums von Brustkrebspatientinnen von wichtiger Bedeutung. Die derzeit wichtigsten Prognosefaktoren sind das *Tumor Staging System* der Union internationale contre le cancer (UICC), der histologische Tumortyp, das Alter bei der Diagnose, ein Befall der regionalen Lymphknoten sowie der Hormonrezeptorstatus. Der TNM-Status (**Tumogröße**, **Nodalstatus**, **Metastasen**) beschreibt für einen soliden Primärtumor dessen Größe (pT), den Befall von regionären und juxta-regionären Lymphknoten (pN) und das Vorhandensein bzw. das Fehlen von Fernmetastasen (pM) (Tab. 1-1). Eine detaillierte Beschreibung der Parameter für das TNM-System ist dem Anhang 6.3 zu entnehmen (Hermanek et al., 1997).

Tab. 1-1: Tumor Staging nach dem TNM-System

Staging	Tumor bzw. Tumogröße (pT)	Regionale Lymphknoten (pN)	Fernmetastasen (pM)
0	<i>In situ</i> -Karzinom	Nicht befallen	Nein
I	< 2cm	Nicht befallen	Nein
IIA	2-5cm	Befallen	Nein
IIB	> 5cm	Nicht befallen	Nein
IIIA	< 5cm	Befallen und verklebt	Nein
IIIB	< 5cm	Befallen	Nein
IV	Tumor jeder Größe	Befallen / nicht befallen	Ja

Die histologische Tumorgraduierung (*Grading*) bewertet die Mitoseraten (1–3 Punkte), die Zellpolymorphie (1–3 Punkte) und das Ausmaß einer Drüsenbildung (1–3 Punkte). Der Malignitätsgrad des Tumors wird dadurch in drei Grading-Stufen eingeteilt: G1 entspricht (0–4 Punkte) einem noch gut differenzierten Tumor. G2 (5–7 Punkte) steht für eine mäßige Differenzierung und das höchste Grading (G3, 8–9 Punkten) und ist mit einer schlechten Differenzierung und der höchsten Malignität assoziiert (Elston und Ellis, 1993) (Für weitere Details siehe Anhang 6.4 und 6.5). Der Hormonrezeptorstatus, also die mögliche tumor-spezifische Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors, stellt einen weiteren wichtigen Prognosefaktor für Mammakarzinopatientinnen dar. Die Möglichkeit einer *targeted therapy* mit einem monoklonalen Antikörper gegen den HER2-Rezeptor (z.B. mit Herceptin®) hat in der letzten Dekade zur Verbesserung der Prognose für diese molekulare Subgruppe von Mammakarzinomen mit amplifizierten HER2-Rezeptor geführt (Nicholson und Johnston, 2005).

1.4 Allgemeine Tumorgenese

Bei der Tumorgenese kommt es zu einer Entkoppelung der Proliferation von Körperzellen aus ihrem physiologischen Kontext (Bishop, 1987; Weinberg, 1989). Die Ursachen hierfür

sind komplex, münden aber oft in eine Deregulation von kritischen Zellzyklusfaktoren. Die Tumorgenese wird als graduell verlaufender Mehrschritt-Prozess verstanden, der sich grundsätzlich in die vier Stadien: Initiation, Promotion, Transformation und klonale Expansion unterteilen lässt (Bishop, 1987; Weinberg, 1989). Die Initiation der Tumorgenese ist durch die Deregulation von Zellzyklus-kontrollmechanismen charakterisiert. Diese führt zu einer von Kontrollmechanismen autonomen gesteigerten Proliferation der Körperzelle. Die molekularen Ursachen beruhen häufig auf Mutationseignissen, die neben dem Zellzyklusapparat auch das DNA-Reparatursystem und die Chromosomenstabilität beeinflussen. Die Konsequenz ist eine genetische Instabilität, welche die Mutationswahrscheinlichkeit des kompletten Genoms dramatisch erhöht (Cahill et al., 1999). Dies begünstigt eine fortschreitende Transformation der entarteten Zelle, die auf diese Weise weitere Wachstumsvorteile erfährt, sodass es zu einer klonalen Selektion kommt. Wenn sich eine normale Körperzelle genetisch verändert und dadurch einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen erfährt, wird sie sich, im Sinne der natürlichen Selektion, verstärkt teilen können. Dies ist die Grundlage für die Ausbildung eines benignen oder malignen Tumors. Im Jahr 2000 postulierten Hanahan und Weinberg ein Modell, das die Wachstumsvorteile der transformierten Zellen durch bis zu sechs modifizierten Eigenschaften hervorgerufen werden können (Hanahan und Weinberg, 2000):

- I. Eine von exogenen Wachstumsfaktoren unabhängige Proliferation (Slamon, 1987).
- II. Die veränderte Zellzykluskontrolle ist gegenüber Stimuli, die das Wachstum inhibieren resistent (Weinberg, 1995).
- III. Eine Apoptoseresistenz durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, z.B. von *p53* (Symonds et al., 1994).
- IV. Eine unlimitierte Replikationsfähigkeit (Immortalisierung) durch eine erhöhte Telomerase-Aktivität und ein damit verbundene Stabilisierung der Telomere (Bryan und Cech, 1999).
- V. Initiation der Neoangiogenese für die notwendige Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen (Hanahan und Folkman, 1996).
- VI. Die Expression von extrazellulären Proteasen, welche die Gewebeinvasion und Metastasierung forcieren können (Coussens und Werb, 1996).

Aus histologischer Betrachtungsweise ergeben sich im Zuge der Tumorgenese folgende Gewebeveränderungen: Die Hyperplasie bezeichnet eine reizabhängige (z.B. durch hormonelle Stimulation), meist reversible, Gewebeumbildung. Bei einer chronischen Reizung kann eine Hyperplasie zu einer reversiblen Gewebeumwandlung führen. Ist diese Umwandlung jedoch irreversibel, spricht man von einer Anaplasie, die wiederum zu einer Dysplasie, einer Organfehlbildung, führen kann. Die Umwandlung einer Gewebeart in eine andere, wird als Präkanzerose bezeichnet. Die Präkanzerose ist die direkte Vorstufe von malignen, präinvasiven und invasiven Neoplasien (Fearon und Vogelstein, 1990). Diese führen zu der Ausbildung von soliden Tumoren, welche, wenn es sich um invasive Formen handelt, ungehemmt in die benachbarten Gewebe einwachsen und somit auch deren Funktionen beeinträchtigen bzw. zerstören können. Erreicht der Tumor eine bestimmte Größe, wird er über neu gebildete Gefäße (Neoangiogenese) versorgt. Wandern die Tumorzellen in die Blut- oder Lymphgefäß ein, kommt es zur Metastasierung. Bei diesem Prozess gelangen einzelne Tumorzellen über das Blut- und Lymphsystem in andere Organe, um sich dort erneut anzusiedeln und weitere Tumorzellpopulationen zu bilden (Böcker et al., 1997).

1.5 Genetische Ursachen des Mammakarzinoms

Das humane Mammakarzinom ist durch eine heterogene Akkumulation von genetischen Veränderungen, wie chromosomal Instabilität und Mutationen, sowie von epigenetischen Veränderungen charakterisiert (Bertucci et al., 2003; Zugmaier et al., 2003). Für die Entstehung von Neoplasien verschiedenster Entitäten sind insbesondere solche genetischen Veränderungen kritisch, welche die Expression oder Funktionalität von Tumorsuppressor-genen und Proto-Onkogenen beeinflussen können (Cho und Vogelstein, 1992). Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen z.B. durch Deletionen sowie die Aktivierung von Proto-Onkogenen z.B. durch Genamplifikationen, stellen wichtige Ereignisse bei der Entstehung und der Progression des Mammakarzinoms dar.

1.5.1 Tumorsuppressorgene

Der Begriff des Tumorsuppressors wurde maßgeblich durch die bahnbrechenden Arbeiten von Ruth Sager geprägt. Sie beobachtete, dass sich, nach der Fusion einer somatischen Tumorzelle mit einer normalen Zelle, ein nicht-tumorgener Hybrid durchsetzte. Die normalen Zellen mussten demzufolge genetische Informationen besitzen, die den neoplastischen Phänotyp der Tumorzelle supprimieren konnten (Sager, 1985). Bereits 1971 entwickelte Knudson, für die Entstehung des Retinoblastoms, sein heute noch gültiges *two-hit* Modell: Mutationen von Tumorsuppressorgenen wirken rezessiv. Für eine phänotypische Ausprägung müssen somit beide Allele des betreffenden Genes mutiert sein. Nach dem *two-hit*

Modell wird in einem ersten Ereignis ein Allel durch eine Keimbahnmutation inaktiviert und in einem zweiten Schritt führt dann eine somatische Mutation zur Inaktivierung des zweiten Allels (Knudson, 1971). Darauf folgende Arbeiten zeigten, dass in der Tat die Mutation beider Allele des *RB-1* Gens für die Ausbildung des Retinoblastoms verantwortlich ist. Geschichtlich ist *RB-1* somit das erste als solches definierte Tumorsuppressoren (Godbout et al., 1983; Benedict et al., 1983).

Etwa 5% aller Mammakarzinome sind hereditären Ursprungs. Bei diesen Tumoren wurden genetische Keimbahnveränderungen festgestellt. Diese äußern sich häufig in Mutationen der mittlerweile prominenten Tumorsuppressorgene *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) und *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*) (Wooster et al., 1994; Miki et al., 1994; Blackwood und Weber, 1998). Die Mehrheit aller Mammakarzinome (90-95%) tritt jedoch sporadisch auf, bedingt durch genetische Veränderungen somatischer Epithelzellen. Im Zuge der Tumorgenese kommt es schrittweise zu einer Zunahme genetischer Veränderungen, wie Deletionen, Inversionen, Translokationen und Punktmutationen. LOH-Studien (*loss of heterozygosity*) konnten primäre genetische Abberationen aufdecken: Patientinnen mit diagnostiziertem DCIS zeigten multiple chromosomale Deletionen (Radford et al., 1995). Korrelationsstudien zeigten, dass bei invasiven Karzinomen (IDC, ILC) mit hoher histologischer Tumorgraduierung ebenfalls die Deletionsfrequenz gesteigert ist (Schmutzler et al., 1996; Driouch et al., 1998; Hirano et al., 2001). Auf den deletierten Chromosomenabschnitten sind Gene lokalisiert, die für wichtige tumorsuppressive Proteine kodieren. Zu nennen ist hier das Tumorsuppressoren *TP53*, welches in 50% aller Mammakarzinome mutiert ist (Valgardsdottir et al., 1997). Durch die Deletion eines Allels von *TP53* und eine unabhängige Mutation des zweiten Allels kommt es zum Verlust dieses wichtigen Tumorsuppressors, was in einer Deregelation des Zellzyklus und somit in einer unkontrollierten Zellproliferation mündet (Levine, 1997).

1.5.2 Onkogene

Neben häufigen Deletionen weisen 60% der humanen Mammakarzinome DNA-Amplifikationen auf (Courjal et al., 1997; Lu et al., 1998; Hermsen et al., 1998). Betroffen sind Regionen, auf denen Proto-Onkogene wie *ERBB2*, *FGFR1*, *MDM2* und *MYC* lokalisiert sind. Eine Amplifikation dieser Gene kann zu einer gesteigerten Zellproliferation führen. Die Gen-Amplifikation (Loci 8q23-24) des Onkogens *MYC* war 1986 die erste genetische Aberration, die für Brustkrebs beschrieben wurde (Escot et al., 1986). Spätere Studien bestätigen frequente Amplifikationsereignisse in 16% aller Mammakarzinome (Deming et al., 2000; Butt et al., 2008). Das *MYC*-Protein besitzt wichtige Regulationsfunktionen für elementare Prozesse wie Zellproliferation und Apoptose. Insbesondere während der Brustdrüseneentwicklung ist *MYC* für eine normale Differenzierung von Bedeutung (Stoelzle

et al., 2009). Die Identifizierung und die molekulare Charakterisierung von solchen tumor-assoziierten Proto-Onkogenen sind für Verbesserung der Diagnostik und der Therapie des humanen Mammakarzinoms von großem Interesse. Auf dem Gebiet der Brustkrebstherapie ist es in den letzten Jahren bereits zu bedeutenden Fortschritten gekommen. Das für die Tyrosinkinase (HER2/neu) kodierende Proto-Onkogen *ERBB2* ist in 30% aller Brustkrebs-patientinnen amplifiziert. Diese Gruppe von Tumoren zeichnet sich ursprünglich durch einen aggressiven Krankheitsverlauf mit schlechter Prognose aus. Mittlerweile lassen sich diese Tumore effektiv mit dem HER2-Inhibitor Herzeptin® therapieren, wodurch sich die Prognose für diese Patientinnen verbessert hat (Vogel et al., 2001; Shawver et al., 2002). Die Inhibierung der überexprimierten Tyrosinkinase HER2/neu durch einen pharmakologischen Wirkstoff ist ein Paradebeispiel für die potenzielle Umsetzung von molekularer Krebsforschung in den klinischen Alltag der Brustkrebstherapie.

1.6 Diagnose-, Prognose-, und Prädiktionsmarker für das Mammakarzinom

Prinzipiell sind in Hinblick auf eine klinische Anwendung drei verschiedene Biomarkerklassen von Bedeutung: Eine möglichst frühzeitige Identifizierung neoplastischer Veränderungen der Brust soll mittels Früherkennungsmarker realisiert werden. Prognostische Marker hingegen sollen den Krankheitsverlauf möglichst genau vorrausagen, ohne die Berücksichtigung möglicher, angewandter Therapien. Für die zuverlässige Abschätzung von Therapieerfolgen dienen schließlich prädiktive Marker. Gehört der betrachtete Tumormarker dabei einer messbaren Stoffklasse an, wie z.B. Proteinen oder Nukleinsäuren, so bezeichnet man diesen als einen Biomarker (Ross et al., 2004; Ross et al., 2005).

1.6.1 Diagnosemarker

Bis jetzt hat kein Marker für die Brustkrebsfrüherkennung seinen Weg in die klinische Routine gefunden. Es gibt bereits serologische Marker wie das CEA oder CA 15-3, jedoch wird von einer klinischen Anwendung durch die *European Group on Tumor Markers (EGTM)* auf Grund fehlender klinischer Sensitivität, insbesondere für frühe Krebstadien, abgeraten (Dnistrian et al., 1991; Molina et al., 1998). Aus diesem Grund kommen für die Früherkennung immer noch klassische Verfahren wie die Palpation (Abtasten) und das Mammographie-Screening zum Einsatz. Die Mammographie wird jedoch immer noch wegen fehlender Sensitivität (20%) sowie falsch-positiven Befunden kontrovers diskutiert (Vlahou et al., 2003; Gotzsche und Nielsen, 2006). In Deutschland wurde ein flächendeckendes Mammographie-Screening erst 2008 eingeführt (siehe auch 1.1). Mit statistischen Erhebungen bezüglich des nationalen Qualitätsstandards kann somit erst in einigen Jahren gerechnet werden.

1.6.2 Prognosemarker

Der Krankheitsverlauf lässt sich mittlerweile relativ zuverlässig durch die Verwendung von mehreren morphologisch prognostischen Parametern abschätzen. Hierzu zählt die Bestimmung des Steroidhormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor), die Tumograduierung, die Größe des Primärtumors, der Befall regionaler Lymphknoten sowie die Fernmetastasierung (TNM-System, siehe Tab. 1-1). Der axilläre Lymphknotenstatus erlaubt bis jetzt die zuverlässigste Abschätzung des Rezidivrisikos (Carter et al., 1989; Zugmaier et al., 2003). Die Überlebenszeit korreliert negativ mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen. Die 5-Jahresüberlebensrate von Patientinnen mit zehn Lymphknotenmetastasen liegt zwischen 20-30%, wohingegen Patientinnen ohne Befall der Lymphknoten eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 70-80% besitzen (Mittra, 2002). Für Nodal-negative Patientinnen ist die Tumogröße von prognostischer Qualität. Bei Nodal-positiven Brustkrebspatientinnen wird diese Qualität jedoch vom Lymphknotenbefall übertroffen. Im Falle einer zum Zeitpunkt der Diagnose vorhandenen Fernmetastasierung ist die weitere Prognose für diese Gruppe von Patientinnen überaus schlecht. Der Östrogenrezeptor-Status wirkt sich unabhängig von anderen Prognosemarkern auf das Gesamtüberleben aus. Adjuvant unbehandelte Patientinnen mit einem positiven Rezeptorstatus leben signifikant länger als Patientinnen mit negativem Befund (McCarty et al., 1990; Bardou et al., 2003). Hierbei ist die Prognoseabschätzung anhand des Östrogenrezeptor-Status jedoch nur für die ersten sieben Jahre nach der Operation sicher. Danach gleichen sich die Überlebenszeitintervalle von Rezeptor-positiven und -negativen Patientinnen an (Fisher et al., 1988). Als zwei putative Prognosemarker für das Mammakarzinom sind die tumor-assoziierten Proteolysefaktoren uPA (Plasminoaktivator Urokinase Typ) und PAI-1 (Plasminoaktivator-Inhibitor Typ 1) von klinischem Interesse sein. Erhöhte uPA und PAI-1 Konzentration sind bereits mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko und mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert (Harbeck et al., 2004; Thomssen et al., 2009). Interessanterweise zeigen Nodal-negative Patientinnen mit niedrigen uPA und PAI-1 Proteinexpressionslevel eine gute Prognose (Harbeck et al., 1999). Der klinische Nutzen könnte für diese Patientengruppe darin bestehen, dass auf eine belastende adjuvante Chemotherapie verzichtet werden könnte (Janicke et al., 2001). Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (EGFR) ist ein weiterer Kandidat für einen klinisch einsetzbaren Prognosemarker. Die EGFR-Expression korreliert negativ mit der Östrogenrezeptor-Expression (Fitzpatrick et al., 1984; Walker und Dearing, 1999).

Eine weitere Strategie für die Verbesserung der Prognoseabschätzung beruht auf der Verwendung von so genannten Markerpanels, also eine Kombination verschiedener Marker die synergetisch eine bessere Prognosequalität aufweisen, als es die einzelnen Marker alleine vermögen. Anfang 2007 wurde ein auf DNA-Chip basierter Test (MammaPrint®,

Agendia, NL) von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Dieser Test bewertet das Expressionsmuster von 70 tumorassoziierten Genen und ist in der Lage das Rezidivrisiko von Nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen abzuschätzen ('t Veer et al., 2002; Weigelt et al., 2003). Ein ähnlicher Ansatz wurde mit dem Oncotype DX® (GenomicHealth, USA) realisiert. Dieser Assay analysiert die Expression von 21 Genen und soll das Rezidivrisiko von Östrogenrezeptor positiven, Nodal-negativen Brustkrebspatientinnen voraussagen, wurde bereits rund 200.000 mal in den USA angewandt, hat die Hürde der FDA Genehmigung jedoch noch nicht genommen (Paik et al., 2004; Habel et al., 2006).

1.6.3 Prädiktionsmarker

Neben seiner prognostischen Qualität ist der Steroidhormonrezeptorstatus ebenfalls für die Prädiktion von Interesse: Östrogenrezeptor positive Patientinnen werden mit einer adjuvanten Hormontherapie behandelt, bei der Östrogenanaloga (Tamoxifen) verabreicht werden, die zu einer Östrogenrezeptorblockade führen sollen, um so die Proliferation der Tumorzellen zu inhibieren (Locker, 1998). Diese Form der endokrinen Therapie bleibt jedoch bei einem Drittel aller ER-positiven Patientinnen ohne Wirkung (Di Leo et al., 2002). Ein weiteres Problem ist die Ausbildung von Tamoxifen-Resistenzen im Verlauf einer solchen Therapie (Moy und Goss, 2006).

Der Genlokus *ERBB2*, welcher für die Tyrosinkinase HER2/neu kodiert, ist in 30% der Mammakarzinome amplifiziert (siehe auch 1.5.2). Bei Diagnose eines HER2-positiven Mammakarzinoms wird gegenwärtig die *first-line* Chemotherapie in Kombination mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab® angewendet (Slamon et al., 2001; Vogel et al., 2001). Der ERBB2-Status gehört neben dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus zu den am besten validierten prädiktiven Biomarkern für das humane Mammakarzinom (Murphy et al., 2005).

1.7 Epigenetik

1.7.1 Grundlagen der Epigenetik

Die Epigenetik befasst sich mit heritären DNA-Modifikationen, welche die Expression von Genen regulieren können ohne die primäre DNA-Sequenz zu verändern (Holliday, 1987). Sie reguliert fundamentale zelluläre Prozesse, wie die Embryonalentwicklung (Ehrlich, 2003), das Chromatin-Remodelling, das genomische Imprinting (Feil und Khosla 1999), die Chromosomenstabilität, die X-Chromosomeninaktivierung (Chow und Brown, 2003) oder die Immunabwehr (Goldberg et al., 2000). Die Modifikationen von genomischer DNA- und Histonproteinen stellen die wichtigsten epigenetischen Ereignisse in einer eukaryotischen Zelle dar (Jones 2002; Bird 2002; Herman und Baylin 2003; Egger et al., 2004). Histonmodifikationen regulieren maßgeblich die Chromatinstruktur und somit die Transkriptionsaktivität von Genen. Die funktionale Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Es

besteht aus vier Homodimeren der Histone H2A, H2B, H3 und H4, um welche eine 146bp lange DNA-Schleife gebunden ist (Fischle et al., 2003). Die epigenetische Transkriptionskontrolle wird über die kovalente Modifikation der Aminosäuren Serin, Lysin und Arginin an spezifischen Positionen der Histone gesteuert. Diese Aminosäuren werden post-transkriptional enzymatisch phosphoryliert, ubiquitiniert (Poly(ADP)-ribosylierte Lysine), methyliert oder acetyliert (Strahl und Allis, 2000; Cosgrove et al., 2004; Esteller und Almouzni, 2005). Die Histonacetylierung hat maßgeblichen Einfluss auf die Chromatinkonformation und beruht auf einer Balance zwischen der Aktivität von Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen. Eine Acetylierung ist mit einer Chromatindekondensation und transkriptioneller Aktivierung verbunden, wohingegen Deacetylierung der Histone mit Chromatinkondensation und transkriptioneller Inaktivität einhergeht (Richards und Elgin, 2002). Ein weiter wichtiger Faktor für die Genexpression ist die Histonmethylierung. Sie wurde bis jetzt z.B. für Lysin 9 und Lysin 27 am Histon 3 nachgewiesen. Diese H3K9- und H3K27-Methylierungen sind bereits mit einer Repression der Gentranskription assoziiert worden, wohingegen eine H3K4-Methylierung mit einer gesteigerten Transkription verbunden ist. Generell ist es die Gesamtheit aller Histonmodifikationen, die in ihrer Komplexität die Gentranskription mitreguliert (Jenuwein und Allis, 2001; Lachner und Jenuwein, 2002).

1.7.2 DNA-Methylierung

Die Methylierung des C5-Atoms des Pyrimidin-Rings von Cytosinbasen (m5C) des Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotids (CpG) ist die häufigste und wichtigste epigenetische DNA-Modifikation des Säugergenoms (Delaval und Feil, 2004). Die postreplikative Übertragung von Methylresten wird enzymatisch durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. S-Adenosyl-Methionin (SAM) dient hierbei als Methylgruppen-Donator. Der relative Anteil von methylierten CpG-Motiven in verschiedenen eukaryotischen Genomen variiert erheblich. Bis heute wurden drei verschiedene Gruppen von Methyltransferasen (DNMT) beschrieben. Die am häufigsten vorkommende ist DNMT1. Die Mitglieder dieser Gruppe besitzen eine sehr hohe Affinität zu hemi-methylierter DNA, wie sie bei der DNA-Replikation entsteht. Sie sind eng mit den Replikationsgabeln des DNA-Replikationsapparats assoziiert. Auf Grund ihrer Aufgabe, die Methylierungsmuster der Parentalstränge auf die neusynthetisierten Tochterstränge zu übertragen, wird sie auch als Erhaltungs-Methylase bezeichnet. DNMT1 ist ebenfalls in die DNA-Mismatch-Reparatur involviert und für die Erhaltung der korrekten Organisation von großen heterochromatischen Regionen verantwortlich. DNMT2 ist die kleinste der bis jetzt entdeckten Methyltransferasen und erfüllt wahrscheinlich Aufgaben bei der DNA-Rekombination und Mutationsreparatur (Okano et al., 1998; Pradhan und Esteve, 2003). Die dritte Gruppe der Methyltransferasen (DNMT 3a und 3b) wird, auf Grund ihrer

gleich gewichteten Affinität für nicht- und hemi-methylierte DNA, als *de novo* Methyltransferasen bezeichnet. In Studien zeigten *knockout*-Mäuse mit DNMT3a- und 3b-Defiziten beträchtliche Entwicklungsstörungen (Zwergwuchs) bzw. waren nicht lebensfähig (Okano et al., 1999).

Die CpG-Methylierungsfrequenzen präsentieren sich je nach Art des betrachteten Genoms recht unterschiedlich: Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* liegen maximal 0.1% der Cytosine methyliert vor (Gowher et al., 2000). Das Genom der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) weist eine Cytosin-Methylierungsrate von bis zu 25% auf (Messeguer et al., 1991). Die meisten der etwa 3-4% CpG-Dinukleotide des humanen Genoms sind methyliert (70-80%). Zugleich ist die Verteilung der CpG-Dinukleotide nicht gleichmäßig (Esteller und Herman, 2002). Dabei sind die CpG-Dinukleotide im menschlichen Genom etwa nur ein Viertel mal so häufig vertreten, wie nach statistischer Basenpaarung zu erwarten wäre. Der Grund hierfür ist die, *in vivo* häufig und spontan auftretende, hydrolytische Desaminierung von 5-Methyl-Cytosinen. Diese Basenmodifikation wird von den DNA-Glykosylasen des Reparatursystems nicht erkannt. Durch die Desaminierung von 5-Methyl-Cytosin entsteht Thymin, das sich Zuge nachfolgender Replikationsrunden als Mutation im Genom manifestieren kann. Es kommt in den DNA-Tochtersträngen also zu einer Basen-Transition von Cytosin nach Thymin und zu einer CpG-Depletion (Knippers, 2001). Die statistische CpG-Nukleotid-Dichte ist, vor allem in 5'-Regionen von Genpromotoren, bis in das erste Exon hinein sehr hoch (Gardiner-Garden und Frommer 1987; Laird und Jaenisch 1994; Bird, 2002). Da CpG-Dinukleotide in Gen-Loci mit Transkriptionsaktivität vor Methylierung geschützt sind (Clark und Melki, 2002), sind die Cytosine im Promotor und im ersten Exon von der CpG-Depletion verschont und bilden als dichte CpG-Gruppen im sonst CpG-armen Genom so genannte CpG-Inseln. Über das humane Genom erstrecken sich etwa 45.000 CpG-Inseln, von denen die Hälfte in Genpromotorbereichen lokalisiert sind (Antequera und Bird, 1993). Nach Takai und Jones' gültiger Definition einer CpG-Insel von 2002 handelt es sich um einen 500bp bis 2kb langen DNA-Abschnitt, mit einem G/C Gehalt von mehr als 55%. Der Quotient aus beobachteten CpGs und zu erwarteten CpGs beträgt mindestens 0.65 (Takai und Jones, 2002). Entsprechend ihrer Funktion für die Transkriptionshemmung, sind die CpG-Inseln in den Promotoren von entwicklungs- und gewebsspezifischen Genen methyliert. Die Promotoren von konstitutiv aktiven Haushaltsgenen liegen hingegen in der Regel unmethyliert vor (Kundu und Rao, 1999). Ein bekanntes Beispiel ist die X-Chromosomen-Inaktivierung in weiblichen Zellen. Hier wird zunächst das so genannte *X-inactive-specific-transcript-Gene* (*Xist*) auf dem später inaktiv vorliegenden X-Chromosom exprimiert, so dass das Transkript im Zellkern akkumuliert und durch einen noch unverstandenen Prozess zur Kondensierung des Chromatins und zur DNA-Methylierung beiträgt (Avner und Heard, 2001).

Die Transkriptionshemmung resultiert unter anderem aus der durch die Basenmodifikation hervorgerufenen Blockierung der DNA-Anbindung von Transkriptionsfaktoren. Die Stärke der Promotormethylierung kann hierbei eine graduelle Hemmung der Transkription verursachen. Man unterscheidet zwischen methylierungsabhängigen und methylierungsunabhängigen Transkriptionsfaktoren: methylierungsabhängige Transkriptionsfaktoren sind z.B. E2F1, NF_kB, ERS-2, CREB, c-Myc/Myn und AP-2. Methylierungsunabhängige Faktoren, deren Bindungseigenschaften kaum bzw. gar nicht von m5C beeinflusst werden, sind z.B. YY1, CTF und Sp1 (Mostoslavsky und Bergman, 1997). Die Repression der Genexpression wird maßgeblich über die hochaffine Anbindung von Repressormolekülen gesteuert. Diese Repressorproteine verfügen über hochkonservierte Methyl-CpG-Bindungsdomänen und bewirken, über die Wechselwirkung mit Histon-Deacetylasen (HDAC), eine Histon-Deacetylierung, die wiederum zu einer Verdichtung der Chromatinstruktur und so zu einer Hemmung der Transkription führt. Solche Repressormoleküle sind z.B. MeCP1-2 und Methyl-Cytosin-Bindungsproteine (MBD 1 bis 3). Eine effektive Transkriptionshemmung scheint synergetisch, durch die Anbindung von Repressormolekülen und die fehlende Anbindung von methylierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren, bedingt zu werden. Die Kondensierung des Chromatins zu kompakten Nukleosomen besitzt eine weitere transkriptionsinhibitorische Wirkung auf benachbarte Gene. Die Wirkung zwischen Histonmodifikation und DNA-Methylierung ist wechselseitig: Eine H3K9-Methylierung durch eine Histon-Methyltransferase (HMT) bewirkt die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen (DNMT), welche dann die regionalen CpGs methyliert und so die Gentranskription effektiv repremiert (Abb. 1-5) (Jones und Baylin, 2002).

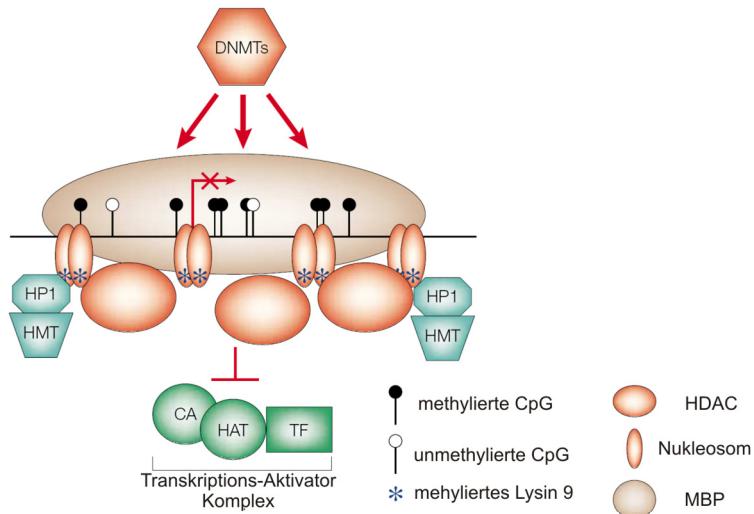


Abb. 1-5: Die heterochromatische Konfiguration eines transkriptional inaktiven Promotorbereichs. An die methylierten CpGs sind Methyl-Cytosin-Bindungsproteine (MBP) gebunden und sind Teil eines Komplexes, der u.a. auch Histon-Deacetylasen (HDAC) beinhaltet. Dieser Komplex hemmt die Aktivität des Transkriptions-Aktivator-Komplexes, bestehend aus einem Transkriptionsfaktor (TF), einem Koaktivator-Protein (CA) und einem Faktor mit Histonacetylaseaktivität (HAT). DNA-Methyltransferasen (DNMT) markieren durch Methylierung die Regionen der DNA. Die Methylierung des Histon H3 an Position Lysin 9 wird durch eine Histon-Methyltransferase (HMT) katalysiert. Die HMT wird durch das Protein HP1 rekrutiert [verändert nach: Jones und Baylin 2002]

Ursprünglich war man der Ansicht, dass humane Malignome primär durch genetische Strukturveränderungen wie Genamplifikationen oder Deletionen hervorgerufen werden (siehe 1.5; Seite 7 folgend). In Laufe des vergangenen Jahrzehnts hat sich jedoch in der onkologischen Forschung ein beachtlicher Paradigmenwechsel vollzogen: Die Entstehung von Krebs wird nicht mehr ausschließlich als Erkrankung mit genetischem Hintergrund aufgefasst, sondern auch als eine Erkrankung mit einem komplexen epigenetischen Ursachen-Wirkungsspektrum verstanden (Esteller, 2008). Diesen relativ neuen Aspekt der molekular-onkologischen Forschung hat in den vergangenen Jahren höchste Aufmerksamkeit erhalten und soll im Folgenden genauer erläutert werden.

1.7.3 DNA-Methylierung in der Tumorgenese

Bei Tumorzellen wurden bereits im Jahre 1983, im Vergleich zu gesunden Zellen, differenzielle DNA-Methylierungsmuster gefunden (Feinberg und Vogelstein, 1983): Die aberrante Hypo- oder Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen von z.B. Zellzyklus-assoziierten Genen kann zu aberranten Transkriptionsmustern von Zellzyklusfaktoren führen und so eine Kanzerogenese forcieren. Die Tumorgenese wird generell durch die aberrante Methylierung von Genen für fundamentale zellulären Prozesse, wie Apoptose, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Angiogenese, Zell-Zellkontakte und Detoxifikation begünstigt (Esteller, 2007). Eine aberrante Hypomethylierung des Proto-Onkogens *KRAS*

wurde bereits vor einigen Jahren in Lungen- und Kolonkarzinomen nachgewiesen (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die Hypomethylierung, also der Verlust von vererbten Methylierungsmustern, an Nicht-Promotor-Regionen der DNA und strukturell kritischen Elementen, wie Zentromeren, ist eine häufige Ursache für chromosmale Instabilität und Aneuploidie von Tumoren (Gaudet et al., 2003). Der Verlust von hereditären Methylierungsmustern scheint ein frühes und häufiges Ereignis während der Tumogenese zu sein und korreliert beispielsweise mit dem histologischen Grad, der Tumorgröße und der Prognose beim Ovarialkarzinom (Widschwendter et al., 2004). Die Gen-Familie der „Melanoma Antigene“ (*MAGE*), die für Tumorantigene mit unbekannter Funktion kodieren, liegen in einer Vielzahl von Tumoren demethyliert und re-exprimiert vor (De Smet et al., 1999). Ähnliches konnte für den Serin-Protease-Inhibitor Maspin in Magenkarzinomen (Akiyama et al., 2003) und für den Apoptose-Antagonisten *bcl-2* bei Leukämien (Shivakumar und Armitage, 2006) gezeigt werden.

Die aberrante Hypermethylierung von spezifischen Tumorsuppressorgenen, die mit einer Genaktivierung einhergeht, forciert die Kanzerogenese in zahlreichen Tumor-Entitäten (Esteller und Herman, 2002). Genetische und epigenetische Ereignisse können synergetisch jeweils auf ein Allel des betroffenen Gens wirken, sodass, im Sinne des *two-hit* Modells (Knudson, 1971), beide Allele des Tumorsuppressorgens inaktiviert werden (Herman und Baylin, 2003). Das erste Tumorsuppressorgen, welches hypermethyliert gefunden wurde, war das *RB-1* Gen (siehe auch 1.5.1) (Greger et al., 1989). Der frühe Verlust des *CDKN2A* (*p16^{INK4a}*)-Tumorsuppressorgens ist ein fundamentales Ereignis in der Progression vieler Tumor-Entitäten (Jones und Baylin 2002). Der epigenetisch verursachte Verlust dieses Zellzyklus-Inhibitors *p16^{INK4a}* führt zu einer unkontrollierten Proliferationssteigerung der betroffenen Zellen (Merlo et al., 1995). Das prominente Tumorsuppressorgen *BRCA1* wurde ebenfalls schon in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen aberrant methyliert gefunden (Esteller et al., 2000). Weitere Beispiele für die Hypermethylierung von Zellzyklus regulierenden Faktoren in Tumor-Entitäten sind das *MGMT* und *MLH-1* des DNA-Reparatursystems (Kolonkarzinom) (Jones und Baylin, 2002) oder das *TIMP3* bei der Tumorinvasivität (Mammakarzinom) (Lui et al., 2005). Auch die mit dem Alter vermehrt auftretenden Methylierungereignisse könnten einen Vorläufer der aberranten Methylierung darstellen und damit zum altersabhängig steigenden Krebsrisiko beitragen (Ahuja und Issa, 2000). Mit der Entwicklung von Genom-weiten Techniken zur Analyse der CpG Methylierung konnten in den letzten Jahren Methylierungs-Landkarten (*methylomes*) humaner Tumor-entitäten erstellt werden, wodurch die Gesamtzahl tumorspezifisch methylierter Gene, je nach Entität, auf 100 bis 400 geschätzt wird (Esteller 2007).

1.7.4 DNA-Methylierung im humanen Mammakarzinom

Im humanen Mammakarzinom wurde die aberrante DNA-Methylierung bereits in frühen, mitunter prämaligen Stadien der Tumorgenese nachgewiesen. Die Hypomethylierung der beiden Proto-Onkogene *MYC* oder *PLAU* (Urokinase Plasminogen Aktivator, UPA) kann zu einer Aktivierung führen (Ross et al., 2003; Szyf et al., 2004). Das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* hingegen wird durch Hypermethylierung inaktiviert (Szyf et al., 2004). Beide Prozesse resultieren letztlich in einer aberranten Proliferation entarteter Zellen (Jackson et al., 2004). Selbst Brust-Progenitorzellen können bereits durch genetische und epigenetische Variationen, z.B durch die Hypermethylierung von 14-3-3 ζ , gekennzeichnet sein (Umbrecht et al., 2001). In Tab. 1-2 ist eine Auswahl von im Mammakarzinom hypermethylierten Genen zusammengefasst (Jovanovic et al., 2010). Interessanterweise zeigen einige dieser Gene eine Spezifität für das Mammakarzinom: *BRCA1* ist in 39% aller sporadischen und in 50% aller hereditären Mammakarzinome methyliert gefunden worden (Feinberg et al., 2006). In Leukämien, in Leber- oder Kolonkarzinomen liegt solch eine epigenetische Veränderung jedoch nicht vor. (Yang et al., 2001). Die Mehrzahl (80%) der lobulären Karzinome zeigt eine Methylierung und einen damit verbundenen Expressionsverlust von *CDH1* (E-Cadherin) und ist besonders in HER2-positiven Tumoren präsent (Droufakou et al., 2001; Sarrio et al., 2003).

Tab. 1-2: Eine Auswahl von aberrant methylierten Genen im humanen Mammakarzinom
Hypomethylierung: -, Hypermethylierung: + [Verändert nach: Jovanovic et al. 2010]

Gen	Funktion	Methylierungsstatus
<i>MGMT</i>	DNA Reparatur	+
<i>BRCA1</i>		+
<i>MLH1</i>		+
<i>ARH1</i>	Zelluläre Homeostase	+
<i>GPC3</i>		+
<i>HOXD11</i>		+
<i>LAMA3</i>		+
<i>BCSG1</i>	Zellinvasion / Metastasierung	-
<i>CDH1, 3</i>		-
<i>CAV1</i>		-
<i>UPA</i>		-
<i>CST6</i>		+
<i>NAT1</i>		-
<i>CCND2</i>	Zellzyklus-Regulation	+
<i>14-3-3sigma</i>		+
<i>CDKN1C</i>		+
<i>CDKN2A</i>		+
<i>ER</i>		+
<i>PGR1</i>		+
<i>RASSF1A</i>		+
<i>SFRP1</i>		+
<i>APC</i>	Apoptose	+
<i>HIC1</i>		+
<i>HOXA5</i>		+
<i>DAPK</i>		+
<i>BCL2</i>		+

Eine funktionelle Verbindung zwischen spezifischen Charakteristika von Mammakarzinomen und der aberranten Promotormethylierung konnte bereits durch diverse Studien belegt werden: Die tumorspezifische Methylierung von *CDH1* korreliert beispielsweise mit der Lymphknotenmetastasierung. Die *GSTP1*-Methylierung ist mit hoch-proliferativen, großen Tumoren assoziiert. Der HER2-Status von Tumoren korreliert mit dem *RAR β 2*-Methylierungsstatus, wobei das Methylierungsereignis häufiger in den HER2-positiven Tumoren zu finden ist (Shinozaki et al., 2005).

Die hier aufgeführten Beispiele unterstreichen den potenziellen Nutzen, welchen die Identifikation von epigenetisch regulierten, metastasierungs-assoziierten Genen für die Abschätzung des Metastasierungspotenzials von Tumoren und das damit verbundene Rezidivrisiko der Brustkrebspatientin haben könnte (Rodenhiser, 2009).

1.8 Intermediärfilamente in der Tumorgenese

Intermediärfilamente (IF) und assoziierte Proteine sind Schlüsselkomponenten für die Zellarchitektur und Zelldynamik. Eine gestörte aberrante Expression oder ein Funktionsverlust kann zu schwerwiegenden phänotypischen Ausprägungen führen. Die Mutation von Desmin oder die aberrante Expression von GFAP (*glial fibrillary acid protein*) stehen in Verbindung mit Muskeldystrophien bzw. neurodegenerativen Erkrankungen (*Morbus Alexander*) (Herrmann et al., 2007). Auf Grund dieser Inzidenzen erscheint es nicht überraschend, dass eine Störung des IF-Netzwerks auch für die Tumorgenese von großer Bedeutung sein kann. Während der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumorzellen führen eine verminderte Zelladhäsion und eine gesteigerte Zellkontraktion zur Translokation von Tumorzellen aus basalen Zellverbänden in angrenzende stromale Bereiche. Intermediärfilamente könnten somit maßgeblich zu der Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen beitragen (Guarino, 2007). Der Expressionsverlust des Zytoskelettproteins Tropomyosin-1 (TPM1) führt zu einer Anoikis-Resistenz und forciert dadurch die neoplastische Zelltransformation und die Metastasierungsfähigkeit von Brustkrebszellen (Bharadwaj et al., 2005). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust des Zytoskelektfaktors Vimentin (IF, Typ III) zu einer Ausbildung von α -Tubulin basierten Mikrotentakeln in humanen Brustkrebszelllinien führen kann. Vimentin ist somit ein Faktor, der Einfluss auf die Metastasierung von Brustkrebszellen nehmen könnte (Whipple et al., 2008).

1.8.1 Das Intermediärfilament Synemin

Synemin (SYNM) zählt zu der Gruppe der Typ IV Intermediärfilamente (IF) und wurde ursprünglich als ein Vimentin Bindungspartner beschrieben (Granger und Lazarides 1980). Das SYNM-Protein verfügt darüber hinaus über Bindungsdomänen für Mikrofilament assoziierte Polypeptide wie α -Aktinin und Vinkulin. SYNM steht in mechanischer Verbindung

zum Dystrophin-Komplex und ist für die Verbindung der Extrazellulärarmatrix (ECM) mit dem IF-Netzwerk verantwortlich. Somit ist das Intermediärfilament SYNM von entscheidender Bedeutung für die strukturelle Integrität von Muskelzellen (Blake und Martin-Rendon 2002). SYNM wird in allen kontraktilen Zelltypen des Meso- und Ektoderms (z.B. Herz-, Skelettmuskel und Intestinaler-Muskelatur) exprimiert. Daneben wurde es in nicht-kontraktilen Zelltypen (z.B. Gliazellen) nachgewiesen (Granger und Lazarides 1980; Bilak et al., 1998; Mizuno et al., 2001; Titeux et al., 2001; Hirako et al., 2003).

1.8.2 Synemin als putatives Tumorsuppressoren der humanen Brust

Bis jetzt wurde eine differenzielle Expression von SYNM bei fibrozystischen Lebererkrankungen und in Lebertumoren gezeigt. Während die SYNM Expression in verschiedenen Formen der Leberfibrose hochreguliert ist, geht sie in hepatzellulären Tumoren verloren (Schmitt-Graeff et al., 2006). SYNM interagiert mit Zyxin, einem LIM-Domänen Protein, welches entscheidenden Einfluss auf die Zellmigration und Adhäsion nimmt. Interessanterweise resultiert ein RNA Interferenz induzierter Expressionsverlust von SYNM in einer verminderten Zelladhäsion von HeLa-Tumorzellen (Beckerle 1986; Sun et al., 2009). Bis jetzt wurden die SYNM-Expression in der menschlichen Brust und seine potenzielle Rolle für das humane Mammakarzinom nicht beschrieben.

1.9 Der eukaryotische Kerntransport

Eukaryotische Zellen zeichnen sich durch eine Kompartimentierung des Zellkerns, des Zytosplasmas, der Mitochondrien bzw. Chloroplasten, des Golgi-Apparates, des Endoplasmatischen Retikulums und der Lysosomen aus. Eine derart komplexe Strukturierung setzt jedoch biochemische Mechanismen für den gerichteten Transport von Molekülen innerhalb der Kompartimente voraus. Der Zellkern ist von einer Doppelmembran umschlossen und trennt auf diese Weise kernspezifische Prozesse, wie die DNA-Replikation und -Reparatur, mRNA-Synthese, mRNA-Splicing, mRNA-Poly-Adenylierung, tRNA-Synthese und rRNA-Synthese, räumlich vom Zytosplasma. Dies ermöglicht der Zelle eine hohe genetische Stabilität und erlaubt die effiziente Kontrolle der Genexpression. Alle für diese Vorgänge notwendigen Faktoren müssen durch die Kernporen (*NPC, nuclear pore complex*) in den Zellkern importiert bzw. exportiert werden. Die NPCs erlauben eine passive Diffusion von Ionen, Metaboliten und kleineren Molekülen bis 60kDa. Größere Moleküle bis zu 10^4 kDa werden mittels energieabhängigem (Ran GTPase abhängigem), aktivem Transport transloziert. Eine Kernpore kann dabei pro Minute bis zu drei ribosomale Untereinheiten, 50 tRNAs sowie ca. 1000 Proteine gleichzeitig importieren und exportieren (Lodisch, 2001). Die Selektivität des aktiven Transports wird durch die Wechselwirkung von

Kernlokalisations-Signalen und Transportrezeptoren mit den NPCs realisiert (Dingwall und Laskey, 1991).

Kargoproteine, die in den Kern importiert werden müssen, zeichnen sich durch eine Nukleäre-Lokalisationssequenz (NLS) aus. Zu exportierende Faktoren besitzen eine entsprechende Nukleäre Exportsequenz (NES). Die klassische NLS (cNLS) besteht aus einer Abfolge der basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R), z.B. K(K/R)x(K/R) (Robbins et al., 1991; Lange et al., 2007). Man unterscheidet hier zwischen ein- und zweiteiligen NLS-Sequenzen. Gegenwärtig geht man davon aus, dass tausende von Proteinen über solche „Lieferscheine“ für den Kernimport verfügen (Macara, 2001). Der Prototyp einer solchen cNLS Sequenz (PKKKRKV), wurde erstmals durch Mutationsanalysen des *Simian Virus 40 large T antigen* nachgewiesen (Kalderon et al., 1984; Lanford und Butel, 1984). NES-Sequenzen sind durch Leucin(L)-reiche Abfolgen (LxxxLxxLxL) charakterisiert und wurden erstmalig für den Export der *HIV-1 rev activation domain* beschrieben (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995; Fornerod et al., 1997). Neben den richtigen „Adressen“ sind für den gerichteten, selektiven Kernimport in der Zelle „lösliche“ Transportrezeptoren, sog. Karyopherine, welche die NLS erkennen können, von entscheidender Bedeutung.

1.9.1 Die Nomenklatur und Struktur der Karyopherine

Die Nomenklatur der Karyopherine zeichnet sich durch eine Mehrfachbenennung derselben Moleküle aus. Dieser Umstand und die Tatsache, dass viele Kargoproteine durch verschiedene Karyopherine transloziert werden können, erschwert eine eindeutige Klassifizierung (Jakel und Gorlich, 1998; Mosammaparast et al., 2001). Jedoch lassen sich beim Menschen mehr als 20 Karyopherine in α -Importine, β -Importine und in andere Importfaktoren und Exportine klassifizieren. Viele Karyopherine, darunter viele β -Importine, interagieren direkt mit ihren Kargoproteinen und transportieren diese alleine in bzw. aus dem Kern. Der klassische Kernimport ist durch die Bildung eines Transport-Trimers, bestehend aus einem Importin α , Importin β 1 und NLS-Substrat definiert und wird durch sieben verschiedene Importine realisiert. In eukaryotischen Zellen existieren sechs α -Importine (Karyopherin α 1– α 6) die mit dem Importin β 1 (Karyopherin β 1) interagieren können (Goldfarb et al., 2004). Im Folgenden soll der Aufbau von Importin α 1 (KPNA2, Karyopherin α 2, RAG cohort 1) näher erläutert werden, da die funktionelle Analyse dieses Importfaktors und seine Rolle im Mammakarzinom in der vorliegenden Arbeit angestrebt wurde. KPNA2 besteht aus drei strukturellen Einheiten, die seine Funktionalität definieren (Abb.1-6). Der zentrale Bereich bildet die NLS-Bindedomäne, der aus zehn Armadillo (ARM)-Motiven besteht und ursprünglich im *armadillo* Gen in *Drosophila melanogaster* charakterisiert wurde (Riggleman et al., 1989). Die neunte und zehnte ARM-Sequenz ist zusätzlich für die Anbindung des Kernexportfaktors CAS (*cellular apoptosis susceptibility protein*) zuständig. C-terminal sind

die positiv geladene IBB Domäne (Karyopherin β 1-Bindedomäne) und eine kleine hydrophile Domäne unbekannter Funktion lokalisiert (Herold et al., 1998; Conti et al., 1998; Cingolani et al., 1999; Chook und Blobel, 2001). Die IBB Domäne beinhaltet eine Pseudo-NLS-Sequenz (KRR), welche eine Autoinhibition von KPNA2 bewirkt und so eine ungerichtete Anbindung von NLS-Substraten im Nukleus verhindert (Harreman et al., 2003) (Abb 1-6). Für die Funktionalität, also die zytoplasmatische Anbindung von NLS-haltigen Substraten, ist die ARM-Sequenz von entscheidender Bedeutung. Ihre rechtsdrehende superhelikale Struktur gewährleistet die nötige Flexibilität des Importadapters KPNA2 und von α -Karyopherinen im allgemeinen (Macara, 2001). Die Expressionsmuster verschiedener α -Importine sind teilweise gewebespezifisch (Kohler et al., 1997). Verschiedene Karyopherine können redundant die gleichen Kargoproteine erkennen oder aber solitär für den Import spezieller Proteine zuständig sein (Quensel et al., 2004).

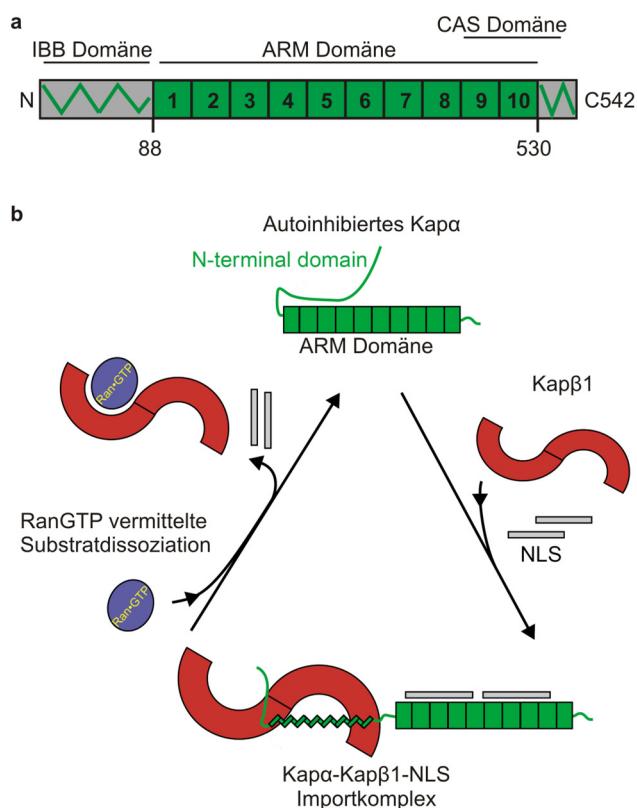


Abb. 1-6: Der Aufbau von Karyopherin $\alpha 2$ (KPNA2) . a: Darstellung der drei funktionellen Domänen des 542 Aminosäuren (AS) großen Proteins KPNA2. Die ARM Domäne erstreckt sich von AS88 bis AS530. **b:** Darstellung der Assoziation und Dissoziation der Importkomplexes, bestehend aus KPNA2 (Kapa, grün), Karyopherin $\beta 1$ (Kap $\beta 1$, rot) und dem NLS-substrat (Kargo, grau). Die autoinhibitorische Domäne von Kapa bindet an Kap $\beta 1$ und ermöglicht die Anbindung von NLS-Substraten an die ARM-Sequenz. In Gegenwart von RanGTP (Nukleus) formiert sich ein Kap $\beta 1$ /RanGTP-Komplex wobei es zu Freisetzung des Kargoproteins kommt und Kapa zurück in seine autoinhibierte Formation gelangt. Dadurch wird ein erneutes binden von NLS-substrat unterbunden [Verändert nach: Chook und Blobel 2001]

1.9.2 Der Kernimportzyklus

Der Kernimportzyklus wird für Proteine mit einer klassischen NLS durch Importin α / Importin β -1-Heterodimere realisiert und ist ein mehrstufiger Prozess (Abb. 1-7) (Gorlich 1997; Gorlich 1998; Mosammaparast und Pemberton 2004). Er beginnt mit der Anbindung des NLS-Substrats an das Importin α/β -1-Heterodimer. Das so formierte Trimer interagiert über Importin β 1 mit der zytoplasmatischen Seite der NPC und wird dadurch in den Kern transloziert. Zwischen Zytosol und Nukleosol besteht ein RanGTP Gradient (hohe RanGTP Konzentration im Kern). Für die Aufrechterhaltung dieses Gradienten wird RanGDP im Kern durch chromatingebundenes RanGEF (*Ran guanine-nuclear-exchange factor*) zu RanGTP umgewandelt. Im Zytosol hingegen erfolgt durch RanGAP (*RAN GTPase activating protein*) die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP. RanGDP wird über seinen Importfaktor NTF2 zurück in den Kern gebracht. Der RanGTP-Gradient ist entscheidend für die Translokationsrichtung von α/β Karyopherinen (Moore und Blobel 1993). Nukleäres RanGTP bindet im Kern an Importin β 1 und führt so zur Auflösung des Transport-Trimers. Importin α löst sich vom Kargoprotein und bildet einen RanGTP/CAS/Importin α Exportkomplex. CAS fungiert als Exportfaktor für Importin α . Im Zytosol wird der Exportkomplex durch die Anbindung von RanBP1 (*Ran binding protein*) an RanGTP aufgelöst. Das Ran-freie CAS verliert seine Affinität zu Importin α , welches jetzt wieder für einen weiteren Importzyklus bereit steht. Importin β 1 wird vermutlich separat als RanGTP/Importin β 1-Heterodimer exportiert. Im Zytosol angekommen wird es ebenfalls über die Hydrolyse von RanGTP zu Ran GDP freigesetzt und für einen weiteren Importzyklus reaktiviert (Abb. 1-7).

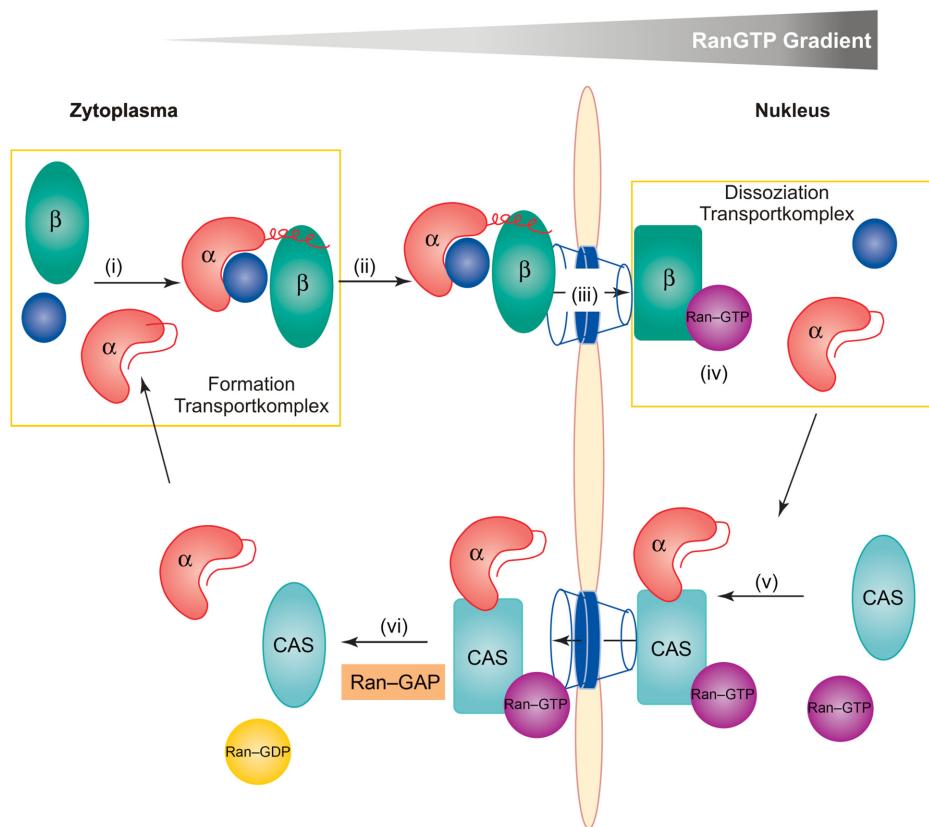


Abb. 1-7: Der nukleozytoplasmatische Transportzyklus mit Importin α und Importin β . (i) Importin α bildet zusammen mit Importin β und dem NLS-Substrat (Kargo) einen tertiären Komplex im Zytosol. (ii) Dieser Transportkomplex interagiert mittels Importin $\beta 1$ mit der Kernpore und (iii) wandert in den Kern. (iv) Durch Bindung von RanGTP an Importin $\beta 1$ kommt es zur Dissoziation des Komplexes und somit zur Freisetzung des Kargoproteins. (v) Importin α bindet den CAS-RanGTP-Exportkomplex und wird ins Zytosol exportiert. (vi) RanGAP stimuliert die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP. Dies führt zu der Freisetzung von CAS und Importin α . Importin α steht erneut für einen Importzyklus bereit. Der Export und das Recycling von Importin $\beta 1$ sind nicht dargestellt, siehe auch Seite 22 [Verändert nach: Goldfarb et al., 2004]

1.9.3 Kerntransport und Krebsentstehung

Der Kerntransport ist von der Funktionalität einer Vielzahl von Faktoren abhängig, welche sich in vier wesentliche Kategorien einteilen lassen: RanGTPasen, spezielle Transportfaktoren für bestimmte Protein/RNA-Komplexe, Kernporenproteine (Nukleoporine) und die Gruppe der Karyopherine (lösliche Transportrezeptoren) (Kau et al., 2004). Eine Störung einer oder mehrerer dieser Faktoren kann zu einem veränderten Proteinimport oder Proteinexport führen. Eine Zusammenstellung von Proteinen deren Fehltranslokation bereits in Krebserkrankungen nachgewiesen wurde, ist in Tab. 1-3 ersichtlich. Ein aus chromosomaler Translokation resultierendes Fusionsprotein des Nukleoporin NUP214 wurde als putatives Onkogen für die Leukämogenese beschrieben, welches die zytoplasmatische Translokation des Exportfaktors CRM1 (Importin β Proteinfamilie) forcieren kann. Dies wiederum nimmt Einfluss auf die Signaltransduktion in Tumorzellen (Kraemer et al., 1994; Fornerod et al., 1995). Ein weiteres tumorassoziiertes Nukleoporin ist das NUP88-Protein.

Es wurde bereits in 76% der Ovarialkarzinome als überexprimiert beschrieben (Martinez et al., 1999).

Karyopherine haben neben ihrer Import- und Exportfunktion von Proteinen und bestimmter RNA Moleküle (tRNAs oder rRNAs) auch eine Schlüsselrolle für die Mikrotubuli Polymerisation und nehmen somit Einfluss auf die Zellmitose. Sie sind an der Zellzykluskontrolle (S-Phasen Regulierung) und der Replikation beteiligt (Mosammaparast und Pemberton 2004). Aufgrund dieser vielseitigen Funktionen kann eine Deregulation von Karyopherinen zu einer Fehltranslokation von Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen führen und so die Tumorgenese forcieren bzw. auslösen (Kau et al., 2004).

Nuclear-Factor-kappa-B (NF κ B)-Komplexe sind prominente Transkriptionsfaktoren, die eng mit Zellproliferation und Apoptose-Inhibierung verbunden sind. Eine NF κ B Überexpression oder Überaktivierung ist mit der Entstehung verschiedenster Krebsentitäten wie Brustkrebs, Darmkrebs, Lungenkrebs oder CLL assoziiert (Sovak et al., 1997; Rayet und Gelinas, 1999; Furman et al., 2000; Cogswell et al., 2000). Interessanterweise wurde, neben einer aberranten Expression oder Aktivierung, auch eine übermäßig starke nukleäre Translokation von NF κ B in Tumorzellen der Mamma, des Ovars, des Kolons und des Pankreas nachgewiesen (Rayet und Gelinas, 1999; Kau et al., 2004). Das Tumorsuppressorgen TP53 ist in 50% der Mammakarzinome mutiert (1.5.1). Darüber hinaus kann eine p53-Inaktivierung auch mutationsunabhängig, über eine zytoplasmatische Sequestrierung, erfolgen (Moll et al., 1992). Vermutlich ist eine gesteigerte Exportin-Aktivität für die zytoplasmatische p53-Anreicherung in Mamma-, Kolon-, Ovarialkarzinomzellen und dem Retinoblastom verantwortlich (Moll et al., 1992; Schlamp et al., 1997; Lu et al., 2000).

Exportin CRM1 und Karyopherin β 1 sind in zervikalen Tumoren überexprimiert. Ein mRNA-Interferenz induzierter Expressionsverlust dieser beiden Faktoren führt jedoch zu Proliferationsminderung und gleichzeitiger Apoptose-Steigerung sowie zu gesteigerter Re-Translokation von p53 in den Zellkern und könnte somit prinzipiell das Wachstum von Tumorzellen unterdrücken (van der Watt et al., 2009). Dieses Beispiel belegt eindrucksvoll den potenziellen Einfluss des Kerntransports auf die fundamentalen Prozesse in (Tumor)-Zellen.

Tab. 1-3: Die zelluläre Fehllokationen tumorassozierter Proteine [Verändert nach Kau et al. 2004]

Protein	Lokalisation normale Zelle	Lokalisation Tumorzelle	Effekt der Lokalisation	Tumor-Entität
NFkB	Zytoplasma	Nukleus	Inhibierung der Apoptose	Brust, Ovar, Kolon, Pankreas, Hodgkin's Lymphom, C-ALL
FOXO	Nukleus	Zytoplasma	Zellzyklus-Arrest, pro-apoptotische Gene werden nicht transkribiert	Niere, Kolon, Glioblastom
p27	Nukleus	Zytoplasma	E2F1 Aktivierung und Zellzyklus-Progression	Oesophagus, Kolon, Brust
p53	Nukleus	Zytoplasma	Keine DNA-Reparatur	Brust, Neuroblastom, Kolon, Ovar
INI1	Nukleus	Zytoplasma	CylinD- und E2F-Aktivierung	Maligne atypische teratoide Tumore
β-Catenin	Zytoplasma	Nukleus	Bindung / Aktivierung von LEF1	Kolon

In Hinblick auf zukünftige (Brust)-Krebstherapien könnte die pharmazeutische Inaktivierung von in Tumorzellen überexprimierten Karyopherinen einen wirkungsvollen neuen Ansatz bedeuten. Kleine molekulare Wirkstoffe (*small molecular drugs*) könnten, durch sterische Inhibierung von Transportfaktoren, regulierend auf die subzellulare Verteilung von Tumorsuppressoren oder Onkogenen (z.B p53 oder NFkB) einwirken. Bis jetzt sind jedoch keine Wirkstoffe bekannt, die den klinischen Anforderungen bezüglich Tumorzellspezifität, der Zielproteinspezifität sowie Zelltoxizität erfüllen könnten (Kau et al., 2004).

1.9.4 Karyopherin α2 als putatives Onkogen des humanen Mammakarzinoms

Der Kernimporter Karyopherin α2 (KPNA2) wurde in Vorarbeiten unserer Gruppe im Mammakarzinom differenziell überexprimiert gefunden. Durch die Kombination von qualitativ hochwertigen, laser-mikrodissezierten, gepaarten Proben von normalen Brustepithelien und invasiven duktalen Karzinomen (I-IIIC) und einer Chip-basierten Genexpressionsstudie (Affymetrix), konnte KPNA2 als tumorspezifisch aufreguliert identifiziert werden (Dahl et al., 2005). Mittels cDNA Dot-Blot Analyse (Clontech) von weiteren 50 gepaarten Normal- und Tumorproben, konnte dieser initiale Befund validiert werden (Dahl et al., 2005). Die weiterführende immunhistochemische Analyse eines *Tissue-Micro-Array*, bestehend aus 289 formalin-fixierten primären Mammakarzinomen (I-IIIC) zeigte, dass mehr als 50% der Tumore eine gesteigerte ($\geq 10\%$) nukleäre KPNA2 Proteinexpression aufwiesen.

Univariate Analysen bestätigten bei Patientinnen mit KPNA2 Überexpression ein reduziertes Gesamtüberleben sowie ein schlechtes rezidivfreies Überleben. Multivariate Regressionsanalysen zeigten, dass es sich bei der tumor-spezifischen KPNA2 Überexpression um einen von anderen Faktoren unabhängigen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben von Mammakarzinopatientinnen handelt. Eine gesteigerte KPNA2 Expression war darüber hinaus eng mit einer fortgeschrittenen Tumogröße und Tumorgraduierung assoziiert (Dahl et al., 2006). Neben Brustkrebs wurde KPNA2 auch als Biomarker für die Diagnose des Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms (NSCLC) vorgeschlagen (Wang et al., 2010). Im oesophagialem Plattenepithelkarzinom ist die KPNA2 Überexpression mit einer fortgeschrittenen Tumorentdifferenzierung, gesteigerter Proliferation und Tumorinvasion assoziiert (Sakai et al., 2010).

Weitere Genexpressionsstudien bestätigten eine tumorbedingte KPNA2 Expression (Wang et al., 2005) sowie dessen Assoziation mit einer schlechten Tumordifferenzierung (Sotiriou et al., 2006). Dankof et al. analysierte die KPNA2 Proteinexpression in gepaarten Brustgewebschnitten mit invasiven duktalen Arealen, *in situ* Anteilen (DCIS) und angrenzenden normalen Epithelstrukturen. Es zeigte sich eine frequente KPNA2 Aufregulation in 21% der DCIS-Anteile, in 31% der invasiven Tumore und in 0% der gesunden Epithelien. Daraus lässt sich folgern, dass die aberrante KPNA2 Expression bereits ein sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese der Brust sein könnte (Dankof et al., 2007). Eine frühe Aufregulation von KPNA2 im Zuge der Tumorgenese wurde ebenfalls in einem Mausmodell gezeigt (Klein et al., 2007). Neben Brustkrebs konnte eine KPNA2 Überexpression in kutanen Melanomen ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert werden (Winneppenninckx et al., 2006). Gluz et al. veröffentlichte 2008 eine *Tissue-Micro-Array* basierte Studie mit insgesamt 191 invasiven Tumoren welche erneut das große prognostische Potenzial von KPNA2 für das humane Mammakarzinom bestätigt hat (Gluz et al., 2008). Neben einer schlechten Überlebensprognose von Hochrisikopatientinnen mit moderat differenzierten (G2) Tumoren, war die KPNA2 Expression generell mit einer fortgeschrittenen Tumorgraduierung, Lymphknotenmetastasen, negativem Hormonrezeptorstatus, Her2/Neu-Expression, EGFR Positivität und einer p53 Überexpression verbunden. Eine KPNA2 Überexpression ist dem zufolge bei besonders aggressiven Tumoren von Hochrisikobrustkrebs (HRBC)-Patientinnen präsent (Gluz et al., 2008). Interessanterweise korreliert die KPNA2 Expression mit Tumoren der basalen (*basal-like*) und der Her2/neu Subtypen des Mammakarzinoms. Diese molekularen Tumorsubtypen werden, verglichen mit luminalen Tumoren, mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003). Die Identifizierung von Markern für diese klinisch relevanten molekularen Subtypen des Mammakarzinoms ist, bezüglich einer möglichen Verbesserung der Prognose und der Therapieabschätzung, von großem Interesse. KPNA2 könnte als ein neuer Marker für basale oder Her2/neu Tumor-

Subgruppen fungieren und dabei helfen HRPC-Patientinnen (G2) zu identifizieren die besondere therapeutische Maßnahmen benötigen (Gluz et al., 2008).

Neben den Ergebnissen, die die prognostische Qualität der tumorassoziierten KPNA2 Expression beschreiben, gibt es zahlreiche Studien, die KPNA2 als einen spezifischen Adapter für den nukleären Import von Tumor-relevanten Faktoren zeigen. KPNA2 steuert die normale, nukleäre Translokation der Tumorsuppressorgene NBS1 und CHK1 (Zannini et al., 2003; Tseng et al., 2005). Der Tumorsuppressor NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome*) ist Bestandteil des DNA-Doppelstrang Reparatursystems und der Zellzyklus-Kontrolle. KPNA2 ist somit ein wichtiger Faktor für die tumorsuppressive Funktion von NBS1 (Tseng et al., 2005; Teng et al., 2006). Der Tumorsuppressor BRCA1 wird ebenfalls durch KPNA2 in den Zellkern transloziert (Thakur et al., 1997). BRCA1 ist in die DNA Reparatur und Zellzyklus-Regulation involviert. Ein durch DNA-Schädigung induzierter Export von BRCA1 wird durch p53 Signaltransduktion reguliert (Feng et al., 2004). Es gibt eine enge Korrelation zwischen der KPNA2 Expression und der nukleären Translokation von p53. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine trunkierte Form des KPNA2 Proteins nicht mehr in der Lage ist p53 als Kargo zu transportieren (Kim et al., 2000). Ein induzierter Verlust der KPNA2 Expression führte zur Inhibierung der Migrations- und Lebensfähigkeit von Lungen-tumorzellen (Wang et al., 2010). Andererseits wurde die direkte Interaktion von KPNA2 mit onkogen wirkenden Faktoren, wie der NF κ B Untereinheit p65 (RelA), nachgewiesen (Cunningham et al., 2003). Erhöhte nukleäre p65 Konzentrationen wurden im Mammakarzinom bereits nachgewiesen (Rayet und Gelinas, 1999). Die überaus komplexe NF κ B Signaltransduktion nimmt fundamentalen Einfluss auf den Phänotyp von normalen und transformierten Zellen durch die Regulation von Apoptose, Proliferation, Angiogenese und Metastasierung, und ist für die Entwicklung und den Erhalt der Brustdrüsenarchitektur von entscheidender Bedeutung (Cao und Karin, 2003). Außerdem wird die Rho-GTPase RAC-1 spezifisch durch KPNA2 transloziert (Sandrock et al., 2010). Die Familie der Rho-GTPasen, RAC-1 im speziellen, ist mit der Regulation von migratorischen, adhäsiven und proliferativen Prozessen assoziiert (Pankov et al., 2005). Eine RAC-1 Signaltransduktion vermittelte Regulation der Zellzykluskontrolle wurde bereits als Faktor für die Tumorgenese der Brust vorgeschlagen (Welsh 2004; Yi et al., 2010).

Die hier beschriebenen Funktionen von KPNA2 als Prognosefaktor, seine Interaktion mit Tumorsuppressorgenen bzw. Onkogenen und eine damit mögliche funktionelle Verknüpfung mit den verschiedensten Signaltransduktionswegen, unterstreichen die potenzielle Rolle von KPNA2 für die Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms. Bis jetzt sind keine Studien veröffentlicht worden, in denen die potenzielle onkogene Wirkung von KPNA2 für das humane Mammakarzinom funktionell analysiert wurde.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Das molekulare Ursachen-Wirkungsspektrum der Tumorgenese erweist sich als außerordentlich komplex und wird bis jetzt, insbesondere beim Brustkrebs, unzureichend verstanden. Die Verbesserung der Früherkennung, Prognose und Prädiktion von Brustkrebs sind wichtige Ziele der modernen molekularen Onkologie. Die Entwicklung von effektiven individuellen Brustkrebstherapien setzt zudem ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorgenese voraus. Die Identifizierung von Genen, die im Tumorgewebe, in direktem Vergleich zum korrespondierenden gesundem Brustepithel, dereguliert vorliegen, ist eine Schlüsselstrategie für Charakterisierung und Validierung von putativen DNA-Methylierungs-Biomarkern, Tumorsuppressorgen und Proto-Onkogenen. In *expressed sequence tags (EST)* und *DNA-Micro-Array* basierten Vorarbeiten wurden im Mammakarzinom differenziell exprimierte Gene identifiziert und für eine weitere Charakterisierung ausgewählt (Dahl et al., 2005; Dahl et al., 2006). Die Auswahl der beiden Kandidaten-Gene *SYNM* und *KPNA2* erfolgte auf Grund ihrer potenziell tumorrelevanten Funktionen.

Das *SYNM* Gen kodiert ein Intermediärfilament (IF) vom Typ IV. IFs sind wesentliche Determinanten der Zellarchitektur und eine Deregulation kann erheblichen Einfluss auf Tumorinvasion und Metastasierung nehmen. Über die Expression von *SYNM* in der gesunden Brustdrüse und über seine Bedeutung für die Tumorgenese und die Progression des humanen Mammakarzinoms war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Der tumorspezifische *SYNM* Expressionsverlust sollte auf mRNA- und Proteinebene, anhand der Expressionsanalysen von normalen Epithelien und invasiven Brusttumoren, validiert und das *SYNM* Proteinexpressionsmuster im Brustdrüsengewebe charakterisiert werden. Die ggf. aberrante *SYNM* Promotormethylierung sollte als potenzieller Mechanismus für das *SYNM gene-silencing* im Brustkrebs analysiert und funktionell durch *in vitro* Demethylierungsanalysen an humanen Brustkrebszelllinien validiert werden. Ein weiteres angestrebtes Ziel war Untersuchung der *SYNM* Promotormethylierungsfrequenz anhand eines großen Kollektivs von invasiven Mammakarzinomen. Durch uni- und multivariate statistische Analysen sollten die prognostische und prädiktive Qualität von *SYNM* als neuer DNA-Methylierungs-Biomarker und seine mögliche tumorsuppressive Funktion für das Mammakarzinom bewertet werden.

Die Kerntransportmaschinerie ist für die Homöostase von eukaryotischen Zellen von elementarer Bedeutung und eine Deregulation von Kernimportfaktoren ist seit längerem mit der Karzinogenese und Tumorprogression assoziiert. Das Gen *KPNA2* kodiert den Kernimporter Karyopherin α2. Seine tumorspezifische Überexpression und die damit assoziierte schlechte Überlebensprognose von Brustkrebspatientinnen wurden bereits nachgewiesen. Ziel war es nun, diese These der onkogenen Wirkung der *KPNA2*

Überexpression durch funktionelle *in vitro* Analysen mittels *gain-of-function* und *loss-of-function* Zellkultur-Modellen zu bestätigen. Zu diesem Zweck sollten benigne MCF10A und maligne MCF7 Brustkrebszelllinien etabliert werden, die KPNA2 stabil über ein induzierbares Tet-On-Expressionsvektorsystems überexprimieren (*gain-of-function*). Die phänotypischen Konsequenzen für KPNA2 überexprimierende Brustkrebszelllinien sollten bezüglich Proliferations-, Apoptose-, Migrations-, Adhäsions- und Kolonienbildungsfähigkeit charakterisiert werden. Die Etablierung eines siRNA vermittelten KPNA2 Verlusts (*loss-of-function*) in KPNA2 hoch exprimierenden MCF7 Tumorzellen versprach zudem ein besseren Einblick in die potenziellen Effekte der differenziellen KPNA2 Expression in Brustumorzellen.

Durch die in dieser Arbeit angestrebte Identifizierung eines neuen DNA-Methylierungs-markers (SYNM) sollte ein Beitrag zur Verbesserung der Prognoseabschätzung für das humane Mammakarzinom geleistet und geholfen werden, das Verständnis für die molekularen Mechanismen der Tumorgenese durch die funktionelle Charakterisierung des putativen Onkogens KPNA2 zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Klinisches Patientenmaterial

2.1.1 Kryokonserviertes humanes Frischgewebe

Diese Studie wurde als retrospektive Multi-Center Studie durchgeführt, in die insgesamt 232 Brusttumorproben und 45 Brust-Normalgewebeproben aus den Kliniken für Gynäkologie des UK Aachen, des UK Jena, des UK Düsseldorf und des UK Regensburg eingeflossen sind. Die Gewebeproben wurden nach der Diagnosestellung eines primären Mammakarzinoms zwischen den Jahren 1991 und 2005 entnommen. Alle Patientinnen hatten eine Einverständniserklärung zur Konservierung ihres Gewebes für Forschungszwecke unterzeichnet. Für Untersuchungen von Brusttumormaterial zur Erforschung des Brustkrebses lag ein positives Votum seitens der Ethikkommission des Universitätsklinikum Aachen (EK104/05) sowie der weiteren beteiligten Zentren vor. Nach der Geweberesektion wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mittels H&E-Färbung an Schnitten (10µm) wurde der Anteil der Tumorzellen bestimmt. Nur solche Proben mit einem Tumorzellanteil >70% wurden weiter verwendet. Die Auswahl der Fälle erfolgte unselektiert und konsekutiv nach Verfügbarkeit von Gewebe in den Kliniken. Die Auswahl der Fälle war nicht stratifiziert nach klinisch-pathologischen / prognostischen Faktoren oder der Art einer adjuvanten Therapie nach chirurgischer Tumorresektion. Einschlusskriterien waren wie folgt definiert: weibliche Patientinnen mit unilateralem, primärem, invasivem Mammakarzinom ohne individuellen Brustkrebs Vorbefund. Ausschlusskriterien waren wie folgt definiert: Erhalt einer neoadjuvanten Chemotherapie, Präsentation mit sekundärem Mammakarzinom oder histologische Sicherung eines peri-tumorösem *in situ* Karzinoms in der Probe. Klinische Pathologen bewerteten die Tumor-Histologie nach den Kriterien der Welt-Gesundheitsorganisation und die Tumor-Klassifikation nach dem etablierten TNM-System (Wittekind et al., 2002). Der histologische Grad wurde nach dem System von Bloom und Richardson und modifiziert nach (Elston und Ellis, 1993) bestimmt. Die Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Faktoren dieses Kollektivs für die SYNM-Methylierungsstudie ist in Tab. 6-1 (Anhang) zusammengefasst.

2.1.2 Formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe (FFPE)

Für immunhistochemische Analysen der SYNM Expression wurden FFPE Schnitte von 31 normalen Brustgeweben und 37 invasiven Brusttumoren verwendet (2µm Schnittdicke), deren klinische Charakteristika bereits beschrieben wurde (Dahl et al., 2006).

2.2 Humane Brustzelllinien

Die in dieser Studie verwendeten Brustzelllinien, wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen und wie vom Anbieter empfohlen kultiviert.

Alle Zelllinien wurden in dreimonatigen Abständen auf Abwesenheit von Mycoplasmen überprüft. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tab. 2-1 aufgeführt.

Tab. 2-1: Verwendete Brustzelllinien und deren Ursprung

Zelllinie	Ursprungsgewebe
benigne	
MCF10A	benigne Veränderung der Brust
MCF12A	spontane Immortalisation, Brust
maligne	
BT20	Invasiv duktales Karzinom
HS578T	Sarkomatoides Karzinom
MCF7	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB231	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB468	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MCF7	Adenokarzinom, pleurale Effusion
SKBR3	Adenokarzinom, pleurale Effusion
T47D	Duktales Karzinom, pleurale Effusion
ZR75-1	duktales Karzinom, Aszites

2.3 Geräte, Software, Chemikalien und Lösungsmittel

2.3.1 Geräte

ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gene Pulser II Electroporation System	Bio-Rad, München
Brutschrank (20% O ₂ , 5% CO ₂ , 37 °C)	Heraeus / Kendro, Düsseldorf
Canto II Durchfluss-Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
CASY 1 Durchfluss-Cytometer	Schärfe System, Reutlingen
CCD Kamera MORADA	Olympus, Hamburg
Digital pH-Meter	Knick, Berlin
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Wesseling
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Wesseling
Eppendorfzentrifuge 5415C (Rotor: UE001)	Eppendorf, Wesseling
Gel-Dokumentationseinheit	MWG Biotech AG, Ebersberg

Hoefer HE 33 Mini Submarine Gelkammer	Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Kryotom HM560	Microm Laborgeräte, Walldorf
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
MegaFuge 1.0 (Rotor: BS4402/A)	Heraeus / Kendro, Düsseldorf
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
PyroMark ID	Qiagen, Hilden
PyroMark Vacuum Prep Station	Qiagen, Hilden
Reinraumwerkbank Hera Safe	Heraeus / Kendro, Düsseldorf
Schüttler MTS4	IKA-Werke, Staufen
SpectraMax 340	Molecular Devices, München
Speed Vac Concentrator	Savant, Ramsey, MN, USA
Stromversorgungsgerät	Gibco / BRL, Eggenstein
Thermoblock DRI-BlockDB-2A	Techne, Burkhardtsdorf
Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
EM 400T	Philips, Hamburg
UV-Lampe	Roth, Karlsruhe
Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.3.2 Software und Datenbanken

Pyro Q-CpG Software	Qiagen, Hilden
PSQ Assay Design Software	Qiagen, Hilden
SPSS 17.0 Statistik Software	SPSS, Chicago, IL, USA
GraphPad Prism 5.0 Gold Statistik Software	GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA
iTEM Imaging Software	Olympus Soft Imaging Solutions
FCS Express V3 Software	http://www.denovosoftware.com
Methprimer Online Portal	http://www.urogene.org/methprimer
Genomatix Online Portal	http://www.genomatix.de
Primer3 Online Portal	http://www.frodo.wi.mit.edu
ENSEMBL Datenbank	http://www.ensembl.org
GeneCards Datenbank	http://www.genecards.org
PUBMETH Datenbank	http://www.pubmeth.org

2.3.3 Chemikalien

Sofern nicht explizit aufgeführt, wurden alle Chemikalien in p. A. Grad oder in der reinsten erwerbbaren Form verwendet. Im Folgenden nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen und sind zum Teil direkt im Methodenteil aufgeführt.

Agarose „SeaKem LE agarose“	Cambrex, Rockham, ME, USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenheim
5-Aza-2'-desoxyctidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto-Agar	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Invitrogen, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CASYTON	Schärfe System, Reutlingen
Diaminobenzidin	DAKO, Glostrup, Dänemark
Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogensulfat	Fluka, Neu-Ulm
EGF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FuGENE HD	Roche Diagnostics, Mannheim
Fötales Kälberserum (FKS)	Seromed Biochrom, Deisenhofen
Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
HPLC-Wasser, Pyrophosphat-frei	Merck, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Deisenheim
Insulin	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Cölbe
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methylenblau	Merck, Darmstadt

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenheim
Natriumzitrat	Fluka, Neu-Ulm
Penicillin; Streptomycin	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Niederlande
Tetracyclin-Hydrochlorid	BioChemica
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trisbase	Merck, Darmstadt
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin
VitroClud	Langenbrinck, Emmendingen
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Fluka, Neu-Ulm

2.3.4 Lösungsmittel

Aceton	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.4 Puffer und Lösungen

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden mit H₂O-bidest. hergestellt und wo erforderlich sterilfiltriert oder autoklaviert. Nicht aufgeführte Puffer und Lösungen sind im Methodenteil beschrieben, oder es wurden kommerzielle Puffer verwendet.

Allgemeine Puffer	Komponenten
Agarose-Lsg.	0.8-2% (w/v) Agarose in 1 × TBE-Puffer
TAE-Puffer 50x (pH 8.0)	2M Tris, 50mM EDTA, pH 8.0 (eingestellt mit Essigsäure)
10x PBS-Puffer (pH 7.5)	160mM Na ₂ HPO ₄ , 40mM NaH ₂ PO ₄ , 1.5M NaCl
10x TBS-Puffer (pH 7.6)	500mM Tris/HCl, 1.5M NaCl
10x TBE-Puffer	54.45g Tris-Base, 27.5g Borsäure, 20ml EDTA pH 8.0, ad 500ml H ₂ O
1M Phosphat (pH 7.2)	60.9g Na ₂ HPO ₄ , 21.8g NaH ₂ PO ₄
PBS/Tween	1l 1xPBS, 0.1% Tween 20
10x TE-Puffer	100ml Tris pH 7.5, 20ml EDTA pH 7.5, ad. 1l H ₂ O
Kristallviolett-Lsg.	0.25% (w/v) Kristallviolett in 10% Formalin/80% Methanol/10%
Methylenblau-Lsg.	0.1% (w/v) Methylenblau in Ethanol abs.
Mayers Hämalaun-Lsg.	1g Hämatoxylin in 1l H ₂ O lösen; 200mg Na-Iodat und 50g Aluminiumkaliumsulfat zugeben; nach dem Lösen 50g Chloralhydrat und 1g Zitronensäure zugeben
Eosin-Lsg.	1g Eosin in 100 ml H ₂ O
Ethidiumbromid-Lsg.	35µl Ethidiumbromid-Stamm-Lsg.. (10mg/ml) in 1×TBE-Puffer (350µg/l)
DEPC-H ₂ O	0.1% (w/v) DEPC in H ₂ O, ü. N. gerührt, autoklaviert
Tris-EDTA Puffer pH9.0	100mM Tris-HCl, 10mM EDTA mit HCl pH einstellen, ad 1000ml ddH ₂ O

2.4.1 Lösungen für Gelelektrophoresen

Agarose-Lsg.	0.8-3% (w/v) Agarose in 1x TBE Pufferff
Ethidiumbromid-Lsg.	35µl Ethidiumbromid-Stamm-Lsg, (10mg/ml) in, 1x TBE-Puffer
5x Ladepuffer	2.5mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 90% Glycerin, 0.01% Bromphenolblau, 0.01% Xylencyanol
1x TBE-Puffer	8.9mM Tris-HCl, 8.9mM Borsäure, 2mM EDTA
10x TE-Puffer	100ml Tris-HCl (1M) pH 7.5, 20ml EDTA (0.5M) pH 7.5, ad. 1l H ₂ O

2.4.2 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

dNTP – Mix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2.5mM
MgCl ₂	25mM Stocklösung Promega, Mannheim
10x PCR-Puffer	500mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3)
10x MSP-Puffer	500mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2mM MgCl ₂

2.4.3 Lösungen für diskontinuierliche Gelelektrophoresen und Westernblot

Lyse-/Probenpuffer	1ml 4x NuPage-SDS Puffer Invitrogen, plus 200µl frisches 1M DTT ad 2.8ml ddH ₂ O.
SDS-Page Laufpuffer	NuPage20xLaufpuffer Invitrogen, Tris-Glycin-Laufpuffer 50ml ad 950ml ddH ₂ O
Transfer Puffer	25mM Tris-Base, 192mM Glycin, 20% v/v Methanol ad. 1l ddH ₂ O

2.4.4 Lösungen für die Lowicryl Einbettung

Lowicryl	3.4g Crosslinker, 17.02g Monomer und 0.10g Initiator vorsichtig unter Stickstoffatmosphäre mischen (sauerstoffempfindlich). Entspricht 20ml Lsg.
----------	--

2.4.5 Lösungen für die β-Galaktosidase (*lacZ*) Färbung

4% PFA	54ml 37% Formaldehyd; 5ml Glutaraldehyd; ad. 500ml PBS
X-Gal-Färbepuffer	1ml 1M MgCl ₂ ; 1.056g K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O; 0.823g K ₃ Fe(CN) ₆ ; 50mg Na-Deoxycholat; 100µl NP-40; ad. 500ml PBS
X-Gal Stocklösung	0.5g X-Gal in 10ml Dimethylformamid

2.5 Detektionskit für die Immunhistochemie

En Vision Kit K5007	DAKO, Glostrup, Dänemark
---------------------	--------------------------

2.6 Monoklonale und Polyklonale Antikörper

Primärantikörper:

SYNM	IgG Ziege, Anti-human, (sc-49651) Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
KPNA2	IgG Ziege, Anti-human, (sc-6917) Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
β-Aktin	IgG Maus, Anti-Human (ab93027) Abcam Antibodies, CB, UK

Sekundärantikörper:

IgG Kaninchen, Anti-Ziege/Immunogold (10nm Partikel)	DAKO, Glostrup, Dänemark
IgG Kaninchen, Anti-Ziege/HRP (P0449)	DAKO Glostrup, Dänemark
IgG Ziege, Anti-Maus/HRP (P0447)	Dako Glostrup, Dänemark

2.7 Medien für die Anzucht von *E.coli*

Die Medien wurden bei 121°C und 2bar für 20 min autoklaviert. Nach Bedarf wurde LB-Medien nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

LB-Medium	10g NaCl, 10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt ad 1000ml H ₂ O (pH 7.4)
LB-Agar	10g NaCl, 10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 15g Bacto-Agar, ad 1000ml H ₂ O (pH 7.4)
SOC-Medium	10g Hefeextrakt, 20g Bacto-Trypton, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM Glucose, ad 1000ml H ₂ O (pH 7.0)

2.8 Medien für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien wurden von der Firma PAA Laboratories (Cölbe) bezogen.

Zelllinie	Medium
MCF10A	DMEM low Glucose/F12; 10% FKS; 2mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50mg/l Streptomycin; 10µg/ml Insulin; 500ng/ml Hydrocortison; 20ng/ml EGF
MCF12A	DMEM low Glucose; 10% FKS; 2mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin
BT20	
BT474	
MCF7	
MDA-MB231	
MDA-MB453	
MDA-MB468	
Hs578T	DMEM low Glucose; 10% FKS; 2mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50mg/l Streptomycin; 10µg/ml Insulin; 1mM Natriumpyruvat
SKBR3	McCoy5A; 10% FKS; 50 Einheiten/l Penicillin; 50mg/l Streptomycin; 1% Vitaminlösung
T47D	
ZR75-1	RPMI 1640; 10% FKS; 50 Einheiten/l Penicillin; 50mg/l Streptomycin; 1% Vitaminlösung (Cholin, Folsäure, Myo-Inositol, Nicotinamid, D-Panthenolsäure, Pyridoxal, Riboflavin, Thiamin)

2.9 Molekularbiologische Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Accutase™	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
ApoOne Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim
APC Annexin V und Bindungspuffer	BD Pharmigen
Universal RiboClone® cDNA Synthesis System	Promega, Mannheim
7-AAD und Bindungspuffer	BD Pharmigen
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Qiagen Plasmid Miniprep Kit I	Qiagen, Hilden
RNAse A	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
EZ- DNA Methylation Kit™	Zymo Research, Bad Homburg
iQ5 SYBR Green MasterMix	Bio-Rad, München

2.10 Oligonukleotide

2.10.1 Oligonukleotide für die semiquantitative *Real-Time PCR*

	Sequenz (5'→3')	TA [°C]	Primer [nM]	Zyklen	Produkt (bp)
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA TGG ACT CCA CGA CGT ACT CA	60	10	38	283
MAPK11	GAATTCCAAGGGCTCCACCA CCTGTTCCATGGCACCTTAT				232
SYNM	GAC CTC CTG CAG GTG AAG AC AGG TGC TTT CTG CCT TGA AA				206
KPNA2	CCA TCC CAG CAT TCA TTT CT GGG TCA ACT GCA CCG TAC TT				126

2.10.2 Oligonukleotide für die methylierungsspezifische PCR (MSP)

	Sequenz (5'→3')	TA [°C]	Primer [nM]	Zyklen	Produkt (bp)
SYNM U For	GGTTAGGATATTGTATGTTTTGGAT	60	10	36	137
SYNM U Rev	CCCCTACCAACACCTTAACAAACCA				
SYNM M For	GTTAGGATAATCGTATGTTTCGGAC				135
SYNM M Rev	CCCTACCGCACCTAACGACCG				

U: MSP Primer zur Detektion unmethylierter DNA

M: MSP Primer zur Detektion methylierter DNA

2.10.3 Oligonukleotide für die Pyrosequenzierung

		Sequenz (5'→3')	TA [°C]	Primer [nM]	Zyklen	Produkt (bp)
SYNM	PCR	GGTTTTTATTTTATTAAAGGTTAGGATA	60	10	40	180
	PCR	biotin-TCTACRACCRCACAACACC				
	Seq	TTTATTAAAGGTTAGGATAT				

2.10.4 Oligonukleotide für die RNA Interferenz

	Sequenz (5'→3')
KPNA2	siRNA1
	siRNA2
MAPK11	siRNA1

2.11 Vektoren

pT-REx-DEST30/KPNA2	Invitrogen, Karlsruhe
pT-REx-DEST30/Mock	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA6/TR	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 4/TO/lacZ	Invitrogen, Karlsruhe

(Die detaillierten Vektorkarten sind in Kapitel 2.14.8 dargestellt.)

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 DNA-Isolation aus Frischgewebe und humanen Brustzelllinien

Die Extraktion genomicscher DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Das zu prozessierende Gewebe wurde jeweils vor dem ersten und dem letzten Schnitt mittels H&E-Färbung charakterisiert. Für tumorfreies Brustepithel war ein Epithelanteil von >30% erforderlich. Für invasives Tumorgewebe ein Tumorzellanteil von >70% sowie das Fehlen von Normalepithel und DCIS maßgeblich. Für die Isolation wurden 20µM dicke Schnitte (10-15mg) von kryokonserviertem Gewebe mit 180µl ATL-Puffer homogenisiert, mit 20µl einer Proteinase-K-Lsg. versetzt und ü.N. bei 56°C in einem Thermomixer inkubiert. Durch Zugabe von 200µl AL-Puffer und Inkubation bei 70°C für 10 min wurde der Ansatz lysiert (Optional Zugabe von 20U RNase). Anschließend wurde die DNA durch Zugabe vom 200µl 100% ETOH präzipitiert. Der Ansatz wurde auf eine QIAamp-Säule gegeben und abzentrifugiert (6000 x g). Die Säule mit der gebundenen DNA wurde zweimal gewaschen mit 500µl AW1-und AW2-Puffer. Die DNA wurde durch Zugabe von 100µl Tris-Puffer pH 8.5 eluiert (DNA-Lagerung bei -20°C). Für die DNA-Isolation aus Zelllinien wurden 5x10⁶ Zellen trypsinisiert und pelletiert, mit PBS gewaschen und in 200µl PBS resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch die Zugabe von 20µl einer Proteinase K-Lösung (20µg/ml) in 200µl AL-Puffer und einer Inkubation bei 56 °C für 10 min. Es folgte ein fünfminütiger RNase A Verdau (20 Einheiten) bei RT, um kopräzipitierte

RNA zu verdauen. Ab diesem Schritt wurde die DNA-Extraktion analog zur DNA-Extraktion aus Frischgewebe weitergeführt.

2.12.2 Gesamt-RNA Isolation aus Frischgewebe und humanen Zelllinien

Die Gesamt-RNA Isolierung wurde entsprechend den Herstellerangaben mit dem TRIzol®-Reagenz (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde 1ml TRIzol® mit 50-100mg Gewebe homogenisiert (Lagerung nach diesem Schritt bei -80°C möglich). Für die RNA Isolierung aus Zelllinien wurde 1ml Reagenz pro 5×10^5 Zellen verwendet. Das Homogenisat wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 200µl Chloroform versetzt und zehnmal invertiert. Nach 3 min Inkubation wurde durch Zentrifugation die rote, organische Phase von der klaren, wässrigen anorganischen Phase getrennt (alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C, 8000 x g durchgeführt). Die obere klare, wässrige Phase enthält die RNA und wurde vorsichtig in ein steriles, RNase freies 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Für die RNA-Präzipitation wurde der Überstand mit 500µl Isopropanol gemischt. Durch Zentrifugation wurde die RNA sedimentiert und mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Abschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das RNA-Pellet leicht getrocknet. Die RNA Resuspension erfolgte in 27µl DEPC-H₂O (Lagerung: -80°C).

2.12.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung für DNA, RNA und cDNA erfolgten mit dem Spektralphotometer NanoDrop®-ND1000. Hierfür werden lediglich 1 bis 2µl einer Nukleinsäure-Lösung benötigt. Das Messprinzip beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, nutzt somit die spezifische Extinktion von Nukleinsäuren bei $\lambda=260\text{nm}$. Die Reinheit der Probe bezüglich der Protein-Kontaminationen wird über den Koeffizienten OD260nm/OD280nm berechnet. DNA gilt ab einem Koeffizienten von 1.8-2.0 als rein. Für reine RNA sollte dieser Koeffizient ≥ 2 sein. Die Sensitivität für dsDNA liegt zwischen 2 bis 3700ng/µl und für RNA zwischen 2 bis 3000ng/µl.

Lamert-Beer'sches Gesetz:

$$c = E_\lambda / (1 \times \alpha_\lambda)$$

mit:

c: Konzentration [µg/ml]

$E\lambda$: Extinktion bei der Wellenlänge λ

1: Weglänge des Lichts im Material [cm]

α : natürlicher molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [$1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

2.12.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die enzymatische reverse Transkription von mRNA zu cDNA erfolgte mit dem Promega Reverse Transcription System (Promega) und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Synthese wurden 1µg RNA in 9.9µl DEPC-H₂O eingesetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10µl eines Mastermixes bestehend aus 4µl MgCl₂ [25mM], 2µl Reverse Transkriptase Puffer[10x], 1µl dNTP-Mix [je 10mM], 20U RNase-Inhibitor, 160pmol OligodT-Nukleotide, 160pmol Hexamer-Oligonukleotide und 8.5U AMV-RT. Im Folgenden wurde der Ansatz zunächst 10 min bei RT und im Anschluss 45 min bei 45°C inkubiert. Während dieser Phase erfolgt die cDNA-Synthese durch das Enzym AMV-Reverse-Transkriptase. Abschließend erfolgte die Enzymaktivierung durch fünf-minütige Inkubation bei 95°C. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bei -20°C (langfristige Lagerung bei -80°C durch N₂-Schockgefrierung). Bei einer vollständigen enzymatischen Umwandlung ergibt sich bei der eingesetzten mRNA Menge eine theoretische cDNA Endkonzentration von 10ng/µl.

2.12.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) ist eine Methode zur Amplifikation von beliebigen Nukleinsäureabschnitten (Mullis et al., 1986).

Ein typischer PCR-Ansatz besteht aus der *Taq* DNA Polymerase (einem hitzestabilen Enzym aus *Thermus aquaticus*, welches die Amplifikationsreaktion katalysiert), Mg²⁺-Ionen (als Ko-Faktor der *Taq* Polymerase), den DNA-Matrizen (Template), den Primern (als Starter Moleküle für die Amplifikationssreaktion), den einzelnen Nukleotiden (dNTPs, als Bausteine für die Synthese der DNA-Kopien) und einem geeigneten Reaktionspuffer (Tab. 2-2). Ein typischer PCR-Reaktionsverlauf besteht aus einer DNA-Denaturierung bei 95°C, einem sich 30-40 mal wiederholenden Amplifikationszyklus zur DNA-Synthese und einem abschließenden Syntheseschritt bei 72°C. Der Amplifikationszyklus besteht wiederum aus drei Temperatur-Plateaus (Denaturierung, Annealing der Oligonukleotide, Elongation) (Tab. 2-3).

Tab. 2-2: Standardansatz der PCR

Mastermix (1x)	
Puffer	[5x]
MgCl ₂	[25mM]
dNTP-Mix	[10mM]
Taq-Polymerase	[5u/µl]
Primer (sense / antisense)	[10µM]
DNA-Template	[1ng/µl]
ad. 25µl ddH ₂ O	

Tab. 2-3: Standard-Temperaturprofil der PCR

Schritt	Temp.	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Hot Start (Zugabe der Polymerase)	80°C	2 min
3. Denaturierung	95°C	30 sec
4. Primer-Annealing	55°C	30 sec
5. Extension	72°C	30 sec
6. Finale Extension	72°C	5 min
7. Kühlen	4°C	∞

Die optimale Temperatur für die Primer-Anlagerung (Annealing) liegt typischerweise ca. 5-10°C unterhalb des T_m -Wertes (mittlere Schmelztemperatur) des Primers. Die mittlere Schmelztemperatur ist u.a. von dem GC-Gehalt der Primersequenz abhängig. Für deren Berechnung stehen diverse Formeln zur Verfügung (z.B. $T_m=2*(A+T)+4*(G+C)$). Theoretisch verläuft die DNA-Amplifikation exakt exponentiell (2^n), dies bedeutet, die DNA verdoppelt sich pro Zyklus. Dieser theoretische Verdoppelung wird praktisch jedoch, bei Verwendung von biologischem Ausgangsmaterial (paraffinfixiertes Gewebe etc.) nicht erreicht. Gründe hierfür sind, neben der DNA-Qualität, Faktoren, die die PCR-Reaktion inhibieren. Hierzu zählen Phenol, Hämoglobin, Heparin, IgG, Lipide (Izraeli et al., 1991; Akane et al., 1994; Al Soud et al., 2000). Der Einsatzbereich von PCR-Reaktionen ist extrem vielseitig und es existieren unzählige Protokolle und Variationen, die den speziellen Aufgaben entsprechend modifiziert und optimiert worden sind.

2.12.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten

DNA wandert aufgrund ihrer negativen Nettoladung des Phosphatrückgrat in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Zwecks Größenunterscheidung lässt man PCR-Produkte in einem elektrischen Feld durch eine Agarose-Matrix wandern. Die Laufgeschwindigkeit korreliert bei entsprechender Agarosekonzentration mit der Amplifikatgröße. Für die Auftrennung von PCR-Produkten wurden die PCR-Ansätze mit farbigen, glycerinhaltigen Ladepuffern (1:5) versetzt und 12.5µl dieses Gemisches auf ein 0.5-3% Agarosegel (je nach Produktgröße) aufgetragen und elektrophoretisch mit einer Feldstärke von 5 V/cm aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine entsprechende DNA-Leiter. Zur

Visualisierung der DNA-Banden wurde Ethidiumbromid (EtBr) verwendet. Ethidiumbromid interkaliert in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix und emittiert Fluoreszenz bei einer Anregung von $\lambda=302\text{nm}$. Für eine einfache Handhabung wurden das Gel sowie der TBE-Laufpuffer mit EtBr [0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] versetzt. Die Detektion erfolgte auf einem UV-Transilluminator und wurde mittels einer hochauflösenden CCD-Kamera digitalisiert.

2.12.7 Semi-quantitative Real-Time PCR

Die semi-quantitative *Real-Time* PCR ist mittlerweile die wohl am weitesten verbreitete Methode die Expressionsstärke von Genen zu analysieren. Sie basiert auf der Verwendung eines während der Amplifikation in die dsDNA interkalierenden Farbstoffs. In dieser Arbeit wurde das Fluorochrom SYBR Green I verwendet, welches zu den asymmetrischen Cyaninen gehört. Diese Moleküle fluoreszieren nicht, wenn sie frei in Lösung vorliegen, sondern nur nach Interkalation mit der kleinen Rinne der dsDNA. Der hieraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei $\lambda_{\text{max}}=498\text{nm}$ und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\text{max}}=522\text{nm}$. Die Fluoreszenz wird, bei gleich bleibender Produktgröße, demnach umso stärker, je mehr PCR-Produkt gebildet wird. Dadurch lässt sich die Zunahme des dsDNA-Produktes direkt und in Echtzeit (*Real-Time*) verfolgen. Abgesehen von der Verwendung von Fluoreszenzreporter-Molekülen, besteht ein *Real-Time* PCR-Ansatz aus den gleichen Komponenten wie der einer konventionellen PCR. Der Vorteil der *Real-Time* PCR gegenüber einer normalen PCR besteht darin, dass die Zunahme der Fluoreszenz nach jeder Elongation gemessen werden kann. So kann während der gesamten Amplifikation direkt auf die Produktmenge geschlossen werden. Dies wiederum ermöglicht eine wesentlich präzisere Quantifizierung der Expressionshöhe, als es bei einer konventionellen PCR der Fall ist.

Durchführung:

Die PCR wurde mit dem iQ5 SYBR GREEN I Mastermix (BioRad) entsprechend den Herstellerangaben, durchgeführt (Tab. 2-4).

Tab. 2-4: Standard *Real-Time* PCR Ansatz

Mastermix	Vol [μl]
iQ SYBR Green I (5x)	5
Primer (sense / anti-sense)[10 μM]	je 0.5
DNA-Template[1ng/ μl]	1
ad. 20 μl ddH ₂ O	13

Ein typisches *Real-Time* PCR Programm ist in Tab. 2-5 dargestellt. Für die Analyse der Genexpression mit Hilfe des iQ5 PCR Gerät (Bio Rad) wurde die Gesamt-RNA aus humanen Gewebsproben oder Zelllinien isoliert, die mRNA in cDNA revers transkribiert und schließlich als Template in die *Real-Time* PCR Reaktion eingesetzt. Bei Verwendung von RNA aus kryokonserviertem Frischgewebe wird in der Regel 1 μ l der entsprechenden cDNA als Template verwendet. Die RNA aus FFPE Gewebe ist jedoch vermehrt fragmentiert, somit wird es notwendig die Templatemenge auf 2 μ l zu erhöhen. Für die Normalisierung der eingesetzten cDNA Menge wurde bei jedem PCR-Lauf das Haushaltsgen Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. Als Negativkontrolle diente bei jedem Lauf ein Doppelansatz mit ddH₂O.

Tab. 2-5: Real-Time PCR Programm für das Gen KPNA2

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
Initiale DNA-Denaturierung und Polymerase-Aktivierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	20 sec	
Primer- Anlagerung	60°C	20 sec	38x
Elongation (DNA-Synthese)	72°C	30 sec	
Finale Elongation	72°C	60 sec	1x
Schmelzkurve	40-95°C	10-20 min	1x

Schmelzkurvenanalytik:

Der wesentliche Unterschied zu einer konventionellen PCR besteht in der Erstellung einer Schmelzkurve für jeden PCR-Ansatz, im Anschluss an die Amplifikation. Hierbei kommt es zu einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 40°C auf max. 99°C und simultaner Fluoreszenzmessung. Durch die Temperaturerhöhung kommt es zu einem, dem GC-Gehalt und der Größe entsprechenden, Aufschmelzen der PCR-Produkte. Ein spezifisches Produkt schmilzt deshalb bei einer genau definierten Temperatur. Dieses Aufschmelzen wird durch eine starke Abnahme der Fluoreszenz-Intensität detektiert. So lässt sich die Spezifität der PCR und seiner Produkte validieren. Außerdem ist es durch die graphische Auswertung mittels der iQ5 Software direkt möglich, unspezifische Produkte und Primer-Dimere von dem spezifischen Produkt zu unterscheiden. Während der Etablierung einer *Real-Time* PCR für ein bestimmtes Primer-Paar ist es außerdem sinnvoll den Ansatz, zum Vergleich der Schmelzkuren und der korrespondierenden Produktgröße, elektrophoretisch aufzutrennen.

Berechnung der relativen Gen-Expression:

Als Basis der Analyse von differentieller Genexpression, wie sie für den Vergleich von Normal- und Tumorgeweben verwendet wird, dient der *cycle-threshold* (CT-Wert). Der CT-Wert bezeichnet den Schwellenwert für das Überschreiten der Hintergrund Fluoreszenz durch die Amplifikation von dsDNA. Wird der CT-Wert überschritten, geht die PCR in die exponentielle Phase über. Je früher der CT-Wert einer Probe überschritten wird, desto mehr Ausgangs DNA (Template) ist vorhanden. Diese Phase zeichnet sich im Optimalfall durch einen linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität aus. Während dieser Phase sind alle limitierenden Faktoren (dNTPs, Primer, Polymerase) im Überschuss vorhanden. Die Quantifizierung der DNA- bzw. der RNA-Ausgangsmenge basiert demnach auf einer logarithmischen linearen Reaktionskinetik. Das bedeutet, es wird die Änderung der Fluoreszenz zwischen zwei Zeitpunkten gemessen und nicht die Gesamtfluoreszenz. Wenn die PCR in die terminale Plateauphase übergeht ist die Änderung der CT-Werte gleich Null. Dies bedeutet, dass auf Grund der zunehmenden Limitierung der PCR-Reaktion, die Rate der DNA-Neusynthese geringer wird und schließlich zum erliegen kommt (Abb. 2-1). Um CT-Werte von verschiedenen, biologischen Materialien in einen quantitativen Bezug setzen zu können, ist es notwendig, diese auf eine Referenz zu normalisieren. Als Referenz diente in allen durchgeführten Analysen das Haushaltsgen GAPDH.

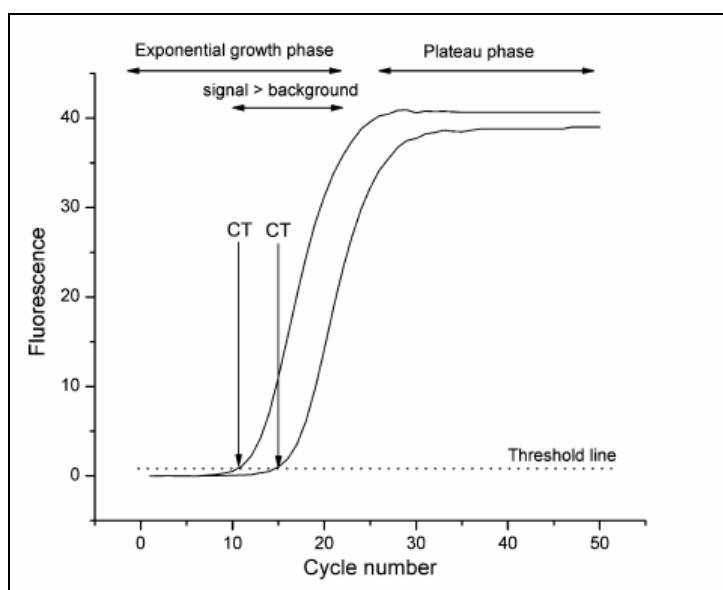


Abb. 2-1: Real-Time PCR Ergebniskurve.

Quantifizierung der relativen mRNA-Expression mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode:

Zum Vergleich der RNA-Expression eines Gens in Normal- und Tumorgeweben werden die normalisierten CT-Werte der beiden Proben ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise kann man die Auf- oder Herabregulation von Genexpressionen in Tumorzellen detektieren und

quantifizieren. Für die Auswertung der CT-Werte nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode wurden folgende Formeln verwendet:

Berechnung der Differenz der CT-Werte zwischen Zielgen und Referenzgen:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

Bestimmung der ΔCT -Differenz ($\Delta\Delta CT$) zwischen zwei Proben

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Probe1}} - \Delta CT_{\text{Probe2}}$$

Die vergleichende Quantifikation (Fink et al., 1998):

$$\text{Expressionstärke} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

($2^{-\Delta\Delta CT}$ bezeichnet den Fold Change (FC) der differentiellen Expression)

2.12.8 Bisulfit-Umwandlung von genomischer DNA aus humanem Gewebe

Die Modifizierung von genomischer DNA mit Natrium-Bisulfit (NaHSO_3) stellt die Grundlage für die Detektion von DNA-Methylierungen dar. Diese Methode wurde ursprünglich entwickelt, um die Sekundärstruktur von Nukleinsäuren zu analysieren. Das Prinzip nutzt die Tatsache, dass Cytosine einzelsträngiger DNA, durch die katalytische Wirkung von Bisulfit, hydrolytisch zu Uracil desaminiert werden können. Das C6-Atom eines zugänglichen Cytosins wird unter leicht aziden Reaktionsbedingungen (pH 5.0) und unter Einwirkung einer hohen NaHSO_3 -Konzentration (3M) sulfoniert. Die Aminogruppe am C4-Atom wird dann spontan hydrolysiert. Durch einen basischen pH Wert wird das Bisulfit-Molekül regeneriert (Abb. 2-2).

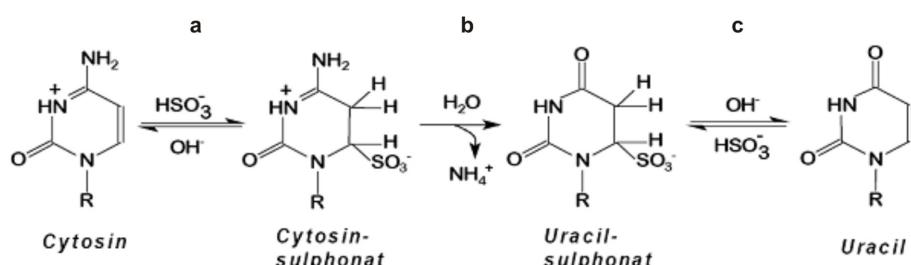


Abb. 2-2: Bisulfit-Konversion. a: Sulfonierung; b hydrolytische Desaminierung u. c: alkalische Desulfonierung. Die Konversion benötigt ein azides Milieu

Das Resultat dieser chemischen Reaktion ist die Transversion eines Cytosins zu einem Uracil. Cytosine die mit Guanin hybridisiert (dsDNA) vorliegen und Cytosine, die am C5-Atom eine Methylgruppe tragen, sind gegen den Bisulfit-Angriff inert. Durch die Bisulfit Behandlung

kommt es also zur Transversion von unmethylierten Cytosin zu Uracil die zu einer Sequenzänderung führt. Diese kann durch eine entsprechende methylierungs-spezifische PCR (MSP) detektiert werden (Abb. 2-3).

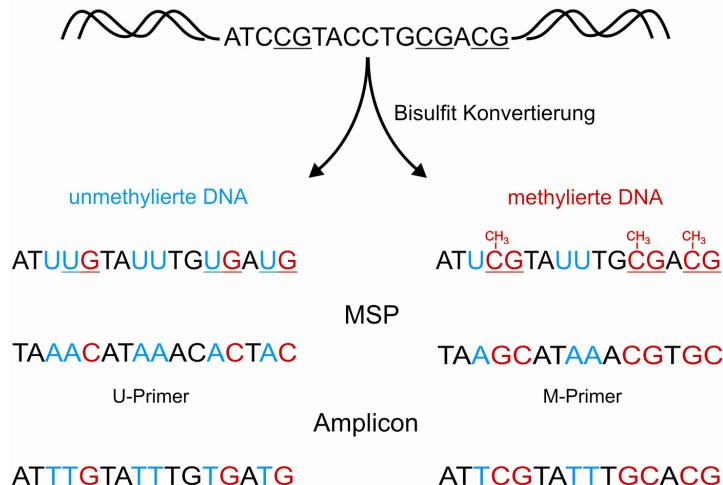


Abb. 2-3: Prinzip der Sequenzänderung durch die Bisulfit-Konversion und der MSP. Durch die Bisulfitbehandlung werden unmethylierte Cytosin-Basen zu Uracil-Basen konvertiert (blau), wohingegen methylierte Cytosin-Basen gegen diese Konversion resistent sind (orange). Da es im Wesentlichen in CpG-Dinukleotiden zur C5-Methylierung des Cytosins kommt, werden nicht Guanin-gekoppelte Cytosin-Basen dieser Sequenzen zu Uracil konvertiert. Nach der Bisulfitbehandlung liegen somit je nach Methylierungsstatus des Guanin-gekoppelten Cytosins unterschiedliche Sequenzen vor. Diese werden mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern in MSP Reaktionen nachgewiesen. Die Primersequenz sollte auch nicht Guanin-gekoppelte Cytosin-Basen abdecken, um eine spezifische Amplifikation von Bisulfit-konvertierter genomischer DNA zu gewährleisten

Die Bisulfit-Umwandlung von DNA wurde mit dem EZ-96 DNA Methylation Kit™ (Zymo Research, Mannheim), den Herstellerangaben entsprechend, durchgeführt. Für die Reaktion wurden 0.5-1µg DNA in 45µl ddH₂O vorgelegt. Nach Zugabe von 5µl M-Dilutionspuffer wurde der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 100µl Konversions-Reagenz und einer Inkubation bei 50°C für 12-16 h, kommt es zur Sulfonierung der Cytosine. Nach der Inkubation wurden 200µl M-Bindungspuffer zugegeben und der Ansatz wird auf eine Säule gegeben. Nach Zentrifugation und einem Waschschnitt wurde der Ansatz durch die Zugabe von 200µl M-Desulfonation Puffer desulfoniert (alkalischer pH). Es folgen zwei weitere Waschschnitte und schließlich die DNA-Elution in 20-25µl M-Elutionspuffer.

2.12.9 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die MSP ist eine *hot-start* PCR-Variante und basiert auf der Methode von Herman et al. (1996). Sie wurde für die Analyse des Promotormethylierungsstatus unter anderem für das Gen SYNM durchgeführt (Tab. 2-6 und Tab. 2-7).

Tab. 2-6: MSP-Reaktionsansatz

Mastermix (1x)		Vol [µl]
MSP-Puffer	[1x]	2.5
dNTP-Mix	[25mM]	1.25
Taq-Polymerase	[5u/µl, 1:25]	5
Primer-Mix (U bzw. M)	[10µM]	1
DNA-Template	[1ng/µl]	1
ad. 25µl ddH ₂ O		14.25
Überschichtung mit Mineralöl		10

Tab. 2-7: MSP Temperaturprofil (*hot-start* Variante)

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
Initiale DNA-Denaturierung	95°C	5 min	1x
Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase (Hot Start)	80°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primer- Anlagerung	58°C	30 sec	38x
Elongation (DNA-Synthese)	72°C	30 sec	
Finale Elongation	72°C	10 sec	1x

2.12.10 Pyrosequenzierung

Diese moderne Sequenziermethode wurde in Schweden am *Royal Institute of Technology* (Stockholm) entwickelt und 1996 erstmalig von Ronaghi und Kollegen vorgestellt (Ronaghi et al., 1996; Ronaghi et al., 1998). Diese Alternative zur klassischen Sanger Sequenzierung (Sanger et al., 1977) beruht im wesentlichen auf der enzymatischen Freisetzung von Bioluminiszenz: Einzelsträngige DNA-Fragmente werden mit einem Sequenzierprimer, den Enzymen DNA *Taq*-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase sowie den Substraten Adenosinphosphosulfat (APS) und Luciferin inkubiert. Im dem darauf folgendem Schritt wird eine exakte Menge eines der vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) zu dem Reaktionsgemisch mittels einer feinen Düse eingespritzt. Die DNA *Taq*-Polymerase katalysiert im Folgenden den Einbau des Nukleotids, falls die entsprechende komplementäre Base auf dem Matrizenstrang vorliegt (Abb. 2-4a). Jeder Nukleotideinbau wird dabei von der äquimolaren Freisetzung eines Pyrophosphat-Restes (PPi) begleitet. Die ATP-Sulfurylase setzt dann PPi in Anwesenheit von APS stöchiometrisch zu ATP um. Das Enzym Luciferase

setzt im finalen Schritt Oxiluciferin und ATP unter Freisetzung von Bioluminiszenz zu Luciferin um (Abb. 2-4b).

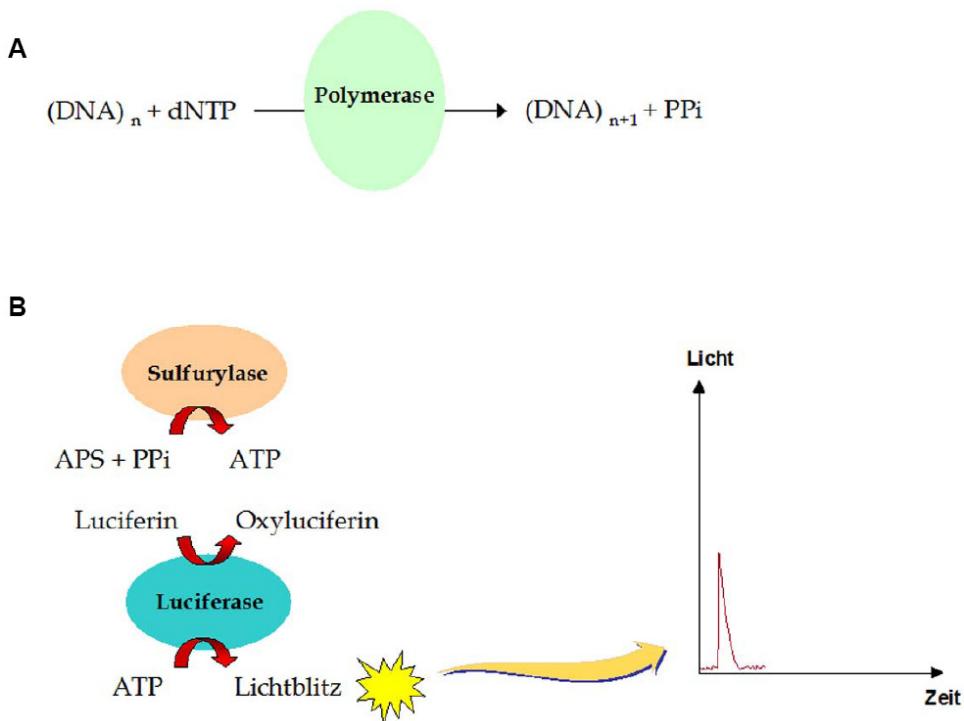


Abb. 2-4: Technisches Prinzip der Pyrosequenzierung. **A:** Die DNA Taq Polymerase katalysiert den Einbau eines zum zu sequenzierenden Matrizenstrang, komplementären Nukleotids unter Freisetzung von Pyrophosphat (PPi). **B:** Das freigesetzte PPi wird in Gegenwart von Adenosinphosphosulfat (APS) von der Sulfurylase stöchiometrisch zu ATP umgesetzt. ATP wird im Anschluss von der Luciferase genutzt, um die enzymatische Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin zu katalysieren. Diese Umsetzung verursacht ein Bioluminiszenzsignal, das mittels einer hochsensiblen CCD-Kamera detektiert und in einem Pyrogramm als Peak verrechnet wird

Die bei dieser enzymatischen Umsetzung entstehende Menge an ATP wird proportional zu messbarem Licht katalysiert, welches sich wiederum in einer entsprechenden Peakhöhe im Pyrogramms widerspiegelt. Kommt es im Zuge einer Sequenzierung zu einer doppelten Abfolge des gleichen Nukleotids, so ist die resultierende Signalstärke rechnerisch zweimal so stark als es bei einem einzelnen Nukleotid der Fall wäre (Abb. 2-5).

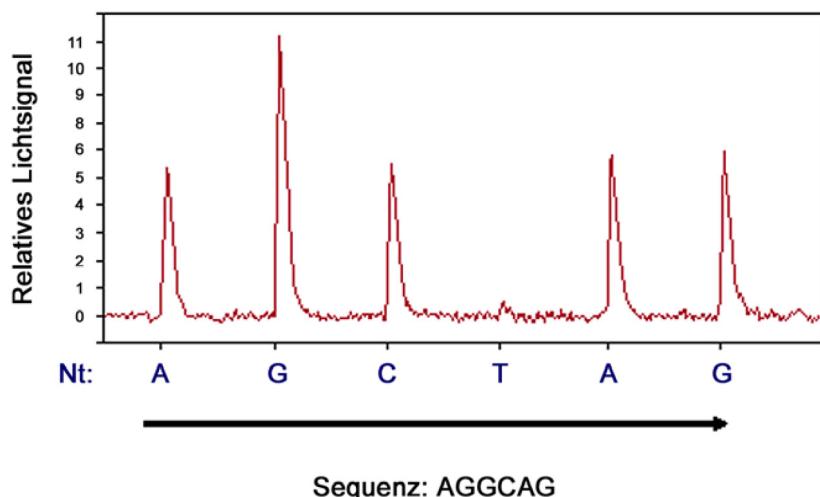


Abb. 2-5: Darstellung eines typischen Pyrogramms. Auf der Ordinate ist die Stärke des relativen Lichtsignals aufgetragen, welches sich nach der Injektion der einzelnen Nukleotide (Nt) im Falle der Beispieldsequenz ergibt (Abszisse). Die Basenwiederholung Guanin-Guanin wird dadurch detektiert, dass das beim Einbau der Nukleotide entstehende Lichtsignal nach der Injektion eines dGTP die doppelte Intensität erreicht. Die injizierte Base dTTP erzeugt hingegen kein Lichtsignal, da an dieser Stelle nicht die komplementäre Base Adenin im Matrizenstrang vorliegt

Nicht-komplementäre Nukleotide und überschüssiges ATP werden während eines Reaktionszyklus von der Apyrase degradiert. Injizierte nicht-komplementäre Nukleotide werden von der Polymerase nicht synthetisiert und folglich entsteht kein Lichtsignal. Die komplementäre Sequenz des zu untersuchenden DNA-Fragments wird so sukzessive durch die Abfolge von *peaks* im Pyrogramm determiniert. Da die Sequenz der zu untersuchenden DNA i.d.R. bekannt ist, wird die Abfolge der Nukleotid-Injektionen in einer sog. *dispensation order* bereits vor der Sequenzierung festgelegt. Das Nukleotid dATP ist in diesem experimentellen System durch das Basenanalagon Desoxyadenosin- α -thio-triphosphat (dATP α S) ersetzt, welches zwar von der Taq DNA Polymerase effizient katalysiert wird, jedoch nicht von der Luciferase genutzt werden kann. Somit werden durch ATP-Umsetzung falsch-positive Singale eliminiert (Abb. 2-4).

Die Methylierungsanalytik mittels Pyrosequenzierung hat den Vorteil gegenüber der qualitativen MSP, dass sie eine quantitative Aussage über den Methylierungsstatus einer (Promotor)-DNA ermöglicht. Eine quantitative Bestimmung der Methylierungsfrequenz ist für bestimmte Fragestellungen wie z.B. der detaillierten Gen-Promotoranalyse, von entscheidendem Vorteil. Eine kombinierte Anwendung von DNA-Bisulfat-Konversion und Pyrosequenzierung ermöglicht es, den Methylierungsgrad einzelner CpG-Dinukleotide einer genomischen DNA-Probe quantitativ zu bestimmen (Tost et al., 2003). Nach der Bisulfat-Konversion (siehe Abschnitt 2.12.8) von DNA unmethylierten Cytosinen zu Uracil, sind methylierte Cytosin-Basen inert gegen diese Konversion. In einer intitalen PCR Amplifikation des zu untersuchenden DNA Fragments wird Uracil durch die Base Thymin ersetzt. Es kommt somit zu einer chemisch induzierten Pyrimidin-Transition. Die je nach Cytosin-Methylierung graduell alternierende DNA-Sequenz kann nachfolgend durch die

Pyrosequenzierung detektiert und quantifiziert werden. Die Besonderheit dabei ist, dass in der Abfolge der injizierten Nukleotide nach einem dCTP immer ein dTTP folgt, wobei ein Lichtsignal durch dCTP auf eine ursprünglich methylierte Cytosin-Base hinweist. Ein Lichtsignal durch dTTP hingegen weist auf eine ursprünglich unmethylierte Cytosin-Base hin.

2.12.11 DNA-Amplifikation für die Pyrosequenzierung

Die genomische DNA der zu analysierenden Probe wurde in einem ersten Schritt einer Bisulfit-Konversion unterzogen (Abschnitt 2.12.8). Der nächste Schritt erfordert eine Amplifikation des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes. Diese erfolgte mittels eines speziell für diesen Zweck entwickelten Prä-PCR Kits (Qiagen). Hierbei wurden am 5'-Ende biotinylierte *antisense*-Primer verwendet, um eine Einzelstrangauftrennung nach der PCR-Amplifikation zu ermöglichen. Die PCR wurde entsprechend den Herstellerangaben und mit 45 Zyklen durchgeführt. Die ungewöhnlich hohe Zyklenzahl gewährleistet, eine vollständigen Verbrauch der PCR-Primer. Reste von nicht verbrauchtem, biotinylierten Primern könnten die folgende Sequenzierungsreaktion stören. Die Prä-PCR Reaktion bestand aus den folgenden Komponenten und Temperaturprofil.

Mastermix	Vol [µl]
Prä-PCR MMX(5x)	5
Primer (sense / anti-sense)[10µM]	je 0.5
DNA-Template[1ng/µl]	1
ad. 25 µl bidest.H2O	13

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
Initiale DNA-Denaturierung und Polymerase-Aktivierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	20 sec	
Primer- Anlagerung	61°C	20 sec	30-40x
Elongation (DNA-Synthese)	72°C	30 sec	
Finale Elongation	72°C	60 sec	1x
Schmelzkurve	40-99°C	10-20 min	1x

Nach Durchführung der Prä-PCR wurden jeweils 5µl des Ansatzes, zwecks Kontrolle der Spezifität und Effizienz, elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.12.6).

2.12.12 DNA-Einzelstrangpräparation und Formulierung des Pyrosequenzieransatzes

Das folgende Verfahren diente zur Aufreinigung von 5-biotinylierter-DNA und zur Eliminierung nicht biotinylierter DNA und anderen Bestandteilen des Prä-PCR Ansatzes, welche die Sequenzierungsreaktion stören könnten. Streptavidin-Sepharose Kugelchen (Amersham Biosciences) wurden auf Raumtemperatur erwärmt und durch 5 min Schütteln homogenisiert. In das Well einer PSQ 96-Platte (Qiagen) wurden 37 μ l Bindungs-Puffer (Qiagen) und 3 μ l Streptavidin-Sepharose Kugelchen vorgelegt. Zu diesem Ansatz wurden sodann 20 μ l des PCR Amplifikates pipettiert. Die Platte wurde für 5 min auf einem Thermo-mixer bei maximaler Drehzahl und Raumtemperatur geschüttelt, wobei es zur Immobilisierung biotinylierter DNA über eine Streptavidin-Bindung an die Sepharose Kugelchen kommt. Unter Verwendung einer PyroMark *vacuum prep station* (Qiagen) wurden nun die DNA-Einzelstränge präpariert. Dazu wurde der Filterträger nach Anlegen eines Vakuums zuerst für 20 sec in Pyrophosphat freiem HPLC-Wasser (Merck) gewaschen, und die Filterköpfe nach einer Invertierung um 90° bei Unterdruck getrocknet. Der Filterträger wurde anschließend in die PSQ 96-Platte eingetaucht und die PCR-Suspension angesaugt. Danach wurde der Träger in 180ml 70%iges Ethanol getaucht und für 10 sec unter Vakuum-einwirkung gewaschen. Als nächstes erfolgte die Denaturierung der an die Filterköpfe angesaugten DNA-Doppelstränge durch Eintauchen des Trägers für 10 sec in 120ml einer Denaturierungslösung (0.2M NaOH). Im Anschluss daran wurden die Filterköpfe für 10 sec in einem Waschpuffer (Qiagen) gereinigt und durch eine Invertierung um 90° erneut luftgetrocknet. Biotinylierte DNA-Einzelstränge lagen nun gebunden an Streptavidin- Sepharose an den Filterköpfen an. Die Kugelchen wurden anschließend durch Abschalten des Vakuums freigesetzt und in 40 μ l Annealing-Puffer (Biotage) in einer PSQ 96/low Platte abgelassen. Dabei waren dem Annealing-Puffer vorher 400nM des Sequenzierprimers zugesetzt worden. Dieser Ansatz wurde nun auf einem Thermoblock für 2 min auf 80°C erhitzt, und danach für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt, was zur Hybridisierung des Sequenzierprimers an die komplementäre DNA-Sequenz führte. Die dem System zugehörige Sequenzier-Patrone (Cartridge) wurde mit einer erforderlichen Menge der dNTPs, des Enzym-Mixes und des Enzym-Substrats gefüllt und zusammen mit der Sequenzierplatte in das Sequenziergerät (PyroMark ID, Qiagen) gestellt. Die Erstellung des Sequenzier-Programms mit zugehöriger *dispensation order* für den jeweiligen Assay erfolgte mit Hilfe *Pyro Q-CpG Software*.

2.12.13 Transformation von *E. coli*

Die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde mittels Transformation von *E. coli* Bakterien durchgeführt. Hierzu wurden 40 μ l kompetente Zellen (*E. coli* Stamm JM 83) auf Eis aufgetaut, 10ng der Plasmid-DNA zugegeben und unter Vermeidung von Schaumbildung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend wurde der Ansatz in Elektroporations-Küvetten überführt. Durch Anlegen eines Spannungsimpulses im

Elektroporator von max. 2.5kV für wenige Millisekunden wurde die Plasmid-DNA in die *E. coli* Zellen transformiert. Danach wurden 400µl vorgewärmtes (37°C) SOC Medium in die Küvette gegeben, der Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zwecks Selektion wurden 50µl und 150µl der Zellsuspension auf LB-Ampicillinplatten (100µg Ampicillin/ml) steril ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Nicht-transformierte *E. coli* Zellen wurden als Selektionskontrolle auf LB-Ampicillinplatten sowie transformierte *E. coli* Zellen auf Ampicillin freien LB-Platten ausgestrichen und ebenfalls ü.N. bei 37 °C inkubiert.

2.12.14 Flüssig-Übernachtkultur transformierter *E. coli*

Transformierte Einzel-Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von LB-Ampicillinplatten gepickt und 10ml vorgewärmtes (37°C) LB-Ampicillinmedium (100µg Ampicillin/ml) in einem sterilen 100ml Erlenmeyerkolben mit diesen Klonen angeimpft. Bei 37°C und 190 UPM erfolgte die Inkubation der Zellen ü.N.

2.12.15 Plasmidisolation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Hierzu wurden 1.5ml der Bakteriensuspension aus der Übernacht-kultur in einem 2ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 800 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und es wurden weitere 1.5ml Bakteriensuspension auf das Zellpellet gegeben und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, und auf das Pellet wurden 250µl P1-Puffer gegeben. Zum Lysieren der Zellen wurde der Ansatz einige Male auf- und abpipettiert. Dem Lysat wurden anschließend 250µl P2-Puffer zugegeben und dieses Gemisch fünfmal invertiert. Anschließend wurden 350µl N3-Puffer hinzugegeben. Durch Invertieren der Lösung wurde so lange gemischt, bis ein Präzipitat entstand. Dieses wurde für 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Plasmidhaltige Überstand wurde dann in eine Qiaprep Spin Säule gegeben und 1 min zentrifugiert (12000 x g). Die Säule wurde mit 500µl PB-Puffer und anschließend mit 750µl PE-Puffer gewaschen, und zum Trocknen abschließend für 1 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die getrocknete Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Nach zweiminütigem Verdampfen der Pufferreste erfolgte die Elution der DNA unter Niedrigsalzbedingungen mit 52µl Tris-HCl (10mM, pH8.5) bei 8000 x g für 1 min.

2.12.16 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für den Nachweis des klonierten KPNA2 ORFs im pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektor wurde die isolierte Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau unterzogen (Tab. 2-8). Der Expressionsvektor pT-REx-Dest30/KPNA2 wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV (1U/µl) und NHE1

(1U/µl) sequenziell in zwei Ansätzen geschnitten, für 1 h bei 37°C inkubiert und der Ansatz schließlich zur Kontrolle der entstandenen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 2-8: Restriktionsverdau für das Plasmid pTRexDest30/KPNA2

Restriktionsansatz 1		Vol [µl]	
Plasmid-DNA		2	
NHE1		2	
Puffer(1x)		17	
Restriktionsansatz 2		Vol [µl]	
NHE1 Verdau		16.5	
EcoRV		1	
Puffer (10x)		2.5	
Enzym	Schnittstelle	Leervektor Fragment (bp)	KPNA2Vektor Fragment (bp)
NHE1	2533	5694	5758
EcoRV	683	1850	1786

2.12.17 Brustkrebs cDNA Dot Blot Array

Der für die *SYNM* mRNA Expressionsanalyse verwendete *Cancer Profiling Array* (CPA) (Firma Clontech) bestand aus 50 cDNAs von malignen Brustgeweben (IDC) und deren korrespondierenden Normalgeweben. Diese cDNAs waren paarweise auf einer Nylonmembran immobilisiert worden. Die Normalisierung jedes cDNA-Paars erfolgte unabhängig über vier Haushaltsgene. Die Hybridisierungs-reaktion wurde mit 25ng einer gen-spezifischen ³²P-markierten cDNA Sonde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Sonde wurde mittels PCR-Oligonukleotiden aus der *SYNM* cDNA-Sequenz mit der Zugangsnummer NM_145728 amplifiziert. Die densito-metrische Auswertung der Hybridisierungsintensität erfolgte mit einem STORM-860-Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Hierzu wurde die Intensitäts-Ratio von Tumor- zu Normalgewebe bestimmt und auf den bestehenden Hintergrund normalisiert.

2.13 Proteinchemische Methoden

2.13.1 Herstellung von Gewebeschnitten aus humanem Paraffinmaterial

Die Herstellung von Paraffingewebeschnitten erfolgte an einem Mikrotom. Hierfür wurden die in Paraffinblöcken fixierten Gewebe in das Gerät eingespannt und 2µm feine Schnitte angefertigt. Diese wurden vorsichtig in ein handwarmes Wasserbad überführt und schließlich auf mit Poly-L-Lysin (0.01% Lsg.) vorbehandelte Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und konnten dann weiterverarbeitet werden.

2.13.2 Gewebeschnitt-Herstellung aus humanem kryokonserviertem Frischmaterial

Die Herstellung von Kryogewebeschnitten erfolgte an einem Kryotom HM560 (Microm Laborgeräte, Walldorf). Als Vorbereitung musste das bei -80°C gefrorene Frischgewebe auf einen Metallsockel fixiert werden. Als Fixierungsmittel diente *Tissue-Tek* Flüssigkeit (Sakura Finetek), welche bei -50°C im Kryotom reversibel erstarrt. Aus den so fixierten, gefrorenen Geweben wurden 6µm feine Schnitte angefertigt. Diese wurden auf mit Poly-L-Lysin (0.01% Lsg.) vorbehandelte Objektträger übertragen. Nach kurzer Trocknung konnten diese dann weiterverarbeitet werden. Für die Isolierung von RNA und DNA aus Frischgewebe wurden 20x 10µm dicke Schnitte in Mikroreaktionsgefäße überführt und dann mit der entsprechenden Methode weiterverarbeitet (siehe DNA-Isolation aus humanem Kryo-Gewebe und RNA-Isolation mit TRIzol®).

2.13.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gewebeschnitten

Für die HE-Färbung der Zellkerne von Kryo- und Paraffingewebeschnitten wurden diese für zwei min mit Hämalaun (nach Mayer) inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit VE-Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Anfärbung des Cytoplasmas durch Inkubation mit Eosin-Karbonat-Lsg. für 45 sec. Die Dehydrierung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1x70% EtOH, 1x96% EtOH, 2x100% EtOH, jeweils nur kurz). Bis zum Eindeckeln verblieben die Schnitte in 100% Xylol. Die Haltbarmachung der Schnitte erfolgte mit dem Eindeckelmedium Vitroclud® (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland).

2.13.4 Immunhistochemie mit paraffinfixiertem Gewebe

Mittels der immunhistochemischen Färbung kann die Proteinexpression in Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit sollte die IHC dazu verwendet werden, die SYNM Proteinexpression an paraffinfixiertem Gewebe nachzuweisen. Insbesondere bei der Verwendung von paraffinfixiertem Material ist es essentiell, das Gewebe zu entparaffinieren, zu rehydrieren und die Antigen-Epitope für eine effektive Antikörper-Anbindung zu demaskieren. Im Folgenden ist das Protokoll für die immunhistochemische Anfärbung von paraffinfixiertem Mamma-Normalgewebe und Mamma-Tumorgewebe mit dem kommerziellen SYNM-Forschungsantikörper (sc-291, Santa Cruz, USA) beschrieben.

Durchführung:

Nach Trocknung der angefertigten Paraffingewebeschnitte bei 37°C wurden diese für 30 min bei 72°C, zwecks weiterer Fixierung auf dem Objektträger, inkubiert. Danach erfolgte die Hydrierung der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe (Tab. 2-9).

Tab. 2-9: Absteigende Alkoholreihe für die IHC

1. Xylol	100%	3x 5 min
2. Ethanol	100%	1x1 min
3. Ethanol	100%	1x1 min
4. Ethanol	96%	1x1 min
5. Ethanol	96%	1x1 min
6. Ethanol	70%	1x1 min
7. VE-Wasser		1x1 min

Nach der Re-Hydrierung erfolgte die Hitze-Demaskierung der Epitope durch eine 30 minütige Inkubation im Wasserbad (96-99°C). Die Schnitte wurden hierfür in eine Küvette, mit einem vorgewärmten Tris-EDTA Puffer (pH 9) überführt. Anschließend mussten die Schnitte bei RT ca. 20 min abkühlen, bevor die Objektträger in *chamber-slides* eingespannt wurden. Die IHC wurde mit dem Envision Kit K5007 (Dako), den Herstellerangaben entsprechend, durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte mit VE-Wasser gewaschen und mit 100µl Peroxidaseblock-Lsg. für 5 min inkubiert, um die intrazelluläre Peroxidase-Aktivität zu hemmen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100µl des SYNM Primärantikörpers (1:100) für 60 min. Nach einem Waschschritt mit Waschpuffer, wurde 30 min mit dem Sekundärantikörper (EnVision Maus Anti-Ziege/HRP-konjugiert) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde erneut zweimalig mit Waschpuffer gewaschen bevor 100µl des Substrates (1:50) Chromogen DAB (Diaminobenzidin, DAKO) hinzu gegeben wurde. Das Chromogen DAB dient als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase (HRP), welche mit dem sekundären Antikörper konjugiert ist. Die HRP katalysiert die Bildung eines löslichen, braunen Farbstoffs, welcher die spezifische Primär-Antikörperbindung an das Antigen (SYNM) sichtbar macht. Abschließend wurde mit VE-Wasser gewaschen und es erfolgte eine zweiminütige Gegenfärbung mit Hämalaun (von Mayer). Das Bläuen der Schnitte wurde durch 10 min Waschen in handwarmen Leitungswasser vorgenommen. Vor der Eideckelung mit Vitroclud® mussten die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert werden (Tab. 2-10). Die Auswertung der IHC erfolgte lichtmikroskopisch.

Tab. 2-10: Aufsteigende Alkoholreihe für die Immunhistochemie

1. VE-Wasser		1x1 min
2. Ethanol	70%	1x1 min
3. Ethanol	96%	1x1 min
4. Ethanol	100%	1x1 min
5. Xylol	100%	3x 5 min

2.13.5 Herstellung von Proteinlysaten für die SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine in der Zelle untersuchen zu können, müssen die kultivierten Zelllinien einer Lyse unterzogen werden. Dazu wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt, um einen fortschreitenden Proteinabbau durch Proteasen zu inhibieren. Je nach Bedarf wurden 1×10^5 bis 2×10^5 Zellen kultiviert, mit PBS zweimal gewaschen und anschließend mit NuPage Lyse-/Probenpuffer (2.4.3) (Invitrogen, Karlsruhe) 5 min auf Eis lysiert. Pro 2×10^5 Zellen wurden 150 μ l Probenpuffer für eine ausreichende Zelllyse benötigt. Das Zelllysat wurde mit einem sterilen Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst und in ein 1.5ml Tube (auf Eis) überführt. Um hochmolekulare DNA und restliche Zelltrümmer zu zerkleinern wurde die Probe 2x 15 sec (35% Stärke, je 9 Zyklen) sonifiziert. Danach wurde die Probe bei 16000 x g (4°C) 15 min abzentrifugiert und der Überstand anschließend in einen sauberen 1.5ml Tube überführt. Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bei -20°C.

2.13.6 Probenvorbereitung für die SDS-Page

Vor der Auftrennung wurden die Lysate 15 min bei 98°C (Wasserbad) gekocht und bis zur Auftragung auf das Gel auf Eis gestellt. Das im Puffer enthaltene DTT reduziert irreversibel Disulfidbrücken zwischen Aminosäuren wodurch Tertiärstrukturen aufgelöst, und so die Proteinlöslichkeit verbessert wird. Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladung von Proteinen effektiv überdecken kann. Es entstehen so Mizellen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit (1.4g SDS / Protein). In einem elektrischen Feld wandern so alle SDS-beladenen Proteine in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen hängt hierbei von dem Landungs-Massenverhältnis ab. So wird eine Größenauf trennung der Proteine erreicht. Je nach Proteinmenge und Geltaschengröße wurden 10 bis 35 μ l der Lysate in die Elektrophorese eingesetzt. Falls eine Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung erforderlich war, wurde die Zelllyse mit NP40-Lysepuffer durchgeführt, da der Bromphenolblauhaltige NuPage-Puffer eine kolorimetrische Konzentrationsbestimmung unmöglich macht.

2.13.7 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Mittels des Micro BCA Assay Kits (Pierce, Rockford, USA) konnte die Gesamtproteinmenge der Lysate gemessen werden. Der BCA-Assay beruht auf einer Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan sowie durch Peptidbindungen. Mit zwei BCA-Molekülen bildet Cu²⁺ einen violetten Farbkomplex, der ein Absorptionsmaximum von $\lambda=562\text{nm}$ hat. Die Menge des durch die Reduktion des Kupfers entstandenen Farbkomplexes ist dabei proportional zur Proteinmenge in den Lysaten. Die exakten Protein-Konzentrationen wurden mit Hilfe einer BSA-Proteinstandardreihe ermittelt.

2.13.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Variante der Gelelektrophorese basiert auf dem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelsystem nach Lämmli (Laemmli, 1970), durch welches eine wesentlich höhere Auflösung gegenüber nicht-diskontinuierlichen Systemen erreicht werden kann. Das System besteht aus einem Sammelgel und einem Trengel. Das hohe Auflösungsvermögen der SDS-PAGE wird durch die Komposition der Gelkomponenten erreicht: Das Sammelgel (4%) ist leicht azid (pH 6.8), das Trengel (5-25%) hingegen besitzt einen basischen Charakter (pH 8.8). Durch die Anlegung eines elektrischen Stroms wandert das im Laupuffer enthaltene Glycin in das Sammelgel. Dort wird, auf Grund des sauren pH's, seine Aminogruppe protoniert und die Carboxylgruppe deprotoniert. Das Glycin liegt jetzt als Zwitterion vor, dessen Nettoladung gleich Null ist. Dadurch bewirkt es im Sammelgel einen elektrophoretischen Stillstand. Die vorauslaufenden Ionen des Sammels gel bewirken einen lokalen Ladungsträgermangel und dadurch einen hohen Widerstand. Bei konstantem Strom führt die erhöhte Feldstärke zu einem schnelleren Lauf der anionisch geladenen Proteine, bis diese die vorauslaufende Ionenfront erreichen. Dies führt zu einer Aufkonzentrierung der Proteine und zur Ausbildung einer scharfen Proteinfraktion (protein-stacking). Wenn diese Proteinfraktion in das Trengel einläuft, kommt es zur Bildung von scharfen, diskreten Proteinbanden, welche eine reliable Interpretation der Ergebnisse erlauben. Es wurden 5-25% Tris-Glycin-Gradientgele verwendet (Novex® mini gel, Invitrogen, Karlsruhe). Diese Gele ermöglichen, aufgrund ihres Konzentrationsverhältnisses, eine saubere Proteinauf trennung über einen weiten Größenbereich hinweg (15kDa bis 150kDa) und waren somit für alle in dieser Arbeit zu analysierenden Proteine geeignet. Die Gelelektrophorese wurde in dem *XCell SureLockTM Mini-Cell System* (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

2.13.9 Westernblotting

Der Western-Blot (hier als *tank-blot* Verfahren durchgeführt) ist ein immunologischer Proteinnachweis, bei dem die durch eine SDS-Gelelektrophorese zuvor aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert und immobilisiert werden. Über eine anschließende

Antigen-Antikörperreaktion (Immunodetektion) kann das gesuchte Protein spezifisch nachgewiesen werden. Nach der SDS-Gelektrophorese wurde das Trengel vom Gelträger gelöst und mindestens 10 min in Transfer-Puffer (2.4.3) äquilibriert. Das Gel wurde luftblasenfrei auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (BioRad) gelegt. Diese Art von Membran muss zuvor mindestens 15 min in reinem Methanol aktiviert werden um ihre maximale Proteinbindekapazität zu erreichen. Für das *tank-blotting* wurden das Gel und die aktivierte PVDF-Membran zusätzlich mit transferpuffergetränktem *Whatmann*-Filterpapier und Kunststoffschwämmen bedeckt. Dieses so genannte „sandwich“ wurde gemäß den Herstellerangaben in die Blot-Vorrichtung (Biorad) eingespannt und der Tank mit 500ml eiskaltem Transferpuffer befüllt. Durch Anlegen eines konstanten Stroms von 100V für 1h bei 4°C, wurden die Proteine von dem Gel auf die Membran transferiert. Um die Proteine auf der Membran zu fixieren, wurde die Membran in einer Ponceau S-Lösung für 10-15 min inkubiert und anschließend mit TBS-T gewaschen.

Immunodetektion:

Für die Proteindetektion wurde die indirekte Immunodetektion über einen enzymmarkierten sekundären Antikörper angewendet, der mit dem unkonjugierten primären Antikörper interagiert der das Zielprotein spezifisch erkennt. Um eine unspezifische Antikörperbindung während der Immunodetektion zu vermeide, wurde die proteinbeladene PVDF-Membran mit mit 1 % Casein-Puffer (Roche, Mannheim, D) in TBS mit 0.05% Tween-20 für ü.N. geblockt (bei β-Aktin 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBS, 0.05% Tween-20). Tween ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches die Oberflächenspannung von Wasser reduziert. Dadurch wird die Stringenz des Puffers erhöht und so eine unspezifische Hintergrundfärbung auf der Membran minimiert. Nach dem Blocken folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1.5h bei RT. Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben mit 0.5% Casein-Puffer (in TBS-T) verdünnt. Zur Entfernung von überschüssigem primärem Antikörper wurde die Membran fünfmal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT unter Schütteln mit einem komplementären sekundären HRP-konjugierten Antikörper inkubiert. Die verwendenden Sekundärantikörper wurden entsprechend der den Hersatellerangaben (Dako) verdünnt, ebenfalls in 0.5% Casein-Puffer. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde dieser fünfmal für 5 min mit TBS-T von der Membran gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Proteine wurde ein Chemilumineszenz Detektionssystem verwendet (HRP). HRP oxidiert Luminol in Anwesenheit von Wasserstoff, wobei Chemilumineszenz im blauen Wellenlängenbereich abgegeben wird. Diese kann über einen Röntgenfilm detektiert werden. Die Expositionszeiten können zwischen 10 sec bis 30 min liegen. Je nach erwarteter Proteinmenge oder verwendeten Antikörper wurde zur Detektion das *SuperSignal West Pico Substrate* (Pierce, Rockford, USA) oder das sensitivere

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, USA) verwendet. Detaillierte Angaben für die Bedingungen der Immundektection der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in Tab. 2-11 zusammengefasst.

Tab. 2-11: Antikörper für die Immunodetektion

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
KPNA2 Ziege Anti-Human (siehe auch 2.6)	1:200	Kaninchen Anti-Ziege/HRP	1:2000
β-Aktin Maus Anti-Human	1:2000	Ziege Anti-Maus/HRP	1:2000

2.13.10 Ponceau S Färbung

Zwecks optischer Kontrolle eines erfolgreichen Proteintransfers wurden die auf der PVDF-Membran transferierten Proteine reversibel mit Ponceau S angefärbt (Nachweisgrenze: 5-15ng/mm²). Des Weiteren immobilisiert dieser Farbstoff Proteine zusätzlich auf der Membran. Die zu färbenden Membranen wurden 10 bis 15 min auf einem Schwenktisch in frischer Ponceau-S Lösung leicht geschüttelt. Danach wurde 1-2 min mit H₂O gewaschen, bis die Hintergrundfärbung verblasst und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Färbung konnte dann zusätzlich photographisch dokumentiert werden.

2.14 Zellbiologische Methoden

2.14.1 Kryokonservierung von Mammakarzinomzelllinien

Für das Einfrieren wurden Mammakarzinomzellen entsprechend dem normalen Passagieren trypsiniert und nach der Pelletierung in 1.5ml bis 3.0ml pro T75-Flasche kaltem (4°C) Einfriermedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden je 0.5ml in ein Kryoröhrchen gegeben und 2 h in einem Einfrierturm tiefgefroren. Danach wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in den Stickstoffbehälter überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen kurz bei 37°C im Wasserbad angetaut, der Rand des Kryorgefäßes mit 70% Ethanol desinfiziert und die Suspension in ein 50ml Reaktionsrörchen überführt. Um einen osmotischen Schock der Zellen zu vermeiden, wurde nun tropfenweise 20ml vorgewärmtes, Gas-äquilibriertes Medium (20% FCS) unter vorsichtigem Schütteln innerhalb von 3 min zugegeben. Im Anschluss wurde die Suspension bei 300x g für 10 min zentrifugiert, in einer der Zellzahl adäquaten Menge frischen Mediums resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um eventuell vorhandene Reste von zelltoxischem DMSO zu entfernen.

2.14.2 Die Kultivierung von humanen Zelllinien

Zur Vermeidung von Kontaminationen der Zellkulturen ist auf eine sterile Handhabung zu achten. Die Anzucht der Zellen erfolgte bei 37°C in Wells mit einer Größe von 25cm² oder 75cm² und bei einer Luftfeuchtigkeit von 95% sowie einer CO₂-Sättigung von 5%. Viele Zelllinien benötigen das Medium DMEM (Low Glucose) welchem 10% FCS, 1mM

Natriumpyruvat, 50 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Für die Kontrolle der optimalen Kulturbedingungen enthalten die Kulturmedien einen pH-Indikator (Phenolrot). Ein Farbumschlag von rot nach gelb signalisiert eine Ansäuerung des Mediums, welche durch die Sezernierung von Stoffwechselprodukten hervorgerufen wird oder eine Kontamination anzeigt. Diese Stoffwechselprodukte wirken zelltoxisch. Ein regelmäßiger Mediumwechsel ist aus diesem Grund, und wegen dem Verbrauch von Nährstoffen durch die Zellen, alle 2 bis 3 Tage notwendig. Waren die verwendeten Zellkulturschalen etwa zu 80% mit Zellen bewachsen, wurden diese mit 3ml Trypsin-EDTA abgelöst und Zellen im Verhältnis 1:10 weiter kultiviert.

2.14.3 Die Ernte von humanen Zelllinien

Die Ernte erfolgte, als die adhärenz wachsenden Zelllinien eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von einer Trypsin-EDTA-Lösung wurde die Adhärenz der Zellen aufgehoben und es folgt eine Ablösung von der Kultivierungsflasche und die Resuspension. Die Protease Trypsin initiiert den Abbau von Oberflächenmolekülen, die für die Adhärenz der Zellen notwendig sind. Kalzium- und Magnesiumionen stellen wichtige Ionen für das Anheften von Zellen dar und werden durch EDTA abgefangen. Dieser Vorgang wird durch eine Inkubation bei 37°C und gelegentliches Klopfen forciert. Die Zellablösung wird lichtmikroskopisch kontrolliert und die Trypsin- und EDTA Aktivität durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt. Die so resuspendierten Zellen konnten nun neu ausgesät werden oder für weitere Analysen wie z.B. RNA-, DNA-, und Protein-Isolationen eingefroren werden.

2.14.4 Zellzahlbestimmung

Die genaue Zellzahl einer Suspension wurde mit Hilfe des Durchfluss-Cyctometers CASY1 bestimmt. Hierbei misst das Gerät die Zell-Zusammensetzung als größenabhängige Verteilung. Die 100 μ l Zellen wurden in 9.9ml einer isotonen Elektrolytlösung (Casyton) resuspendiert. Diese Suspension wurde durch eine 150 μ M Messkapillare gesaugt, an die über zwei Elektroden eine Spannung angelegt wird. Die Zellen erzeugen somit beim Durchtritt der Kapillare einen elektrischen Impuls. Da das Gerät das Widerstandsmessprinzip mit der Pulsflächenanalyse kombiniert, ermöglicht das Gerät neben der Zellzahl auch die Ausgabe der Größenverteilung der Zellen (Abb. 2-6). Somit können unerwünschte Zählerartefakte (Zelltrümmer, Aggregate, tote Zellen) aus der Zellzahlbestimmung ausgeschlossen werden.

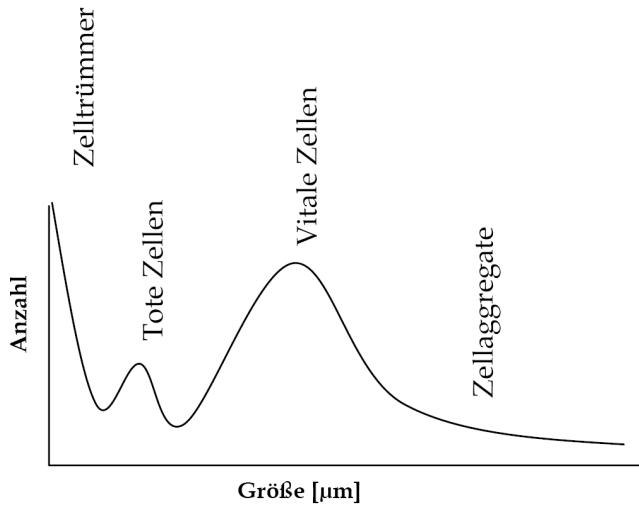


Abb. 2-6: Graphische Ausgabe einer typischen CASY1 Zellzahlbestimmung

2.14.5 DNA Demethylierung

Die *in vitro* Demethylierung genomischer DNA ermöglicht die Analyse des Einflusses des DNA Methylierungsstatus in Promotorregionen auf die Genexpression. In dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt um die Genexpression von *SYNM* vor und nach der Promotor-demethylierung zu vergleichen. Für eine Demethylierung von humanen Mammakarzinomzelllinien wird bei folgender Methode die *de novo* Methylierung von Zellpopulationen inhibiert. Die Applikation des Aza-Nukleosid-Derivats 5'-Aza-2'-desoxycytidin (DAC), welches ein Basenanalagon von Cytidin ist bewirkt dessen Einbau in genomische DNA während der Replikationsphase von proliferativen Zellen. Da DAC C5-ständig nicht methyliert werden kann, kommt es in Zuge fortlaufender Replikationszyklen zu einer sukzessiven globalen Demethylierung der kompletten genomischen DNA der behandelten Zelle. Des Weiteren bewirkt die kovalente Bindung von DAC an DNA-Methyltransferasen (DNMT), eine irreversible Hemmung dieses Enzyms (Constantinides et al., 1977; Jones und Taylor, 1980; Santi et al., 1984). Als Vorbereitung für den Demethylierungsversuch werden die zu behandelnden Zelllinien in Kultur gebracht und anschließend in 6-well Kulturschalen überführt. Die Zelldichte betrug 3×10^4 Zellen/ cm^2 . Pro Zelllinie werden vier Ansätze (2x Kontrolle und 2x Demethylierung) mit je 2ml Volumen vorbereitet. Nach 24 h wird ein Mediumwechsel (2ml) vorgenommen und mit PBS-Puffer (2ml) gewaschen. Im Demethylierungsansatz wird Medium mit $1\mu\text{M}$ DAC appliziert und für 24 h inkubiert. Der Mediumwechsel und die Zugabe von DAC werden zweimal wiederholt. Zusätzlich wurde den Ansätzen nach 48 h der Histon-deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) in einer Endkonzentration von 300nM zugesetzt, um eine mögliche expressionshemmende Histon-deacteylierung zu verhindern. Nach abschließender Inkubation für weitere 24 h werden die Zellen geerntet (2.14.3) und jeweils die RNA (TRIzol® Isolation, 2.12.2) und die genomische DNA (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, 2.12.1) isoliert.

2.14.6 RNA Interferenz

Die RNA Interferenz wurde für einen induzierten KPNA2 Expressionsverlust in MCF7 Brustkrebszellen etabliert. Für die Transfektion wurden je Ansatz 1×10^4 Zellen in einer 6-well Kulturschale ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Bei 80% Zellkonfluenz wurde der siRNA Transfektionsmix tropfenweise in das Kulturmedium gegeben und vorsichtig geschwenkt. Der 100 μ l Transfektionsmix bestand aus je 5 μ l (20 μ M) der zwei KPNA2 spezifischen siRNAs (Roche, Mannheim), 10 μ l Transfektionsreagenz (HiPerfect, Roche, Mannheim) und 80 μ l Medium (serumfrei) und wurde 15 min vor Transfektion bei RT inkubiert. Der Transfektionsschritt wurde für die gesamte Versuchsdauer alle 48 h wiederholt. Nach 96 h waren die Zellen in der Regel konfluent gewachsen und mussten passagiert werden. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und 30% der Zellmasse weitergeführt. Nach der Zellpassage wurde der Transfektion wiederholt. Nach 48 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h erfolgte jeweils die Probennahme für die RNA-Isolation (TRIzol®) und die Herstellung von Proteinlysaten für die Western Blot Analyse der KPNA2 Expression.

2.14.7 Transiente Transfektion von Mammakarzinomzelllinien

Die transiente Transfektion von humanen Zellen mit Vektorkonstrukten wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGeneHD (Roche Diagnostics) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Methode basiert auf einer Liposomen vermittelten Transfektion, wobei nach Mischen von DNA und Liposomen die negativ geladenen DNA-Moleküle mit der positiv geladenen Oberfläche der Liposomen interagieren. Die Aufnahme der DNA-Liposomen Komplexe in die Zellen erfolgt im Anschluss durch Endozytose oder Verschmelzen der DNA-Liposomen Komplexe mit der Zellmembran. Die Transfektion der Zellen erfolgte in 6 well Kulturschalen bei einer Konfluenz von 80-90% (Zellzahl von 3×10^4 Zellen/cm²). Der Transfektionsansatz für MCF10A Zellen wurde wie folgt angesetzt: 3 μ g Plasmid-DNA wurden in insgesamt 93 μ l ddH₂O gegeben und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gut gemischt. Danach wurden 7 μ l FuGeneHD Reagenz zu der verdünnten Plasmid-DNA gegeben. (Transfektions-Ratio: 7:2 / FuGeneHD/DNA). Die optimale Transfektions-Ratio für MCF7 Zellen betrug 3:2 / FugenHD/DNA). Dementsprechend wurde mehr ddH₂O zugegeben (97 μ l). Für die Ausbildung von DNA-Liposomen Komplexen wurde die Mischung 15 min bei RT vorinkubiert. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe des Transfektionsansatzes auf die in 2ml Medium befindlichen Zellen, welche unter Standardbedingungen 48 h bis 72 h kultiviert wurden. Abschließend wurde das Medium gewechselt um das Transfektionsreagenz auszudünnen, da dieses über längeren Zeitraum zelltoxisch wirken kann. Nach 2 bis 3 Tagen Transfektion konnte die Proteinüberexpression gemessen bzw. die transfizierten Zellen für weitere funktionelle Analysen verwendet werden.

2.14.8 Stabile Transfektion von Mammakarzinomzelllinien

Grundlagen:

Im Folgenden wird die stabile Transfektion für MCF7 Zellen mit dem pT-REx-DEST30 Gateway™ Vektorsystem der Firma Invitrogen beschrieben. Dieses System zeichnet sich durch einen Tet-Operator (TetO₂) regulierten *Cytomegalovirus immediate-early* (CMV) Promoter aus. Für diese Arbeit lag ein bereits aufgereinigtes pT-REx-DEST30/KPNA2 Konstrukt mit integrierter KPNA2 Volllängen cDNA vor (Abb. 2-7). Die Transfektion des entsprechenden Leervektors diente zur Herstellung zusätzlicher Negativkontrollen. Um einen Tetracyclin induzierbares KPNA2- Expressionssystem zu generieren wurde in einem ersten Schritt ein Tet-Repressor (TR) Expressionsvektor (pcDNA6/TR, Invitrogen) stabil in MCF7 Zellen transfiziert. In einem zweiten Schritt wurde dann der KPNA2 Expressionsvektor stabil einen ausgewählten MCF7/pcDNA6/TR (MCF7/TR) Klon transfiziert. Die daraus resultierenden pcDNA6/TR/pT-RExDEST30/KPNA2 (MCF7/TR/KPNA2) Klone zeichnen sich durch eine basale KPNA2 Expression aus, die der einer Wildtypzelle entspricht, da bei normaler Kultivierung (ohne Tetracyclin) der konstitutiv exprimierte Tet-Repressor an den Tet-Operator des KPNA2 Vektors bindet und so den CMV Promoter inaktiviert. Erst nach Zugabe eines Überschusses von Tetracyclin [1µg/ml] wird das Tet-Repressorprotein von Tetracyclin abgefangen, sodass der CMV-Promoter abgelesen werden kann und das vektorielle KPNA2 exprimiert wird (Abb. 2-8).

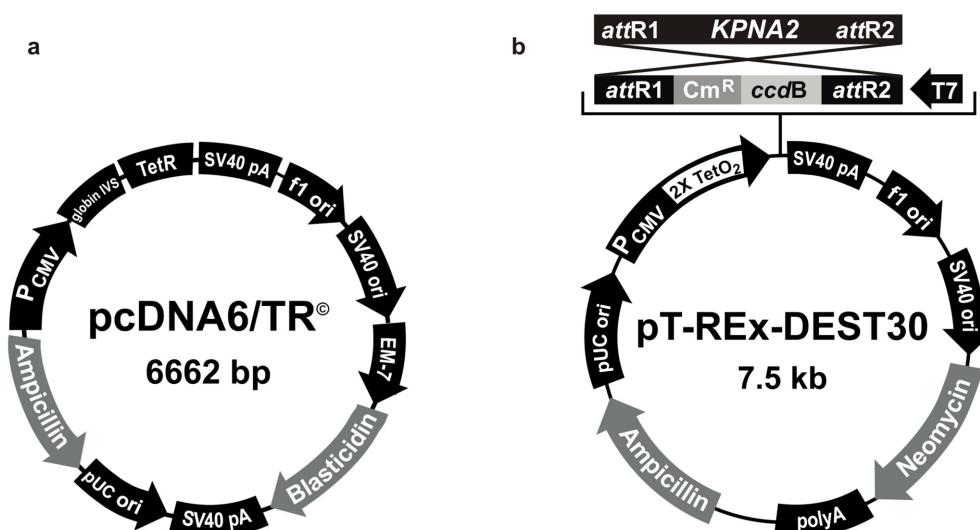


Abb. 2-7: Vektorkarten des Tet On regulierten KPNA2 Expressionssystems

Abb. 2-7: Vektorkarten des Tet O₂ regulierten KPNA2 Expressionssystems
a: Tet-Repressor Expressionsplasmid. **b:** Tet Operator (TetO₂) reguliertes KPNA2 Expressionsplasmid pT-REx-DEST30/KPNA2. Die KPNA2 Volllängen cDNA wurde über die *attR1+attR2* Rekombinationsstellen in den Leervektor kloniert (Der klonierte pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektor stand bereits zur Verfügung)

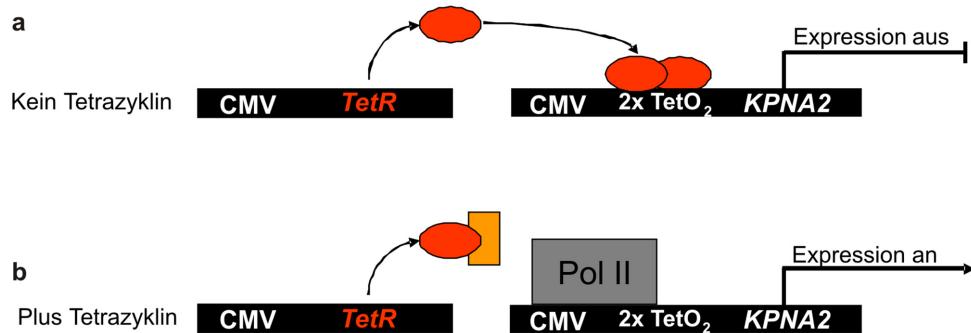


Abb. 2-8: Funktionsschema der Tetracyclin regulierten KPNA2 Expression.

a: In Abwesenheit von Tetracyclin im Zellkulturmedium bindet der konstitutiv exprimierte Tet-Repessor (rot) an den Tet Operator des CMV Promoters. Dadurch wird die extrinsische KPNA2 Expression über den pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektor inhibiert. **b:** Tetracyclin (orange) bindet kompetitiv an den Tet-Repessor (rot). Dadurch kann die RNA-Polymerase II (grau) an den CMV Promoter binden und KPNA2 wird exprimiert

Die Positivselektion von MCF10A/TR und MCF7/TR Klonen erfolgte über eine integrierte Blasticidin-Resistenz. MCF7/TR/KPNA2 Klonen wurden über die vorhandene Blasticidin- und die Neomycin-Resistenz selektiert (Abb. 2-7). Als Selektivum für die Neomycin-Resistenz wurde das Antibiotikum Genetecin (G418) verwendet. Vor Beginn der Transfektion mit dem pcDNA6/TR Plasmid musste die für die spätere Positivselektion die optimale also die minimal letal wirkende Dosis an Blasticidin für MCF10A und MCF7 Wildtypzellen ermittelt werden: Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurden die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Antibiotika ausgesetzt. Es wurden je 1×10^3 Wildtypzellen ausgesät und im Anschluss mit einer jeweils bestimmten Antibiotikum Konzentration versetzt (Tab. 2-12). Alle 2 bis 3 Tage erfolgte die Zugabe von frischem Medium und Antibiotikum. Die optimale Blasticidin- und Genetecin-Konzentration war hierbei die niedrigste Dosis, die innerhalb von 14 Tagen zum Absterben aller Zellen führte. Vor der zweiten Transfektion mit dem pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektor musste die letale Genetecin- Konzentration der MCF10A/TR sowie der MCF7/TR Klonen bestimmt werden um eine effektive Positivselektion der MCF10A/TR/KPNA2 bzw. der MCF7/TR/KPNA2 Klonen zu gewährleisten.

Tab. 2-12: Blasticidin Verdünnungsreihe für die Positivselektion von TR Klonen

Ansatz	Blasticidin [µg/ml]
1	100
2	75
3	65
4	55
5	30

Die Lipofektion:

Die Transfektion wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGeneHD (Roche, Mannheim) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Diese Methode basiert auf einer Liposomen vermittelten Transfektion. Dabei interagieren nach Mischen von DNA und Liposomen die negativ geladenen DNA-Moleküle mit der positiv geladenen Oberfläche der Liposomen. Die Aufnahme der Fremd-DNA erfolgt dann durch Endozytose bzw. der Verschmelzung von DNA-Liposomen Komplexen mit der Zellmembran. Um die Effizienz der homologen Rekombination der Plasmid-DNA in das Genom wurden die zu transfizierenden Vektoren mittels enzymatischer Restriktion (2.12.16) linearisiert. Hierzu wurden die Plasmide innerhalb nicht relevanter Sequenzen geschnitten (Ampicillin Resistenz).

Durchführung für den Vektor pcDNA6/TR:

Für die Transfektion wurden zwei 6-well Kulturschalen mit je 1×10^3 Zellen/well ausgesät. Bei 80-90% Konfluenz wurden die Transfektionsansätze (Tab. 2-13) tropfenweise zu den Zellen gegeben und für 48 h inkubiert.

Tab. 2-13: Transfektionsschema für den Vektor pcDNA6/TR.

Ansatz	Funktion	DNA [µg]	FuGeneHD [µl]	SFM [µl]
A	Selektionskontrolle	0	0	100
B	Reagenzkontrolle	0	7	93
C	pcDNA6/TR	2	3	97
D	pcDNA6/TR	2	7	93
E	pcDNA6/TR	1	7	93

SFM: Serum freies Medium

Für die weitere Kultivierung wurden die Effizienzkontrolle (B) verworfen und Ansätze A, C, D und E weitergeführt. Diese Ansätze wurden standardgemäß trypsiniert und das Pellet in 10ml Medium resuspendiert. Jeder Ansatz wurde 1:2, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 verdünnt und in einer 100mm Petrischale ausgesät (Tab. 2-14). Die Ansätze wurden für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Blasticidin, in der im Vorversuch ermittelten Endkonzentration von 75µg/ml (für MCF7) bzw. 100µg/ml (für MCF10A).

Tab. 2-14: Titrationsreihe für die stabile Transfektion

Verdünnung	1:2	1:4	1:10	1:20	1:50
Medium	5ml	7.5ml	9ml	9.5ml	9.8ml
Zellsuspension	5ml	2.5ml	1ml	500µl	200µl

Die Selektion und Aufzucht von Einzelklonen:

Die maximal zu erwartende Wahrscheinlichkeit einer stabilen Integration der transfizierten DNA in eine Zelle liegt bei 10^{-4} . Aus diesem Grund wurde erst nach vollständigem Absterben der Wildtypzellen (Ansatz A, Tab. 2-13) durch das Blasticidin (2-3 Wochen), mit der Selektion von Einzelklonen begonnen. Die in einer 96-well Kulturschale umgesetzten Zellen wurden mit konditioniertem und 20% FKS-haltigem Medium zum Wachstum angeregt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100% wurden die Klone in ein nächst größeres Kulturgefäß überführt (48-well, 24-well, 6-well Kulturschalen). Im Folgenden konnten die MCF10A/TR und MCF7/TR Klone in T75-Zellkulturflaschen kultiviert werden. Es folgte die funktionelle Charakterisierung dieser Tet-Repressor exprimierenden Klone.

Funktionstest der MCF10A/TR und MCF7/TR Klone:

Für die weitere Transfektion mit dem pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektor (Abb. 2-9) musste ein geeigneter Klon ausgewählt werden, der über eine ausreichend starke Expression des Tet-Repressorproteins verfügt: Hierzu wurde der pCDNA4/TO/lacz Vektor transient in verschiedene MCF7/TR und MCF10A/TR Klone transfiziert (siehe 2.14.7). 72 h nach der Transfektionsprozedur wurden die Transfektanden mit 1 μ g/ml Tetracyclin für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde ein β -Galaktosidase Färbetest durchgeführt (2.15.1) um TR-Klone zu identifizieren die in Abwesenheit von Tetracyclin eine möglichst vollständige Repression und bei Anwesenheit eine möglichst starke Induktion der *lacZ*-Expression aufweisen.

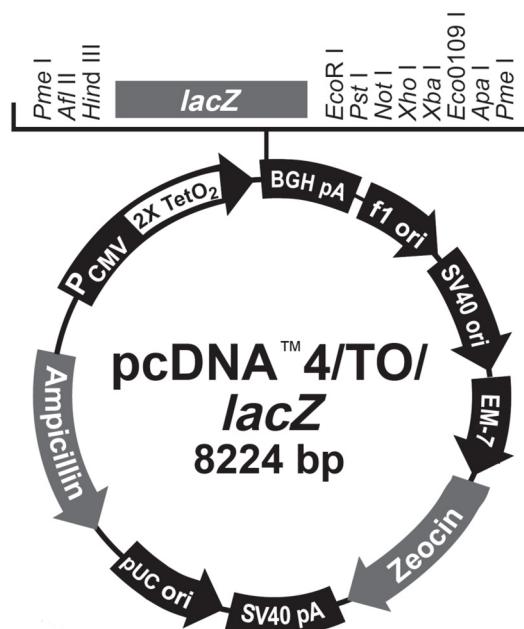


Abb. 2-9: Vektor-Karte des pcDNA4/TO/lacz Vektors

Durchführung für den Vektor pT-REx-DEST30/KPNA2:

Nachdem ein funktionaler MCF10A/TR sowie ein MCF7/TR Klon identifiziert wurde, sollte in einem nächsten Schritt der pT-REx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektor stabil in diese Klone transfiziert werden. Der Ablauf entsprach hierbei der Transfektion des pcDNA6/TR Plasmids. Die Bestimmung der letalen Genetecin-Konzentration für die Positivselektion musste im Vorfeld für die ausgewählten MCF10A/TR und MCF7/TR Klone durchgeführt werden (Tab. 2-15). Als optimal, letale Genetecin-Konzentration erwies sich für die MCF10A/TR Klone 600µg/ml und für die MCF7/TR Klone 500µg/ml.

Tab. 2-15: Genetecin Verdünnungsreihe für die Positivselektion von TR/KPNA2 Klonen

Ansatz	Genetecin [µg/ml]
1	1000
2	700
3	600
4	500
5	250

Die Isolierung und die Anzucht der MCF10A/TR/KPNA2 und MCF7/TR/KPNA2 Klonen erfolgten wie bereits für die erste Transfektion beschrieben. Der ausgewählte MCF10A/TR Klon erwies sich jedoch als nicht transfizierbar bzw. nicht kultivierbar.

2.14.9 Lowicryl Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Lowicryl Einbettung wurden Brustkrebszelllinien in 100mm Petrischalen unter Standardbedingungen kultiviert. Bei 80% Zellkonfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 5ml Paraformaldehyd (3%+ 0.2% Glutaraldehyd) für 4 h bei RT fixiert. Danach wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen für 2 Stunden in PBS bei RT gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber vorsichtig vom Untergrund abgelöst. Die Pelletierung der Zellen erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation bei 1000 RPM. Das Pellet wurde dann in 1ml Agarose (2%) resuspendiert, in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur vollständigen Auspolymerisierung der Agarose bei 4°C gelagert. Nach der Agarose-Einbettung wurde das Eppendorfgefäß aufgebrochen und der Agarosekörper in 0.5 bis 1cm³ Würfel geschnitten. Diese Würfel wurden dann einer automatisierten Niedrigtemperatur Einbettung in 10ml Lowicryl unterzogen (AFSII, PLT Verfahren). Dabei wurden die Agaroseblöcke in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, und 100% ETOH) entwässert mit Lowicryl eingebettet und anschließend durch UV-Strahlung ausgehärtet. Die so fixierten und eingebetteten Würfel wurden dann mit Semi-Schnitten (1µm Schnittdicke) angeschnitten bis eine Ebene mit ausreichender Zelldichte gefunden wurde. Die Präparation von Ultradünnnschnitten (90nm Schnittdicke) erfolgte mit Hilfe des *Ultracut*

(Reichert-Jung). Abschließend wurden die Ultradünnschnitte auf Nickelgitter transferiert und für die weitere immunologische Aufarbeitung vollständig bei RT getrocknet.

2.14.10 Immunogold-Markierung von humanen Brustkrebszelllinien

Nach vollständiger Trocknung der Ultradünnschnitte wurden diese zwecks Blockierung von freien Aldehydgruppen dreimal 10 min mit 50nM NH₄CL (in PBS) bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min mit 3% BSA (plus 5% Normalserum Kaninchen) geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (plus 0.2% BSA) für je 10 min wurden die Schnitte 1 h mit dem KPNA2-Primärantikörper (1:75 Verdünnung in PBS, 0.2% BSA) inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS (+0.2% BSA) für je 5 min, erfolgte die Inkubation mit dem ImmunoGold Partikel (10nm) markiertem Sekundärantikörper (1:25 in PBS+0.2% BSA). Danach wurden die Schnitte sechsmal mit PBS (+0.2% BSA) für je 5 min gewaschen und 10 min mit 3% Glutaraldehyd fixiert. Abschließend wurde die Fixierlösung durch dreimaliges spülen mit ddH₂O entfernt und die Schnitte bei RT vollständig getrocknet. Damit war die Präparation der Schnitte für die transelektronenmikroskopische Auswertung abgeschlossen. Die Auswertung erfolgte an dem Transelektronenmikroskop EM 400T (Philips) mit der CCD Kamera MORADA (Olympus).

2.15 Funktionelle *in vitro* Experimente

2.15.1 β -Galaktosidase (*lacZ*) Färbung von MCF10A/TR und MCF7/TR Klonen

Das *lacZ* Gen kodiert für das bakterielle Enzym β -Galaktosidase und ist *in vivo* für die Aufspaltung von Laktose in Galaktose und Glukose zuständig. Die β -Galaktosidase kann jedoch auch das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) spalten wodurch ein blauer Indigofarbstoff entsteht. Zellen, die das β -Galaktosidase Gen exprimieren, färben sich unter Behandlung mit X-Gal blau ein. Für den Nachweis der konstitutiven Expression des Tet-Repressormoleküls und die Fähigkeit den Promotor des pT-Rex-DEST30/KPNA2 Vektors effektiv zu inhibieren, wurden MCF10A/TR und MCF7/TR Klone für 48 h mit einem Tet-regulierten pcDNA4/TO/*lacZ* Vektor transfiziert. Die Prozedur entsprach in allen Punkten der in Kapitel 2.14.7 beschriebenen transienten Transfektion. Nach der Transfektion wurde pro Klon jeweils ein Ansatz mit Tetracyclin (1 μ g/ml) für weitere 48 h inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen und für 30 min bei 4°C mit 4% PFA fixiert. Danach erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS (je 5 min) und eine 4 h Inkubation mit je 2ml X-Gal-Färbelösung (bei 30°C im Dunkeln). Anschließend konnte die β -Galaktosidase Expression vor und nach Tetracyclin Behandlung anhand der Blaufärbung der Zellen bewertet werden (Blau-Weiß Selektion).

2.15.2 Apoptosemessung mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Grundlagen:

Eine wichtige Anwendung der Durchflusszytometrie dient der Quantifizierung von intrazellulären Proteinen und extrazellulären Oberflächenmolekülen von Zellpopulationen. Die Grundlage ist häufig eine Antigen-Antikörperreaktion die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern detektiert wird. Für die Durchflusszytometrie werden Einzelzellsuspensionen durch eine Kapillare gezogen. In der Kapillare kommt es zur hydrodynamischen Fokussierung der Zellen. Dabei werden die Zellen nacheinander durch eine Kapillare an einem monochromatischem Laserstrahl vorbeigeführt. Die dabei gestreute Lichtmenge gibt Aufschluss über die Größe und die Granularität von Zellen. Es wird zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC= *forward scatter*) und dem Seitwärtsstreulicht (SSC= *sidewards scatter*) unterschieden. Der FSC ist ein Maß für das Zellvolumen und der SSC gibt Aufschluss über die Granularität der Zelle, die unter anderem durch die Größe und Struktur des Zellkerns beeinflusst wird. Gleichzeitig kann während der Wanderung der Zellen durch die Kapillare die auftretende Emmission von Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen wird über einen Detektor (*Photomultiplier*) gemessen werden.

Anwendung:

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für die Messung der Apoptoseinduktion von humanen Brustkrebszelllinien angewendet. Als Apoptosemarker diente die Phosphatidylserin (PS) Externalisierung auf die Zelloberfläche mittels einem APC markierten Annexin V Antikörper. Zusätzlich wurde das DNA interkalierende Agenz 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) für den Nachweis der DNA Fragmentierung verwendet, um eine Differenzierung zwischen nekrotisch zu Grunde gegangen und apoptotischen Zellen zu ermöglichen. Dabei war eine simultane Messung der beiden Fluorochrome auf Grund der unterschiedlichen maximalen Emmissionen möglich. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer Canto II (BD Biosciences, Heidelberg).

Fluorochrom / Filter	Absorptionsmaxima (nm)	Emmissionsmaxima (nm)
APC	743	767
7-AAD	550	650

Durchführung:

Die zu analysierenden Zellen wurden entsprechend den Vorgaben behandelt und unter Standardbedingungen in 6-well Kulturschalen kultiviert. Für die Messung wurden die adhärenten Zellen schonend mit 500µl Accutase™ enzymatisch in Lösung gebracht. Durch 10 minütige Zentrifugation (1000 UPM) wurden die Zellen pelletiert und zweimal mit kaltem

PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 μ l Bindungspuffer resuspendiert und mit 5 μ l Annexin V APC-Antikörperlösung und 5 μ l 7-AAD-Lösung gemischt und geschüttelt. Nach 15 min Inkubationszeit (RT, im Dunkeln) wurden weitere 400 μ l Bindungspuffer zu den Zellen gegeben und die Fluoreszenzmessung im Durchflusszytometer gestartet. Für die Messung wurden je Ansatz 1×10^4 Zellen gemessen und die Daten mit der FCS Express V3 Software ausgewertet. Bei allen Versuchen erfolgte eine Hintergrundkorrektur der Messwerte durch Abzug der Grundfluoreszenz von ungefärbten Zellen.

2.15.3 Caspase 3/7-Aktivitätsmessung

Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 nach Apoptoseinduktion in Mammakarzinomzelllinien wurde mit dem ApoOne® *Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5000 Zellen in 96-well Kulturschalen ausgesät und nach 24 h Erholungsphase einer Apoptoseinduktion unterzogen. Dazu wurden die Zellen mit 100ng/ml Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) inkubiert. Je nach Versuchansatz wurde zusätzlich 1 μ g/ml Cyclohexemid (CHX) zu den Zellen gegeben. Die Inkubationszeiten schwankten je nach Versuch zwischen 3.5 h, 5 h und 24 h. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde pro 100 μ l Medium 100 μ l Caspase Substrat/Puffer Lösung auf die Zellen gegeben und für 4 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Fluoreszenz (FITC, 499nm/521nm) in einem Fluorometer (Infinitive500, Tecan). Bei allen Versuchen erfolgte eine Hintergrundkorrektur der Messwerte durch Abzug der Grundfluoreszenz von zellfreiem Medium.

2.15.4 XTT Proliferationstest

Die Analyse der Zellproliferation erfolgte mit dem XTT-Zellproliferations-Kit II von Roche. Der Assay basiert auf der Reduktion des Tetrazoliumderivats XTT in Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen in stoffwechselaktiven Zellen. Das entstehende H₂O lösliche Formazan Salz besitzt eine gelblich Farbe. Formazan absorbiert Licht einer Wellenlänge zwischen $\lambda=450\text{nm}$ und $\lambda=500\text{nm}$. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Absorptions-Readers (Infinitive500, Tecan). Dabei war die Zellzahl proportional zur gebildeten Menge an Formazan. Je 96-well Kulturschale wurden 1000 Zellen in 100 μ l Medium möglichst schaumfrei ausgesät. Pro Zellart, Zeitpunkt und Stimulation wurden die Zellen dreifach ausgesät und für 24 h, 48 h und 72 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Abstand von 24 h wurde nun das XTT-Reagenz zugegeben. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Anschließend wurde dem XTT-Reagenz ein Elektronenkopplungs-Reagenz (1:50) zugegeben. Nach Zugabe von 50 μ l der aktivierten XTT-Lösung pro well erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C im Brutschrank. Die Quantifizierung der Proben erfolgte gegen drei mitgeführte Leerwerte

(zellfreies Medium). Die spezifische Absorption eines Ansatzes wurde berechnet nach der folgenden Formel:

$$A_{\text{Probe}} = (A_{492\text{nm}(\text{Probe})} - A_{650\text{nm}(\text{Probe})}) - (A_{492\text{nm}(\text{Leer})} - A_{650\text{nm}(\text{Leer})})$$

2.15.5 Adhäsionstest

Die Fähigkeit von Zellen *in vitro* auf einer Oberfläche zu adhären, wurde mittels eines funktionellen Adhäsionstest ermittelt. Zu diesem Zweck wurden 6-well Zellkulturschalen mit Matrigel™ *Basement Membrane Mix* der Firma BD Bioscience beschichtet, um eine möglichst physiologische Oberfläche, die der *in vivo* Situation einer extrazellulären Matrix möglichst nahe kommt, zu generieren. Matrigel™ entstammt einem Engelbrecht-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarkom, einem Tumor, der reich an extrazellulärem Matrixprotein ist und simuliert mit Komponenten wie Laminin und Collagen IV die natürliche Basalmembran. Es enthält zudem noch TGF-β und andere Wachstumsfaktoren. Matrigel™ wurde mit serumfreiem Zellkulturmedium zu einer Arbeitslösung gemischt (10µg/ml Endkonzentration) und je 1ml dieser Lösung in die Wells gegeben. Nach zweistündiger Polymerisationsphase wurde der flüssige Überstand abgesaugt und die Oberfläche vorsichtig zweimal mit 1ml serumfreien Medium gewaschen. Anschließend wurden 4×10^4 Zellen in 1ml Medium in die wells gegeben und 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium inklusive der zu diesem Zeitpunkt nicht-adhärenen Zellen abgesaugt, die Ansätze erneut zweimal mit je 1ml serumfreien Medium gewaschen und anschließend 15 min mit 1ml 70% EtOH (in H₂O) bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die adhärenen Zellen 20 min mit 1ml 0.1% Kristallviolett-Lsg. gefärbt. Nach der Färbung wurden die „wells“ dreimal mit je 2ml PBS gewaschen, getrocknet und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der sich in den fixierten Zellen befindliche blaue Farbstoff, durch 30 min Inkubation mit einer 0.1% Triton-X Lsg. und anschließender fünfminütiger Zugabe mit 2ml Isopropanol, aus den Zellen ausgelöst. Die bläuliche Färbung des Überstands korreliert mit der Anzahl der adhärenen Zellen und wurde jeweils in Dreifachbestimmung durch Absorptionsmessung ($\lambda=590\text{nm}$) von je 200µl pro Ansatz quantifiziert. Die Hintergrundfärbung wurde durch eine Dreifachbestimmung mit zellfreien Matrigel™ beschichteten Wells bestimmt und von allen anderen Werten dividiert (siehe auch 2.15.4).

2.15.6 Wundheilungstest

Die Fähigkeit von Zellen *in vitro* auf einer Oberfläche in eine freie Fläche zu migrieren wurde mittels eines funktionellen Wundheilungstest (*scratch assay*) ermittelt. In dieser Arbeit wurden maligne und benigne Brustkrebszelllinien vor und nach Transfektion mit einem KPNA2 Expressionsvektor in Bezug auf ihre Migrationsfähigkeit untersucht. Zu diesem Zweck

wurden spezielle Silikonrahmen verwendet. Diese Rahmen bestehen aus zwei Kammern mit definierter Größe (0.22cm^2), die durch einen Steg ($500 \pm 50\mu\text{m}$ Dicke) von einander getrennt sind. Diese Zellkultureinsätze wurden unter sterilen Bedingungen in 6-well Kulturschalen eingebracht und je Kammer 8500 Zellen in einem Volumen von $70\mu\text{l}$ ausplattiert um innerhalb von 24 h einen konfluenten Zellrasen zu erhalten. Nach 24 h Kultivierung, wurde der Silikonrahmen vorsichtig mit einer sterilen Pinzette entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um nicht adhäsente Zellen zu entfernen und anschließend mit 2ml Medium befüllt (Abb. 2-10).

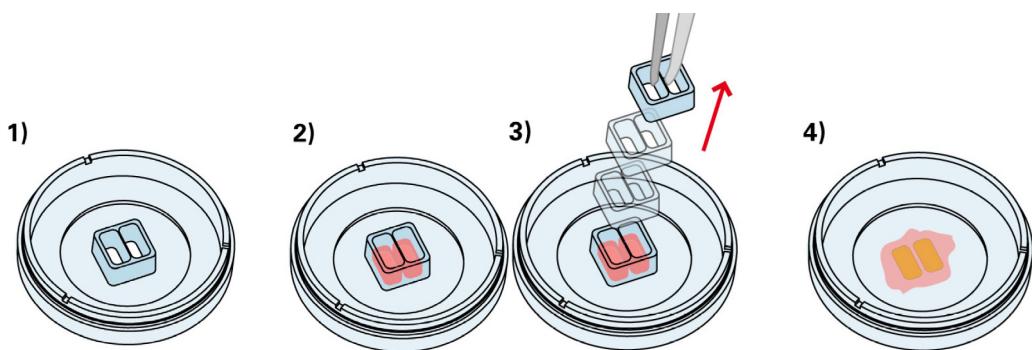


Abb. 2-10: Anwendung der Zellkultureinsätze für den Wundheilungstest. 1) Einsatz des Silikonrahmens in die Zellkulturschale. 2) Befüllung mit Zellsuspension. 3) Ablösen des Rahmens nach 24 h. 4) Inkubation der Zellen mit Wachstumsmedium

Um das Migrationsverhalten der Zellen zu dokumentieren wurden die Ansätze alle 24 h fotografiert. Hierzu wurde ein Axiovert TV100 (Zeiss) Mikroskop mit einer hochauflösenden ColourVision III CCD Kamera verwendet. Die Dokumentation wurde bei 2.5 facher Vergrößerung vorgenommen um einen möglichst großen Ausschnitt erfassen zu können, wobei zu jedem Zeitpunkt der gleiche Ausschnitt dokumentiert wurde. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Axiovert-Software (Zeiss), wobei die Abnahme der zellfreien Fläche (in Pixel) vermessen und in Relation zur bewachsenen Fläche gesetzt wurde. Daraus ergab sich für jeden Ansatz und jedem Zeitpunkt ein bestimmter Pixel-Wert für die verbliebene noch zu migrierenden Oberfläche. Die Ansätze wurden solange dokumentiert bis die Zellen den zellfreien Spalt vollständig migriert hatten.

2.15.7 Kolonienbildungstest (*Colony Formation Assay*)

Neben dem XTT-Assay stellt der „*Colony Formation Assay*“ eine Methode dar, mit der die Proliferation von Zellen quantifiziert werden kann. Zugleich lässt dieser Assay aber auch eine Aussage über morphologische Unterschiede, Migrationsverhalten, und generell das Koloniebildungsvermögen der Zellen zu. Nach der Zellzählung mit dem CASY-1 wurden 1000 Zellen pro 6-well Kulturschale in einem Volumen von 2ml DMEM-Medium und in einer

Dreifachbestimmung ausgesät. Im Falle der stabil transfizierten MCF7/TR/KPNA2 und der transient transfizierten MCF10A/KPNA2 Klonen wurde jedem Ansatz die entsprechende Menge Selektivum (Genetecin bzw. Blasticidin) zugegeben. Die optimalen Konzentrationen wurden für jeden Zelltyp im Vorfeld durch Titrationsreihen bestimmt (2.14.8). Es folgte eine Inkubation für 10 bis 14 Tage bei 37°C im Brutschrank. Bei jedem Mediumwechsel wurde frisches Selektivum zugegeben. Der geeignete Zeitpunkt für die Auswertung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Das alte Medium wurde daraufhin abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung und Fixierung der Einzelkolonien mit einer Kristallviolett-Lsg. (80% MeOH, 10% Formalin). Nach einer Inkubationszeit bei RT von 30 min und einem dreimaligem Waschen mit H₂O wurden die fixierten und gefärbten Kolonien fotografiert. Die Bestimmung der Kolonienzahl und die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ImageQuant TL (v2003.2).

2.16 Statistische Methoden

Die statistischen Analysen wurden mit SPSS 17.0 (SPSS, IL, USA) oder GraphPad Prism 5.0, CA, USA) durchgeführt. Alle Tests waren zweiseitig angelegt. Die statistisch signifikante Fehlerwahrscheinlichkeit war, wenn nicht anders angegeben, mit P<0.05 definiert. Die differenzielle Expressionsstärke oder der Vergleich von Effektgrößen von zwei unabhängigen Gruppen, wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test berechnet. Bei drei oder mehr unabhängigen Stichproben wurde der Wilcoxon Test verwendet. Die Berechnung globaler P-Werte erfolgte über den Kruskal-Wallis Post-Test. Der Vergleich des SYNM Expression in Abhängigkeit des SYNM Promotormethylierungsstatus von Brustkrebszelllinien erfolgte über ein angepasstes gemischtes Dreifaktormodell. Die wiederholten Messungen wurden als Zufallseffekt (Expression) und die Eigenschaft (Methylierungsstatus) als fixierter Effekt betrachtet. Bivariate Korrelationsanalysen zwischen molekularen und klinisch-pathologischen Parametern wurden mittels Kontingenztabellen unter Anwendung des Fishers Exakt-Test durchgeführt. Univariate Überlebensanalysen wurden nach der Methode von Kaplan und Meier berechnet. Die Signifikanz der Funktion wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt. Multivariate Cox Regressions-Analysen erfolgten mittels der Einschluss-Methode. Die jeweils angewendeten Tests sind im Ergebnisteil entsprechend angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Der *SYNM* Expression geht im humanen Brustkrebs häufig verloren

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Dahl wurde durch die bioinformatische *in silico* Analyse von Datenbanken (*expressed sequence tags, EST*) und durch die Erstellung von DNA-Array basierten Genexpressionsprofilen über 100 neue Gene entdeckt, die im humanen Mammakarzinom differentiell exprimiert werden (Dahl et al., 2005; Dahl et al., 2006). In diesen Studien wurde das Gen *SYNM* in 83% der Tumore als herabreguliert (FC>2.0) identifiziert. Basierend auf diesem Befund sollte nun eine detaillierte *SYNM* Expressionsanalyse in primären humanen Mammakarzinomen durchgeführt werden. Begonnen wurde mit der Validierung des *SYNM* mRNA Expressionsverlusts unter Verwendung eines Brustkrebs cDNA *Dot Blot Arrays*. Dieser *Cancer Profiling Array* bestand aus 50 gepaarten cDNA Proben von normalem Brustepithel und korrespondierendem Tumorgewebe. Zusätzlich waren für drei Gewebe-paare die cDNAs von zugehörigen Lymphknotenmetastasen verfügbar. Die Detektion der *SYNM* Expressionsstärken erfolgte über die Hybridisierung ^{32}P -markierter *SYNM* spezifischer cDNA Sonden (Abb. 3-1a). Die densitometrische Auswertung dieser Hybridisierung ist in Abb. 3-1b dargestellt.

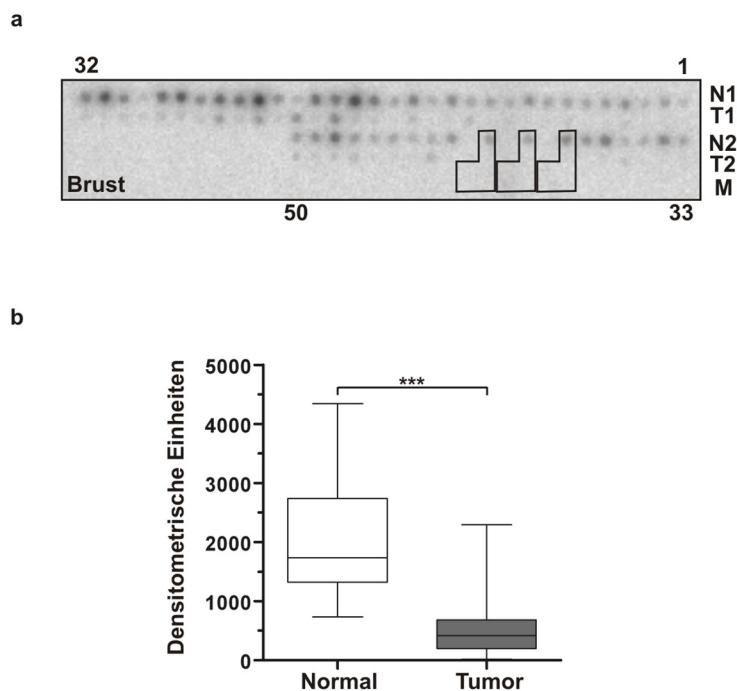


Abb. 3-1: Der *SYNM* Expressionsverlust auf einem Brustkrebs *Dot Blot Array*. a: Der für die Analyse verwendetete Dot Blot Array. Die enthaltenen cDNAs von 50 gepaarten normalen Brustepithelien (N) und korrespondierenden invasiven Tumorproben (T), wurden mit einer ^{32}P -markierten *SYNM* spezifischen cDNA Sonde hybridisiert. Die eingezeichneten Rahmen repräsentieren die Position von drei gepaarten Proben aus Normal, Tumor und Lymphknotenmetastase (M). 1, 32, 33, 50: Probenfolge. b: Box Plot Darstellung der densitometrischen Auswertung des Arrays (a). ***: $P < 0.001$, horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum, Box: 25% bis 75% Quartile, Gepaarter Wilcoxon Test

Im direkten Vergleich zu den Normalproben zeigte sich ein hochsignifikanter Verlust der *SYNM* mRNA Expression in 86% (FC>2.0) der korrespondierenden Tumoren sowie in den Lymphknotenmetastasen. Im nächsten Schritt wurde die *SYNM* mRNA Expression in einem weiteren Kollektiv von 31 invasiven Brusttumoren und 14 normalen ungepaarten Brustgeweben mittels *Real-Time* PCR gemessen. Die *SYNM* Expression innerhalb der Normalgewebe war relativ variabel. Die mediane Expression betrug 0.8618 (Abb. 3-2). Im Vergleich dazu lag die mediane Expression der invasiven Brusttumore bei einem Wert von 0.0008. Daraus errechnete sich für die Gruppe der Mammakarzinome ein, im Vergleich zu dem verwendeten Goldstandard, hochsignifikanter ($P<0.0001$) 1044 facher medianer *SYNM* mRNA Expressionsverlust (Abb. 3-2).

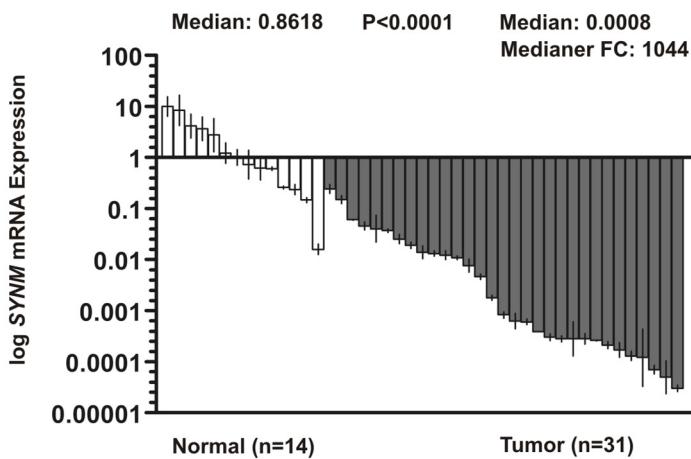


Abb. 3-2: Der *SYNM* Expressionsverlust in invasiven Brusttumoren. *Real-Time* PCR Messung der *SYNM* mRNA Expression in 31 Tumorproben und 14 Normalgeweben. Die Berechnung der medianen Expression der Tumorproben erfolgte durch Normierung auf die mediane Expression des Normalgewebepools (Goldstandard). Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. Ungepaarter Mann-Whitney-U-Test

3.2 Die Charakterisierung der *SYNM* Proteinexpression im Brustepithel

Nach der Validierung eines hochsignifikanten *SYNM* mRNA Expressionsverlusts in primären invasiven Brusttumoren sollte als nächstes das *SYNM* Proteinexpressionsmuster in gesundem Brustepithel und in invasiven Mammakarzinomen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische Färbungen von Brustgeweben mit einem kommerziellen polyklonalen *SYNM* Antikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle für die *SYNM* Antikörper Etablierung diente das bereits beschriebene *SYNM* Expressionsmuster in humanem Lebergewebe (Schmitt-Graeff et al., 2006) (siehe auch Anhang Abb. 6-2). Neben der qualitativen Charakterisierung wurde eine Quantifizierung der *SYNM* Färbung im humanen Brustgewebe mit dem immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner vorgenommen (Remmele und Stegner, 1987). Die *SYNM* Proteinfärbung war prädominant im Zytoplasma von myoepithelialen Zellen gesunder Lobuli und Dukti sichtbar (Abb. 3-3a, b und e).

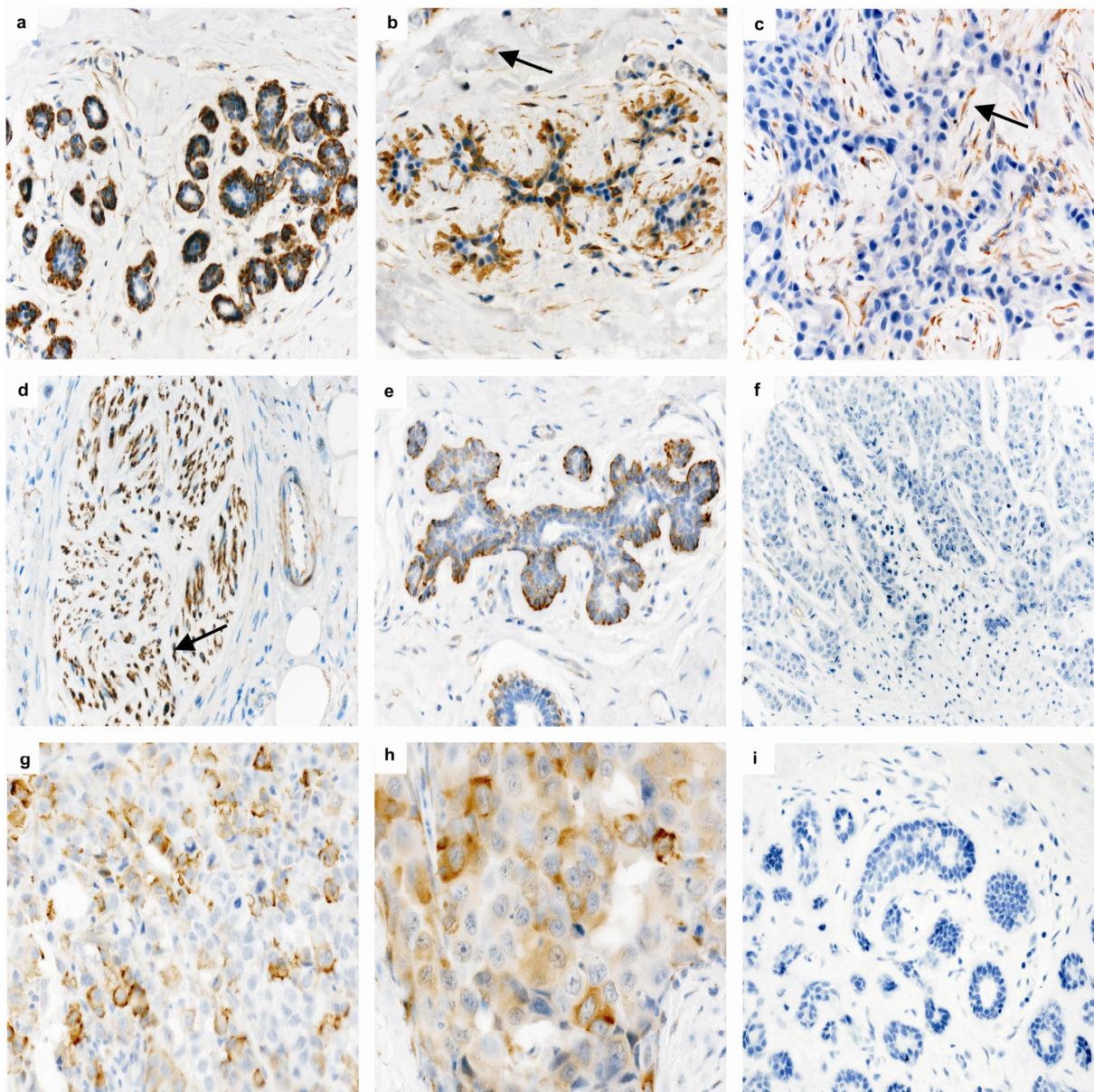


Abb. 3-3: Die Charakterisierung der SYNM Proteinexpression in der humanen Brust. Immunhistochemische Analyse der SYNM Expression in normalem und tumorösem Brustgewebe. **a** und **b**: Starke SYNM Immunreaktivität (IRS=9) in Myoepithelzellen normaler Brustgewebe und Kapillaren (Pfeil). **c**: Sehr schwache SYNM Färbung (IRS=1) in Tumorzellen eines IDC mit gleichzeitig erhalten Färbung in den Kapillaren (Pfeil). **d**: Deutliche SYNM Färbung in Nervenbündeln (Pfeil) und Blutgefäßen (rechts, Mitte) im Kontext von gesundem Brustgewebe. **e**: Moderate SYNM Färbung (IRS=4) in normalen Lobuli. **f**: Vollständiger Verlust (IRS=0) der SYNM Färbung in den Tumorzellen eines IDC. **g** und **h**: Moderate (IRS=2) bzw. starke (IRS=8) SYNM Färbung in den Tumorzellen zweier IDC's. **i**: Brustnormalgewebe als Negativkontrolle ohne Applikation des SYNM Primärantikörpers. Originalvergrößerungen: x400. Der IRS berechnet sich aus dem mathematischen Produkt von Färbeintensität (0: negativ, 1: schwach, 2: mäßig, 3: stark) und der Färbequantität (0: negativ, 1: <10% positive Zellen, 2: 10-50% positive Zellen, 3: 51-80% Zellen, 4: >80% positive Zellen). IRS Minimum: 0 (0x0) und IRS Maximum: 12 (3x4)

Eine eher sporadische SYNM Färbung war in luminalen epithelialen Zellen zu erkennen. Zusätzlich zeigte sich eine starke SYNM Färbung in kontraktilen Zelltypen, wie Kapillaren und Blutgefäßen (Abb. 3-3b und c). Daneben konnte das SYNM Protein ebenfalls in nichtkontraktilen Zellen, wie Nervenbündeln und zum Teil auch in Stromazellen des Bindegewebes nachgewiesen werden (Abb. 3-3d). Im Gegensatz zu der klaren SYNM Färbung in

gesundem Brustgewebe zeigten Tumorzellen invasiver duktaler Karzinome entweder eine schwache oder in großen Teilen keine SYNM Färbung (Abb. 3-3c und f). Insgesamt wurde die SYNM Expression in 31 gesunden Brustgeweben und 37 invasiven duktalen Karzinomen (IDC) mit dem IRS semi-quantitativ ausgewertet und miteinander verglichen (Abb. 3-4). Der Großteil der Normalgewebe (94%, 29/31) wies eine deutliche SYNM Proteinexpression auf (Medianer IRS=4 \pm 2.74, Spannweite: 0-9) (Abb. 3-4a und c). Im Gegensatz dazu war die SYNM Expression in 57% (21/37) der IDCs vollständig verloren (Medianer IRS=0 \pm 1.86, Spannweite: 0-8) (Abb. 3-4b und c). In Abb. 3-3g und h sind zwei repräsentative Gewebe-schnitte von Tumoren mit einem IRS=2 und IRS=8 für die SYNM Expression dargestellt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die SYNM Proteinexpression in 70% (26/37) der invasiven duktalen Mammakarzinome stark reduziert war bzw. vollständig verloren ging (IRS=0 oder 1). Gesunde Brustgewebe hingegen zeigten in 84% (26/31) der Fälle eine klare SYNM Expression (IRS=2-9).

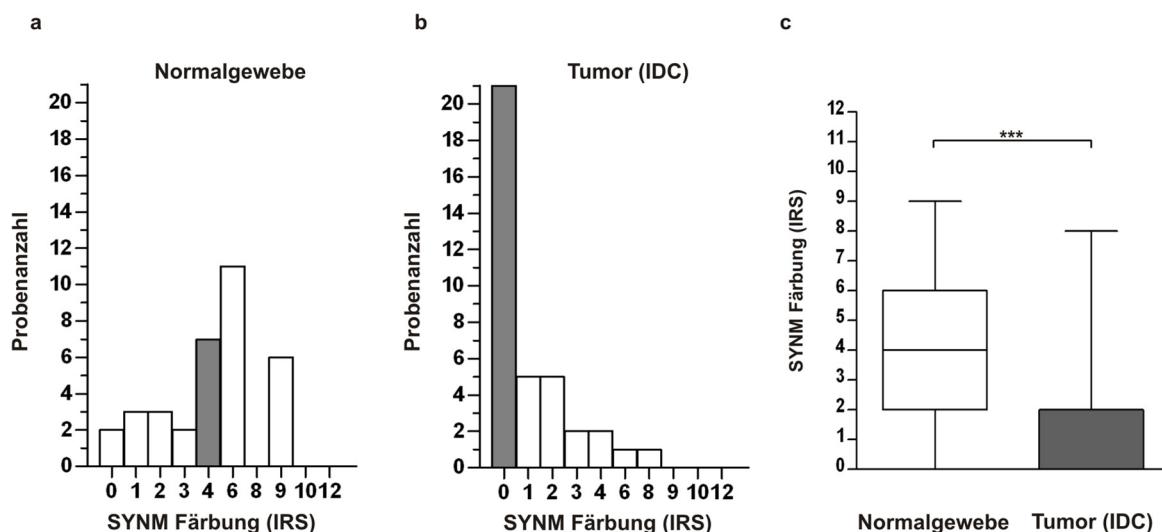


Abb. 3-4: Der SYNM Proteinexpressionsverlust im humanen Mammakarzinom. Verteilung des semi-quantitativen kategorisierten IRS der SYNM Proteinexpression von insgesamt 31 normalen Brustgeweben und 37 invasiven duktalen Karzinomen (IDC). **a** und **b**: Verteilung der SYNM Färbung innerhalb der Gruppe der Normal- und Tumorgeweben. Grauer Balken: Medianer IRS. **c**: Box Plot der IRS Verteilung zwischen Normal- und Tumorgeweben. ***: P<0.001, horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum. Box: 25% bis 75% Quartile, zweiseitiger Mann-Whitney U Test. Der IRS berechnet sich aus dem mathematischen Produkt von Färbeintensität (0: negativ, 1: schwach, 2: mäßig, 3: stark) und der Färbequantität (0: negativ, 1: <10% positive Zellen, 2: 10-50% positive Zellen, 3: 51-80% Zellen, 4: >80% positive Zellen). IRS Minimum: 0 (0x0) und IRS Maximum: 12 (3x4)

3.3 Die SYNM Hypermethylierung und Expression in Brustkrebszelllinien

Nachdem der hochsignifikante Expressionsverlust von SYNM im humanen Mammakarzinom nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage nach dem hierfür verantwortlichen Regulationsmechanismus. Interessanterweise wurde durch die Sequenzanalyse des SYNM Gens eine große CpG Insel identifiziert (Abb. 3-5a). Diese CpG Insel erstreckt sich innerhalb des SYNM Promoters (Start: -992bp) über 1797bp bis weit in das erste Exon (Ende: +805bp) hinein. Es

sollte untersucht werden, ob eine aberrante *SYNM* Promotormethylierung für den beobachteten tumorassoziierten *SYNM* Expressionsverlust verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde eine methylierungsspezifische PCR (MSP) etabliert. Die Lage der verwendeten MSP-Primer und die Größe des detektierten MSP-Produkts werden in Abb. 3-5a illustriert. Die MSP Primer wurden so positioniert, dass sie mindestens je drei CpG Dinukleotide abdecken und so eine möglichst gute Sequenzspezifität erreichen. Die analysierte *SYNM* Promotorsequenz enthält mit einem CCAAT-Enhancer Motiv, einer GC-Box (Etienne et al., 1990) und einer MYC/MAX Bindungsstelle (Luscher, 2001) Konsensussequenzen von drei transkriptionsrelevanten Sequenzelementen (Abb. 3-5a).

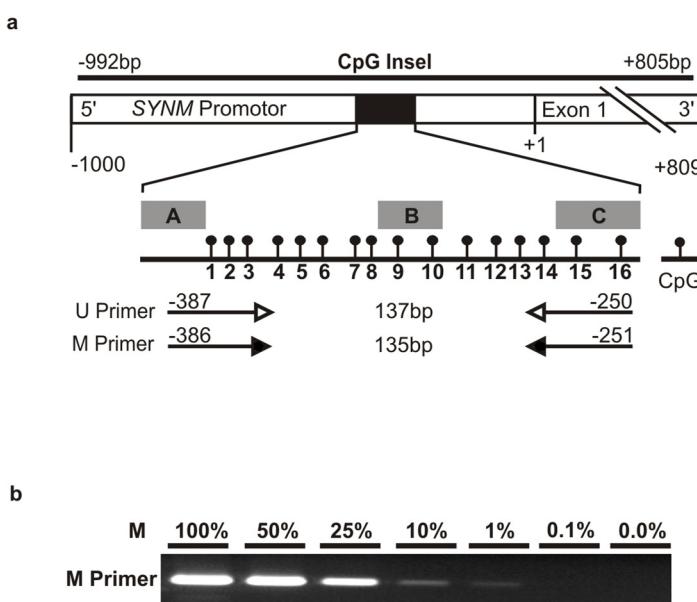


Abb. 3-5: *SYNM* Promotoranalyse und MSP Primer Design. a: Schematische Darstellung der humanen *SYNM* Promotorregion und der MSP Primer Topologie. Die mittels speziellem Algorhytmus identifizierte CpG Insel erstreckt sich von -992bp bis +805bp in das Exon 1 hinein (GC Gehalt: 67%, CpG (beobachtet) / CpG (erwartet)= 1.75). Jeder MSP Primer (Pfeil) erstreckt sich über drei CpG Dinukleotide. Schwarzer Block: Die relative Position des mit den MSP Primern detektierten MSP-Amplikons. Die Amplikongröße beträgt für die unmethylierte *SYNM* Promotorsequenz 137bp und entspricht bezüglich Position und Größe der korrespondierenden methylierten Sequenz (135bp). +1: Transkriptionsstartpunkt. Graue Boxen: Illustration der Bindungsstellen für Gentranskription regulierende Faktoren. Die Konsensussequenzen wurden durch eine *in silico* Promotorsequenzanalyse ermittelt. A: CCAAT-Motiv (Bindungsstelle für das Enhancer-binding-protein-β); B: E-Box (Bindungsstelle für Myc/Max Transkriptionsfaktoren); C: GC-Box Elemente (Bindungsstelle für den SP1 Transkriptionsfaktor). b: MSP Primer Verdünnungsreihe. Die MSP mit einer polymethylierten DNA zeigt die Sensitivität des *SYNM* methylierungsspezifischen (M) Primers für methylierte DNA (100% - 0.0%) in einem Hintergrund von unmethylierter DNA (0.0% - 100%).

Vor Beginn der *SYNM* Promotormethylierungsanalyse musste eine ausreichende Sensitivität der M-Primer für methylierte *SYNM* Promotor DNA nachgewiesen werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, um das Detektionslimit der M-Primer, mit abnehmender Konzentration von methylierter bisulphit-konvertierter (bis) DNA in einem Hintergrund aus unmethylierter bisDNA, zu bestimmen. Die verwendeten M-Primer waren in der Lage, minimal 1% (0.1ng) methylierte *SYNM* Promotor DNA in einem Hintergrund von 99% (9.9ng)

unmethylierter DNA zu amplifizieren (Abb. 3-5b). Damit war der Anspruch einer hohen Sensitivität der M-Primer für die Analyse der *SYNM* Promotormethylierung erfüllt.

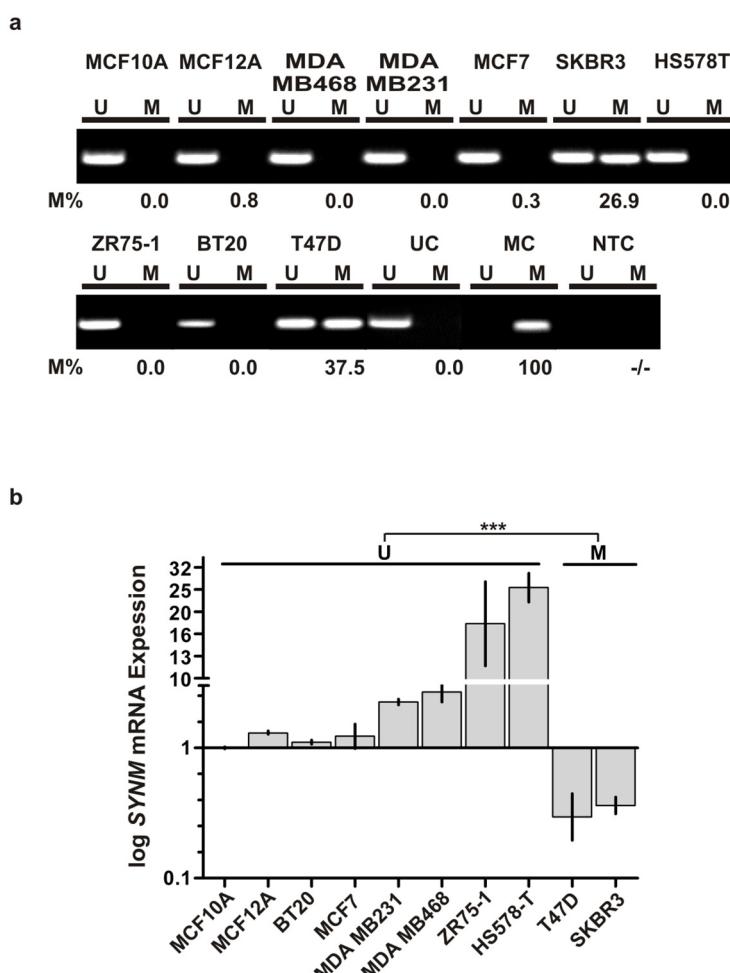


Abb. 3-6: Die *SYNM* Hypermethylierung und Expression in humanen Brustkrebszelllinien. a: Der mit MSP gemessene Promotormethylierungsstatus von zwei benignen (MCF10A, MCF12A) und acht malignen (Rest) humanen Brustkrebszelllinien. Mit U und M gekennzeichnete Banden repräsentieren unmethylierte (U) und methylierte (M) *SYNM* Promotor DNA. M%: Durchschnittliche Methylierungsfrequenzen, die mit Hilfe der Pyrosequenzierung detektiert wurden. Universell polymethylierte (MC) und unmethylierte (UC) bisDNA dienten als Positivkontrollen für die MSP bzw. für die Pyrosequenzierung. Wasser diente als PCR-Template der Negativkontrolle (NTC). **b:** Die differenzielle *SYNM* mRNA Expression der zehn analysierten Brustkrebszelllinien in Abhängigkeit des *SYNM* Promotormethylierungsstatus. Die *SYNM* Expressionsstärke in benignen MCF10A Zellen diente der Normierung aller anderen Werte und wurde gleich eins gesetzt. ***: P<0.001. Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. U: Gruppe der unmethylierten Zelllinien, M: Gruppe der methylierten Zelllinien. Angepasstes gemischtes Dreifaktor Modell: Messungen der Expression (log) als Zufallseffekt und der Methylierungsstatus (U und M) als Fix-Effekt

Die Überprüfung der Spezifität der *SYNM* U- und M-Primer für unmethylierte bzw. methylierte Sequenzen erfolgte generell bei jeder MSP Analyse über die mitgeführten U- und M-Kontrollen (siehe auch Abb. 3-6a). Nach abgeschlossener Etablierung der MSP Technik wurde der *SYNM* Promotormethylierungsstatus von zehn humanen Brustkrebszelllinien

bestimmt (Abb. 3-6a) und mit der *SYNM* mRNA Expressionsstärke korreliert (Abb. 3-6b). Die beiden malignen Brustkrebszelllinien T47D und SKBR3 zeigten eine deutliche *SYNM* Promotormethylierung, wo hingegen keine der benignen Zelllinien eine Methylierung aufwiesen. Mittels Pyrosequenzierung konnte eine zu den MSP Banden korrespondierende Methylierungsfrequenz von 26.9% und 37.5% für SKBR3 bzw. T47D gemessen werden. In Übereinstimmung mit dem Methylierungsstatus war die *SYNM* Expression in diesen beiden Zelllinien, im Vergleich zu den anderen acht unmethylierten Zelllinien, hochsignifikant ($P<0.001$) reduziert (Abb. 3-6b).

3.4 *SYNM* Re-Expression nach *in vitro* Demethylierung

Nachdem eine Korrelation zwischen der *SYNM* Promotormethylierung und dem *SYNM* Expressionsverlust in humanen Brustkrebszelllinien gezeigt werden konnte, sollte dieses Phänomen auf einer funktionellen Ebene begründet werden. Aufbauend auf der Annahme, dass die Hypermethylierung des *SYNM* Promotors die *SYNM* mRNA Expression reprimieren kann, sollte eine Demethylierung des *SYNM* Promotors zu einer Re-Expression von *SYNM* führen. Aus diesem Grund wurden die beiden methylierten Zelllinien SKBR3 und T47D sowie die unmethylierte ZR75-1 Zelllinie einer globalen demethylierenden Behandlung mit 5'-Aza-2'Deoxycycloidin (DAC) unterzogen. Da CpG Methylierungereignisse Chromatin kondensierende Prozesse, wie z.B. Histonacetylierung, forcieren können, wurde zusätzlich der Histondeacetylase-Hemmstoff Trichostatin A (TSA) appliziert (Jones und Baylin, 2002). Nach demethylierender Behandlung konnte in T47D eine sehr starke Abnahme der M-Bandenstärke und in SKBR3 ein vollständiger Verlust der M-Bande beobachtet werden (Abb. 3-7a). Diese Änderung des Methylierungsstatus wurde durch die Pyrosequenzierung bestätigt. Nach *in vitro* Demethylierung hatten T47D Zellen eine marginale Restmethylierung (5.3%) und SKBR3 keine *SYNM* Methylierung mehr (0%) (Abb. 3-7a). In Übereinstimmung mit dem MSP Ergebnis zeigte das Pyrogramm der behandelten SKBR3 A/T Zellen keine Methylierung der einzelnen CpG Dinukleotide (Abb. 3-7b). Im Vergleich dazu war die Demethylierung in T47D A/T Zellen in fünf CpG Positionen unvollständig. Interessanterweise war dieser Effekt vornehmlich in CpG Dinukleotiden präsent, die innerhalb der MSP-Primer Hybridisierungsstellen lagen (Position 3, 14, 15). Das resultierte konsequenterweise in einem schwachen Methylierungs-signal (vgl. Abb. 3-7a). In Übereinstimmung mit der effektiven Demethylierung des *SYNM* Promotors in T47D und SKBR3 Zellen wurde die *SYNM* Expression deutlich re-induziert (Abb. 3-7c). Die *Real-Time* PCR Messung ergab nach *SYNM* Promotordemethylierung eine 21.8 fache bzw. eine 43.0 fache Steigerung der *SYNM* Expression in T47D und SKBR3. Der Scatter Plot (Abb. 3-7d) verdeutlicht, dass die *SYNM* Expression in T47D und SKBR3 durch die *SYNM* Demethylierung auf die Höhe von ursprünglich unmethylierten Mammakarzinomzelllinien angehoben wurde.

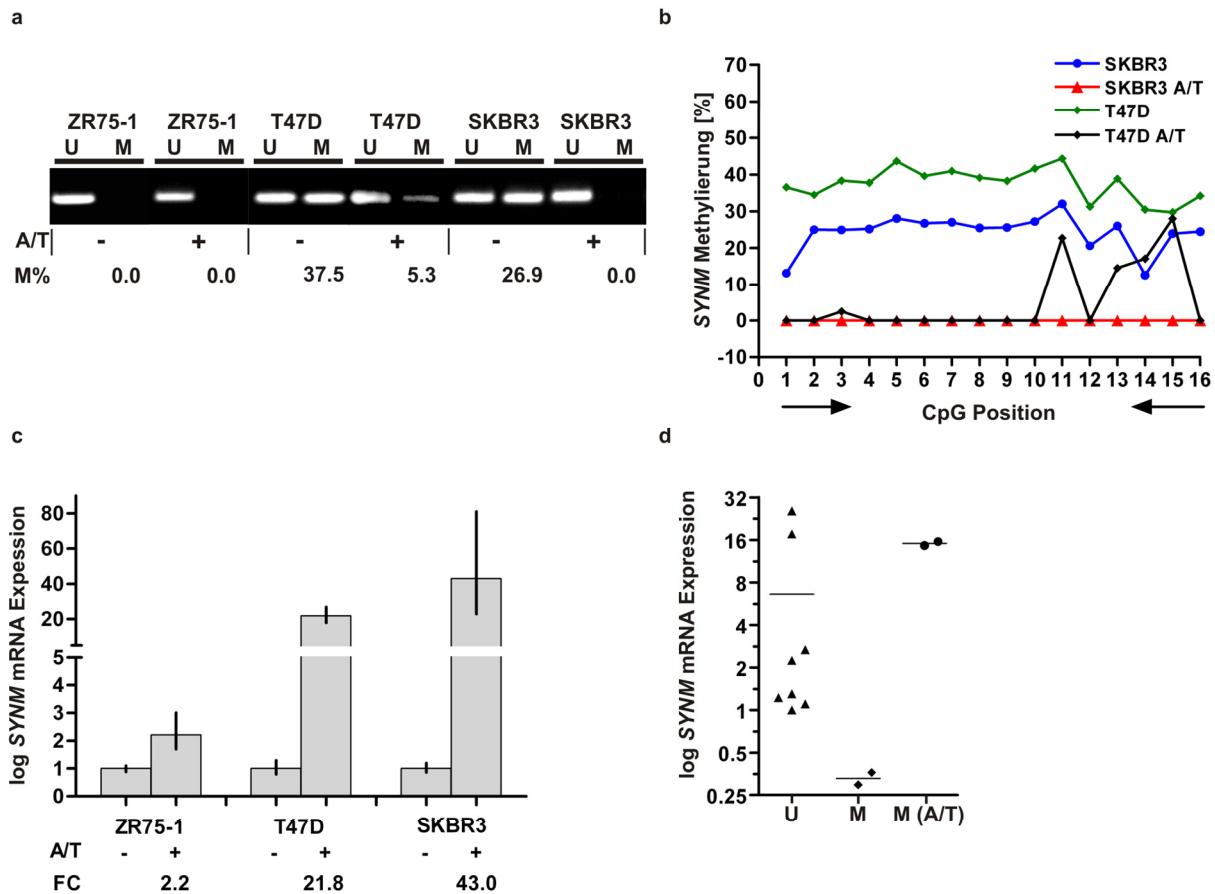


Abb. 3-7: Die SYNM Demethylierung und Re-Expression in humanen Brustkrebszelllinien. **a:** Der SYNM Methylierungsstatus vor (-) und nach (+) DAC/TSA Behandlung (A/T). Mit U und M gekennzeichnete Banden repräsentieren unmethylierte (U) und methylierte (M) SYNM Promotor DNA. M%: Durchschnittliche Methylierungsfrequenzen die mit Hilfe der Pyrosequenzierung detektiert wurden. **b:** Programme von SKBR3 und T47D vor der A/T Behandlung. Aufgetragen sind die exakten Methylierungsfrequenzen für jede der 16 CpG Dinukleotide innerhalb der mit MSP analysierten SYNM Promotorsequenz. Pfeile kennzeichnen die von den MSP Primern detektierten CpGs. **c:** Semiquantitative Real-Time PCR der SYNM Re-Expression nach A/T Behandlung des gleichen Experiments (FC). Die SYNM Expressionswerte vor A/T Behandlung dienten jeweils als Normierung und wurden gleich 1 gesetzt. Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. **d:** Scatter Plot Darstellung der Verteilung der SYNM Expression aller getesteten Zelllinien (siehe auch Abb. 3-6b), in Abhängigkeit des SYNM Methylierungsstatus. Horizontale Linien: Mediane Expression. U: unmethylierte Zelllinien (MCF10A, MCF12A, MDA-MB468, MDA-MB231, MCF7, HS578-T, ZR75-1, BT20). M: methylierte Zelllinien (SKBR3 und T47D). M (A/T): demethylierte Zelllinien (SKBR3 und T47D).

3.5 Die SYNM Promotormethylierung im primären Brustkrebs

Nachdem eine SYNM Promotormethylierung in humanen Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen wurde, sollte nun analysiert werden, ob die SYNM Methylierung ebenfalls zu dem beobachteten *SYNM gene silencing* im primären humanen Brustkrebs beiträgt. Der SYNM Promotormethylierungsstatus wurde an genomicscher Bisulfit behandelter DNA von insgesamt 195 Brustkrebspatientinnen mit der MSP-Technologie analysiert. Repräsentative Ergebnisse sind in Abb. 3-8a dargestellt. Eine aberrante SYNM Promotormethylierung

konnte in 26.7% (52/195) der Brustkrebsproben nachgewiesen werden (z.B. Patient #90, #121 und #164 in Abb. 3-8a). Dementsprechend zeigten 73.3% (143/195) der Brustkrebspatientinnen keine *SYNM* Methylierung (z.B. Patient #4, #11 und #34 in Abb. 3-8a).

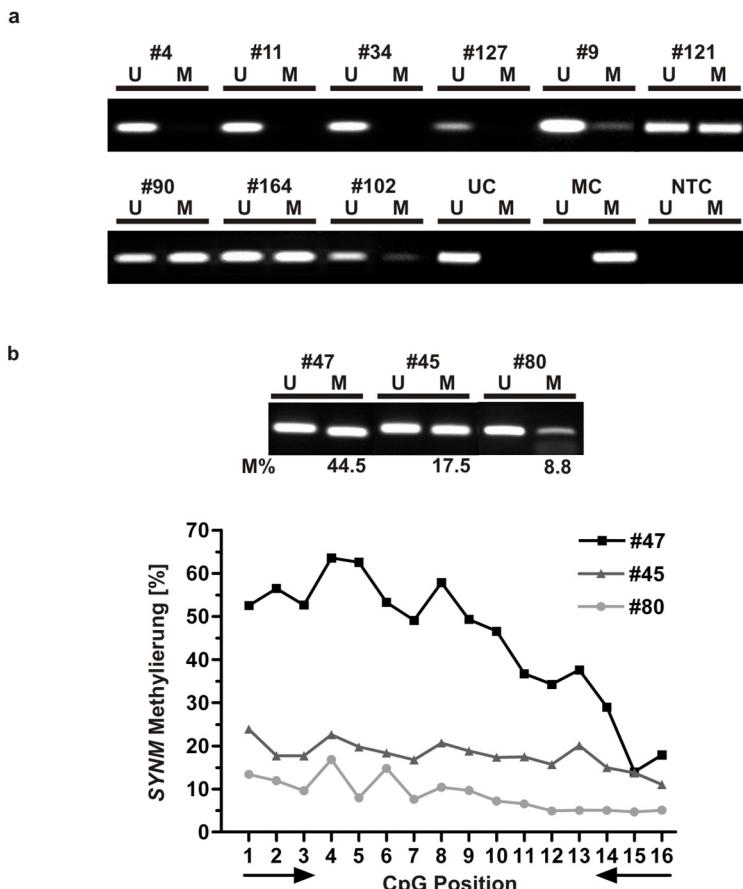


Abb. 3-8: Die *SYNM* Promotormethylierung im primären humanem Brustkrebs. a: Repräsentative MSP Ergebnisse des *SYNM* Methylierungsstatus von neun Brustkrebsproben (#). Mit U und M gekennzeichnete Banden repräsentieren unmethylierte (U) und methylierte (M) *SYNM* Promotor DNA. Universell polymethylierte (MC) und unmethylierte (UC) bisDNA dienten als Positivkontrollen der MSP bzw. der Pyrosequenzierung. Wasser diente als Template in der Negativkontrolle (NTC). b: Pyrogramme drei ausgewählter Brustkrebsproben. Angezeigt sind die MSP Ergebnisse und die korrespondierenden durchschnittlichen Methylierungsfrequenzen (M%), die mit Hilfe der Pyrosequenzierung detektiert wurden. Pfeile kennzeichnen die von den MSP Primern detektierten CpGs

In keinen der gestesteten gesunden Brustgeweben ($n=10$) war eine *SYNM* Promotormethylierung nachweisbar, was auf die Tumorspezifität des *SYNM* Methylierungsereignisses schließen lässt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu den qualitativen MSP Resultaten wurden die exakten Methylierungsfrequenzen aller CpG Dinukleotide innerhalb des analysierten 137bp großen *SYNM* Promotorbereichs, von insgesamt 13 Mammakarzinompatientinnen mit deutlichem *SYNM* Methylierungereignis, mittels Pyrosequenzierung bestimmt. In Abb. 3-8b sind die Pyrogramme für drei repräsentative Patientinnen

(#45, #47, #80) dargestellt. Es zeigte sich eine durchgängige Methylierung aller 16 CpG Dinukleotide im Fall einer, mit MSP nachgewiesenen, *SYNM* Promotormethylierung. Die gemessene durchschnittliche Methylierungsfrequenz aller 13 Proben war innerhalb der ersten neun CpG Positionen höher (Mittlere Methylierung: $13\% \pm 13.6\%$, Spannweite: 3.1% - 63.7%) als die der CpG Positionen 10 bis 16 (Mittlere Methylierung: $7.0\% \pm 8.2\%$, Spannweite: 1.8% - 30.9%). Insgesamt konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den Methylierungsbandenstärken der MSP und den mittleren Methylierungsfrequenzen der Pyrosequenzierung beobachtet werden (Abb. 3-8b).

3.6 *SYNM* Methylierung assoziierter *SYNM* Verlust im Brustkrebs

Eine Assoziation zwischen der *SYNM* Promotormethylierung und dem *SYNM* gene silencing konnte für Brustkrebszelllinien gezeigt werden. Diese Assoziation sollte im Folgenden auch in primären Mammakarzinomen untersucht werden. Dazu wurde die *SYNM* mRNA Expression in einer Fraktion (n=36) der analysierten Mammakarzinom Kohorte (n=195) gemessen, für die der Promotormethylierungsstatus bereits bestimmt wurde. Insgesamt wurde die *SYNM* Expression in 14 unmethylierten und 22 methylierten Tumorproben mit einem Normalgewebestandard (n=10) verglichen (Abb. 3-9a). Mit Werten zwischen 0.072 und 38.36 war die Spannweite der *SYNM* Expression innerhalb der Gruppe von normalen Brustgeweben relativ variabel. Die Gruppe der unmethylierten Tumore zeigte eine mediane 28.1 fache Herabregulation der *SYNM* Expression. Verglichen mit der *SYNM* Expression in den Normalgeweben war diese jedoch statistisch nicht signifikant ($P>0.05$, FC=28.1) (Abb. 3-9a und b). Im Gegensatz dazu zeigten die methylierten Tumore, im Vergleich zu den unmethylierten Normalgeweben und den unmethylierten Tumore, einen 1299 fachen, statistisch hochsignifikanten *SYNM* Expressionsverlust (FC=1299, $P<0.001$) (Abb. 3-9a und b). Zusätzlich korrelierte der Grad des *SYNM* Expressionsverlustes positiv mit dem *SYNM* Promotormethylierungsstatus in humanen Mammakarzinomen ($P<0.0001$) (Tab. 3-1).

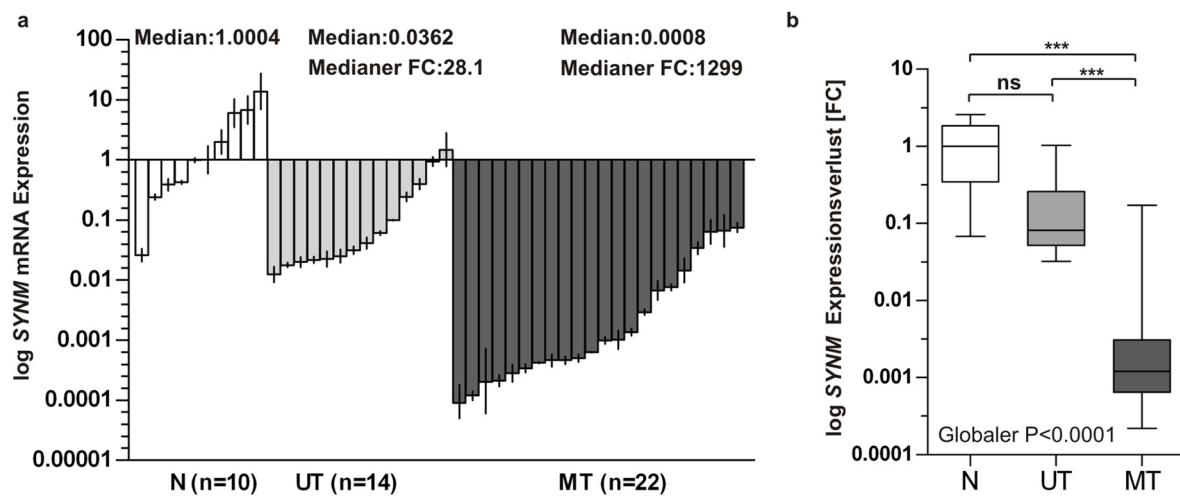


Abb. 3-9: Der SYNM Promotormethylierung assoziierte SYNM Verlust im humanem Brustkrebs. a: Real-Time PCR Messung der SYNM mRNA Expression in normalen Brustepithelgeweben (N) und in Brusttumorgeweben, gruppiert nach dem SYNM Methylierungsstatus. UT: unmethylierte Tumoren, MT: methylierte Tumoren. Die Berechnung der medianen Expression der Tumorgeweben erfolgte durch Normierung auf die mediane Expression des Normalgewebebestandards. Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. b: Box Plot Analyse für den Vergleich des SYNM Expressionsverlusts (FC) in Relation zum SYNM Methylierungsstatus. ns: $P > 0.05$. ***: $P < 0.001$. horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum. Box: 25% bis 75% Quartile. Zweiseitiger, nicht parametrischer Kruskal-Wallis-Test Post Test für den globalen P-Wert: Zweiseitiger, nicht parametrischer Dunn's-multipler-Vergleichstest

3.7 SYNM Methylierung in Bezug zu klinisch-pathologischen Parametern

Das für diese Arbeit verwendete Kollektiv, bestehend aus 195 primären Mammakarzinomen, ermöglichte die Analyse der SYNM Promotormethylierung anhand einer großen Fallzahl. Die klinisch-pathologischen Charakteristika der 195 primären Mammakarzinome sind in Tab. 6-1 (Anhang) zusammengefasst. Mit Hilfe der Kontingenztabellen Analyse konnte eine statistisch hochsignifikante Assoziation zwischen aberranter SYNM Promotormethylierung und positivem Lymphknotenstatus ($P=0.0177$), hoher Tumorgraduierung (G2 und G3) ($P=0.0275$) und dem Verlust der SYNM mRNA Expression ($P<0.0001$) bestätigt werden (Tab. 3-1). Für die Bestimmung der positiven Korrelation zwischen der SYNM Methylierung und dem SYNM Expressionsverlust wurde der methylierungsunabhängige mediane SYNM Verlust ($FC=342.9$) aller analysierten Mammakarzinome für die Dichotomisierung verwendet (siehe auch 3.6). Es konnten keine Assoziationen zwischen der SYNM Promotormethylierung und anderen klinisch-pathologischen Parametern, wie Alter bei Diagnose, Tumogröße, histologischer Tumortyp sowie Hormonrezeptorstatus, gefunden werden (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Die Korrelation von klinisch-pathologischen Parametern mit der *SYNM* Promotormethylierung

	<i>SYNM</i> Methylierung			
	n ^a	Positiv	Negativ	P-Wert ^b
Total	195	52 (26.6%)	143 (73.4%)	-/-
Alter bei Diagnose				
<57 Jahre	96	22 (22.9%)	74 (77.1%)	
≥57 Jahre	99	30 (31.3%)	69 (69.7%)	0.2462
Tumogröße^c				
pT1	68	17 (25.0%)	51 (75.0%)	
pT2-4	108	30 (27.8%)	78 (72.2%)	0.6878
Lymphknotenstatus^c				
pN0	82	16 (19.5%)	66 (80.5%)	
pN1-3	74	27 (36.5%)	47 (63.5%)	0.0177
Histologische Tumograduierung^d				
G1	12	0 (0%)	12 (100%)	
G2	87	22 (25.3%)	65 (74.7%)	0.0275
G3	79	26 (32.9%)	53 (67.1%)	
Histologischer Tumortyp				
invasiv duktal	155	43 (27.7%)	112 (72.3%)	
invasiv lobulär	17	3 (17.6%)	14 (82.4%)	0.1151
andere	11	1 (9.1%)	10 (90.9%)	
Östrogenrezeptorstatus				
negativ (IRS ^e 0-2)	54	8 (14.8%)	46 (85.2%)	
positiv (IRS 3-12)	97	23 (23.7%)	74 (76.3%)	0.1971
Progesteronrezeptorstatus				
negativ (IRS 0-2)	56	10 (17.9%)	46 (82.1%)	
positiv (IRS 3-12)	95	21 (22.1%)	74 (77.9%)	0.5365
FC^f des <i>SYNM</i> Expressionsverlusts				
<FC=342.9	21	14 (66.7%)	7 (33.3%)	
≥FC=342.9	15	15 (100%)	0 (0%)	<0.0001

^aFrauen mit primärem, unilateralem, invasiven Brustkrebs. ^bFisher's Exakt Test. ^cEntsprechend der TNM Klassifikation nach Sobin und Wittekind (Sobin und Wittekind, 1997). ^dNach Bloom und Richardson und modifiziert durch Elston und Ellis (Elston und Ellis, 1993). ^eIRS= Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner, 1987). ^fMedianer FC des *SYNM* Expressionsverlusts in der Gruppe der Mammakarzinome. Fettdruck: signifikante P-Werte (<0.05)

3.8 Die univariate Überlebensanalyse in Bezug zur *SYNM* Methylierung

Durch univariate Überlebensanalysen wurden das rezidivfreie Überleben (RFÜ) und das Gesamtüberleben (GÜ) von Mammakarzinompatientinnen, in Relation zu klinisch-pathologischen Faktoren und der *SYNM* Promotormethylierung, untersucht (Tab. 3-2). Für die Analyse wurde der Log-Rank Test entsprechend der Kaplan-Meier Methode angewendet (Kaplan und Meier, 1958).

Tab. 3-2: Univariate Analyse prognostischer Faktoren und der *SYNM* Methylierung in Bezug zum rezidivfreien Überleben (RFÜ) und dem Gesamtüberleben (GÜ)

	RFÜ			GÜ		
	n ^a	Ereignisse	P-Wert ^b	n	Ereignisse	P-Wert
Alter bei Diagnose						
<57 Jahre	71	21	0.3092	71	12	0.1897
≥57 Jahre	63	14		64	17	
Tumogröße^c						
pT1	38	7	0.1358	38	6	0.3153
pT2-4	72	20		72	16	
Lymphknotenstatus^c						
pN0	51	5	0.0001	51	6	0.0231
pN1-3	58	22		58	17	
Histologische Tumograduierung^d						
G1	11	0		11	1	
G2	57	12	0.0183	57	5	0.0024
G3	60	22		60	22	
Histologischer Tumortyp						
invasiv duktal	104	25		104	25	
invasiv lobulär	16	4	0.6640	16	2	0.0928
andere	9	3		9	0	
Östrogenrezeptorstatus						
negativ (IRS ^e 0-2)	43	13	0.2917	43	13	0.0226
positiv (IRS 3-12)	80	21		80	13	
Progesteronrezeptorstatus						
negativ (IRS 0-2)	44	17	0.0162	44	13	0.0387
positiv (IRS 3-12)	79	17		79	13	
<i>SYNM</i> Promotormethylierung						
negativ	111	21	0.0005	111	21	0.4369
positiv	23	14		24	8	

^aFrauen mit primärem, unilateralem, invasiven Brustkrebs. ^bLog-Rank Test mit zweiseitigem Signifikanzlevel von 0.05. ^cEntsprechend der TNM Klassifikation nach Sabin und Wittekind (Sabin und Wittekind, 1997). ^dNach Bloom und Richardson und modifiziert durch Elston und Ellis (Elston und Ellis, 1993). ^eIRS= Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner 1987). Fettdruck: Signifikante P-Werte (<0.05)

Im verwendeten Tumorkollektiv waren ein positiver Lymphknotenstatus, eine hohe Tumorgraduierung (G2 und G3) sowie ein positiver Progesteronrezeptorstatus signifikant mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben (RFÜ) assoziiert. Dieselben Parameter, und der positive Östrogenrezeptorstatus, waren zudem signifikant mit einem verkürzten Gesamtüberleben (GÜ) verknüpft (Tab. 3-2). Eine Promotormethylierung des *SYNM* Gens war hochsignifikant ($P<0.0005$) mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben von Brustkrebspatientinnen assoziiert (Tab. 3-2 und Abb. 3-10a). Patientinnen ohne *SYNM* Promotormethylierung hatten eine mittlere RFÜ Zeit von 132.4 ± 6.8 Monaten. Im Vergleich dazu wiesen Patientinnen mit *SYNM* Methylierung eine drastisch reduzierte mittlere RFÜ Zeit von 58.7 ± 7.1 Monaten auf. Anders ausgedrückt bedeutet dies für diese Patientinnen eine Reduktion der mittleren RFÜ-Zeit auf 44.3% der durchschnittlichen Überlebenszeit von Patientinnen ohne *SYNM* Methylierung. Die *SYNM* Promotormethylierung war demnach mit einer niedrigen 5-Jahres RFÜ Wahrscheinlichkeit von $29\% \pm 12\%$ assoziiert, wohingegen Patientinnen ohne aberrante *SYNM* Methylierung eine wesentlich höhere 5 Jahres RFÜ Wahrscheinlichkeit hatten ($70\% \pm 6\%$) (Abb. 3-10a).

Eine Subgruppenanalyse zeigte die prognostische Qualität der *SYNM* Promotormethylierung für pN positive Patientinnen. Frauen mit Lymphknotenmetastasen und *SYNM* Promotormethylierung hatten ein hochsignifikantes schlechteres RFÜ (mittlere RFÜ Zeit: 47.4 ± 9 Monate, $P=0.0094$) als pN positive Patientinnen ohne *SYNM* Methylierung (mittlere RFÜ Zeit: 92.6 ± 8.5 Monate) (Abb. 3-10b). In Abb. 3-10d ist ein direkter Vergleich des Einflusses der *SYNM* Promotormethylierung auf das rezidivfreie Überleben von Nodal-positiven und Nodal-negativen Brustkrebspatientinnen dargestellt. Unabhängig vom *SYNM* Methylierungsstatus hatten Nodal-negative Patientinnen die beste Prognose (5-Jahres RFÜ Wahrscheinlichkeit: $81\% \pm 8\%$, mittlere RFÜ Zeit: 120.1 ± 5 Monate) (Abb. 3-10c und d). Interessanterweise zeigte die Gruppe von Nodal-positiven Patientinnen ohne *SYNM* Methylierung eine unerwartet gute Prognose. Diese Gruppe hatte, mit einer 5 Jahres RFÜ Wahrscheinlichkeit von $62\% \pm 10\%$ und einer mittleren RFÜ Zeit von 92.6 ± 8.5 Monaten, eine deutlich bessere Prognose als Nodal-positive Patientinnen mit *SYNM* Methylierung (5 Jahres RFÜ Wahrscheinlichkeit: $17\% \pm 11\%$, mittleren RFÜ Zeit: 47.4 ± 9 Monaten) (Abb. 3-10d). Es wurde keine signifikante Assoziation zwischen der *SYNM* Methylierung und dem Gesamtüberleben (GÜ) von Brustkrebspatientinnen gefunden (Tab. 3-2).

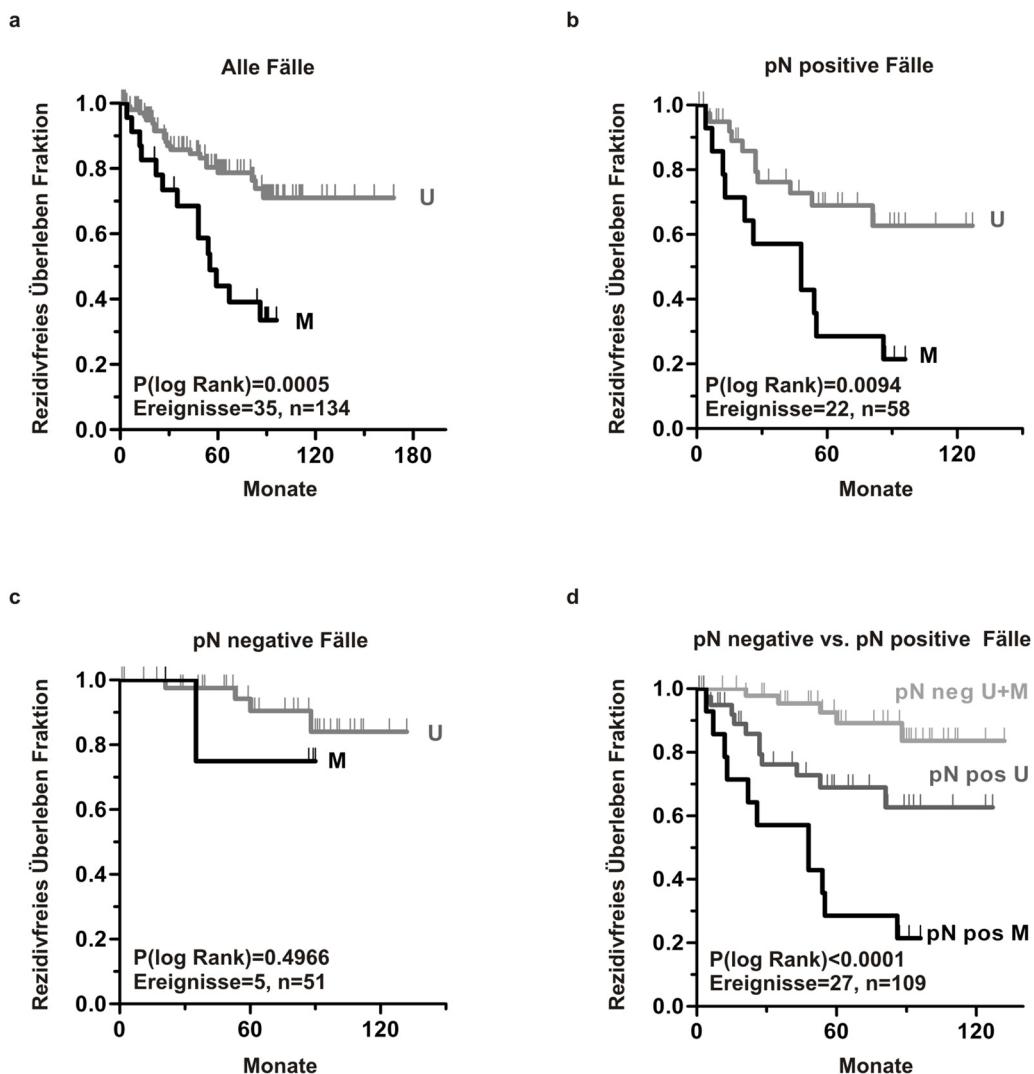


Abb. 3-10: Univariate Kaplan-Meier Analyse des RFÜ in Bezug zur *SYNM* Promotormethylierung. **a:** Die Überlebensfraktion aller Fälle in Abhängigkeit des *SYNM* Promotormethylierungsstatus. **b:** Der prädiktive Wert der *SYNM* Methylierung innerhalb der Patientinnengruppe mit Lymphknotenmetastasen (pN positiv). **c:** Illustration der fehlenden prädiktiven Qualität der *SYNM* Methylierung für Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen (pN negativ). **d:** Vergleichende Darstellung des Einflusses der *SYNM* Promotormethylierung auf die Prädiktion des RFÜ von pN positiven und pN negativen Patientinnen. U: Patientinnen ohne *SYNM* Methylierung, M: Patientinnen mit *SYNM* Methylierung. Vertikale Linien: zensierte Fälle

3.9 Die multivariate Überlebensanalyse in Bezug zur *SYNM* Methylierung

Die multivariate Cox Regressionsanalyse diente zur Prüfung, ob die hier beobachtete univariate prognostische Assoziation der *SYNM* Methylierung mit dem rezidivfreien Überleben von anderen Prognosefaktoren (Kovariaten) des Mammakarzinoms unabhängig ist und demnach einen eigenständigen prognostisch relevanten Informationsgewinn bietet. In dem berechneten Regressionsmodell wurden, neben der *SYNM* Methylierung, alle Prognosefaktoren eingeschlossen, die in der univariaten Analyse eine Assoziation zum RFÜ mit einer P-Wert Grenze von 20% aufwiesen (Mickey und Greenland, 1989). Die Selektion beschränkte sich deshalb auf den Lymphknotenstatus ($P<0.0001$), die Tumogröße

($P=0.1358$), den Progesteronrezeptorstatus ($P=0.0162$), die histologische Tumorgraduierung ($P=0.0183$) und die *SYNM* Promotormethylierung ($P=0.0005$) (vgl. Tab. 3-2). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab. 3-3 zusammengefasst. Das Modell ergab, dass die *SYNM* Promotormethylierung ein prognostisch unabhängiger Faktor für das rezidivfreie Überleben von Mammakarzinompatientinnen darstellt ($P=0.0282$). Brustkrebspatientinnen mit *SYNM* Promotormethylierung haben demnach ein fast dreifach gesteigertes Rezidivrisiko (HR= 2.941), verglichen mit Patientinnen ohne *SYNM* Methylierung (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Multivariates Cox Regressionsmodell prognostischer Faktoren und der *SYNM* Methylierung

Variabel	HR	P-Wert	95% KI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
<i>SYNM</i> Methylierung				
Negativ	1.000			
Positiv	2.941	0.0282	1.122	7.710
Lymphknotenstatus^a				
Negativ	1.000			
Positiv	4.974	0.0055	1.600	15.466
Tumogröße^a				
pT1	1.000			
pT2-4	0.896	0.8230	0.343	2.344
Progesteronrezeptorstatus				
Negativ (IRS^b 0-2)	1.000			
Positiv (IRS 3-12)	0.409	0.0690	0.156	1.072
Histologische Tumorgraduierung^c				
G1-2	1.000			
G3	1.223	0.6402	0.525	2.848

^aEntsprechend der TNM Klassifikation nach Sobin und Wittekind (Sobin und Wittekind, 1997). ^bIRS= Immunreaktiver Score nach Remmeli und Stegner (Remmeli und Stegner, 1987). ^cNach Bloom und Richardson und modifiziert durch Elston und Ellis (Elston und Ellis, 1993). Fettdruck: Signifikante P-Werte (<0.05). HR= Hazard Rate. KI= Konfidenzintervall

3.10 Die Generierung von KPNA2 überexprimierenden Brustkrebszelllinien

Die tumorspezifische KPNA2 Überexpression und eine damit assoziierte schlechte Tumordifferenzierung und Überlebensprognose wurde in Tumorproben von Mammakarzinompatientinnen bereits vor Beginn dieser Arbeit beschrieben (Dahl et al., 2006b; Dankof et al., 2007b; Gluz et al., 2008c). Diese deskriptiven Daten bilden die Basis für die weiterführende funktionelle Charakterisierung der KPNA2 Wirkung in humanen Brustkrebszelllinien. Im Rahmen dieser Arbeit sollten stabile KPNA2 Expressionsmodelle (*gain-of-function*) *in vitro* generiert werden. Für die stabile Integration des pTREx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektors in humane Mammakarzinomzelllinien mussten in einem ersten Schritt geeignete Rezipienten (Zelllinien) ausgewählt werden und der KPNA2 Expressionsvektor auf seine Funktionalität hin überprüft werden.

3.10.1 Die KPNA2 Überexpression in Brustkrebszelllinien

Im Folgenden sollten die KPNA2 Expressionsstärke in benignen und malignen humanen Mammakarzinomzelllinien charakterisiert werden. Hierfür wurde die KPNA2 Expression zuerst auf mRNA-Ebene und anschließend auf Proteinebene bestimmt, um dann eine Zelllinie mit niedriger KPNA2 Expression sowie eine Linie mit moderat gesteigerter KPNA2 Expression, für die Generierung stabiler KPNA2 Expressionstransfektanten, auszuwählen. Die relative KPNA2 mRNA Expressionsstärke wurde initial mittels *Real-Time* PCR bestimmt (Abb. 3-11). Es zeigte sich, dass die KPNA2 mRNA-Expression, im Vergleich zu den beiden benignen Brustkrebszelllinien MCF10A und MCF12A, in sieben von den acht analysierten malignen Zelllinien deutlich gesteigert war (FC Median: 3.9). Eine moderate KPNA2 Aufregulation war in SKBR3, MCF7 und T47D nachweisbar. Die hochinvasive Zelllinie HS578-T wies mit Abstand die höchste KPNA2 Expression auf (FC=15.1) (Abb. 3-11).

Nachdem die Expressionsstärke von KPNA2 auf Transkriptionsebene ermittelt wurde, sollte in einem nächsten Schritt die tatsächlich in der Zelle vorhandene KPNA2 Proteinmenge in den beiden Kandidaten Zelllinien MCF10A und MCF7 für die Transfektion nachgewiesen werden. Hierzu wurden gleiche Zelllysatmengen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, das KPNA2 Protein durch anschließendes Immunoblotting nachgewiesen und die KPNA2 Bandenstärken densitometrisch ausgewertet. Die KPNA2 Expressionstärke wurde auf das konstitutiv exprimierte Haushaltsprotein β -Aktin normiert. MCF7 Zellen wiesen, verglichen mit MCF10A Zellen, eine 410%ige Aufregulation des KPNA2 Proteins auf (Abb. 3-12). Der Vergleich der KPNA2 mRNA (FC=5.9) und Proteinmengen (FC=5.1) in MCF10A und MCF7, deutet auf eine direkte Korrelation zwischen Transkriptions- und Translationsebene der KPNA2 Biosynthese hin. Auf Grund seiner moderaten aber nicht zu starken KPNA2 Überexpression, wurde die nicht-invasive Zelllinie MCF7 für die stabile Transfektion mit

einem KPNA2 Expressionsvektor ausgewählt. Als beniges KPNA2 Expressionsmodell wurde MCF10A als Rezipient für die Transfektion ausgewählt.

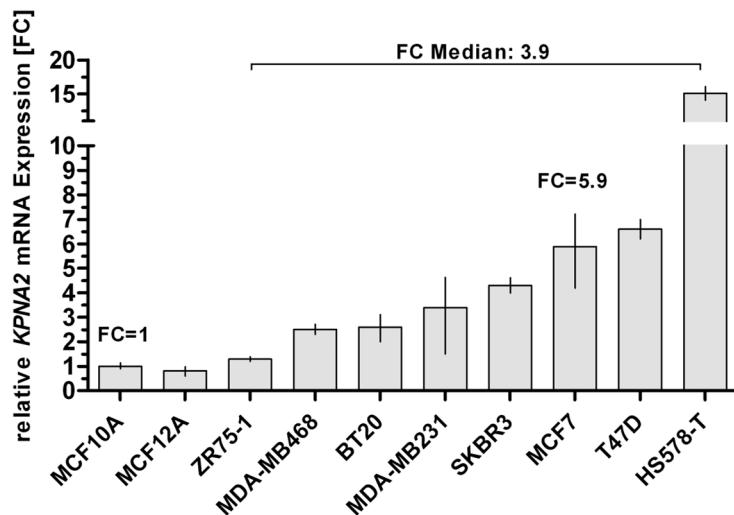


Abb. 3-11: Die KPNA2 mRNA Expression in zehn humanen Mammakarzinomzelllinien. Dargestellt ist die KPNA2 mRNA Expression in Relation zu der Expression des Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Alle Werte sind auf die basale KPNA2 Expression in der benignen Zelllinie MCF10A normiert (=1). Die beiden benignen Brustkrebszelllinien MCF10A und MCF12A zeigen, im Vergleich zu den acht malignen Zelllinien, die geringste KPNA2 Expression. FC= Fold Change, vertikale Linien: \pm Fehler. Horizontale Linie: Fraktion der KPNA2 aufregulierten malignen Mammakarzinomzelllinien (FC \geq 2)

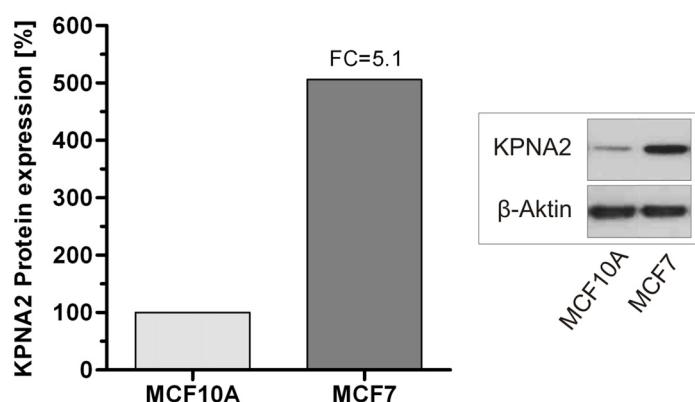


Abb. 3-12: Die KPNA2 Proteinexpression in MCF10A und MCF7. Für die densitometrische Auswertung wurden die KPNA2 Proteinbändern in Relation zu den β -Aktin Bändern der entsprechenden Proben gesetzt. Die KPNA2 Expression in MCF10A wurde für die Normierung gleich 100% gesetzt und daraus die KPNA2 Überexpression in MCF7 bestimmt. MCF7 Zellen zeigten eine 5.1 fach gesteigerte KPNA2 Expression als MCF10A Zellen. FC: Fold Change

3.10.2 Funktionstest des pT-REx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektors

Bevor mit der stabilen Transfektion begonnen werden konnte, musste die Funktionalität des pT-REx-DEST30/KPNA2-Vektors in MCF10A und MCF7 Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wurde die KPNA2 mRNA- und Proteinexpression 48 Stunden nach transienter Transfektion mit dem KPNA2 Vektor oder dem entsprechendem Leervektor (pT-REx-DEST30/Leer) gemessen. Als Positivkontrolle für die Transfektionseffizienz wurden die Zelllinien in einem Parallelansatz auf gleiche Weise mit einem Grün-fluoreszierendem Protein (GFP) exprimierendem Vektor transfiziert (Abb. 3-13).

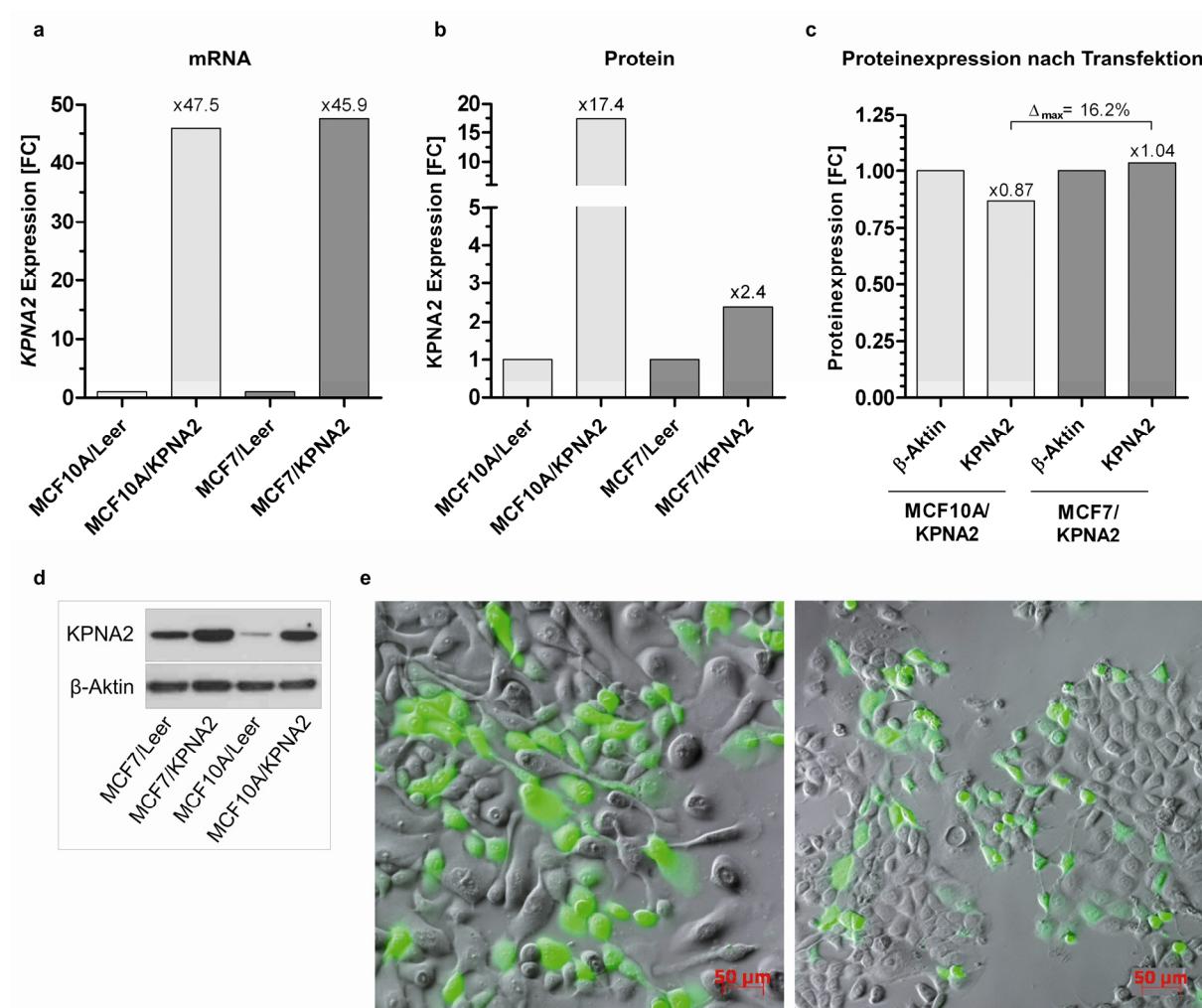


Abb. 3-13: Funktionstest des pT-REx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektors. a: KPNA2 mRNA und (b) Proteinexpression nach der Transfektion mit einem Leervektor (pT-REx-DEST30/Leer) und dem KPNA2 Vektor (pT-REx-DEST30/KPNA2). Die KPNA2 Expression wurde jeweils auf die Expression in den Leer transfizierten Zellen normiert (FC=1). c: Darstellung der absoluten KPNA2 Proteinmenge (Δ_{max}) in KPNA2 transfizierten MCF10A und MCF7 Zellen in Relation zur Referenz β -Aktin d: Western Blot für KPNA2 und das Referenzprotein β -Aktin, die für die densitometrische Auswertung verwendet wurden. e: GFP Vektor transfizierte Zellen (MCF10A, links und MCF7, rechts) dienten als Kontrolle für die Transfektionseffizienz. Kombination aus einer Durchlicht- und einer Fluoreszenzaufnahme (FITC Filter: 506/529nm). FC: Fold Change

Nach Transfektion mit dem Vollvektor zeigten MCF10A/KPNA2 und MCF7/KPNA2 Zellen, mit Werten von 47.5 bzw. 45.9, eine ähnlich starke Induktion der *KPNA2* mRNA Expression (Abb. 3-13a). Auf Proteinebene waren die Induktionswerte der *KPNA2* Expression differenzieller. MCF10A/KPNA2 Zellen wiesen eine 17.4 fache Steigerung der *KPNA2* Proteinexpression auf, MCF7/KPNA2 Zellen hingegen, zeigten eine Steigerung um Faktor 2.4 (Abb. 3-13b und c). Die Transfektionseffizienz war jedoch bei beiden Zelllinien mit 40-50% ähnlich (Abb. 3-13e). Die maximalen *KPNA2* Proteinmengen waren wiederum in MCF10A/KPNA2 und MCF7/KPNA2 Zellen, trotz unterschiedlicher *KPNA2* Ausgangsmengen und Induktionsstärken, ähnlich stark ($\Delta\text{max}=16\%$) (Abb. 3-13c und d). Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Sättigung der *KPNA2* Proteinexpression, also dem durch eine Transfektion maximal erreichbaren Wert, in MCF10A/KPNA2 und MCF7/KPNA2 Zellen hin. Durch diesen Versuch konnte die Funktionalität des pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektors in den beiden humanen Mammakarzinomzelllinien bestätigt werden und die zu erwartenden *KPNA2* Expressionsstärken in den stabilen Transfektanden abgeschätzt werden.

3.10.3 Stabile Transfektion mit dem Tet-Repressor Expressionsvektor

In dieser Arbeit sollten MCF10A und MCF7 Zelllinien generiert werden, bei denen eine *KPNA2* Überexpression induzierbar und somit steuerbar war. Zu diesem Zweck wurde das Tetracyclin regulierte T-Rex™ Tet-On Vektorsystem (Invitrogen) verwendet. Es besteht aus einem Tet-Repressor (TR) Expressionsplasmid (pcDNA6/TR) und dem *KPNA2* Expressionsplasmid (pT-REx-DEST30/KPNA2), welche sequenziell in die Rezipienten transfiziert werden. Nach stabiler Integration beider Plasmide in das Genom der Empfängerzelle, wird der CMV Promotor des *KPNA2* Vektors durch das konstitutiv gebildete Tet-Repressor Protein inhibiert. Erst durch Zugabe von Tetracyclin, einem Tet-Repressor Inhibitor, wird der Tet-Repressor abgefangen und die *KPNA2* Expression wird angeschaltet. Dieser Vorgang ist reversibel, das bedeutet nach Wegnahme von Tetracyclin, wird der CMV Promoter erneut durch Anbindung des Tet-Repressors an das Tet-Operon blockiert. Die Selektion der MCF10A/TR und MCF7/TR Klone erfolgte über die Blasticidin Resistenz des pcDNA6/TR Vektors. Der Selektionsdruck für MCF10A/TR und MCF7/TR Klone betrug 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin. Die isolierten Klone wurden einem Funktionstest bezüglich der Tet-Repressor Expressionsstärke unterzogen (Abb. 3-14). Für die weitere Transfektion mit dem *KPNA2* Expressionsvektor wurden solche TR-Klone benötigt, die über eine gute Repressions- und Induktionsfähigkeit verfügen. Diese Eigenschaften werden durch die Tet-Repressor Expressionsstärke bestimmt. Für den Test wurden je drei MCF10A/TR und MCF7/TR Klone transient mit einem Tet-Repressor regulierten β -Galaktosidase Expressionsvektor (pcDNA4/TO/lacZ) transfiziert. Anschließend wurden die Transfektanden mit bzw. ohne Tetracyclin Induktion mittels X-Gal-Färbung einer Blau/Weiß-Selektion unterzogen (Abb. 3-14).

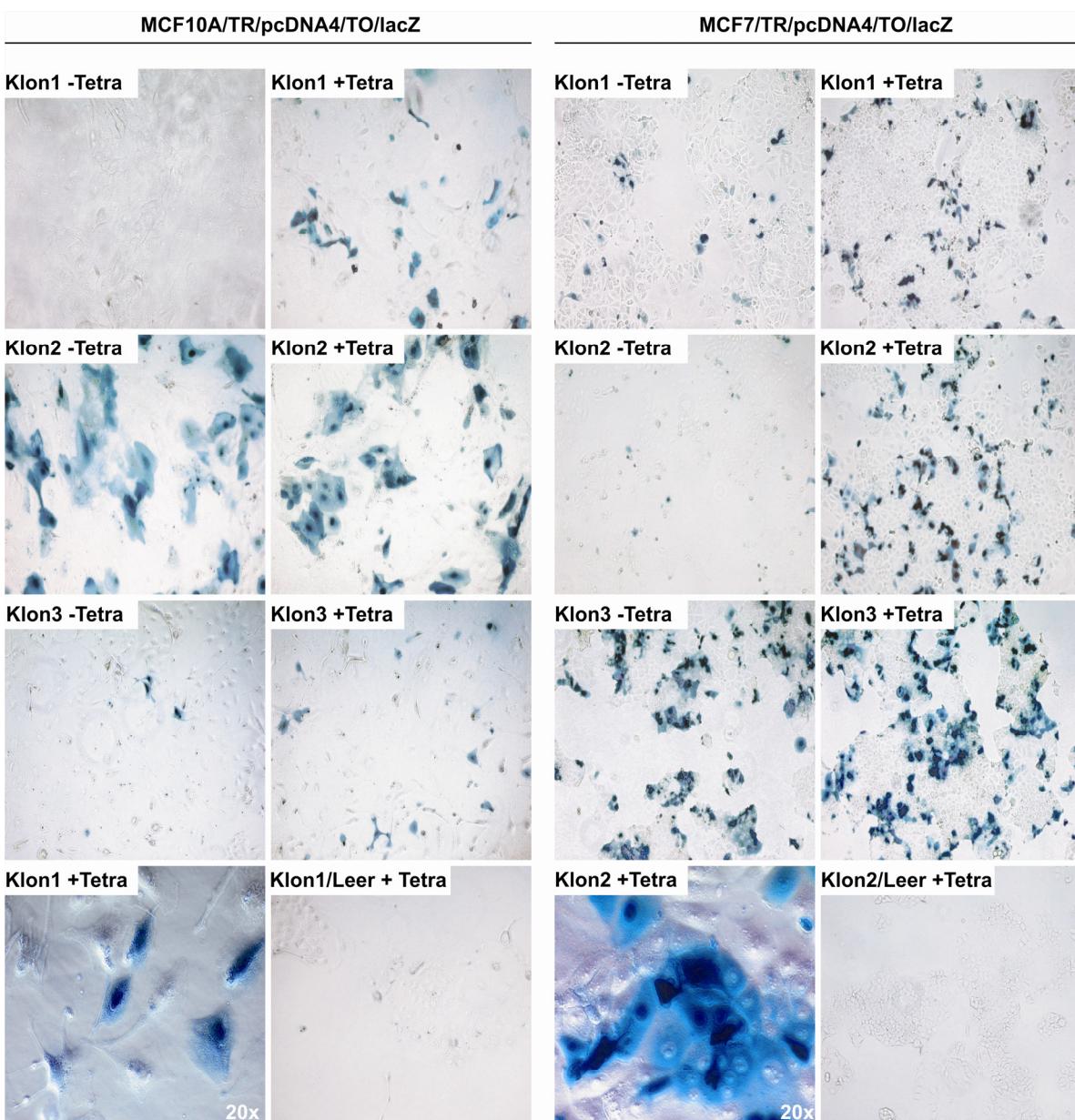


Abb. 3-14: Funktionstest der MCF10A und MCF7 Tet-Repressorklone. Dargestellt ist die β -Galaktosidase (β -Gal) Expression von je drei pCDNA4/TO/lacZ transfizierten Zellen (Klone 1-3) ohne und mit Tetracyclin (-/+ Tetra). Für die Sichtbarmachung der β -Gal Proteinexpression wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion, und anschließender 48 Stunden Tetracyclin-Induktion, vier Stunden mit einer X-Galaktosidase (X-Gal) Färbelösung inkubiert. lacZ positive Zellen setzen X-Gal zu einem blauen Farbstoff um, was in einer Blaufärbung der Zellkörper resultiert. Als Negativkontrolle dienten TetR-Klone, die anstatt mit dem lacZ-Vektor mit H_2O transfiziert wurde. Bei MCF10A wies Klon1 eine 100% Repression sowie eine gute Indizierbarkeit auf. Bei MCF7 zeigte Klon2 die beste Repression mit einer gleichzeitig hohen Induktionsfähigkeit. Originalvergrößerung: 5x wenn nicht anders angegeben

Der gestestete MCF10A/TR Klon1 zeigte in Abwesenheit von Tetracyclin keine Blaufärbung der Zellen. Demnach war die TR Expression in diesem Klon stark genug, um den Promotor des lacZ Vektors effektiv zu blockieren. Gleichzeitig wurde der Tet-Repressor nach Tetracyclin Zugabe ausreichend abgefangen, was sich in einer deutlichen β -Galaktosidase Expression und Blaufärbung der Kolonien wiederspiegeln (Abb. 3-14, links). Ein ähnliches Resultat ergab sich für den MCF7/TR Klon2. Im Grundzustand waren nur vereinzelt blaue

Zellen zu erkennen, was eine fast vollständige Repression des lacZ Vektors zurückzuführen war. Andererseits war nach Zugabe von Tetracyclin eine deutliche Blaufärbung der Zellen sichtbar, was durch eine starke Induktion der β -Galaktosidase Expression hervorgerufen worden sein musste (Abb. 3-14, rechts). Die anderen getesteten MCF10A/TR und MCF7/TR Klone zeigten entweder keine effiziente Repression oder keine ausreichende Induktion der β -Galaktosidase Expression (Abb. 3-14, MCF10A/TR Klon2 und 3, MCF7/TR Klon1 und 3). Diese Klone waren somit für das vorgesehene TR kontrollierte KPNA2 Expressionssystem ungeeignet und wurden verworfen. Durch diesen Versuch konnte für MCF10A/TR und MCF7/TR je ein geeigneter Klon mit zufriedenstellender Funktionalität für die subsequenzielle Ko-Transfektion mit dem pT-REx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektor identifiziert werden.

3.10.4 Stabile Transfektion mit dem KPNA2 Expressionsvektor

Nach dem stabile MCF10A/TR und MCF7/TR Transfektanden generiert worden waren, sollte in einem zweiten Schritt der TetR-regulierbare pT-REx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektor stabil in diese Klone integriert werden. Der Doppelselektion der MCF10A/TR/KPNA2 und MCF7/TR/KPNA2 Klone erfolgte über die Blasticidin Resistenz des pcDNA6/TR (7.5 μ g/ml Blasticidin) und der Genetecin Resistenz des pT-REx-DEST30 Vektor (500 μ g/ml Genetecin). Vor Beginn der Transfektion wurde der notwendige Selektionsdruck über entsprechende Blasticidin/Genetecin Verdünnungsreihen mit den Wildtypzellen bestimmt (siehe Material und Methoden 2.14.8). Daraus ergab sich für die Selektion von MCF10A/TR/KPNA2 Klonen eine Blasticidin Konzentration von 10 μ g/ml Blasticidin bzw. 600 μ g/ml Genetecin und für MCF7/TR/KPNA2 Klone eine Blasticidin Konzentration von 7.5 μ g/ml Blasticidin bzw. 500 μ g/ml Genetecin. Insgesamt wurden 23 MCF7/TR/KPNA2 und acht entsprechende Leerklonen (MCF7/TR/Leer) in Reinkultur gebracht. Für einen spezifischen Nachweis des pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektors, wurden exemplarisch zwei MCF7TR/KPNA2 Klone (V6, V9) sowie der Leerklon 7 einer Kontroll-PCR unterzogen. Durch Auswahl von PCR-Primerpaaren für die spezifische Amplifikation von vektoriellen und von Vektor/KPNA2 Sequenzen, konnte die stabile Integration des KPNA2-ORF, in das Genom der MCF7/TR/KPNA2 Zellen auf genomischer Ebene bestätigt werden. Die Position der Vollvektor spezifischen Primer-Paare wurde so gewählt, dass der 3'-Übergang zwischen Vektorpromotor und KPNA2-ORF oder der Übergang zwischen dem 5'-Ende des KPNA2-ORF und 5'-UTR Bereichs des Vektors amplifiziert werden konnte (Abb. 3-15a). Erwartungsgemäß waren die Voll- und Leerklonen für die Vektorsequenz positiv. Die KPNA2-spezifischen Sequenzen waren ausschließlich in den beiden Vollklonen nachweisbar. Der MCF Wildtyp (WT) war entsprechend für alle getesteten Sequenzen negativ (Abb. 3-15b).

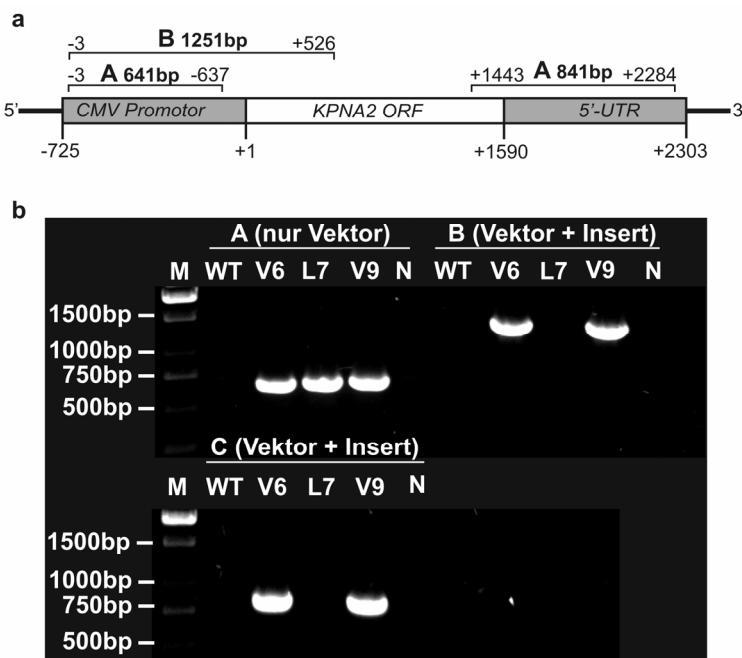


Abb. 3-15: Kontroll-PCR für stabile MCF7/TR/KPNA2 Transfektanten. Für einen sicheren Nachweis des pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektors, wurde die genomische DNA von MCF7 WT Zellen, von MCF7/TR/KPNA2 Klon 6 (V6) und 9 (V9) sowie von MCF7/TR/Leer Klon 7 (L7), mittels RT PCR analysiert. **a:** Schematische Darstellung der Position der RT PCR Primer-Paare innerhalb des analysierten pT-REx-DEST30/KPNA2 Sequenzbereichs. Je Zelltyp wurde eine pT-REx-DEST30 spezifische Sequenz (A) sowie zwei KPNA2 Vollvektor spezifische Sequenzen amplifiziert (B und C). **b:** Agarosegel mit den Amplifikaten (A, B und C) der RT PCR. N= NTC

Die stabile Transfektion des MCF10A/TR Klon 1 mit dem pT-REx-DEST30/KPNA2 verlief ohne zufriedenstellenden Erfolg und musste nach dreimaligem Versuch, aus zeitökonomischen Gründen, eingestellt werden. Alle Klone wurden unter ständigem Selektionsdruck gehalten, um eine Abstoßung der pcDNA6/TR und pT-REx-DEST30/KPNA2 Vektorsequenzen zu supprimieren. Die wenigen Klone die isoliert werden konnten, zeigten einen inhomogenen Phänotyp und zeichneten sich durch mangelndes Wachstum aus, was eine Kultivierung unmöglich machte. Die in Reinkultur gebrachten MCF7/TR/KPNA2 Klone wurden bezüglich ihrer KPNA2 mRNA-Expression, vor und nach Tetracyclin Induktion [1µg/ml] analysiert (Abb. 3-16). Die Mehrheit der MCF7/TR/KPNA2 Vollklone (78%, 18/23) zeigte einen deutlichen Anstieg der KPNA2 Expression (FC>2) nach Tetracyclin Induktion (Abb. 3-16a). Der mediane Anstieg der KPNA2 Induktion innerhalb der MCF7/TR/KPNA2 Vollklone war hochsignifikant ($P<0.001$) und betrug 2.8 ± 1.1 (Spannweite: 1.2-5.7, 25-75% Quartile: 1.8-3.7) (Abb. 3-16c). Erwartungsgemäß zeigte kein MCF7/TR/Leer Klon eine signifikante Änderung der KPNA2 Expression in Abhängigkeit von Tetracyclin $1.1 \pm$ (STABW) 0.17 (Spannweite: 0.7-1.2, 25-75% Quartile: 0.8-1.2). (Abb. 3-16b). Somit konnten Vektorunabhängige unspezifische Einflüsse von Tetracyclin auf die KPNA2 Expression ausgeschlossen werden.

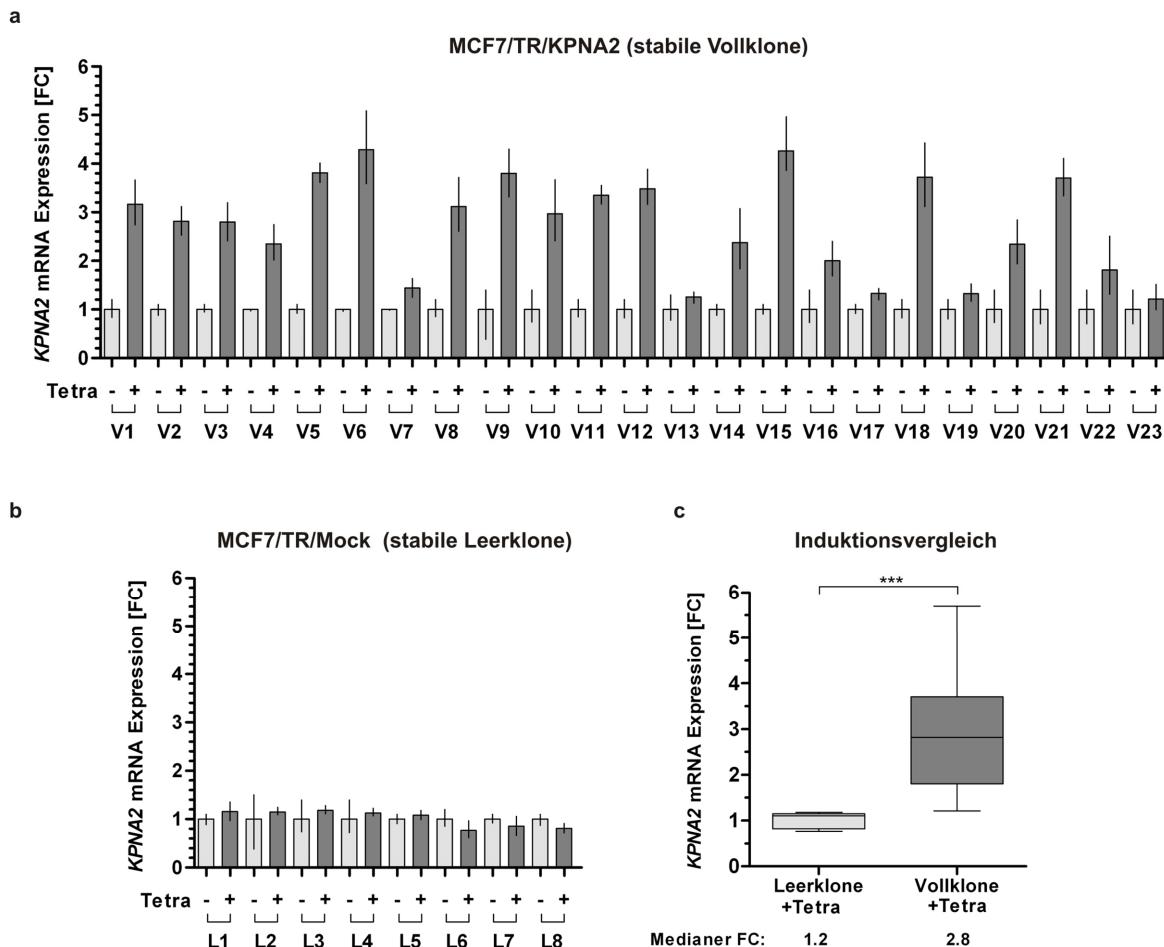


Abb. 3-16: KPNA2 mRNA Expression in MCF7/TR/KPNA2- und MCF7/TR/Leer Klonen. **a:** Übersicht der KPNA2 Expression (als FC) in 23 MCF7/TR/KPNA2 Klonen (V) vor (-) und nach (+) 48 Stunden Induktion mit Tetracyclin [1 μ g/ml]. Die KPNA2 Expression in den nicht-induzierten Klonen (-) diente als Normierung für den korrespondierenden induzierten Klon (FC=1). **b:** Entsprechende Übersicht der KPNA2 Expression in acht MCF7/TR/Leer Klonen (L) (\pm Tetracyclin). Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. **c:** Box Plot zum Gruppenvergleich der Änderung der KPNA2 Expression nach Tetracyclin Induktion in den analysierten MCF7 Leer- und Vollklonen. ***: P<0.001, horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum. Box: 25% bis 75% Quartile, zweiseitiger Mann-Whitney U Test

3.10.5 Optimierung der KPNA2 Induktion in MCF7/TR/KPNA2 Klonen

Nachdem der Erfolg der stabilen Transfektion für MCF7/TR/KPNA2 Zellen auf mRNA-Ebene und auf genomischer Ebene bestätigt werden konnte, sollte nun die Induzierbarkeit der KPNA2-Proteinexpression optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei MCF7/TR/KPNA2 Klonen (V9 und V18), die auf mRNA-Ebene eine gute Induzierbarkeit aufwiesen (vgl. Abb. 3-16a), exemplarisch verschiedenen Tetracyclin Konzentrationen und Inkubationszeiten ausgesetzt. Die KPNA2 Induktion nach 48 Stunden Inkubation mit 1 bzw. 2 μ g/ml Tetracyclin war in V9 3.8 fach bzw. 4.2 fach und in V18 3.8 fach bzw. 3.4 fach. Eine Verdoppelung der Tetracyclin Konzentration [2 μ g/ml] führte zu keiner signifikanten Steigerung (Abb. 3-17a und b). Aus diesem Grund wurde 1 μ g/ml Tetracyclin als ausreichend für die maximal erreichbare KPNA2 Induktion in MCF7 Vollklonen determiniert. Die hier

bestimmte optimale Tetracyclin Konzentration von 1 μ g/ml entsprach der in einer bereits publizierten Studie zur Optimierung des pT-Rex-Systems in Nierenzellen (HEK293) verwendeten Menge (Jones et al., 2005). Die mitgeführte Wildtypkontrolle sowie die Leerklonkontrolle zeigte erwartungsgemäß keine Änderung der KPNA2 Expression vor und nach Tetracyclin Induktion. Für die Bestimmung der optimalen Dauer der KPNA2 Induktion wurde der MCF7TR/KPNA2 Klon 9 für 0, 24, 48 und 72 Stunden mit 1 μ g/ml Tetracyclin inkubiert (Abb. 3-17c und d). Es stellte sich heraus, dass, abgesehen von geringfügigen Varianzen, schon nach 24 Stunden eine ausreichend deutliche KPNA2 Induktion in V9 erreicht wurde (Abb. 3-17d). Durch diese Versuche konnten die optimalen Bedingungen für die KPNA2 Induktion in den stabilen MCF7/TR/KPNA2 Transfektanden bestimmt werden. Für alle nachfolgenden funktionellen Analysen wurden die untersuchten Klone für mindestens 48 Stunden mit 1 μ g/ml Tetracyclin behandelt, um eine effektive KPNA2 Proteininduktion zu gewährleisten.

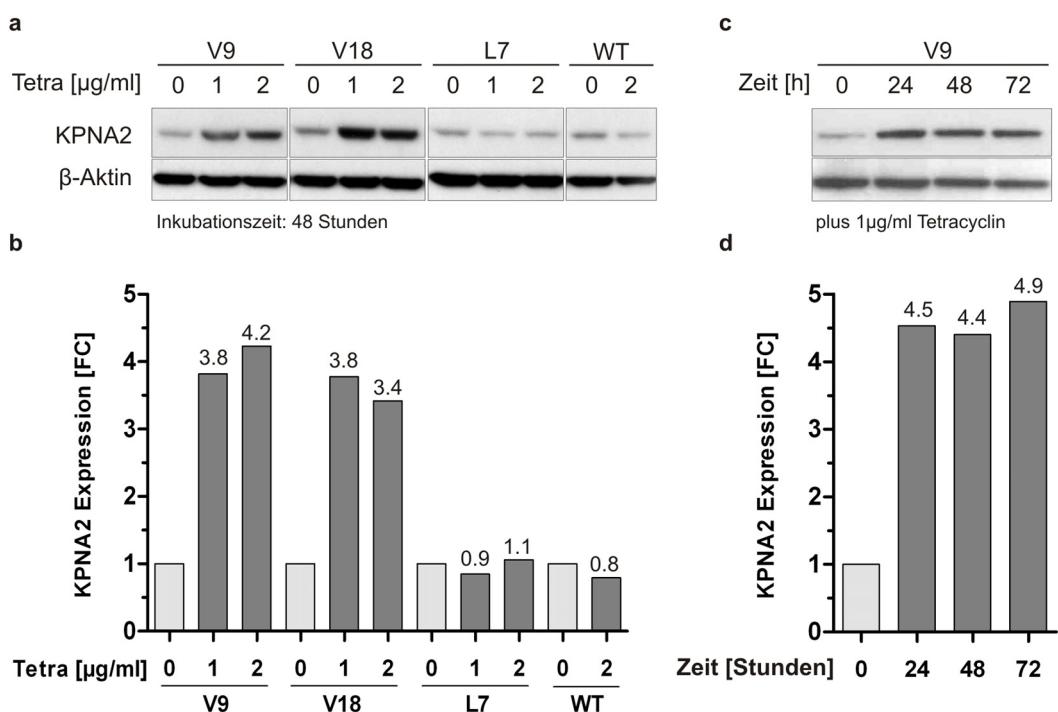


Abb. 3-17: Optimierung der KPNA2 Induktion in MCF7/TR/KPNA2 Klonen. **a:** Western Blot der KPNA2 Expression in Abhängigkeit der Tetracyclin Konzentration in zwei MCF/TR/KPNA2 Klonen (V9, V18) und einem Leerklon (L7) sowie dem MCF7 Wildtyp (WT) als Negativkontrolle. **b:** Densitometrische Auswertung der konzentrationsabhängigen Induktion von Abb. a, als FC. Alle Werte sind normiert auf die nicht-induzierten [0 μ g Tetra] Ansätze (FC=1). **c:** Western Blot der KPNA2 Expression in Abhängigkeit der Induktionsdauer (0 bis 72 Stunden) mit 1 μ g/ml Tetracyclin in V9. **d:** Densitometrische Auswertung der zeitabhängigen Induktion, als FC (b). Alle Werte sind normiert auf den Zeitpunkt 0 Stunden (FC=1)

3.10.6 Validierung der KPNA2 Proteininduktion in MCF7/TR/KPNA2 Klonen

Nachdem die experimentellen Rahmenbedingungen der Tetracyclin regulierten KPNA2 Expression festgelegt waren, sollten nun geeignete Vollklone für die weiterführende funktionelle Analyse der durch eine KPNA2 Überexpression bedingten zellulären Prozesse ausgewählt werden. Hierzu wurden sieben MCF7/TR/KPNA2 Vollklone, die bereits auf mRNA Ebene gute Induktionsraten aufwiesen, erneut mit Tetracyclin behandelt und die KPNA2 Expression auf Proteinebene bewertet (Abb. 3-18). Bei Vollklon 6, 9, 11, V12 und 18, konnte eine signifikante KPNA2 Induktion ($FC \geq 2$) auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die Vollklone 2 und 10 hinhegen zeigten mit einem $FC = 1.3$ bzw. $FC = 1.7$, keine signifikante KPNA2 Überexpression im direkten Vergleich zu den korrespondierenden nicht-induzierten Zellen (Abb. 3-18a, b). Die mediane KPNA2 Aufregulation war jedoch auf die Gesamtheit der getesteten Klone bezogen signifikant und betrug den 4.2 fachen Wert der nicht-induzierten Zellen (Abb. 3-18c). Bei einem Vergleich von mRNA und Proteinmengen, sind gewisse Varianzen nicht ungewöhnlich. Unter diesem Gesichtspunkt schienen die hier ermittelten Expressionswerte, die tatsächlichen KPNA2 Mengen in den induzierten Vollklonen 6, 9, 11, 12 und 18 reproduzierbar wiederzuspiegeln.

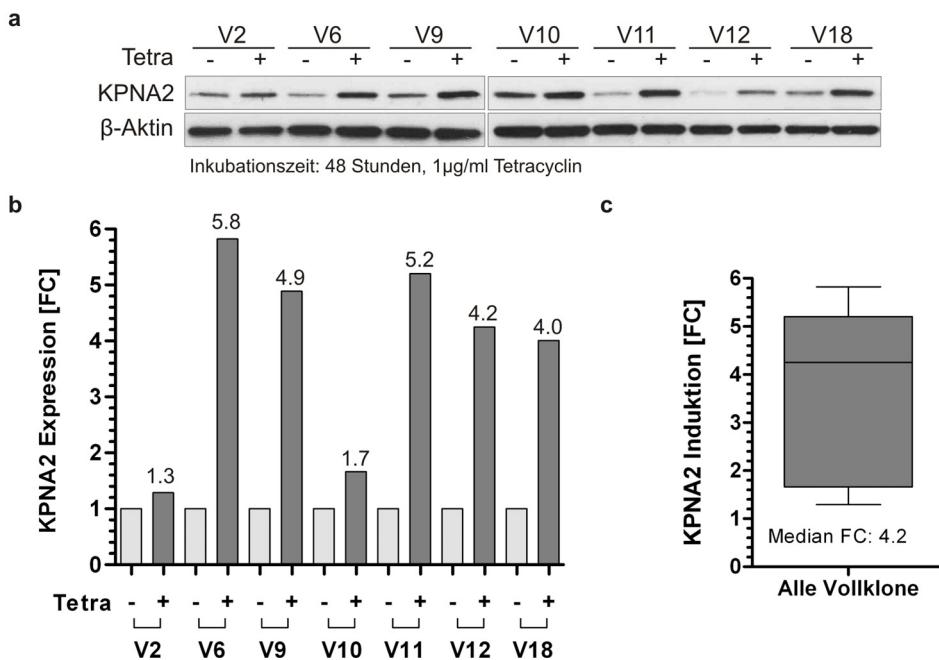


Abb. 3-18: KPNA2 Proteinexpression in MCF7/TR/KPNA2 Klonen. **a:** Western Blot der KPNA2 Expression von sieben MCF7/TR/KPNA2 Vollklonen (V2, V6, V9, V10, V11, V12 und V18) vor (-) und nach (+) Tetracyclin Induktion (1µg/ml, 48 Stunden). **b:** Densitometrische Auswertung des Induktionstest (a). Alle Werte (+) sind auf die korrespondierenden nicht-induzierten Klone (-) normiert ($FC = 1$). **c:** Box Plot Darstellung der Induktionswerte der betrachteten Vollklone. Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum. Box: 25% bis 75% Quartile, zweiseitiger Mann-Whitney U Test

3.10.7 Elektronenmikroskopischer Nachweis von KPNA2 in MCF7/TR/KPNA2 Klonen

Neben den ermittelten absoluten KPNA2 mRNA und Proteinmengen sollte die KPNA2 Überexpression in MCF7/TR/KPNA2 Klonen zusätzlich auf einer hochauflösenden optischen Ebene verifiziert werden. Hierzu wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) für LowyCryl eingebettete Ultradünnsschnitte, in Kombination mit einem Antikörper basierten ImmunoGold (IG) KPNA2 Nachweis, etabliert. Durch Anwendung dieser Technik war es möglich, einzelne KPNA2 Moleküle indirekt über IG-Partikel in Schnittebenen von Einzelzellen sichtbar zu machen. Zudem sollte auf diese Weise eine Aussage über die intrazelluläre Verteilung (IG-Dichte) von KPNA2, zwischen Zytoplasma und Nukleus realisiert werden. In Abb. 3-19 sind repräsentative TEM-Bilder von L7, V6 und V9 gezeigt, die für die Bestimmung der KPNA2 Dichte verwendet wurden. Bei den induzierten V6 und V9 waren deutlich mehr IG-Partikel im Zytoplasma und im Nukleus erkennbar. Im Vergleich dazu erschien die KPNA2 Menge und Verteilung zwischen dem induzierten und nicht-induzierten Leerklon 7 nicht differenziell. Die Detailaufnahme des induzierten Vollklon 9 deutet zudem auf eine funktionelle Assoziation einzelner KPNA2 Moleküle mit einem Kernporenkomplex (NPC) hin (Abb. 3-19 unten links). Für jeden Klon wurde eine Negativkontrolle (NK) mitgeführt, bei der nur der sekundäre IG-markierte Anti-KPNA2 Antikörper appliziert wurde. Keine der Negativkontrollen wies IG-Artefakte auf, was auf eine gute Spezifität des verwendeten IG-Antikörpers schließen lässt (Abb. 3-19 unten rechts). Um eine statistisch valide Aussage über die intrazelluläre Verteilung und Menge von KPNA2 treffen zu können, wurden die an KPNA2 gebundenen IG-Partikel in sechs Einzelzellen je MCF7/TR/KPNA2 und MCF7/TR/Leer Klon ausgezählt [$\text{IG}/\mu\text{m}^2$]. Auch auf dieser Nachweisebene war ein signifikanter Anstieg von KPNA2 Protein ausschließlich in induzierten Vollklonen vorhanden (Abb. 3-20a-d). Zu beobachten war, dass die Tetracyclin Induktion gleichermaßen zu einer erhöhten, zytoplasmatischen und nukleären KPNA2 Dichte führte; z.B. wies Vollklon 11 nach Induktion eine fast zehnfache Menge an nukleärem KPNA2 auf (FC=9.9) (Abb. 3-20c). Der mediane FC der KPNA2 Expression, innerhalb der Gruppe induzierter Vollklone, betrug 2.7 ($P<0.001$) (Abb. 3-20h). Als Negativkontrollen dienten nicht-induzierte Voll- und Leerkline sowie mit Tetracyclin behandelte Leerkline. Sie wiesen untereinander erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede ($P>0.05$, $\text{FC}=0.7-1.2$), bezüglich der intrazellulären Dichte oder der Verteilung (Zytoplasma, Kern) von KPNA2, auf (Abb. 3-20e-h).

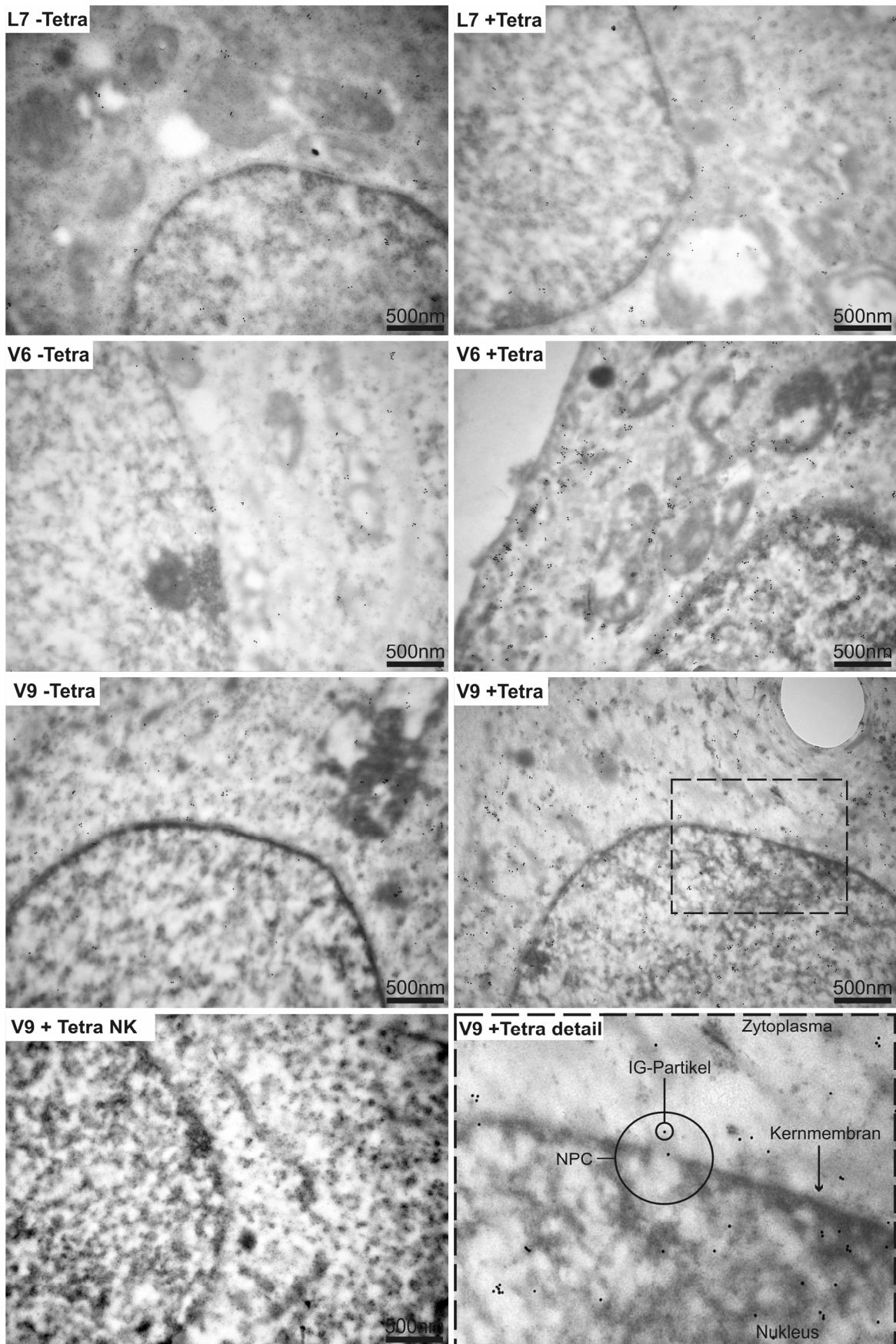


Abb. 3-19: Zelluläre Lokalisation von KPNA2 in MCF7/TR/KPNA2 Klonen. TEM Bilder für den Nachweis und die Auszählung der KPNA2 IG-Partikel (10nm Durchmesser) in mit Tetracyclin [1 μ g/ml] induzierten (+) und nicht-induzierten (-) MCF7/TR/KPNA2 Klonen (V6, V9) und dem Leerklon (L7). Originalvergrößerung aller Bilder: x36000. NPC: Nuclear Pore Complex, NC: Negativkontrolle ohne KPNA2-Antikörper

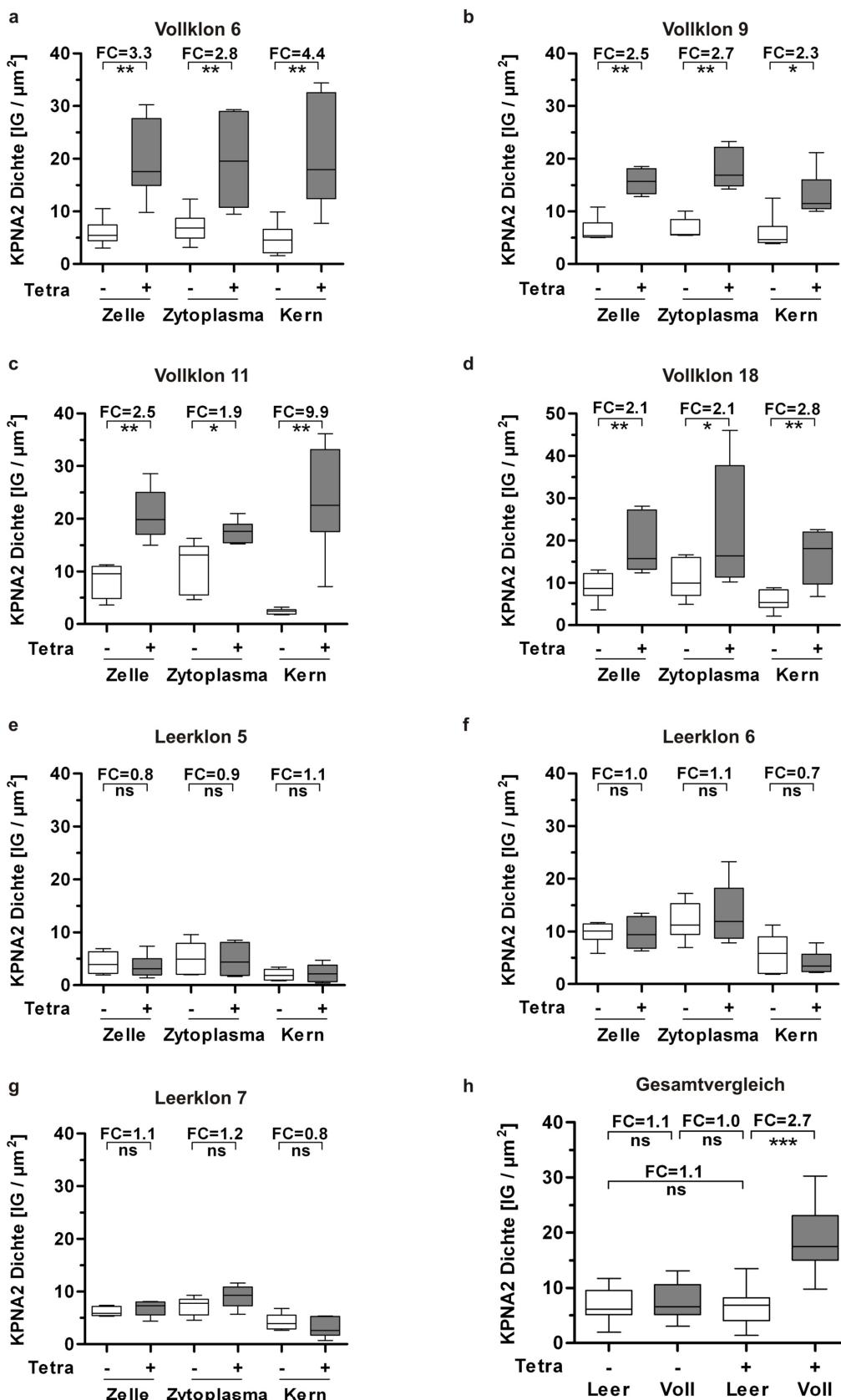


Abb. 3-20: KPNA2 Dichte in MCF7/TR/KPNA2 Klonen. Auszählung der KPNA2 ImmunoGold (IG)-Partikel pro Zellfläche [$\text{IG}/\mu\text{m}^2$] in 4 Vollklonen (a-d) und 3 Leerklonen (e-g) vor (-) und nach (+) Tetracyclin Induktion (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 48 Stunden) im Zytoplasma, dem Kern oder der gesamten Zelle (jeweils sechs Einzelzellen). h: Übersichtsdarstellung der intrazellulären KPNA2 IG Dichte aller Leer- und Vollklone (a-g). ns: nicht signifikant, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$. FC: Fold Change. Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum. Box: 25% bis 75% Quartile, zweiseitiger Mann-Whitney U Test

3.11 Der induzierte KPNA2 Expressionsverlust in MCF7 WT Zellen

Durch die Generierung von KPNA2 defizienten Zellen (*loss-of-function*), sollten die potenziellen Effekte eines KPNA2 Expressionsverlust in Tumorzellen analysiert werden. Hierzu wurde ein induzierter KPNA2 *knock down* mittels RNA Interferenz (RNAi) Technik etabliert. Als Modell diente die maligne Brustkrebszelllinie MCF7, da diese über eine, im Vergleich zu den benignen MCF10A Zellen, deutlich gesteigerte KPNA2 Proteinexpression verfügt (siehe Abb. 3-12). Für die Etablierung wurden zwei unterschiedliche KPNA2 siRNA Oligonukleotide kombiniert und mittels Lipofektion in die Rezipientenzellen transfiziert. Die initiale Transfektion zur Bestimmung des KPNA2 mRNA Verlustes erfolgte über einen Zeitraum von 144 Stunden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb. 3-21a zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass eine effektive Herabregulation der KPNA2 mRNA auf 19.4% der ursprünglichen Menge bereits von nach 48 Stunden vorlag. Die KPNA2 Expression verminderte sich weiterhin auf 7.3% nach 96 Stunden bis hin zu 4.9% nach 144 Stunden. Es konnte somit ein fast vollständiger Verlust der KPNA2 mRNA nach 144 Stunden erreicht werden. Als Negativkontrolle (N) und zur Normierung aller anderen Werte dienten MCF7 Zellen, die mit einer *non-scrambling* siRNA transfiziert wurden. Die KPNA2 mRNA Mengen in den untransfizierten Zellen (U) blieben im Vergleich mit den negativ transfizierten Zellen (N), bis auf marginale wahrscheinlich physiologisch bedingte Varianzen, unverändert. Durch die Mitführung der Negativkontrolle sowie der unbehandelten MCF7 WT Zellen, konnte somit ein unspezifischer Einfluss des Transfektionsreagenz auf die KPNA2 Expression ausgeschlossen werden. Abb. 3-21b zeigt den parallel durchgeföhrten Versuch mit einer kommerziellen Positivkontrolle. Der dargestellte maximale *knock down* der MAP-Kinase 1 (MAPK11) auf 16.5% Ausgangsstärke diente zur Bestätigung der prinzipiellen Funktionalität der Methode. Die Etablierung des induzierten KPNA2 Verlust in MCF7 Zellen war demnach erfolgreich und übertraf in ihrer Effizienz, sogar die Positivkontrolle. Der Grund hierfür könnte die Kombination von zwei verschiedenen KPNA2 siRNA's sein. Der nächste Schritt war nun die Validierung des RNAi bedingten KPNA2 Proteinverlust. Hierzu wurde der Versuch wiederholt, wobei diesmal eine engere zeitliche Abstufung, für die Bestimmung des genauen Zeitpunkts des KPNA2 *knock-down*, vorgenommen wurde. Ab 96 Stunden Transfektion wurde alle 24 Stunden eine Probe für die Western Blot Analyse genommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-21c und d dargestellt. Es zeigte sich, dass ein markanter KPNA2 Proteinverlust auf 66.1% der Ausgangsexpression, nach 96 Stunden, zu verzeichnen war. Ein effektiver, fast vollständiger KPNA2 *knock-down* (4.9% Expressionsstärke) war nach 192 Stunden erreicht.

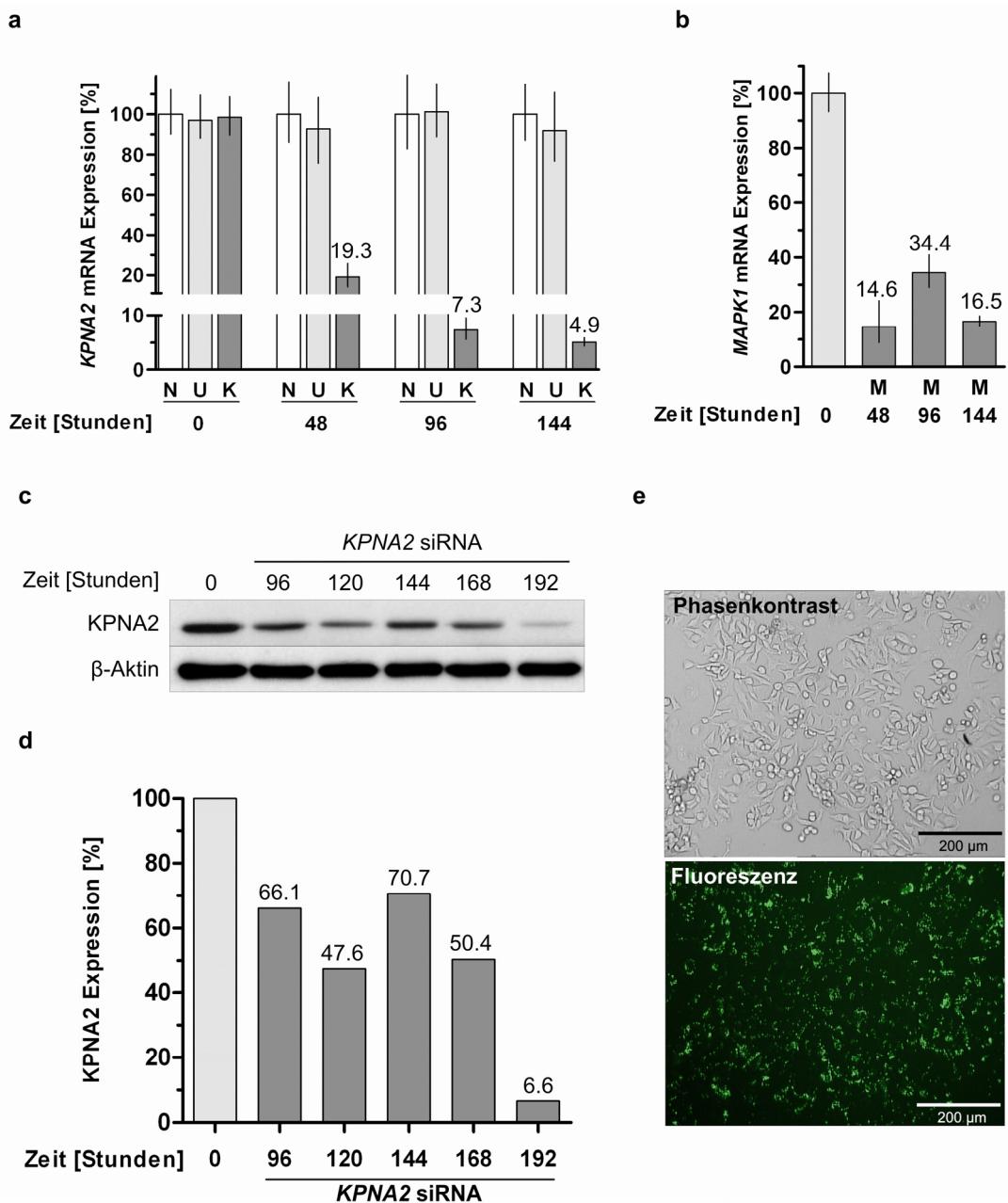


Abb. 3-21: Der RNA Interferenz induzierte KPNA2 Expressionsverlust in MCF7 WT Zellen. Die KPNA2 Expression wurde durch die kombinierte Anwendung von zwei unterschiedlichen KPNA2 spezifische siRNA Oligonukleotiden [je 5 μ M] auf mRNA Ebene (Real-Time PCR) und Proteinebene (WB) herabreguliert. Für den induzierten KPNA2 knock-down wurden 5×10^4 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät und anschließend für insgesamt 192 Stunden mit den siRNAs transfiziert. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt erfolgt die Probennahme für die RNA- bzw. Proteininsolation. **a:** Die KPNA2 mRNA Expression in unbehandelten (U), mit einer non-scrambling siRNA (N) transfizierten und mit den KPNA2 siRNA's transfizierten MCF7 Zellen. Dargestellt ist die Änderung der KPNA2 Expression nach Beginn (0 Stunden) der Transfektion (48-144 Stunden). Alle Werte sind auf die Negativkontrolle (N) normiert (=100%). **b:** Die für die Etablierung verwendete kommerzielle Positivkontrolle. Darstellung der kontinuierlichen Abnahme der MAPK1 mRNA Expression während der Transfektion (48, 96 und 144 Stunden) mit einer spezifischen MAPK1 siRNA [10 μ M]. Alle Werte sind auf die basale MAPK1 Expression in MCF7 Zellen vor Beginn der Transfektion normiert (0 Stunden). Vertikale Linien: \pm Fehler. **c:** Verifizierung des KPNA2 Proteinverlusts (WB) (0 bis 192 Stunden). Die KPNA2 Expression ist auf die Expression von β -Aktin (Ladekontrolle) normiert. **d:** Densitometrische Auswertung des WB. Die siRNA induzierte Abnahme der KPNA2 Expression ist auf die basale KPNA2 Expression in unbehandelten MCF7 Zellen normiert. **e:** Kontrolle der Transfektionseffizienz in MCF7 durch den Nachweis der FITC-markierten non-scrambling siRNA (N). Oben: Phasenkontrastaufnahme der MCF7 Zellen. Unten: FITC Filter (506/529nm)

3.12 Die funktionelle Analyse der KPNA2 Expression in Brustkrebszellen

Durch die vorangegangenen Versuchsreihen konnte, neben den optimalen Parametern für die Tetracyclin regulierte KPNA2 Expression, auch die intrazelluläre Verteilung von KPNA2 bestimmt werden. Der nächste wichtige Schritt war nun, die möglichen funktionellen Auswirkungen auf den Phänotyp der stabilen Transfektanden, bedingt durch die Überexpression von KPNA2, zu analysieren. Da die Generierung von stabilen MCF10A/TR/KPNA2 Transfektanden nicht möglich war, wurden alle funktionellen Analysen mit transient pT-REx-DEST30/KPNA2 transfizierten MCF10A Zellen durchgeführt. Es sollte eine Reihe von funktionellen Tests durchgeführt werden, mit denen fundamentale Eigenschaften von Tumorzellen bewertet werden können. Hierzu zählen, neben einer gesteigerten Proliferation und Migration, eine geminderte Adhäsion und Apoptose (Hanahan und Weinberg, 2000). Ein wesentlicher Vorteil des hier verwendeten TR/KPNA2 Expressionssystems besteht in der Möglichkeit, denselben MCF7/TR/KPNA2 Klon vor und nach KPNA2 Induktion zu analysieren. Für den Versuchsaufbau der funktionellen Tests bedeutete dies, dass die eigentliche Negativkontrolle nicht ein mit Leervektor transfizierter Klon ist, sondern der korrespondierende nicht-induzierte MCF7/TR/KPNA2 Klon. Auf diese Weise erhält man für die Normierung der Messwerte eine individuelle, Klon-spezifische Negativkontrolle. Zusätzlich wurde in den folgenden Experimenten ebenfalls ein Tetracyclin behandelter Leerklon mitgeführt, um einen unspezifischen Einfluss von Tetracyclin auf die gemessenen Effektgrößen ausschließen zu können.

3.12.1 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Zellproliferation

Als erstes sollte das Proliferationsverhalten der benignen MCF10A und der malignen MCF7 Brustkrebszelllinie bestimmt und der potenzielle Effekt einer KPNA2 Überexpression auf diese Eigenschaft analysiert werden. Die Zellproliferation wurde mit einem Test durchgeführt, der auf der mitochondrialen Reduktion (Dehydrogenasen vermittelt) eines Tetrazolium-derivats (XTT) basiert, welche sich durch eine Blaufärbung von vitalen, stoffwechselaktiven Zellen äußert. Der Farbumschlag steht in einem linearen Verhältnis zu der Zellzahl und lässt sich durch Absorptionsmessung quantifizieren. Je Ansatz wurden 5000 Zellen in 96-well Kulturschalen ausgesät. Die Zunahme der Zellzahl wurde alle 24 Stunden über einen Zeitrahmen von vier Tagen gemessen. Für die bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Absorptionswerte je Ansatz auf den gleichen Zeitpunkt (Tag 0) normiert. Der direkte Vergleich von MCF10A und MCF7 Wildtypzellen zeigte, dass die Proliferation in der malignen Brustkrebszelllinie MCF7 moderat gesteigert war (Abb. 3-22a). Die maximale Differenz der Proliferationsrate betrug nach drei Tagen 15.8%. Durch transiente Transfektion der MCF10A Zellen mit dem pT-REx-DEST30/KPNA2 Expressionsvektor, sollte untersucht werden, ob eine KPNA2 Überexpression in den gleichen Zellen zu einer Änderung des Proliferationsverhaltens führt. In Abb. 3-22b ist zu erkennen, dass eine gesteigerte KPNA2

Expression weder zu einer Steigerung noch zu einer Verminderung der Zellproliferation von MCF10A/KPNA2 Zellen führte.

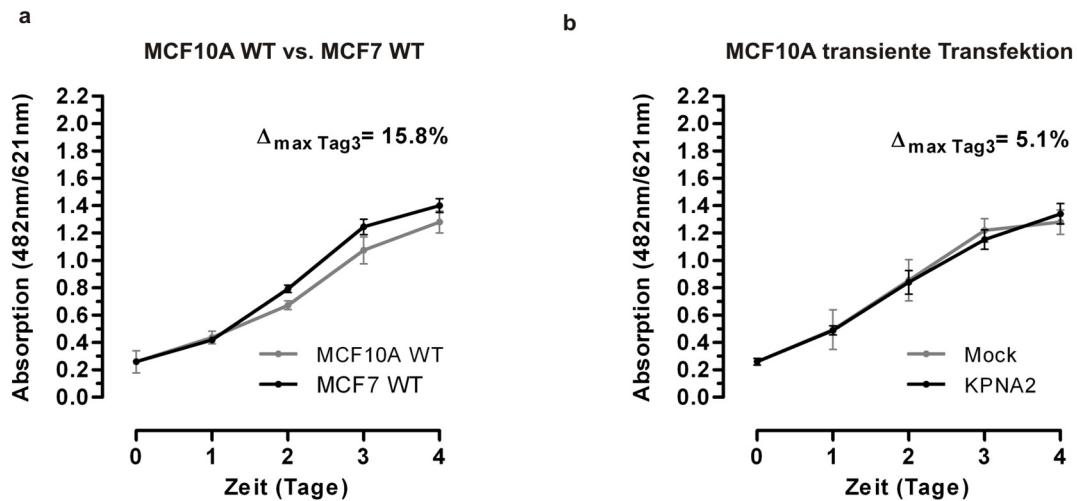


Abb. 3-22: Einfluss der KPNA2 Expression auf die Zellproliferation von MCF7 und MCF10A Zellen. Die kolorimetrische Bestimmung der Zellproliferation (XTT-Test). Die Absorptionsmessungen (490nm/650nm) erfolgten über einen Zeitraum von 4 Tagen. **a:** Vergleichende Darstellung des Proliferationsverhaltens von MCF10A und MCF7 Wildtypzellen. **b:** Die Zellproliferation von pT-Rex-DEST30/KPNA2 und Leervektor transient transfizierter MCF10A Zellen (Mock). Die Transfektion erfolgte 48 Stunden vor Messbeginn (Tag 0). Vertikale Linien: Standardabweichung (STABW) der Dreifachbestimmung. Δ_{\max} : Maximale Differenz der jeweiligen Messreihe. Normierung: Die Werte jeder Versuchsreihe wurden auf Tag 0 normiert

Das Ziel der nächsten Versuchsreihe war, das Proliferationsverhalten von MCF7/TR/KPNA2 Klonen vor und nach KPNA2 Expressionsinduktion zu analysieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-23 zusammengefasst. Insgesamt wurde die Proliferation von fünf Vollklonen (V6, 9, 11, 12 und 18) sowie von Leerklon 7 gemessen. Es zeigte sich, dass die Vollklone 6, 9 und 12 nach KPNA2 Induktion eine maximale Proliferationssteigerung von 37.8%, 12% und 12.9% aufwiesen (Abb. 3-23a, b und d). Die beiden Vollklone 11 und 18 hatten mit 6.5% bzw. 5.3% nur eine sehr geringe Proliferationssteigerung nach Tetracyclin Induktion (Abb. 3-23 c und e). Insgesamt ergab sich für die analysierten MCF7/TR/KPNA2 Vollklone eine durchschnittliche Proliferationssteigerung nach KPNA2 Induktion von 14.9%. Zu ergänzen ist jedoch, dass die nicht mit Tetracyclin behandelten Leerklonzellen, im Vergleich zu den korrespondierenden behandelten Zellen, eine leicht erhöhte Proliferation (9.5%) hatten. Dieses Ergebnis verdeutlicht die nicht zu eliminierende Varianz bei *in vitro* Versuchen und muss bei der Bewertung der Effektgrößen berücksichtigt werden. Dennoch erscheint der beobachtete Effekt einer KPNA2 bedingten Proliferationssteigerung in den MCF7/TR/KPNA2 Vollklonen 6, 9 und 18 valide. Der bei den Wachstumskurven teilweise bereits zu beobachtende Übergang in die stationäre Phase (Abb. 3-23b, e und f) ist mit einer etwas höheren Zellzahl (höhere Grundabsorption) zu Beginn des Versuchs erklärbar. Für die Qualität der

Auswertung ist dieser Effekt jedoch nicht relevant, da die Normierung der Messwerte für jeden Ansatz separat erfolgte. Abschließend lässt sich festhalten, dass maligne MCF7 Brustkrebszellen, die im Vergleich zu der benignen MCF10A Zelllinie über eine fünffach gesteigerte KPNA2 Proteinexpression verfügen, ein ebenfalls gesteigertes Proliferationsverhalten (15.8%) aufweisen. In der Mehrheit (60%) der getesteten MCF7/TR/KPNA2 Klone war die Zellproliferation durch KPNA2 Induktion um 12%-37.8% zusätzlich gesteigert.

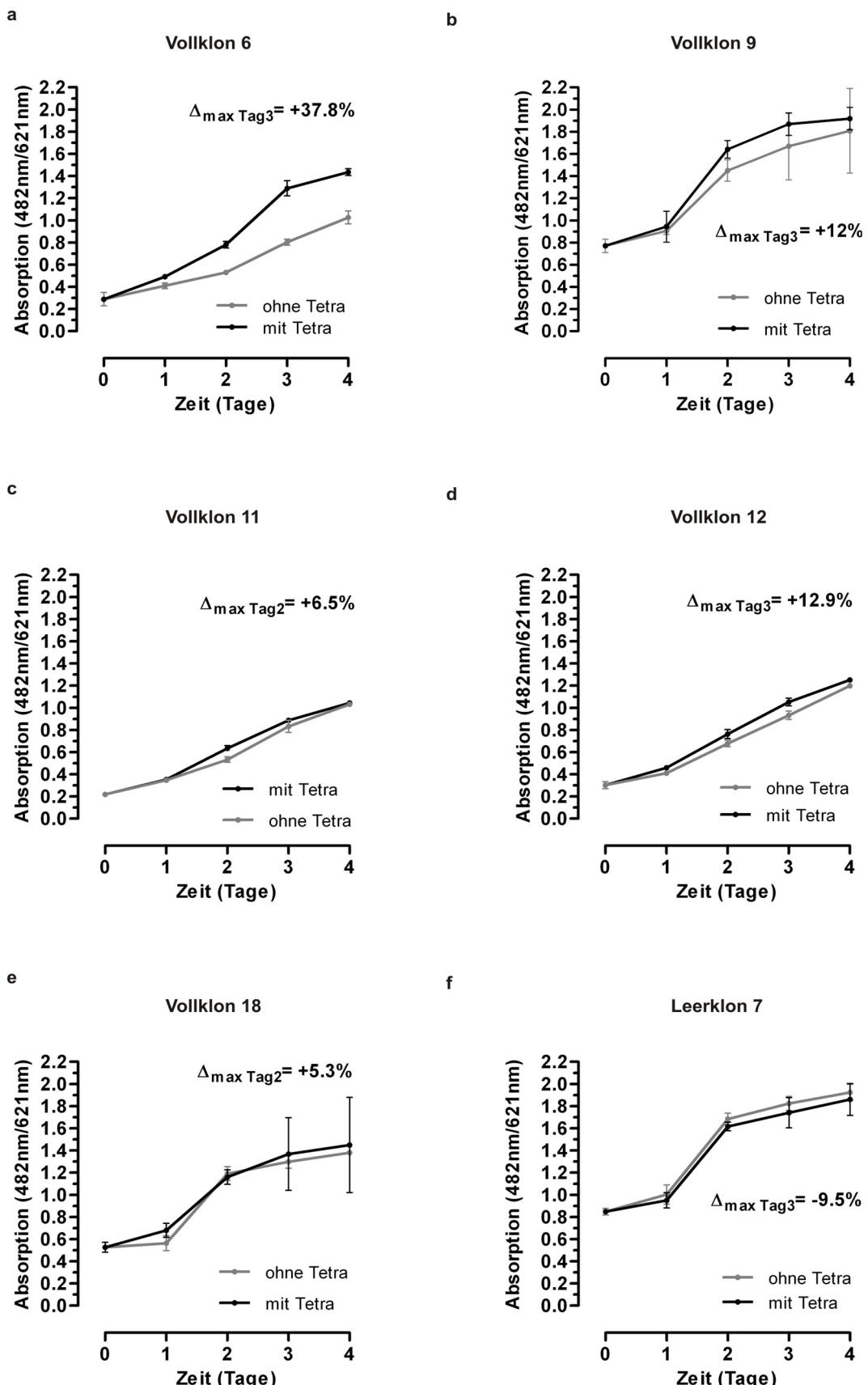


Abb. 3-23: Einfluss KPNA2 Überexpression auf die Zellproliferation in MCF7/TR/KPNA2 Klonen. Die kolorimetrische Bestimmung der Zellproliferation (XTT-Test) vor (ohne Tetra) und nach (mit Tetra) Tetracycline Induktion. Absorptionsmessungen (482nm/621nm) über einen Zeitraum von 4 Tagen. Vertikale Linien: STABW der Dreifachbestimmung. Δ_{\max} : Maximale Differenz der jeweiligen Messreihe. Normierung: Die Werte jeder Versuchsreihe wurden auf Tag 0 normiert

3.12.2 Der Einfluss des KPNA2 Verlusts auf die Zellproliferation

Es stellte sich die Frage in wie weit sich ein drastischer KPNA2 Expressionsverlust auf einen fundamentalen zellulären Prozess, wie die Zellproliferation, auswirken könnte. Das Proliferationsverhalten von KPNA2 defizienten MCF7 Zellen sollte mit dem von MCF7 Wildtypzellen verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen entsprechend dem etablierten RNAi Protokoll für 192 Stunden behandelt und anschließend einem dreitägigem XTT-Proliferationstest unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-24 zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass ein KPNA2 Expressionsverlust mit einer regelrechten Proliferationsinhibition assoziiert war (Abb. 3-24a). Die Absorption in MCF7 defizienten MCF7 Zellen wies keinerlei Steigerung auf und nahm nach Tag eins sogar ab, was in einer Reduktion der Absorption um 51% (FC= -0.51) mündete (Abb. 3-24a und b).

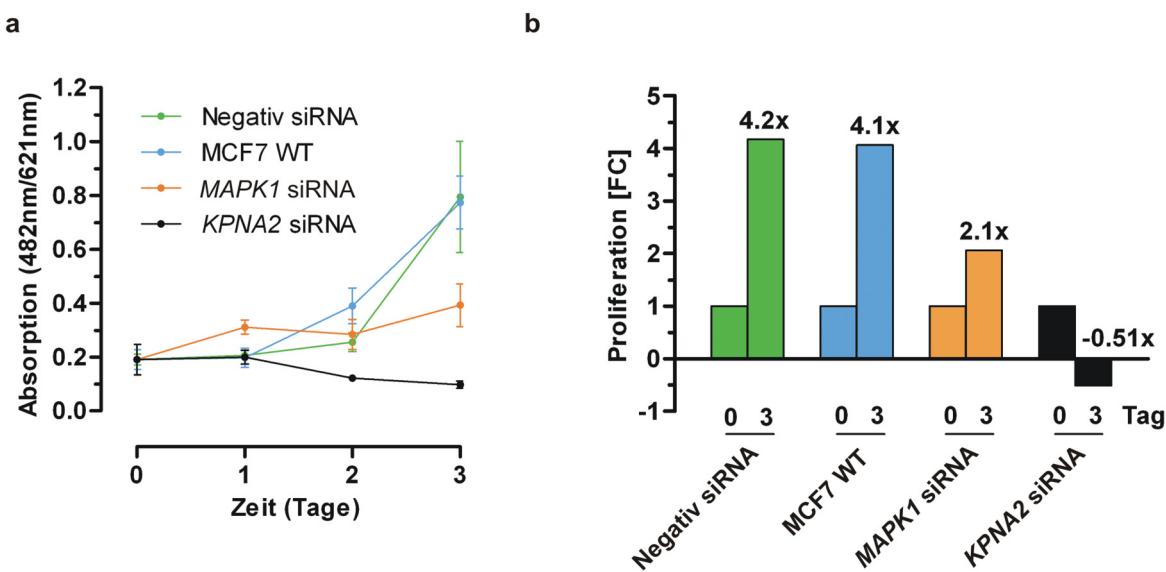


Abb. 3-24: Der Einfluss des KPNA2 Verlusts auf die Zellproliferation in MCF7 WT Zellen. Nach 192 Stunden RNA Interferenz wurden alle Ansätze trypsinisiert und jeweils 5000 Zellen in 96-well Kulturschalen ausgesät (alle in Dreifachansätzen). Nach 24 Stunden Erholungsphase wurden die Zellen einem XTT-Test unterzogen. **a:** Vergleichende Darstellung der Proliferation (Absorption) von Negativ (Grün), MAPK1 siRNA (Orange), KPNA2 siRNA (Schwarz) transfizierten Zellen, sowie untransfizierter (Blau) MCF7 WT Zellen. Die Absorption wurde über einen Zeitraum von drei Tagen (Zeitpunkte 0, 1, 2 und 3) gemessen. Vertikale Linien: STABW der Dreifachbestimmung. **b:** Darstellung der Proliferationsänderung (Absorptionswerte als FC) zwischen den Zeitpunkten 0 Tage und 3 Tage. Zeitpunkt 0 Tage diente für jeden Ansatz als Normierung (=1)

Als Positivkontrolle wurden MCF7 Zellen mit einer für die MAP-Kinase1 (MAPK1) spezifischen siRNA transfiziert. Der Verlust, dieses für die Proliferation notwendigen Faktors, führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Minderung der Zellproliferation (Brunet et al., 1995). Die Absorptionswerte stiegen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen und der Negativkontrolle nur leicht, was sich in einer Proliferationssteigerung von nur 2.1x äußerte

(Abb. 3-24a und b). Im Gegensatz zu KPNA2 und MAPK1 defizienten Zellen zeigten sowohl die untransfizierten MCF7 Wildtypzellen als auch die mit einer *non-scrambling* siRNA transfizierten Zellen eine deutliche Proliferationssteigerung (FC=4.1 bzw. FC=4.2) bzw. ähnliche Kurvenverläufe (Abb. 3-24a und b). Durch diese Kontrollen konnten, transfektions bedingte, unspezifische Effekte auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden.

3.12.3 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Apoptose

Nachdem das veränderte Proliferationsverhalten in KPNA2 differentiell exprimierenden Zelltypen beschrieben wurde, sollte nun mit der Apoptose eine weitere inhärente Eigenschaft von Tumorzellen, in Abhängigkeit von KPNA2, analysiert werden. Die Apoptoseraten von MCF10A WT und MCF7 WT Brustkrebszelllinien sollte dabei auf zwei unterschiedlichen Aktivierungsebenen detektiert werden. Zum Ersten wurde die durch einen pro-apoptotischen Stimulus ausgelöste Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 untersucht (Miura et al., 1993; Stennicke et al., 1998). Die Anbindung von pro-apoptotischen Liganden an Todesrezeptoren resultiert unter anderem in der Aktivierung der Caspase-Signalkaskade und stellt einen der zentralen Apoptosemechanismen dar (Lamkanfi et al., 2002). Effektorcaspasen sind aktiv an dem Abbau von Lamin und Aktin beteiligt und haben zudem über 280 bekannte Apoptose relevante Substrate, darunter auch die DNase CAD (Caspase aktivierte DNase), die für die Fragmentierung der DNA verantwortlich ist (Fischer et al., 2003). Zum Zweiten sollte mit der Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) ein zweites, in der Kaskade der apoptotischen Prozesskette, fundamentales Ereignis nachgewiesen werden. Externalisiertes PS fungiert als „Freßsignal“ für die Phagozytose der apoptotischen Zellvesikel (Leventis und Grinstein, 2010). Durch die Analyse dieser beiden Apoptosemarker sollte eine sichere Beurteilung des Apoptoseverhaltens von MCF10A und MCF7 Tumorzellen sichergestellt werden.

Der direkte Vergleich der Caspase 3/7 Aktivitäten von MCF10A WT und MCF7 WT Zellen ist in Abb. 3-25 zusammengefasst. Die Apoptose wurde mit einer Kombination aus Tumornekrose-Faktor- α (TNF α) und Cycloheximid (CHX) über einen Zeitraum von 1, 2 und 3.5 Stunden stimuliert. TNF α stellt einen relativ schwachen pro-apoptotischen Stimulus dar, der gleichzeitig NF κ B vermittelte anti-apoptotische Signalwege aktiviert (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Der TNF α Stimulus kann jedoch durch CHX verstärkt werden. CHX inhibiert die Proteinsynthese und schwächt die translationsabhängige anti-apoptotische Signaltransduktion. Beide Zelllinien zeigten eine Steigerung der Caspaseaktivität über die Zeit. Die benignen MCF10A WT Zellen wiesen jedoch im Vergleich zu den malignen MCF7 WT Zellen eine deutlich stärkere Caspaseaktivität nach 3.5 Stunden auf (Abb. 3-25a). Die Induktionsrate der Effektorcaspasen 3 und 7 betrug in MCF10A Zellen 69.3% und in MCF7 Zellen 23.7%. Daraus berechnete sich eine fast dreifach stärkere Apoptoseinduktion (FC=2.9) in der benignen Mammakarzinomzelllinie MCF10A (Abb. 3-25b). Eine Apoptoseinduktion in

MCF10A und MCF7 Brustkrebszelllinien mit TNF α (ohne CHX) hatte auch nach 5 Stunden lediglich einen marginalen Anstieg (6.6% bzw. 8.0%) der Caspaseaktivität zur Folge (siehe Anhang Abb. 6-1).

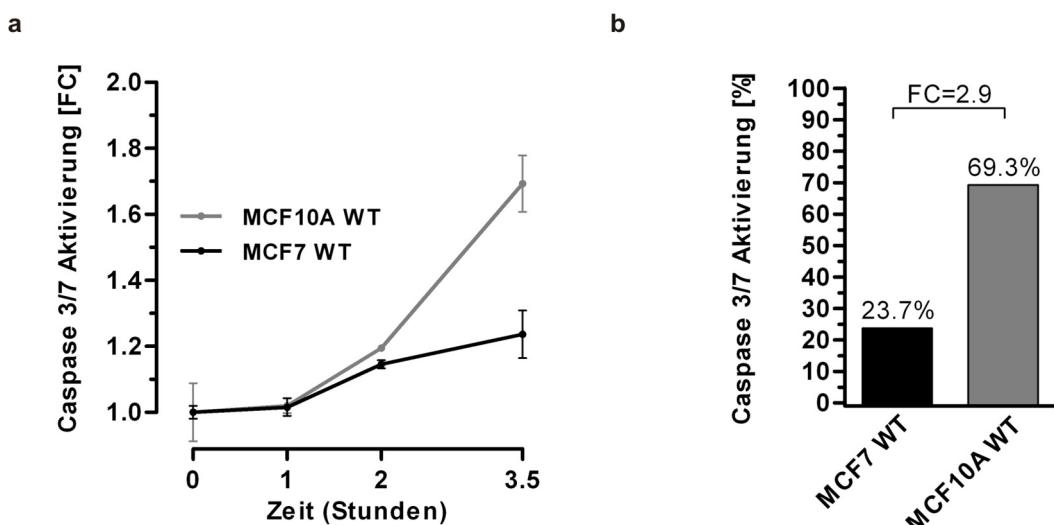


Abb. 3-25: Caspaseaktivierung in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen. Für die Messung der Caspase 3/7 Aktivität in MCF10A und MCF7 Wildtypzellen, wurden je Ansatz 5000 Zellen in 96-well Kulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden Adhäsionsphase mit TNF α [100ng/ml] und Cyclohexemid (CHX) [1 μ g/ml] inkubiert. Die Detektion der Caspaseaktivität wurde mittels Fluoreszenz basiertem Caspase-Assay detektiert (499nm/521nm). **a:** Darstellung der Caspase 3/7 Aktivität als FC über die Zeit durch den pro-apoptotischen Stimulus. Die Messungen erfolgten vor (0 Stunden) und nach Stimulierung mit dem pro-apoptotischen Stimulus (1, 2 und 3.5 Stunden). Die Werte für jede Zelllinie wurden jeweils auf die nicht stimulierten Zellen (Zeitpunkt 0 Stunden) normiert (FC=1). Vertikale Linien: STABW der Dreifachbestimmung. **b:** Vergleich des prozentualen Anstiegs der Caspaseaktivierung in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen nach 3.5 Stunden Stimulierung mit TNF α /CHX. Die Normierung erfolgte erneut auf die Werte der nicht stimulierten Zellen (=0%)

Die Messung der Phosphatidylserin Externalisierung nach Apoptoseinduktion wurde mittels FACS-Analytik und einem PS spezifischem fluoreszenzmarkierten Antikörper (AnnexinV) durchgeführt. Für die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden alle Ansätze zusätzlich mit einem fluoreszierenden DNA interkalierenden Agenz (7-AAD) markiert. Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen haben nekrotische und bereits durch Nekrose gestorbene Zellen keine intakte Kernhüllen, was die Interkalation von 7-AAD in die DNA und auch die Detektion von PS auf der Membraninnenseite ermöglicht. Somit waren in der durchgeföhrten Analyse, nekrotische Zellen für AnnexinV und 7-AAD positiv, wohingegen die apoptotischen Zellen nur AnnexinV positiv erschienen. Diese Doppelfärbung ermöglichte die exakte Detektion der Anzahl von Apoptose durchlaufenden Zellen und erlaubte es falsch positive Zellen auszuschließen. In Abb. 3-26a sind die Messwerte der FACS Analyse für unbehandelte und mit TNF α /CHX stimulierte MCF10A bzw. MCF7 Zellen zusammengefasst. Die Verteilung der apoptotischen und nekrotischen Zellpopulation sind in Abb. 3-27 dargestellt. Nach 24 Stunden TNF α /CHX Induktion wiesen beide Zelllinien eine Zunahme der apoptotischen Zellpopulation (oberer linker Quadrant) auf. Die Zunahme war

jedoch bei MCF10A WT Zellen mit 30.5% deutlich stärker ausgeprägt als bei MCF7 WT (10.9%). Zusätzlich zeigten beide Zelltypen eine Zunahme der nekrotischen Zellzahl (Abb. 3-26a bzw. Abb. 3-27c, d oberer rechter Quadrant). In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies, dass benigne MCF10A WT Zellen mit 21.9% eine vierfach stärkere Induktion (FC=4.0) der Apoptose durch TNF α /CHX Stimulus zeigten, als die maligne MCF7 WT Zelllinie (5.4%) (Abb. 3-26b).

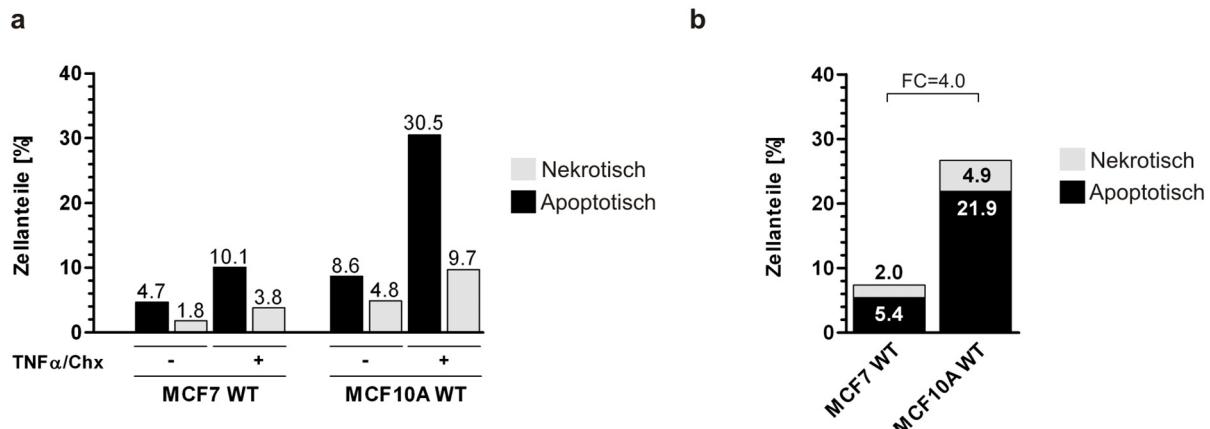


Abb. 3-26: FACS-Auswertung der Apoptoseinduktion in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen. Graphische Darstellung der mittels FACS Analyse bestimmten Zellpopulation. **a:** Vergleich der apoptotischen und nekrotischen Zellen [%] vor und nach TNF α /CHX Stimulus (24 Stunden) von MCF10A und MCF7 Wildtypzellen (WT). **b:** Die Änderung der apoptotischen und nekrotischen Zellanteile [%] nach der TNF α /CHX Induktion. FC: Differenz der Summe von apoptotischen und nekrotischen Zellen in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen

Die Induzierbarkeit der Apoptose durch den TNF α /CHX Stimulus konnte für MCF10A und MCF7 Wildtypzellen *in vitro* auf zwei unterschiedlichen Nachweisebenen bestätigt werden. Die Induktionsstärke der Apoptose war in benignen MCF10A WT Zellen, auf Ebene der Caspasenaktivierung (FC=2.9) sowie auf der PS-Oberflächenmarkerebene (FC=4.0), deutlich stärker als in malignen MCF7 WT Zellen.

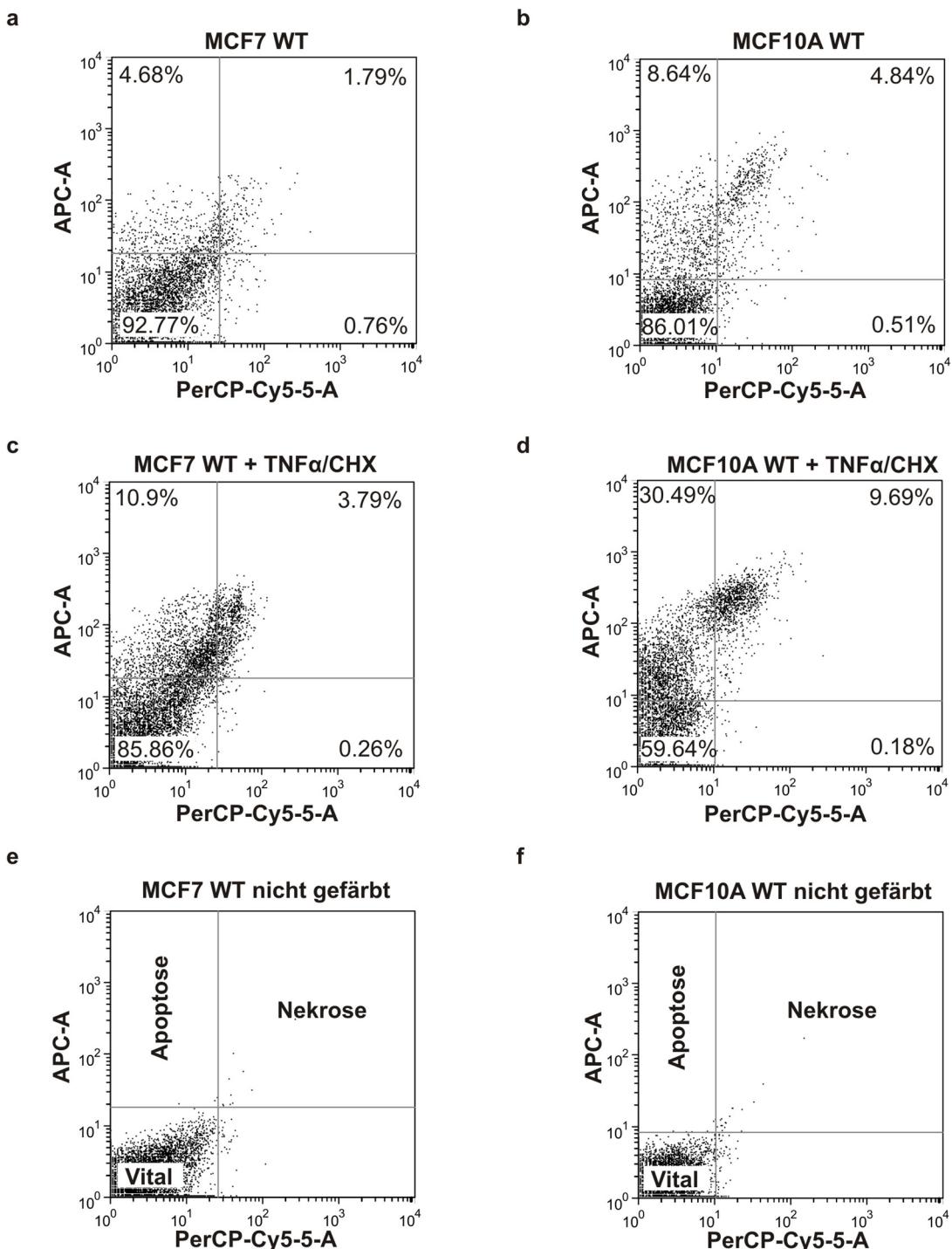
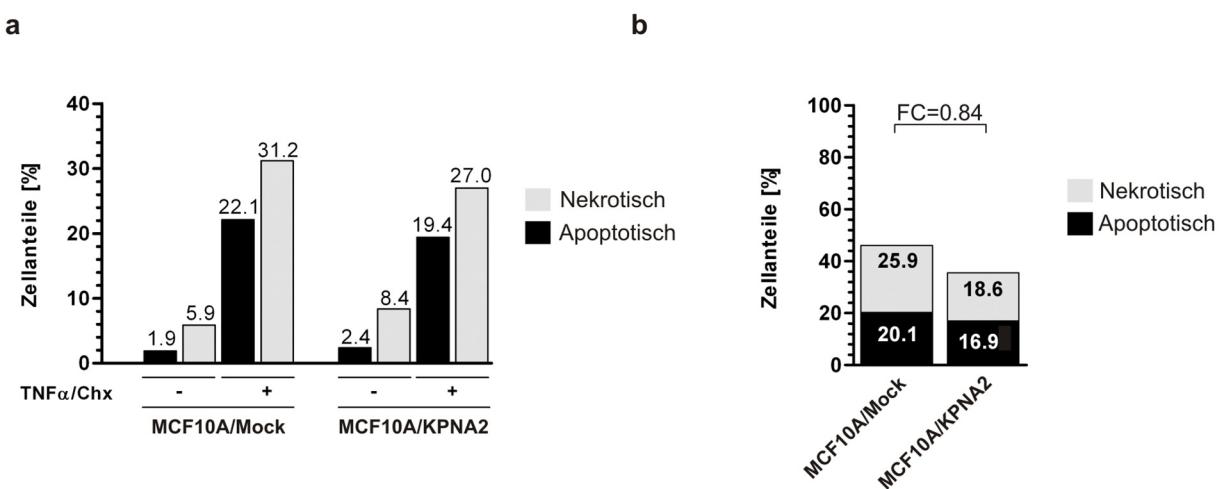


Abb. 3-27: FACS Analyse der Apoptoseinduktion in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen. Für die Messung der Apoptoserate in MCF10A und MCF7 Wildtypzellen (WT), wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden Adhäsionsphase für weitere 24 Stunden mit TNF α [100ng/ml] und CHX [1 μ g/ml] inkubiert. Die Detektion von Phosphatidylserin (früher Apoptosemarker) erfolgte mit einem AnnexinV-Antikörper (APC-A Filter). Die Zell-Markierung mit dem DNA interkalierendem Agenz 7-AAD (PerCP-Cy5-5-A Filter) diente zur Detektion nekrotischer Zellen. Pro Ansatz wurde die Fluoreszenz von 1×10^4 Zellen gemessen. **a** und **b**: Die apoptotischen und nekrotischen Zellanteile [%] von nicht stimulierten MCF7 WT und MCF10A WT Zellen. **c** und **d**: Die apoptotischen und nekrotischen Zellanteile [%] von stimulierten MCF7 WT und MCF10A WT Zellen. **e** und **f**: Darstellung der definierten Quadranten für die Normierung und Unterscheidung der vitalen (unten links), der nekrotischen (oben rechts) und der apoptotischen (oben links) MCF7 WT und MCF10A WT Zellpopulationen. Die Position der Quadranten basiert auf der gemessenen Grundfluoreszenz nicht behandelter MCF10A und MCF7 Zellen (ohne AnnexinV Antikörper und ohne 7-AAD). Die Skalierung der Ordinaten ist logarithmisch

Es stellte sich nun die Frage, ob die KPNA2 Expression Einfluss auf die Apoptose Sensibilität von Tumorzellen nehmen könnte und eine KPNA2 Überexpression möglicherweise zu einer Verringerung der Apoptoseraten führt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten KPNA2 niedrig exprimierende MCF10A WT Zellen transient mit dem pT-Rex-DEST30/KPNA2 Expressionsvektor transfiziert werden und die Apoptoserate in diesen KPNA2 überexprimierenden Zellen mittels FACS-Technik analysiert werden. Der Versuchsaufbau entsprach hierbei dem für MCF7 und MCF10A Wildtypzellen durchgeführten Versuch. Der apoptotische Zellanteil nach Stimulation war in beiden Zelltypen klar gesteigert (Abb. 3-29a). In Abb. 3-29 sind die apoptotischen und nekrotischen Zellpopulation von Leer (Mock) und KPNA2 transfizierten MCF10A Zellen, vor und nach TNF α /CHX Stimulation dargestellt. Die Steigerungsraten in MCF10A/Mock und MCF10A/KPNA2 Klonen waren mit 20.1% bzw. 16.9%, ähnlich der für MCF10A WT Zellen gemessenen Werte (21.9%). MCF10A/KPNA2 Zellen zeigten mit 16% (FC=0.84) eine geringfügige Verminderung der Apoptoserate (Abb. 3-28b). Zusätzlich war in beiden Zelltypen ein deutlicher Anstieg der nekrotischen Zellen zu beobachten, der mit 25.9% (MCF10A/Mock) und 18.6% (MCF10A/KPNA2) sogar die Größe der jeweiligen apoptotischen Zellpopulationen überstieg (Abb. 3-28b bzw. Abb. 3-29b und d).



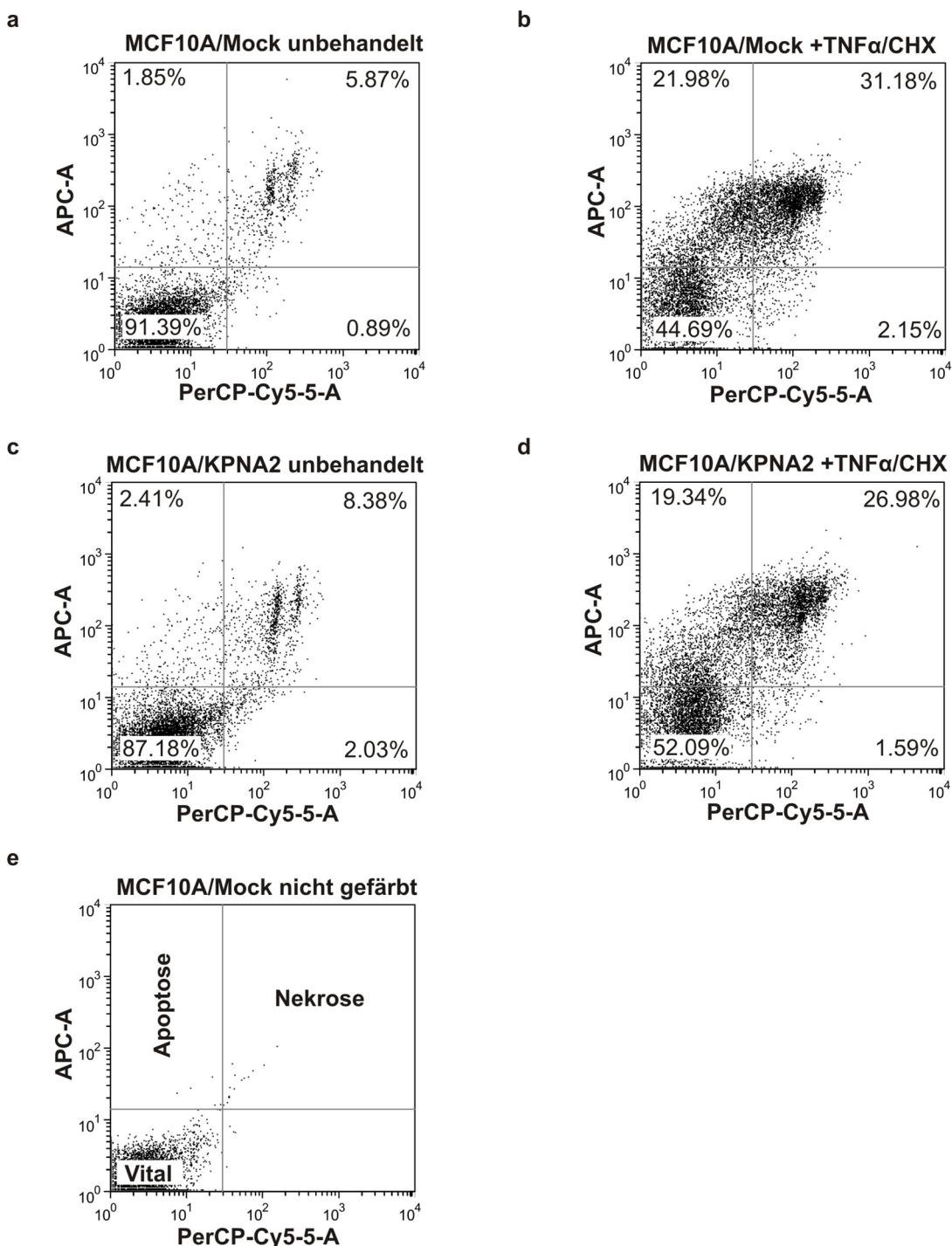
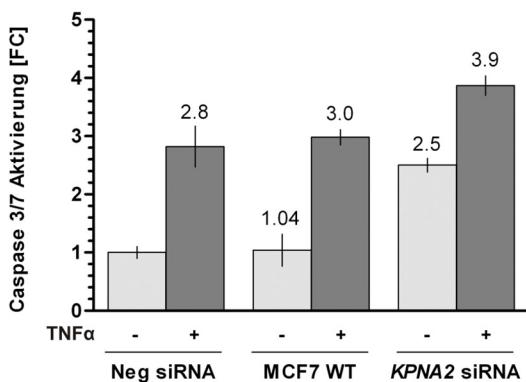


Abb. 3-29: FACS Analyse der Apoptoseraten von transienten MCF10A/KPNA2 Zellen. Für die Messung der Apoptoserate in MCF10A/KPNA2 und in MCF10A/Mock transfizierten Zellen, wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden Adhäsionsphase für weitere 24 Stunden mit TNF α [100ng/ml] und CHX [1 μ g/ml] inkubiert. Die Detektion von Phosphatidylserin (früher Apoptosemarker) erfolgte mit einem AnnexinV-Antikörper (APC-A Filter). Die Zell-Markierung mit dem DNA interkalierendem Agenz 7-AAD (PerCP-Cy5-5-A Filter) diente zur Detektion nekrotischer Zellen. Pro Ansatz wurde die Fluoreszenz von 1×10^4 Zellen gemessen. **a** und **c**: Die apoptotischen und nekrotischen Zellanteile [%] von nicht stimulierten MCF10A/Mock und MCF10A/KPNA2 Zellen. **b** und **d**: Die apoptotischen und nekrotischen Zellanteile [%] von stimulierten MCF10A/Mock und MCF10A/KPNA2 Zellen. **e**: Darstellung der definierten Quadranten für die Normierung und Unterscheidung der vitalen (unten links), der nekrotischen (oben rechts) und der apoptotischen (oben links) MCF10A/Mock Zellpopulationen. Die Position der Quadranten basiert auf der gemessenen Grundfluoreszenz nicht behandelter MCF10A/Mock Zellen (ohne AnnexinV Antikörper und ohne 7-AAD). Die Skalierung der Ordinaten ist logarithmisch

3.12.4 Der Einfluss des KPNA2 Verlusts auf die Apoptose

Nachdem für MCF7 WT Zellen eine geringere Sensibilität gegenüber TNF α /CHX induzierter Apoptose, verglichen mit MCF10A WT Zellen, nachgewiesen werden konnte (siehe 3.12.3), sollte nun die Apoptoserate in MCF7 WT Zellen vor und nach KPNA2 Verlust analysiert werden. Hierzu wurde die Apoptoseinduktion auf Ebene der Caspase 3/7Aktivität gemessen. In Abb. 3-30 ist die Caspaseaktivität vor (-) und nach (+) dem pro-apoptotischen Stimulus in negativ transfizierten (Neg siRNA), Wildtypzellen und KPNA2 transfizierten (KPNA2 siRNA) Zellen zusammengefasst. Die Caspaseaktivierung in der stimulierten Negativkontrolle war mit FC=2.8 ähnlich stark wie in den mitgeführten untransfizierten MCF7 WT Zellen (FC=3.0). Im Gegensatz dazu wiesen stimulierte KPNA2 defiziente MCF7 Zellen eine mit FC=3.9 deutlich stärkere Induktion der Effektorcaspasen 3 und 7 auf (Abb. 3-30a). Der direkte Vergleich in Abb. 3-30b belegt, dass die Induktion nach TNF α Stimulation in KPNA2 defizienten Zellen gegenüber der Negativkontrolle um 40% (FC=1.4) gesteigert war. Darüber hinaus wurde ein Vergleich der Caspaseaktivitäten in nicht TNF α stimulierten Zellen vorgenommen. Interessanterweise war die Grundaktivität der Caspase 3 und 7 ohne pro-apoptotischen Stimulus in KPNA2 defizienten MCF7 Zellen mit einem FC von 2.5 deutlich erhöht (Abb. 3-30a und b). Der Aktivierungswert in MCF7 Wildtypzellen erschien mit 4% Differenz (FC=1.04), gegenüber der Negativkontrolle, unverändert (Abb. 3-30a). Die homogenen Werte mit und ohne TNF α Stimulus in Wildtypzellen und in der Negativkontrolle zeigten, dass die Transfektion keinen Einfluss auf die Caspaseaktivierung hatte. Der beobachtete Effekt der gesteigerten Caspaseaktivität in KPNA2 defizienten MCF7 Tumorzellen, mit und ohne pro-apoptotischem Reiz, konnte somit mit dem RNA Interferenz bedingtem KPNA2 Expressionsverlust assoziiert werden.

a



b

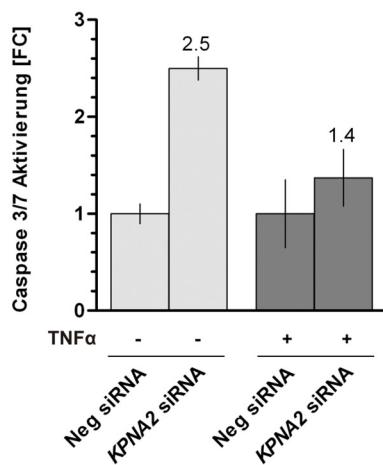


Abb. 3-30: Die Apoptoserate von KPNA2 defizienten MCF7 Zellen. Nach 192 Stunden RNA Interferenz wurden alle Ansätze trypsiniert und jeweils 5000 Zellen in 96-well Kulturschalen ausgesät (alle in Dreifachansätzen). Nach 24 Stunden Erholungsphase wurden die Zellen, einem Fluoreszenz basierten Caspase 3/7 Aktivierungstest (499nm/521nm) unterzogen. Die Messung der Caspase 3/7 Aktivität erfolgte in Negativ (Neg siRNA), untransfizierten (WT) und KPNA2 siRNA transfizierten MCF7 Zellen, vor (-) und nach (+) TNF α [100ng/ml] Stimulation (24 Stunden). **a:** Darstellung der Caspase 3/7 Aktivität als FC vor (-) und nach (+) dem pro-apoptotischen Stimulus. Alle Werte wurden auf die nicht stimulierte (-) Negativkontrolle (Neg siRNA) normiert (FC=1). Vertikale Linien: STABW der Dreifachbestimmung. **b:** Vergleich des Anstiegs [FC] der Caspase-aktivierung in der Negativkontrolle (Neg siRNA) und den KPNA2 defizienten (KPNA2 siRNA) MCF7 Zellen vor (-) und nach (+) TNF α Stimulation. Die Normierung erfolgte jeweils auf den Grundwert der Negativkontrolle (=1)

3.12.5 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Zelladhäsion

Als nächstes sollte die Fähigkeit von humanen Brustkrebszellen, innerhalb eines definierten Zeitrahmens auf einer Oberfläche zu adhärieren, in Abhängigkeit der KPNA2 Expressionsstärke, analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden MCF10A und MCF7 Wildtypzellen, transiente MCF10A/KPNA2 Zellen, sowie stabile MCF7/TR/KPNA2 und MCF7/TR (Leerklonen) einem Adhäsionstest unterzogen. Um eine sichere Quantifizierung der Adhäsionsraten vornehmen zu können, wurde das Prinzip der Kristallviolettfärbung von fixierten Zellen angewendet: Je mehr adhärente Zellen vorhanden waren, desto mehr Kristallviolett wurde gebunden und konnte in einem anschließendem Schritt aus den Zellen gelöst, fotometrisch quantifiziert und verglichen werden. Die maligne MCF7 WT Brustkrebszelllinie zeigte mit 0.174 ± 0.006 (Spannweite: 0.166-0.184, 25-75% Quartile: 0.167-0.180), im Vergleich zu der benignen Zelllinie MCF10A WT (0.237 ± 0.004 , Spannweite: 0.228-0.265, 25-75% Quartile: 0.232-0.261) eine deutlich geringere mediane Absorption auf (Abb. 3-31a und b). In Prozent ausgedrückt bedeutet dies, dass MCF7 WT Zellen verglichen mit MCF10A WT Zellen, eine mit 35.6% hochsignifikant ($P<0.001$) geminderte Adhäsionsrate besaßen.

Als nächstes sollte eine mögliche Änderung der Adhäsion nach KPNA2 Überexpression in MCF10A/KPNA2 Zellen untersucht werden. Insgesamt wurden hierfür je drei unabhängige Transfektionen mit dem KPNA2 Vektor und dem entsprechendem Leervektor durchgeführt

(Abb. 3-31c und d). Es zeigte sich, dass die getesteten MCF10A/KPNA2 Vollklone(V1-3) eine mediane Absorption von 0.199 ± 0.005 (Spannweite: 0.195-0.213, 25-75% Quartile: 0.197-0.205) und die entsprechenden MCF10A/Leerkclone (L1-3) eine mediane Absorption von 0.228 ± 0.014 (Spannweite: 0.228-0.266, 25-75% Quartile: 0.232-0.262) aufwiesen (Abb. 3-31 c und d). Daraus ergab sich in den MCF10A/KPNA2 transfizierten Zellen eine hochsignifikante ($P<0.001$), mediane Erniedrigung der Adhäsionsrate um 21.1%, verglichen mit den Mock-transfizierten Zellen (L1-3).

Parallel wurde der Versuch mit den drei stabilen MCF7/TR/KPNA2 Vollklonen 9, 11 und 12 sowie dem Leerklon 5 durchgeführt (Abb. 3-31e). Die medianen Absorptionswerte, vor und nach der KPNA2 Induktion durch Tetracyclin, waren mit 0.179 ± 0.005 (Spannweite: 0.171-0.190, 25-75% Quartile: 0.175-0.183) bzw. mit 0.180 ± 0.005 (Spannweite: 0.176-0.195, 25-75% Quartile: 0.178-0.186) jedoch nicht verändert ($P>0.05$) (Abb. 3-31f). Konsequenterweise blieben die Absorptionswerte, respektive die Adhäsionsrate, bei dem als zusätzliche Negativkontrolle mitgeführten Leerklon 5 (L5), nach der Tetracyclin Behandlung unverändert (Abb. 3-31e). Die Absorptionswerte ohne Tetracyclin betrugen 0.173 ± 0.010 (Spannweite: 0.168-0.188, 25-75% Quartile: 0.165-0.169) bzw. mit 0.173 ± 0.004 (Spannweite: 0.166-0.179, 25-75% Quartile: 0.169-0.177). In Abb. 3-32 sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen der adhärenten Zellen von MCF10A und MCF7 Wildtypzellen sowie von korrespondierenden KPNA2 transfizierten und Leer-transfizierten MCF10A Zellen dargestellt. Die Kristallviolettfärbung innerhalb der Zellkörper der fixierten Zellen ist deutlich erkennbar. Visuell waren die berechneten Unterschiede von 35.6% bzw. 21.1%, für die analysierten MCT10A WT Zellen und den KPNA2 überexprimierenden MCF10A/KPNA2 Zellen, nicht eindeutig feststellbar. Dies unterstreicht die Notwendigkeit quantifizierbarer Verfahren, um eine statistisch valide Aussage über funktionelle Effektgrößen treffen zu können (Abb. 3-31).

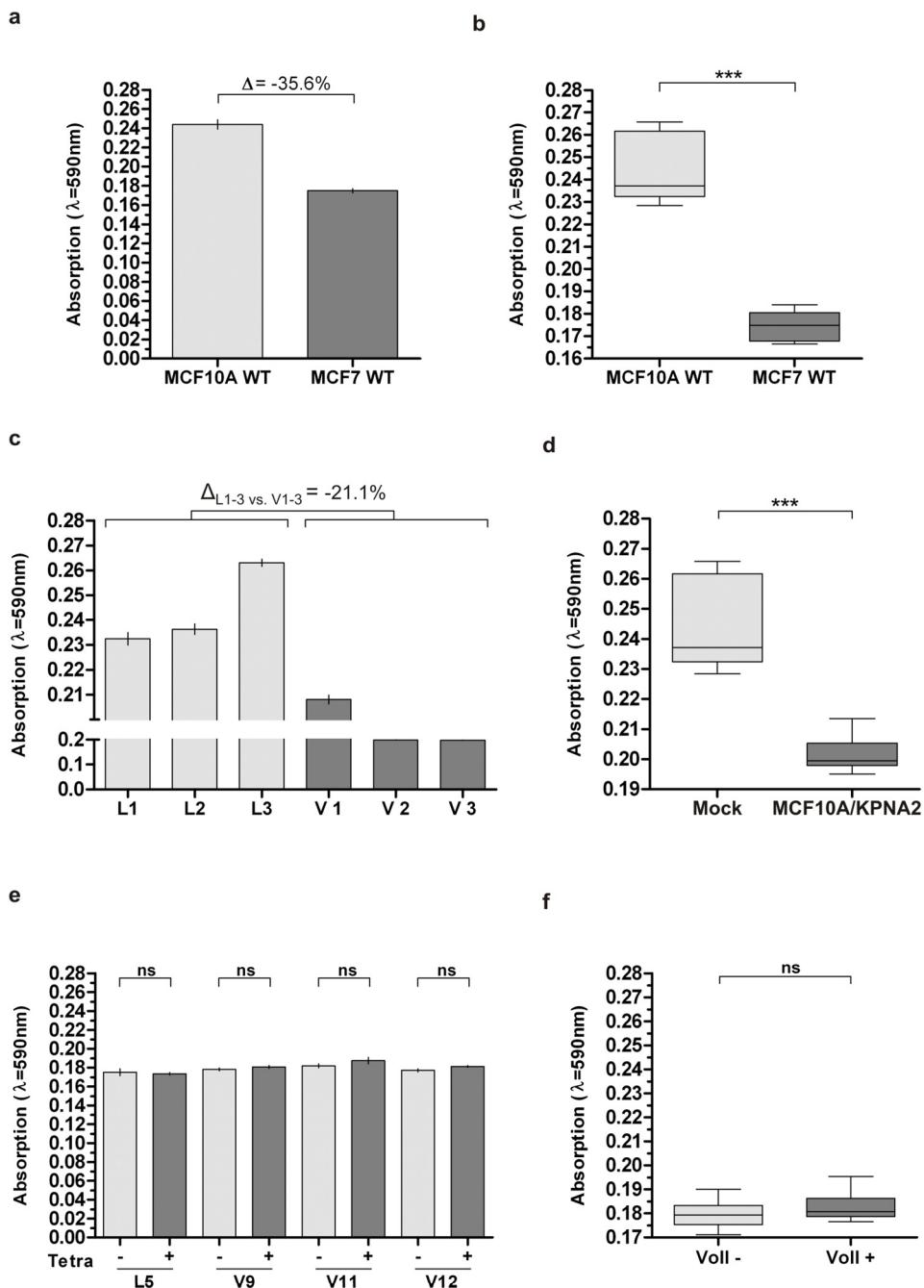


Abb. 3-31: Adhäsionstest mit MCF10A und MCF7 Zellen. Je Versuchsansatz wurde 1ml Zellsuspension (4×10^4 Zellen/ml) auf mit Matrigel beschichtete (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 6-well Kulturschalen gegeben und 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die suspendablen Zellen abgewaschen und der verbleibende adhäsente Zellanteil fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Der Test basiert auf der linearen Korrelation zwischen Zellzahl und der Menge an zellulär gebundenem Kristallviolett (blauer Farbstoff). Dargestellt sind die kolorimetrischen Auswertungen ($\lambda=590\text{nm}$) der Kristallviolettmenge der analysierten Zelltypen. Alle Ansätze wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. **a** und **b**: Vergleich der Absorptionswerte für MCF10A und MCF7 Wildtypzellen. Δ : Mediane Änderung der Absorption (%) zwischen MCF10A WT und MCF7 WT. **c** und **d**: MCF10A Zellen wurden für 48 Stunden mit dem pT-REx-DEST30/KPNA2 (V) bzw. mit dem entsprechenden Leervektor (L), transzisiert. Jeweils drei unabhängige Transfektionen (L1-3 bzw. V1-3). Δ : Mediane Änderung der Absorption (%) zwischen der Gruppe der Leer- und Vollklone. **e** und **f**: Absorptionswerte für, mit Tetracyclin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 48 Stunden) induzierte (+) und nicht-induzierte (-), stabile MCF7 Vollklone (V9, V11, V12) bzw. dem Leerklon L5. Vertikale Linien in **a**, **c** und **e**: STABW der Dreifachbestimmung. **b**, **d** und **f**: Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum. Box: 25% bis 75% Quartile, ***: $P < 0.001$, ns: nicht signifikant ($P > 0.05$), zweiseitiger Mann-Whitney U Test.

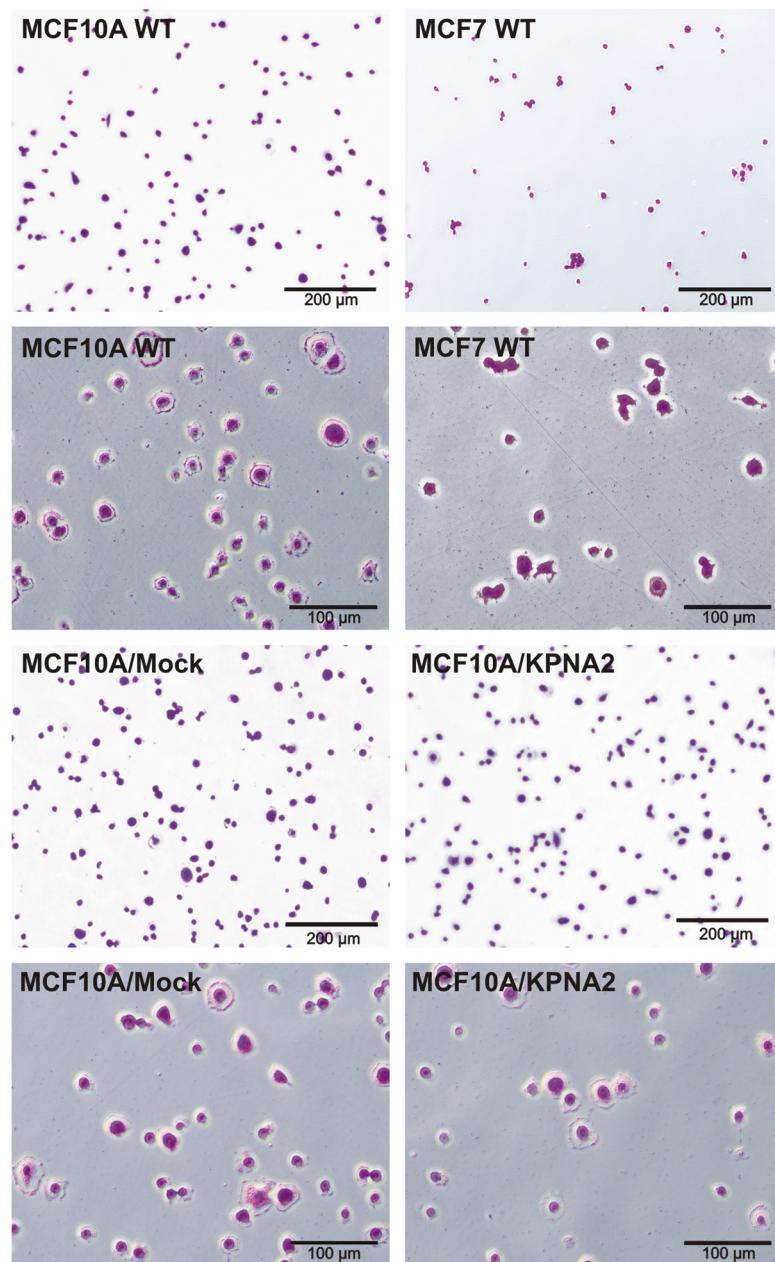


Abb. 3-32: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Adhäsion von MCF10A und MCF7 Zellen. Vergleichende Zusammenstellung von Hellfeldaufnahmen der adhärenten Zellpopulationen von MCF10A und MCF7 Wildtypzellen sowie mit dem pT-REx-DEST30/KPNA2 bzw. mit dem entsprechenden Leervektor transizierte MCF10A Zellen. Die Bilder wurden nach der EtOH-Fixierung und vor der Quantifizierung aufgenommen. Originalvergrößerungen für 200 μ m: 5x und für 100m: 10x

3.12.6 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Zellmigration

Mit Hilfe des 2D-Wundheilungs-Tests, auch als *scratch-assay* bezeichnet, sollte die Fähigkeit zur Migration von nicht-induzierten und induzierten MCF7/TR/KPNA2 sowie transienten MCF10A/KPNA2 Zellen analysiert werden. Bei diesem Test wurde mit Hilfe eines Silikonrahmens ein 500 μ m breiter *scratch* in einen konfluenten Zellrasen gesetzt. Danach wurde die Zeit bis zum vollständigen Bewuchs der zellfreien Fläche durch die migrierenden Zellen bestimmt und alle 24 Stunden photographisch dokumentiert. Daraus ergab sich für

jeden Klon eine Abnahme der freien Fläche pro Tag. In einem ersten Versuch wurde die Migrationsgeschwindigkeit von MCF10A und MCF7 Wildtypzellen sowie transienten MCF10A/KPNA2 Transfektanden verglichen (Abb. 3-33). Maligne MCF7 Brustkrebszellen waren in der Lage den zellfreien 500 μ m breiten Spalt in drei Tagen vollständig zu schließen (100% Konfluenz). Zu diesem Zeitpunkt waren bei den benignen MCF10A Zellen noch 69% der Fläche nicht migriert. MCF10A Zellen benötigen insgesamt mehr als sechs Tage, um den entsprechenden Bereich vollständig zu besiedeln (Abb. 3-33a). Zwischen den beiden Brustkrebszelllinien konnte somit eine hochsignifikante Differenz ($P<0.0001$) bezüglich der Migrationsfähigkeit festgestellt werden.

Als nächstes sollte analysiert werden, ob eine Überexpression von KPNA2 einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von MCF10A Zellen hat. In der Tat konnte in MCF10A/KPNA2 Transfektanden eine hochsignifikante Steigerung ($P<0.0001$) der Migrationsfähigkeit gemessen werden (Abb. 3-33b). KPNA2 überexprimierende MCF10A/KPNA2 Zellen wiesen nach drei Tagen, im direkten Vergleich zu Leervektor transfizierten Zellen (Mock Klon), eine Migrationssteigerung von 43.9% auf, was in einem fast vollständigen Bewuchs der Fläche nach vier Tagen resultierte. Die Mock Klonen und die untransfizierten MCF10A WT Zellen benötigten hierfür sieben Tage (vgl. Abb. 3-33a und b).

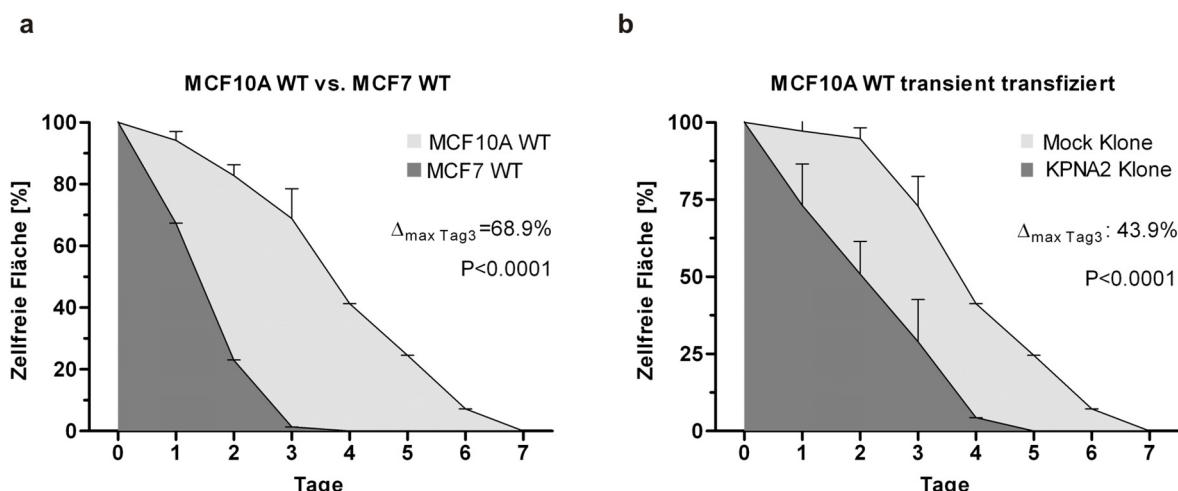


Abb. 3-33: Migrationsverhalten von MCF10A Zellen. a: Vergleichende Darstellung für die Änderung der zellfreien Fläche in MCF10A und MCF7 Wildtypzellen (WT). b: Änderung der Migrationsgeschwindigkeit vor und nach transakter Transfektion von MCF10A mit einem KPNA2 Expressionsvektor (KPNA2 Klon) bzw. einem Leervektor (Mock Klon). Vertikale Balken: STABW der Dreifachbestimmung. Δ_{\max} : Maximale Differenz zwischen den Wildtypzellen bzw. den Transfektanden. Alle Werte wurden auf Tag 0 normiert (Fläche=100%)

Mit dem folgenden Versuch wurde das Migrationsverhalten von MCF7/TR/KPNA2 Klonen nach KPNA2 Induktion analysiert. Insgesamt wurden vier Vollklone (V6, V9, V11 und V12) sowie der Leerklon 7 einem Wundheilungstest unterzogen (Abb. 3-34). MCF7/TR/KPNA2 Vollklon 9 und 12 wiesen, mit einer Migrationsteigerung von jeweils 26.3% (Tag 2, $P<0.0001$)

bzw. 33.9% (Tag 3, $P=0.0028$) nach Tetracyclin Induktion, hochsignifikante Änderungen in Bezug zu den nicht-induzierten Kontrollzellen auf (Abb. 3-34c und e). Die photographische Dokumentation des Migrationsverlaufs ist für den induzierten bzw. nicht-induzierten MCF7/TR/KPNA2 Vollklon 12 in Abb. 3-35 zusammengestellt. In den KPNA2 induzierten Vollklonen 6 und 11 war ebenfalls eine 10.2% und 16.8% Steigerung der Migration zu verzeichnen, diese waren jedoch mit $P=0.0763$ und $P=0.0937$ nicht signifikant ($P>0.05$). Ein Grund hierfür könnte die hohe Standardabweichung sein, die bei geringeren Effektgrößen (10.2% und 16.8%), eine Fehlerwahrscheinlichkeit von >5% bedingen kann. Trotz der fehlenden statistischen Sicherheit war ein deutlicher Trend für die KPNA2 bedingte Migrationsteigerung bei Vollklon 6 und 12 nachweisbar. Der Leerklon 7 zeigte mit 1.94% erwartungsgemäß eine nur marginale und nicht signifikante Änderung der Migrationsrate, vor und nach Tetracyclin Inkubation (Abb. 3-34a). Somit ließ sich ein unspezifischer Einfluss von Tetracyclin auf das Migrationsverhalten der Zellen ausschließen. Des Weiteren ist zu beachten, dass geringe, physiologisch bedingte, Varianzen bei *in vitro* Experimenten niemals ganz auszuschließen sind. Abb. 3-34f zeigt eine Übersicht der Migrationsraten aller induzierten und nicht-induzierten Vollklone für jedem Zeitpunkt. Diese Box Plot Analyse ergab für die KPNA2 induzierten Vollklone eine mediane Differenz von -21% bis -25.1% der zellfreien Fläche zwischen den Tagen 1 und 3. Die Gesamtheit der Vollklone zeigte eine mit $P<0.0001$ hochsignifikante Steigerung der Migrationsfähigkeit nach KPNA2 Überexpression (Abb. 3-34f).

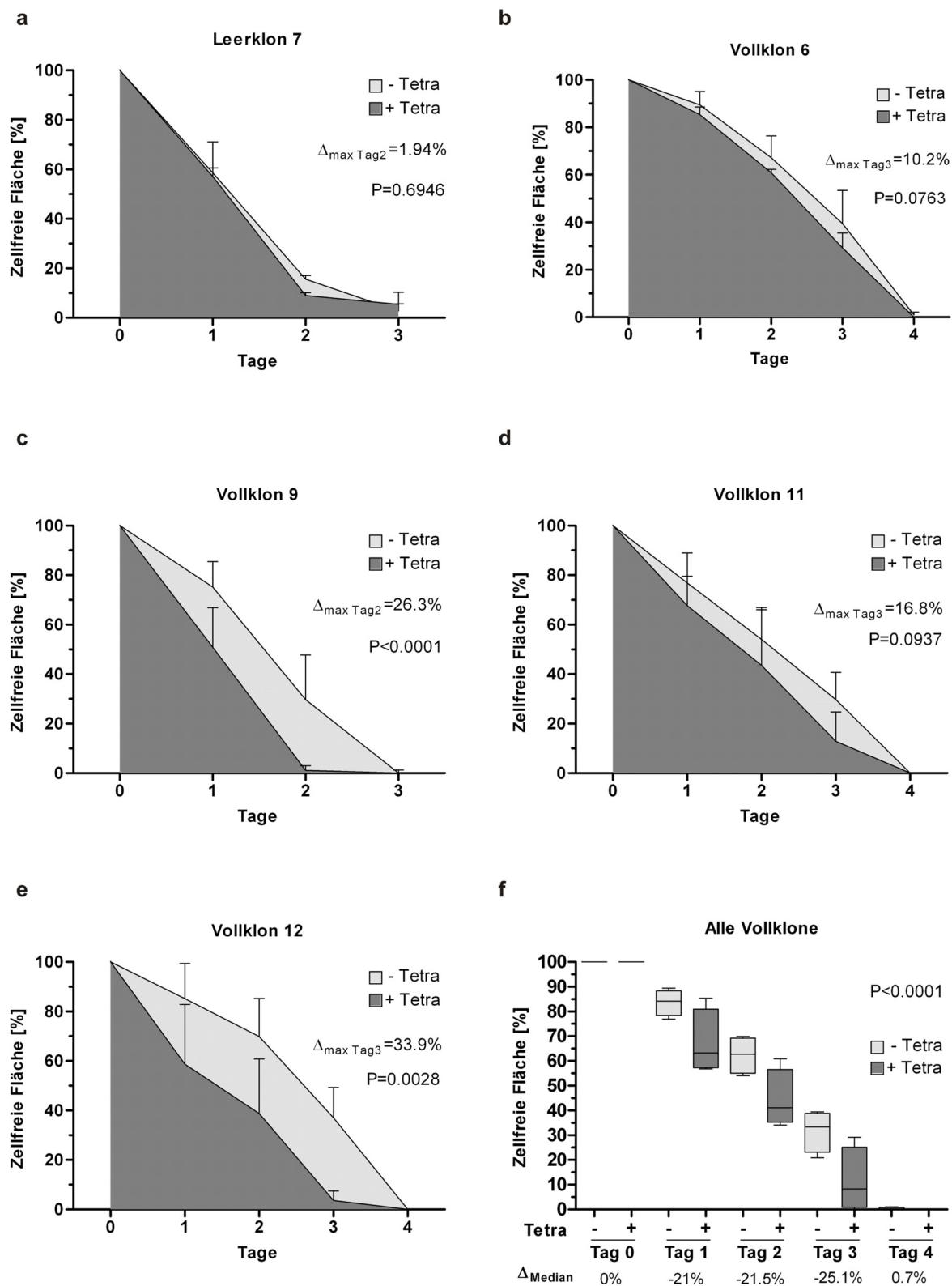


Abb. 3-34: Das Migrationsverhalten von stabilen MCF7/TR/KPNA2 Klonen. Vergleichende Darstellung für die Änderung der zellfreien Fläche in Leerklon 7 (a) und den Vollklonen 6, 9, 11, 12 (b-e) vor und nach Tetracyclin Induktion (1 μ g/ml) für den angegebenen Zeitraum. (f). Übersichtsdarstellung der Medianen Änderung (Δ_{Median}) aller getesteten induzierten (+) und nicht-induzierten (-) Vollklone (siehe b-e). Vertikale Balken: STABW der Dreifachbestimmung. Δ_{\max} : Maximale Änderungsrate für den angegebenen Zeitpunkt (Tag), zwischen den induzierten und nicht-induzierten Zellen. Alle Werte sind auf Tag 0 normiert (Fläche=100%). Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum. Box: 75% Quartile

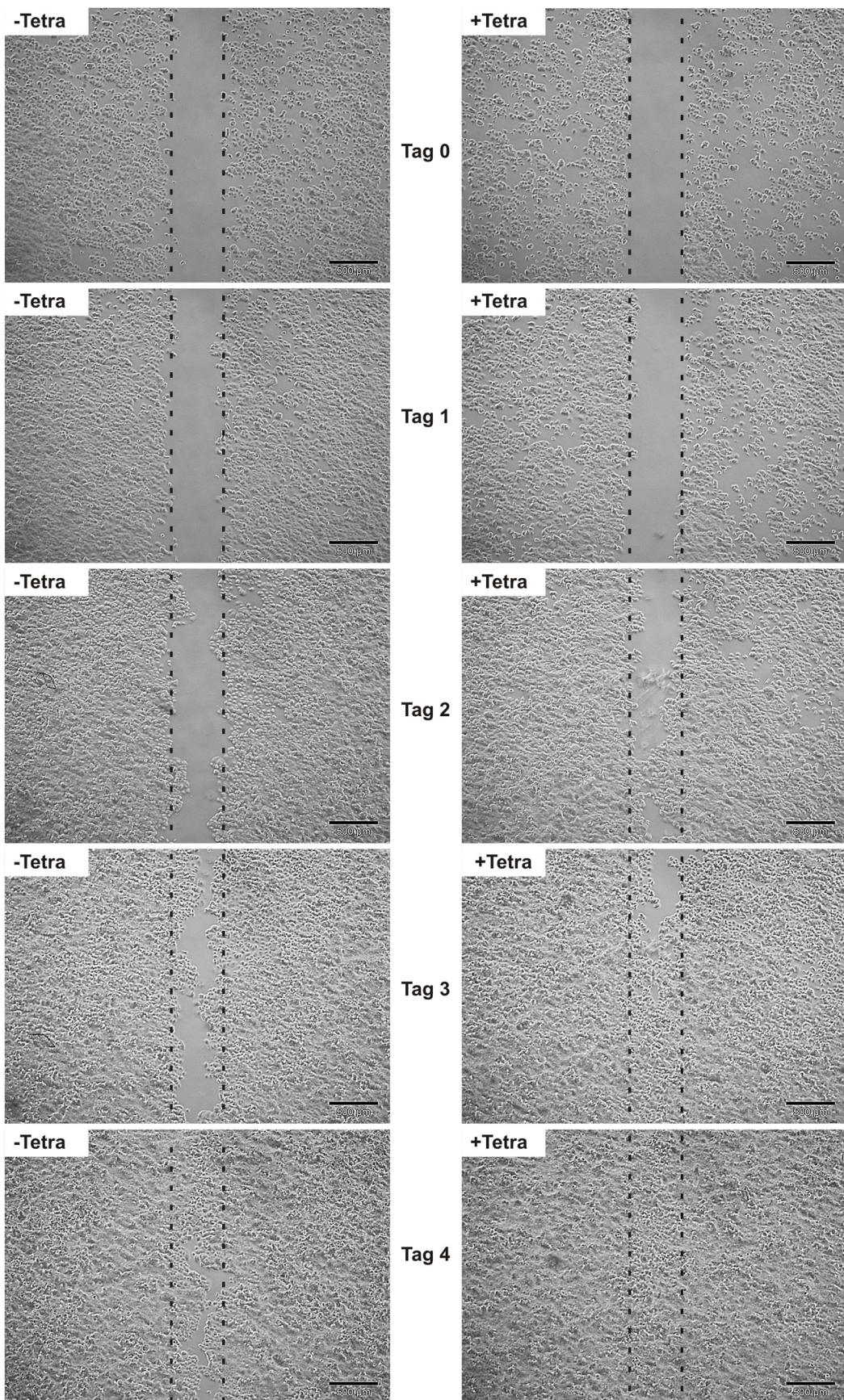


Abb. 3-35: Wundheilungstest mit dem MCF7/TR/KPNA2 Vollklon 12. Vergleichende Darstellung der Abnahme der zellfreien Fläche in Vollklon 12 mit (+) und ohne (-) Tetracyclin Induktion, über einen Zeitraum von 0 bis 4 Tagen. Phasenkontrast Aufnahmen: alle 5x Originalvergrößerung. Horizontaler Balken: 500μm Größenstandard. Gestrichelte vertikale Linie: Rand der zellfreien Fläche

3.12.7 Der Einfluss der KPNA2 Überexpression auf die Kolonienbildung

In einem abschließenden Test sollte der potenzielle Einfluss von KPNA2 auf eine komplexe Eigenschaft von Brusttumorzellen, nämlich die gesteigerte Fähigkeit zur Kolonienbildung, analysiert werden. Die Ergebnisse für MFC10A und MCF7 Wildtypzellen sowie transienten MCF10A/KPNA2 Zellen sind in Abb. 3-36 zusammengestellt. Die maligne MCF7 WT Zelllinie wies im direkten Vergleich zu benignen MCF10A WT Zellen mit 130.6%, eine deutlich höhere Zahl von neu gebildeten Kolonien auf (Abb. 3-36a und d). MCF10A/KPNA2 zeigten im Vergleich zu den Leervektor transfizierten Negativkontrollen eine 190% Steigerung der Kolonienzahl. Die gebildeten Kolonien der MCF10A/KPNA2 Zellen hatten zudem einen größeren Durchmesser, als die Kolonien der Negativkontrolle und der MCF10A Wildtypzellen (vgl. Abb. 3-36d und e). Auf Grund der gesteigerten Koloniengröße der MCF10A/KPNA2 Zellen wurde, zusätzlich zur Messung der Kolonienzahl, eine densitometrische Messung durchgeführt um die Zunahme der besiedelten Oberfläche zu bestimmen. Die Auswertung ergab eine Steigerung der mit MCF10A/KPNA2 Zellen bewachsenen Fläche um 259% (Abb. 3-36c). Die lichtmikroskopische Analyse der Zellmorphologie von MCF10A Einzelzellen ergab kein Unterschied zwischen Wildtypen, leer transfizierten und KPNA2 transfizierten Zellen.

Es zeigte sich weiterhin, dass alle getesteten MCF7/TR/KPNA2 Klone, nach Tetracyclin-Induktion, eine gesteigerte Kolonienbildung aufwiesen. Die Werte für die induzierten Klone V6, V9, V11 und V12 betrugen 36.3%, 37%, 32.6% bzw. 42.9%. Eine unspezifische Wirkung von Tetracyclin auf das Kolonienbildungsvermögen und die Zellmorphologie konnte durch die zusätzlich mitgeführte Negativkontrolle (Leerklon7) ausgeschlossen werden. Diese wies nach Tetracyclin Behandlung eine marginal geringere Kolonienzahl von 2.9% auf (Abb. 3-37a). Die mediane Steigerung der Kolonienbildung aller induzierten MCF7/TR/KPNA2 Klone, war mit $40.58\% \pm 20.05\%$ (Spannweite: $+15.84\% - +86.72\%$, 25-75% Quartile: 27.45- $+52.88$) hochsignifikant ($P<0.001$). Im Gegensatz dazu war die mediane Änderung der nicht-induzierten Kontrollgruppe mit $+0.47\% \pm 10.66\%$ (Spannweite: $-18.59\% - +14.63\%$, 25-75% Quartile: $-7.81 - +7.81$) marginal und nicht signifikant ($P>0.05$) (Abb. 3-37b).

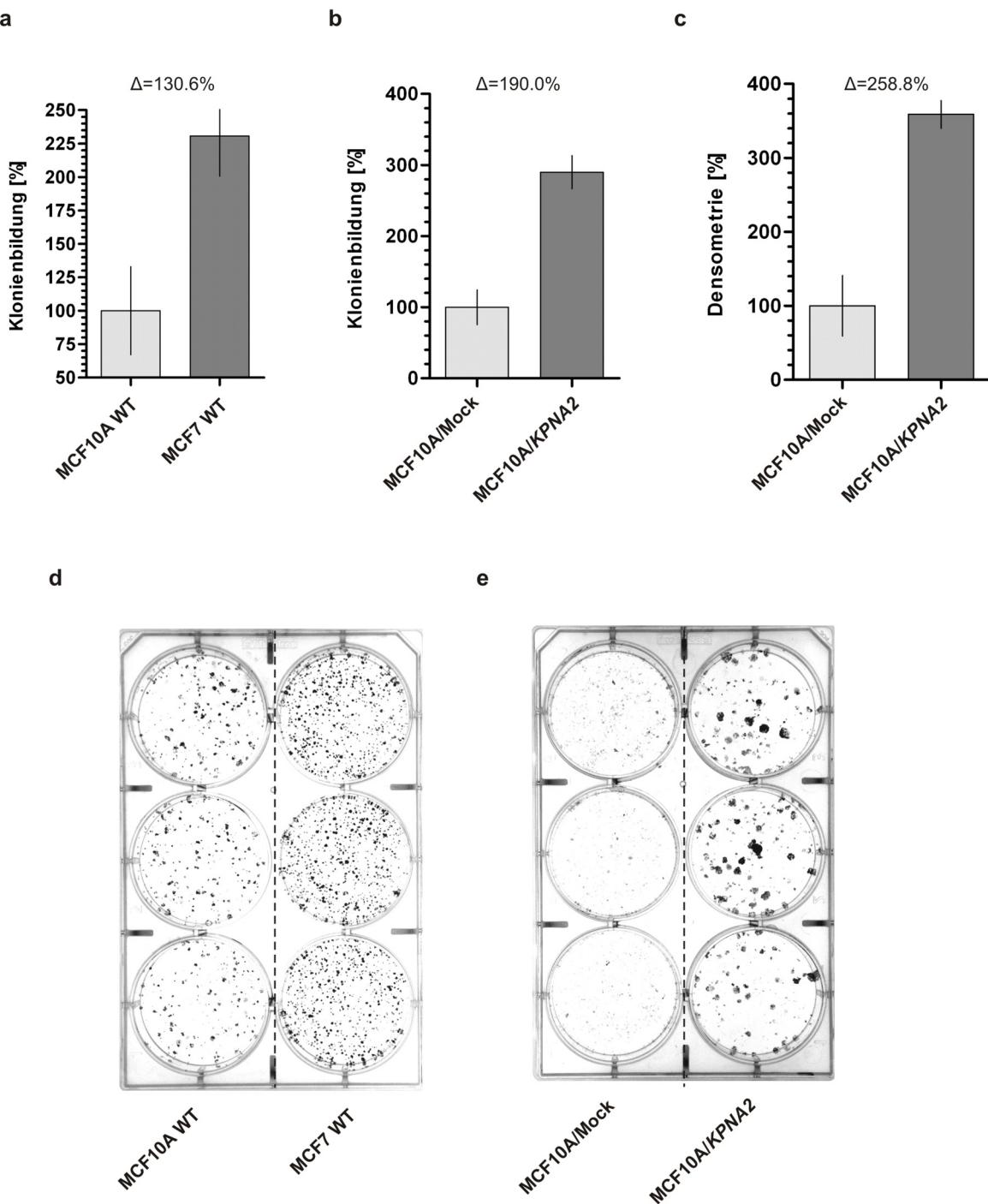


Abb. 3-36: Der Einfluss von KPNA2 auf die Kolonienbildung in MCF10A und MCF7 Zellen. Für die Bestimmung des Kolonienbildungsvermögen wurden pro Versuchsansatz 3x je 1000 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät, 7 Tage unter Standardbedingungen kultiviert, fixiert und für die Auszählung der Kolonien mit Kristallviolett angefärbt. **a:** Unterschiede der gebildeten Kolonien in MCF10A und MCF7 Wildtypzellen (WT). Die Kolonienzahl der MCF10A Zellen diente zur Normierung (=100%). **b:** Die Änderung der neu gebildeten Kolonien [%] von MCF10A Zellen die mit dem KPNA2 Expressionsvektor (MCF10A/KPNA2) bzw. mit dem entsprechendem Leervektor (MCF10A/Mock) transfiziert wurden. Die Transfektion erfolgte für 48 Stunden. Die Zellen wurden 10 Tage unter Selektionsdruck (600 μ g/ml G418) kultiviert. Die Kolonienzahl der MCF10A/Mock Zellen diente zur Normierung (=100%). **c:** Auswertung der bewachsenen Gesamtfläche von MCF10A/KPNA2 Transfektanden (siehe auch **d**) Die Kolonienzahl der MCF10A/Mock Zellen diente zur Normierung (=100%). Vertikale Linien: STABW der Dreifachbestimmung. Δ : Änderungswert der Kolonienbildung. **d** und **e:** Repräsentative Darstellung der für die Auswertung verwendeten Kulturschalen

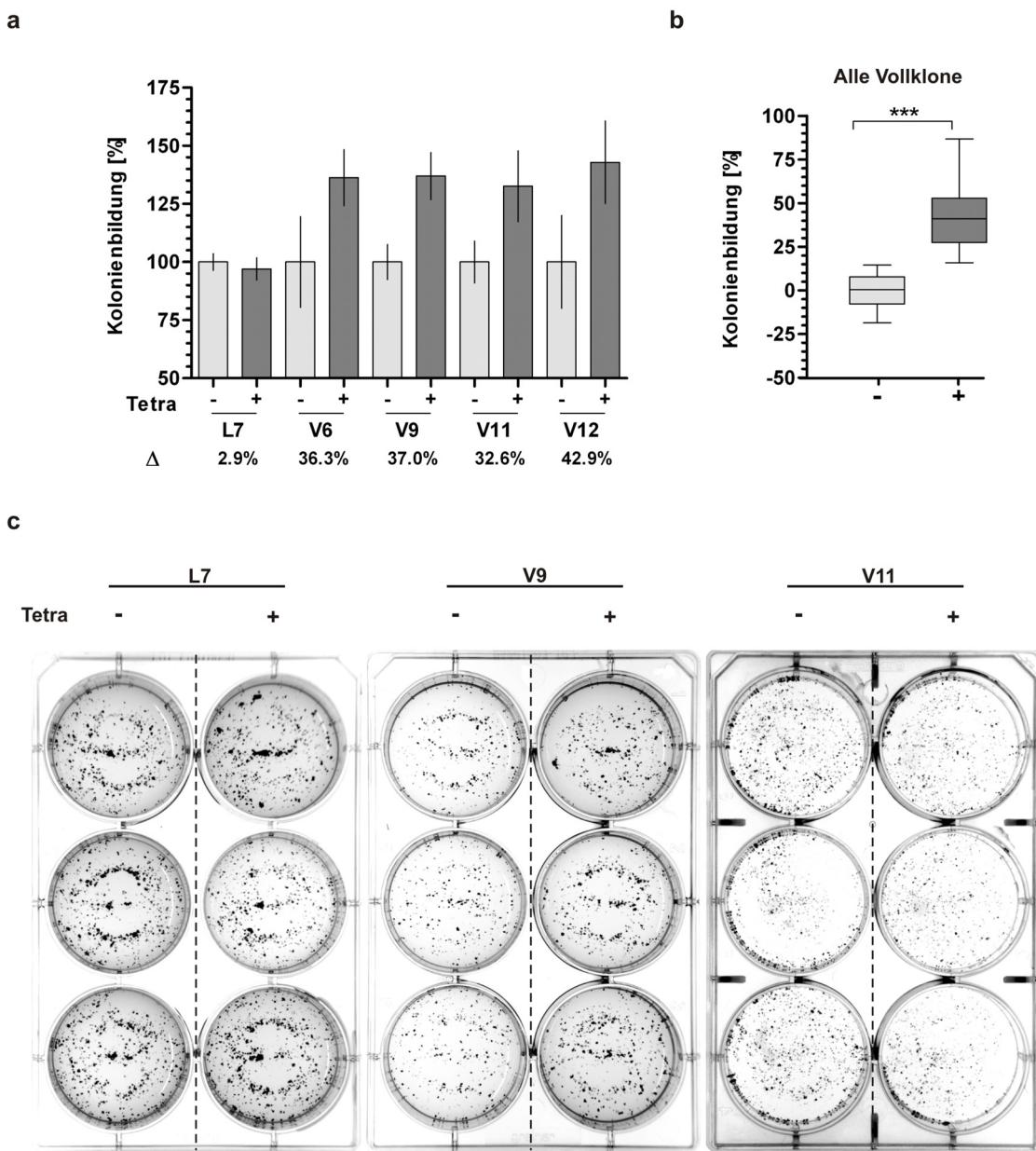


Abb. 3-37: Der Einfluss von KPNA2 auf die Kolonienbildung in MCF7/TR/KPNA2 Klonen. Für die Bestimmung des Kolonienbildungsvermögen wurden pro Versuchsansatz 3x je 1000 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät, 7 Tage unter Standardbedingungen kultiviert, fixiert und für die Auszählung der Kolonien mit Kristallviolett angefärbt. **a:** Darstellung für die Änderung der neu gebildeten Kolonien [%] in vier Vollklonen (V6, 9, 11, 12) sowie einem Leerklon (L7), vor (-) und nach (+) Tetracyclin Induktion (1 μ g/ml). Die Werte der induzierten Klone sind auf die entsprechenden nicht-induzierten Klone normiert (=100%). Vertikale Linien: STABW der Dreifachbestimmung. Δ : Änderungswert der Kolonienbildung. **b:** Vergleichende Darstellung der Kolonienbildung innerhalb der Gruppe der nicht-induzierten (-) und induzierten Vollklone (+). Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Minimum und Maximum, Box: 25% bis 75% Quartile, ***: $P < 0.001$, zweiseitiger Mann-Whitney U Test. **c:** Repräsentative Darstellung von fixierten und gefärbten Kolonien

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des putativen Tumorsuppressorgens *SYNM* für den Brustkrebs

Die Regulation der Zellarchitektur durch das Intermediärfilament-Netzwerk ist ein hoch-dynamischer Vorgang, der es Zellen erlaubt, sich an veränderte Situationen, wie z.B. Zellstress, anzupassen (Herrmann et al., 2009). Eine veränderte Expression von IFs ist bereits mit verschiedensten Krankheiten, wie Muskeldystrophien oder entzündlichen Darm-erkrankungen, assoziiert. In diesem Zusammenhang wurden Mutationen des Intermediärfilaments Keratin bereits diskutiert (Omary et al., 2004). Eine Deregulation von IFs wird darüber hinaus als wichtiger Faktor für die Tumorentstehung und Tumorinvasion angenommen (Guarino, 2007). Ein tumorassozierter Verlust des Zytoskelettfaktors Vimentin wurde bereits als metastasierungsförderndes Ereignis für Brustkrebs nachgewiesen (Whipple et al., 2008). Die Untersuchung der Expression von Intermediärfilamenten im Kontext von malignen Erkrankungen könnte somit für das Verständnis der Tumogenese von Nutzen sein. Bis jetzt war wenig über die potenzielle Rolle des Intermediärfilaments *SYNM* für maligne Erkrankungen bekannt. Eine differenzielle *SYNM* Expression wurde bis jetzt in fibrozystischen Lebererkrankungen und in Lebertumoren nachgewiesen (Schmitt-Graeff et al., 2006). Zudem bewirkt ein Verlust der *SYNM* Expression in humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa Zellen) eine Verminderung der Zelladhäsion (Sun et al., 2009) und reduziert die Migrationsfähigkeit von malignen Astrozytomzellen (Pan et al., 2008). Über die Rolle von *SYNM* für die Entstehung und Progression von Brustkrebs ist jedoch bisher nichts bekannt. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit der Charakterisierung der *SYNM* Expression und Regulation für das humane Mammakarzinom begonnen werden.

Initial durchgeführte *Real-Time* PCR und cDNA *Dot Blot* Analysen belegten eine starke *SYNM* mRNA Expression in normalem Brustgewebe. Im Gegensatz dazu konnte ein hoch-signifikanter *SYNM* Expressionsverlust in invasiven Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Nach diesem Befund wurde eine detaillierte Charakterisierung der *SYNM* Proteinexpression in Brustepithelien vorgenommen. Das *SYNM* Protein wird vornehmlich im Zytoplasma myoepithelialer Zellen der Brustdrüse und zu einem geringeren Anteil auch in luminalen Epithelzellen exprimiert. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit der beschriebenen *SYNM* Expression in Muskelzellen von Säugern (Hirako et al., 2003). Die myoepitheliale Lokalisation ist durch die biologische Funktion von *SYNM*, nämlich die Erhaltung der Zellkontraktibilität von Herz- und Skelettmuskelzellen erklärbar (Blake und Martin-Rendon, 2002). Eine stringent regulierte *SYNM* Expression in myoepithelialen Strukturen könnte demnach ein wichtiger Faktor für die Homöostase und die Morphologie des humanen Brustgewebes sein. Insbesonders die Laktationsfähigkeit des

Brustdrüsengewebes ist von der Kontraktibilität myoepithelialer Zellen abhängig (Deugnier et al., 2002). Ein starker SYNM Verlust war in 70% und ein vollständiger SYNM Verlust in 56% der untersuchten invasiven Brusttumore nachweisbar. Bis jetzt wurde ein tumorassozierter Verlust der SYNM Expression lediglich für die epithelialen Strukturen hepatzellulärer Tumore gezeigt (Schmitt-Graeff et al., 2006). Die hier durchgeführten Expressionsstudien konnten erstmalig eine Herabregulation von SYNM auf Transkriptions- und Translationsebene im humanen Mammakarzinom belegen. Die genaue Bestimmung des Zeitpunkts des SYNM Verlusts während der Brustkrebsentwicklung könnte durch die Analyse der SYNM Expression in prämalignen Läsionen und nicht invasiven (*in situ*) Tumoren realisiert werden.

In Anbetracht der biologischen Funktion von SYNM könnte ein Expressionsverlust großen Einfluss auf die Morphologie und die Funktionsfähigkeit myoepithelialer Zellen nehmen. SYNM ist funktionell mit dem Dystrophin-Komplex verbunden (Blake und Martin-Rendon, 2002). Somit könnte ein tumorspezifischer SYNM Verlust die mechanische Verbindung zwischen der Extrazellulären Matrix (ECM) und dem intrazellulären Intermediärfilament Netzwerk in Myoepithelzellen unterbrechen. Dies würde möglicherweise die Zelladhäsion verringern, das Metastasierungspotenzial von Tumorzellen erhöhen und so zur Progression des Mammakarzinoms beitragen. Eine solche, durch den Expressionsverlust eines Intermediärfilaments bedingte und die neoplastische Progression forcierende Zytoskelett-Destabilisierung wurde bereits für das IF Tropomyosin-1 (TPM1) in MCF7 und MDA-MB231 Brustkrebszelllinien gezeigt (Bharadwaj et al., 2005). Myoepithelzellen nehmen fundamentalen Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der luminalen Strukturen des Brustgewebes. Myoepitheliale Brustzellen werden auch als „natürliche Tumorsuppressoren“ bezeichnet (Lakhani und O'Hare, 2001), weil sie auf umliegende Gewebestrukturen Einfluss nehmen und z.B. die Angiogenese inhibieren bzw. den Wachstumsarrest und die Apoptose induzieren können (Nguyen et al., 2000). Die myoepitheliale Zellschicht ist ein Schlüssellement für die Etablierung und für den Erhalt der epithelialen Architektur der Brustdrüse (Deugnier et al., 2002).

Nachdem der SYNM Verlust im Mammakarzinom gezeigt werden konnte, sollte der molekulare Mechanismus für dieses tumorassoziierte *gene-silencing* identifiziert werden. Interessanterweise beinhaltet der SYNM Promotor einen CpG-reichen Sequenzabschnitt (CpG-Insel) der zudem verschiedene transkriptionsrelevante DNA-Bindemotive beinhaltet. Eine CpG Methylierung in diesem für die Transkription potenziell regulatorisch wichtigen Promotorbereich könnte zu einer Repression der SYNM Expression führen. In zwei humanen Brustkrebszelllinien (T47D, SKBR3) und in mehr als einem Viertel (26.7%) der analysierten invasiven Mammakarzinome konnte die SYNM Promotormethylierung nachgewiesen

werden. Die CpG Methylierung erstreckte sich dabei über alle, in dem analysierten Sequenzbereich enthaltenen, Transkriptionsfaktor Bindestellen. Dies konnte durch die Pyrosequenzierung der *SYNM* Promotorsequenzen von Brustkrebszelllinien und von humanen Mammakarzinomen bestätigt werden, wobei im Fall einer *SYNM* Promotormethylierung alle CpG Dinukleotide eine durchgehende Methylierung aufwiesen. Ferner zeigte sich bei allen analysierten invasiven Tumoren eine höhere Methylierungsfrequenz der ersten neun CpGs. Ob es sich hierbei um ein wiederkehrendes Methylierungsmuster in Brusttumoren handeln könnte, sollte durch die Analyse einer höheren Fallzahl statistisch abgesichert werden. Die Promotormethylierung in dem betrachteten Sequenzabschnitt (-387bo bis -250bp) könnte die Anbindung von transkriptionsfördernden Faktoren räumlich inhibieren und so zu einem aberranten *SYNM gene-silencing* im humanen Brustkrebs beitragen.

Es konnte eine starke Korrelation zwischen der *SYNM* Promotormethylierung und der *SYNM* Expression nachgewiesen werden. Ein signifikanter *SYNM* Expressionsverlust war ausschließlich in Brusttumoren mit gleichzeitiger *SYNM* Promotormethylierung vorhanden. Eine *in vitro* Demethylierung des *SYNM* Promotors war zudem mit einer starken *SYNM* Re-Expression in den beiden ursprünglich methylierten Mammakarzinomzelllinien, T47D und SKBR3, funktionell verbunden. Nach der *in vitro* Demethylierung des *SYNM* Promotors war die *SYNM* Expression in T47D und SKBR3 Zellen mit der von unmethylierten Brustkrebszelllinien vergleichbar. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass die *SYNM* Promotormethylierung ein Hauptmechanismus für das aberrante *SYNM gene-silencing* in humanem Brustkrebs darstellt und dass eine *SYNM* Promotor Demethylierung den *SYNM* Transkriptionsblock in T47D und SKBR3 Brustkrebszelllinien aufheben kann. Die marginale *SYNM* Expressionssteigerung in der unmethylierten Zelllinie ZR75-1 ist wahrscheinlich in der globalen Chromatin dekondensierenden Wirkung von TSA begründet. Dies unterstreicht zudem, dass nicht TSA für die starke *SYNM* Re-Expression in T47D und SKBR3 verantwortlich sein kann, sondern durch die demethylierende Wirkung von DAC hervorgerufen werden muss.

Die in dieser Studie gefundene durchschnittliche *SYNM* Promotormethylierungsfrequenz ist mit 26.7% kein hoch-frequentes epigenetisches Ereignis, besitzt jedoch eine prognostische Qualität. Die durchgeführten Kontingenztabellen-Analysen belegen, dass die *SYNM* Methylierung hochsignifikant mit einer fortgeschrittenen Metastasierung (positiver Lymphknotenstatus) und einer schlechten Tumorgraduierung (G2 bis G3) assoziiert ist. Univariate Kaplan-Meier Analysen bestätigen die hochsignifikante Assoziation zwischen der *SYNM* Promotormethylierung und dem reduzierten rezidivfreien Überleben. Die enge Korrelation der *SYNM* Methylierung mit der Lymphknotenmetastasierung und dem verkürzten

rezidivfreien Überleben deutet darauf hin, dass das Potenzial *SYNM*-methylierter Tumore, in umliegende Gewebestrukturen zu metastasieren, gesteigert sein könnte. Die Assoziation der *SYNM* Methylierung mit der Tumorgraduierung, einem klinischen tumorprogressiven Faktor, impliziert weiterhin, dass *SYNM*-methylierte Tumore ein höheres Potenzial zur Tumorprogression aufweisen. Auf Grund der Beobachtung, dass, mit Ausnahme der Tumorgröße, alle wichtigen prognostischen Parameter des humanen Mammakarzinoms eine signifikante Assoziation mit einem reduzierten Überleben anzeigen, konnte das für diese Studie verwendete Kollektiv als statistisch repräsentativ bewertet werden. Zwischen der *SYNM* Methylierung und dem Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen konnte keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden.

Multivariate Cox Regressionsanalysen (Cox, 1972) zeigen zudem, dass die prognostische Qualität der *SYNM* Methylierung einen von anderen Prognosefaktoren, wie Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus, Tumorgraduierung und Nodal-Status, unabhängigen Informationsgewinn bietet. Die *SYNM* Promotormethylierung zeigte, in dem verwendeten Kollektiv, ein knapp dreifach erhöhtes Rezidivrisiko (HR:2.9, P=0.0282) für Brustkrebspatientinnen an. Für bereits beschriebene DNA-Methylierungsmarker, wie z.B. der *GSTP1* und *CDH1* Methylierung, zeigte sich hingegen eine Limitierung der prognostischen Aussagekraft, bedingt durch eine enge Assoziation mit anderen starken Prognosefaktoren wie dem Nodal-Status (Shinozaki et al., 2005). Diese Marker waren somit prognostisch nicht unabhängig, was den zusätzlichen Informationsgewinn automatisch verringert. Im Gegensatz dazu bewies die *SYNM* Promotormethylierung ihren unabhängigen Status sogar gegenüber dem bis jetzt stärksten bekannten Prognosefaktor für das Mammakarzinom, dem Lymphknotenstatus (Carter et al., 1989).

Auf Grund der Tatsache, dass die *SYNM* Methylierung stark mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert war, wurden weiterführende univariate Überlebens-Analysen mit pN positiven Patientinnen durchgeführt. Die Fokussierung auf diese Gruppe von Hochrisiko-Brustkrebspatientinnen offenbarte eine weitere prognostische Qualität der *SYNM* Methylierung. Erwartungsgemäß hatten Patientinnen ohne Befall der Lymphknoten (pN negativ) ein besseres rezidivfreies Überleben als Frauen mit Lymphknotenmetastasen. Innerhalb dieser Patientinnengruppe hatte die *SYNM* Methylierung keine prädiktive Aussagekraft über die Rezidivwahrscheinlichkeit. Patientinnen mit befallenen Lymphknoten und nachgewiesener *SYNM* Promotormethylierung hatten mit Abstand die schlechteste Prognose für ein rezidivfreies Überleben. Anders verhielt es sich in der Gruppe der Nodal-positiven Patientinnen. Mammakarzinompatientinnen mit Lymphknotenmetastasen und ohne *SYNM* Methylierung hatten eine unerwartet gute Prognose, also eine deutlich geringere Rezidivwahrscheinlichkeit, als pN-positive Patientinnen mit *SYNM* Methylierung. Die Risikoabschätzung von Nodal-positiven Hochrisiko-Brustkrebspatientinnen ist von großer

Bedeutung für eine zukünftige Therapieverbesserung. Neueste Studien belegen für die Subgruppe von Patientinnen mit ein bis drei befallenen Lymphknoten eine ausreichend gute Prognose, sodass eine adjuvante Chemotherapie keinen Prognosevorteil bieten würde und deshalb auf solche belastende Maßnahmen verzichtet werden könnte (Mook et al., 2009). Bis jetzt herrscht jedoch ein Mangel an zuverlässigen DNA-Methylierungsmarkern die zu einer verbesserten Unterscheidung zwischen Niedrig- und Hoch-Risiko Brustkrebs-patientinnen beitragen könnten. Die *PITX2* Methylierung ist der bislang am besten evaluierte DNA-Methylierungsmarker für das humane Mammakarzinom. Seine prognostische Qualität ist jedoch für pN-positive Patientinnen gering und entfaltet sich erst in der Gruppe von Nodal-negativen und gleichzeitig Hormonrezeptor positiven Patientinnen (Harbeck et al., 2008). Die Anwendung von Brustkrebs Früherkennungsmarkern in der klinischen Routine wird von der *European Group on Tumor Markers (EGTM)* auf Grund der fehlenden Sensitivität für frühe Brustkrebsstadien nicht empfohlen. Dennoch besitzen DNA-Methylierungsmarker ein großes diagnostisches Potenzial, da die CpG Promotormethylierung oft ein frühes Ereignis der Tumorgenese ist. Über den Zeitpunkt der *SYNM* Methylierung während der Tumorgenese des Mammakarzinoms kann in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden. Auf Grund der relativ geringen Methylierungsfrequenz (26.7%) würde *SYNM* als Diagnosemakr für die Brustkrebsfrüherkennung keinen Informationsgewinn bieten.

4.2 Schlussfolgerungen für *SYNM*

Die hier vorgestellten Daten geben erste Hinweise auf, dass die *SYNM* Methylierung als ein neuer Methylierungs-Biomarker für die Risikoabschätzung Nodal-positiver Mammakarzinom-patientinnen Verwendung finden könnte. Der hier gefundene prognostische Wert der *SYNM* Methylierung muss für eine mögliche Anwendung in der klinischen Onkologie in weiteren retrospektiven Studien validiert werden. Die Identifizierung und die Validierung von derartigen Biomarkern ist ein wichtiger Schritt in Richtung Therapieoptimierung. Das prädiktive Potenzial von epigenetischen Markern wurde für maligne Erkrankungen bereits mehrfach gezeigt. Mit Hilfe der tumorspezifischen Methylierung der *death-associated* Proteinkinase (DAPK) ist es z.B. möglich, aggressive Stadium I Tumore des Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms zu identifizieren (Tang et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gelungen ist, die *SYNM* Expression in der gesunden Brust zu charakterisieren und die DNA Promotormethylierung als tumorspezifischen Mechanismus für den *SYNM* Expressionsverlust, im humanen Mammakarzinom nachzuweisen. Die *SYNM* Methylierung könnte zudem als neuer prognostischer DNA-Methylierungsmarker für den humanen Brustkrebs dienen und helfen, die Risikoabschätzung von Nodal-positiven Patientinnen zu verbessern.

4.3 Ausblick für SYNM

Auf Grund seines tumorspezifischen Expressionsverlust und seiner wichtigen biologischen Funktion könnte *SYNM* ein neues Tumorsuppressorgen der humanen Brust darstellen, das durch eine aberrante Promotormethylierung im Zuge der Tumorgenese epigenetisch inaktiviert wird. Die hier vorgestellten Resultate geben erste Hinweise auf den potenziellen tumorsuppressiven Charakter von *SYNM*. Diese Eigenschaft muss jedoch in funktionellen Analysen bestätigt werden. Zu diesem Zweck würden sich *in vitro* Modelle eignen, mit denen sich die funktionellen Auswirkungen einer differenziellen Expression des Intermediärfilaments *SYNM* auf den Phänotyp von benignen und malignen Tumorzellen charakterisieren lassen. Die epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die einen Einfluss auf das Intermediärfilament Netzwerk und damit auf die Zytoskelettorganisation von Tumorzellen nimmt, wurde bereits für die aberrante Promotormethylierung von *PAK3* bei Lungenkrebs gezeigt (Hoque et al., 2008). Mit Bezug auf das humane Mammakarzinom wurden ebenfalls verschiedene Tumorsuppressorgene als aberrant methyliert identifiziert. Prinzipiell können dabei die verschiedensten tumorrelevanten Signaltransduktionswege von diesen Epimutationen betroffen sein. Die Tumorbildung wird z.B durch die Methylierung des Zellzykluskontrollfaktors 14-3-3 σ forciert (Ferguson et al., 2000). Des Weiteren wurden, durch Hypermethylierung bedingte, Störungen der DNA Reparatur Maschinerie (*BRCA1*) (Dobrovic und Simpfendorfer, 1997), der Zelladhäsion (*CDH1*) (Caldeira et al., 2006), der Zell-Differenzierung (*SFRP1* und *SFRP2*) (Veeck et al., 2006; Veeck et al., 2008) und des Steroid-Rezeptorsignalwegs (*ESR1*, *PGR*) (Widschwendter und Jones, 2002) nachgewiesen. Diese Klasse von epigenetisch inaktivierten Tumorsuppressorgenen bietet ein mögliches Potenzial für die Entwicklung neuer (Brust)-Krebstherapien. Durch die prinzipielle Reversibilität der CpG Promotormethylierung *in vivo*, durch DNA-Methyltransferasen- bzw. Histon-Deacetylaseinhibitoren, sind epigenetisch inaktivierte Tumorsuppressorgene für die Entwicklung epigenetischer Therapien von großem Interesse (Yang et al., 2001; Kristensen et al., 2009).

4.4 Die funktionelle Analyse des putativen Onkogens *KPNA2* im Brustkrebs

Die Maschinerie des eukaryotischen Kerntransports wird schon seit längerem mit der Entstehung und Progression von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Kau et al., 2004). Karyopherine, die löslichen Import und Exportrezeptoren des eukaryotischen Kerntransports, sind für die korrekte zytoplasmatische und nukleäre Translokation von tumorsuppressiven und onkogenen Faktoren verantwortlich und können auf diese Weise Einfluss auf fundamentale Prozesse wie die Zellzykluskontrolle nehmen (Mosammaparast und Pemberton 2004; Kau et al., 2004). Der Kerntransporter Karyopherin $\alpha 2$ (KPNA2) ist im Vergleich zu normalem Brustepithel in invasiven Mammakarzinomen heraufreguliert und mit reduziertem Patientenüberleben, gesteigertem Rezidivrisiko, fortgeschrittener Tumogröße und Tumorgraduierung verknüpft (Dahl et al., 2006). Des Weiteren korreliert die KPNA2 Expression mit wichtigen Prognosefaktoren wie dem Hormonrezeptorstatus und der Her2/Neu Expression (Gluz et al., 2008). Die Aufregulationen von KPNA2 konnte bereits im DCIS, einer frühen nicht invasiven Vorstufe des invasiven duktalen Karzinoms, nachgewiesen werden (Dankof et al., 2007). Die KPNA2 Überexpression ist mit basalen und Her2/Neu positiven Tumoren, also mit aggressiven Subtypen des Mammakarzinoms, verknüpft. Die KPNA2 Expression könnte somit ein Werkzeug für die Stratifizierung von Niedrig- und Hoch-Risikopatientinnen sein und damit möglicherweise für die Therapieoptimierung eingesetzt werden (Gluz et al., 2008).

4.5 Die Generierung von KPNA2 überexprimierenden *in vitro* Modellen

Im Gegensatz zu dem beeindruckenden Potenzial von KPNA2 als Biomarker für das humane Mammakarzinom war über die möglichen phänotypischen Auswirkungen der KPNA2 Überexpression auf Brusttumorzellen nichts bekannt. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit detaillierte funktionelle Tests mit KPNA2 überexprimierenden Brustkrebszelllinien durchgeführt werden. Eine Voraussetzung für diese Analysen war die Herstellung geeigneter *in vitro* Modellsysteme. Diese Modellsysteme sollten KPNA2, ausgehend von einer unterschiedlichen hohen Grundexpression, überexprimieren. Auf diese Weise sollte der expressionsabhängige Einfluss von KPNA2 auf Tumorzellen untersucht werden. Nicht-transformierte benigne MCF10A und MCF12A Zellen hatten die niedrigste KPNA2 Expression aller getesteten benignen Brustzelllinien. Die Mehrheit (87%) der malignen Zelllinien zeigten eine mindestens um 100% gesteigerte KPNA2 Expression. Dieses Ergebnis entspricht der, im Vergleich zu normalem Brustepithel, gefundenen tumor-assoziierten KPNA2 Überexpression in nicht-invasiven und invasiven Formen des humanen Mammakarzinoms (Dahl et al., 2006; Dankof et al., 2007; Gluz et al., 2008). Auf Grund der niedrigen KPNA2 Expression und der Klassifizierung als benigne Mammakarzinomzelllinie wurde MCF10A als Rezipient für die Transfektion mit einem KPNA2 Expressionsvektor ausgewählt. MCF10A Zellen stammen von der Brustreduktionsplastik einer 36-jährigen

kaukasischen Frau und sind fibrozystischen Ursprungs. Immortalisierte MCF10A Zellen werden als nicht-transformierte und nicht-invasive Brustepithelzellen eingestuft (Neve et al., 2006). Als zweiter Rezipient für die Transfektion mit dem KPNA2 Vektor wurden maligne MCF7 Zellen ausgewählt. MCF7 zeigte, im Vergleich zu MCF10A und anderen malignen Zelllinien, eine moderat gesteigerte KPNA2 mRNA (x5.9) und Proteinexpression (x5.1). MCF7 Zellen wurden ursprünglich aus der pleuralen Effusion einer 69 Jahre alten, schwarzen Frau mit invasiv duktalem Karzinom isoliert. MCF7 Zellen werden dem luminalen molekularen Subtyp des humanen Mammakarzinoms zugeordnet und sind, im Gegensatz zu MCF10A, Hormonrezeptor positiv (Neve et al., 2006). Entsprechend der luminalen Klassifizierung zeigen MCF7 Zellen eine gute morphologische Differenzierung und haben *in vitro* einen nicht-invasiven Phänotyp (Neve et al., 2006).

Für diese Studie wurde ein Tet-On KPNA2 Expressionssystem verwendet, mit dem eine gezielte Induktion der KPNA2 Expression in MCF10A/TR/KPNA2 und MCF7/TR/KPNA2 Transfektanden möglich sein sollte. Das System bietet den großen Vorteil, dass ein und derselbe Klon vor und nach KPNA2 Induktion funktionell charakterisiert werden kann. Prinzipiell wird dadurch die Vergleichbarkeit der funktionellen Effekte dadurch verbessert werden. Jedoch hat dieses induzierbare Expressionssystem den Nachteil eines weit höheren Etablierungsaufwandes, verglichen mit herkömmlichen konstitutiven Expressionsvektoren. Das für die Steuerung der KPNA2 Induktion notwendige Regulatorplasmid (pcDNA6/TR) und das eigentliche KPNA2 Expressionsplasmid (pT-REx-DEST30/KPNA2) mussten durch zwei subsequenzielle Transfektionen stabil in die Genome der Rezipientenzellen integriert werden. Die Induktionsfähigkeit der stabilen TR/KPNA2 Klone musste im Anschluss durch Funktionstests bestätigt und optimiert werden. Vor Etablierung induzierbarer MCF10A/TR/KPNA2 und MCF7/TR/KPNA2 Modelle wurde die Funktionalität des pT-Rex-DEST30/KPNA2 Vektors überprüft. Dazu wurde der KPNA2-Vektor transient und ohne Regulatorplasmid in MCF10A und MCF7 Zellen transfiziert. Die daraus resultierende Steigerung der KPNA2 mRNA Expression war in MCF10A/KPNA2 (x47.5) und MCF7/KPNA2 (x45.9) sehr ähnlich. MCF10A/KPNA2 Zellen hatten, bei ähnlicher Transfektionseffizienz, einen deutlich höheren KPNA2 Proteinanstieg (x17.4) als MCF7/KPNA2 Zellen (x2.4). Interessanterweise war die maximale KPNA2 Proteinmenge in beiden Zelltypen, trotz der unterschiedlichen Induktionsstärken, ähnlich. Dies könnte bedeuten, dass posttranskriptionale Prozesse wie z.B. Protein-Ubiquitinierung (Hershko und Ciechanover, 1992), eine Obergrenze für die maximale zelluläre KPNA2 Konzentration in MCF10A und MCF7 Zellen determinieren. MCF7 Wildtypzellen haben im Vergleich zu MCF10A Wildtypzellen bereits eine gesteigerte KPNA2 Proteinexpression. Eine weitere Verdoppelung bzw. Verdreifachung der KPNA2 Expression in MCF7/KPNA2 Zellen resultiert somit ebenfalls in der angestrebten drastischen Zunahme der zellulären KPNA2 Konzentration. Die Funktionalität des KPNA2

Expressionsvektors konnte durch diesen Versuch bestätigt und die zu erwartende KPNA2 Expressionssteigerung in stabilen MCF10A/TR/KPNA2 und MCF7/TR/KPNA2 Zellen eingeschätzt werden.

Die Etablierung des induzierbaren KPNA2 Expressionssystems begann mit der Generierung von MCF10A/TR und MCF7/TR Klonen. Durch einen Funktionstest, bei dem isolierte MCF10A/TR und MCF7/TR Klone transient mit einem TR-reguliertem *lacZ* Vektor transfiziert und einer Blau-Weiß-Selektion unterzogen wurden, konnten MCF10A/TR (Nr.1) bzw. MCF7/TR (Nr.2) Klone identifiziert werden, die den Tet-Repressor in ausreichender Menge exprimierten. Diese Klone hatten das Potenzial den Promotor des pT-Rex-DEST30/KPNA2 Vektors in Abwesenheit von Tetracyclin effektiv zu blockieren und die vektorielle KPNA2 Expression zu inhibieren. Im Gegensatz zum MCF7/TR Klon2 gestaltete sich die weitere Transfektion des MCF10A/TR Klon1 mit dem pT-Rex-DEST30/KPNA2 Vektor als nicht realisierbar. Auch nach dreimaligem Versuch war es nicht möglich auf Dauer lebensfähige MCF10A/TR/KPNA2 Klone in Reinkultur zu bringen. Gründe für dieses Phänomen könnten eine schlechte Transfektionsfähigkeit der MCF10A/TR Zellen oder eine durch die erste Transfektion verursachte unzureichende Zellfitness sein, sodass ein weiterer Transfektionsschritt bzw. eine Kultivierung unter Selektionsdruck unmöglich waren.

Nachdem der Nachweis einer stabilen Integration des KPNA2 Vektorkonstrukts durch eine spezifische Kontroll-PCR mit genomischer DNA zweier MCF7/TR/KPNA2 und einem Leerklon erbracht werden konnte, wurde mit der Charakterisierung der Klone begonnen. Die Mehrheit der isolierten MCF7/TR/KPNA2 Klone (78%, 18/23) zeigten nach Tetracyclin Induktion eine hochsignifikante Steigerung der KPNA2 mRNA Expression (medianer FC=2.8). Der Tet-Repressor musste demnach in diesen Klonen durch die Tetracyclin Behandlung effektiv abgefangen und die vektorielle KPNA2 Expression induziert worden sein. Auffällig war, dass die Steigerung der KPNA2 mRNA Expression in den zuvor transient transfizierten MCF7/KPNA2 Zellen deutlich stärker ausfiel (FC=45.9), als bei den stabilen MCF7/TR/KPNA2 Klonen (Medianer FC=4.3). Diese Unterschiede könnten damit erklärt werden, dass bei einer transienten Transfektion eine große Menge Plasmid von den Zellen aufgenommen wird, die kurzfristig zu einer stärkeren KPNA2 Expression führte. Das Ausmaß der stabilen Integration des KPNA2 Vektors könnte hingegen vergleichsweise geringer ausfallen, was sich in einer weniger starken KPNA2 mRNA Expressionssteigerung widerspiegelte. Im Gegensatz dazu war die maximal erreichbare KPNA2 Proteinexpression, verglichen mit transienten MCF7/KPNA2 Zellen (FC=2.4), in den stabilen MCF7/TR/KPNA2 Klonen fast doppelt so stark (Medianer FC=4.2). Dieses Ergebnis verdeutlicht den Vorteil von stabilen Expressionsmodellen gegenüber transienten Modellen. Die erreichbaren Effekte in polyklonalen Modellen sind immer stark von einer variablen Transfektionseffizienz und der

Heterogenität der Wildtypzellen abhängig. Stabile Systeme hingegen sind auf Grund ihrer Monoklonalität reproduzierbarer. Ein unspezifischer Einfluss von Tetracyclin auf die KPNA2 Expression konnte, durch die erwartungsgemäß unveränderte KPNA2 mRNA- und Proteinexpression vor und nach Tetracyclin Behandlung in allen getesteten MCF7 Leerklonen, ausgeschlossen werden.

Zwecks Optimierung der Induktionseffizienz der MCF7/TR/KPNA2 Klone wurden verschiedene Tetracyclin Konzentrationen und Induktionszeiten getestet. Es stellte sich heraus, dass die von Beginn an gewählte Tetracyclin Konzentration [1 μ g/ml] und eine Induktionsdauer von mindestens 48 Stunden zu der optimalen KPNA2 Expressionssteigerung führten. Die hier ermittelten Parameter wurden ebenfalls für vergleichbare Systeme bestätigt und für alle folgenden Analysen angewendet (Jones et al., 2005). Eine konzentrations- oder zeitabhängige zelltoxische Wirkung von Tetracyclin konnte durch die MCF7 Wildtypkontrolle erfolgreich ausgeschlossen werden. Für die weiteren funktionellen Analysen wurden insgesamt fünf MCF7TR/KPNA2 Klone (V6, V9, V11, V12 und V18) ausgewählt die eine gute KPNA2 Proteininduktion auswiesen (Medianer FC=4.2). Somit war es möglich die Auswirkungen einer als physiologisch zu bewertenden KPNA2 Überexpression *in vitro* zu untersuchen. Obwohl jeder MCF7TR/KPNA2 Klon mit seinem nicht-induzierten Gegenstück über eine individuelle Negativkontrolle verfügt, wurde der MCF7 Leerklon 7 als zusätzliche Negativkontrolle für alle funktionellen Versuche mitgeführt. Physiologisch bedingte Varianzen bei der Messung von phänotypischen Veränderungen sind unvermeidbar. Die Leerklonkontrolle diente der Differenzierung von echten funktionellen Effekten der KPNA2 Überexpression und experimentell bedingten Messfehlern.

Neben der KPNA2 Induktion musste die Funktionalität des vektoriell exprimierten KPNA2 Proteins in MCF7/TR/KPNA2 Klonen bestätigt werden. Die intrazelluläre Verteilung des KPNA2 Proteins wurde mittels ImmunoGold Partikel-Markierung auf transelektronenmikroskopischer Ebene untersucht. Alle getesteten induzierten MCF7/TR/KPNA2 Klone hatten einen, im Vergleich zu den entsprechenden nicht-induzierten Kontrollen, hochsignifikanten Anstieg der KPNA2 Proteindichte im Zytoplasma und im Nukleus. Die Tetracyclin behandelte Leerklonkontrolle zeigte keine signifikante Änderung der KPNA2 Dichte, sodass ein unspezifischer Einfluss von Tetracyclin auf die intrazelluläre Verteilung von KPNA2 ausgeschlossen werden konnte. Mitunter ließ sich ein drastischer fast zehnfacher Anstieg der nukleären KPNA2 Dichte nach KPNA2 Expressionsinduktion nachweisen (FC=9.9, Vollklon 11). Der Befund einer vermehrten nukleären Lokalisation von KPNA2, belegt die aktive Beteiligung des vektoriell produzierten KPNA2 Proteins am Kernimport und somit seine Funktionstüchtigkeit. Eine nukleäre Translokation von KPNA2 erfolgt ausschließlich nach Formierung des funktionellen Dreierkomplexes bestehend aus

Karyopherin α 2, Karyopherin β 1 und einem Kargoprotein (Chook und Blobel, 2001). Somit konnte die funktionelle Interaktion von KPNA2 mit seinen Kargoproteinen und mit Karyopherin β 1 indirekt belegt werden. KPNA2 ist durch seine autoinhibitorische Domäne nicht in der Lage solitär in den Zellkern zu gelangen (Harreman et al., 2003). Nicht-funktionelles vektorielles KPNA2 Protein hingegen wäre durch zytoplasmatische oder nukleäre Akkumulation auffällig geworden. Zudem konnte eine enge räumliche Assoziation einzelner IG-markierter KPNA2 Proteine mit den Kernporen dokumentiert werden. Das könnte für die beim Importmechanismus notwendige aktive Interaktion der Import-Trimere mit dem Kernporenkomplex sprechen (Goldfarb et al., 2004).

4.6 Die Generierung eines KPNA2 defizienten *in vitro* Modells

Neben der Generierung von KPNA2 überexprimierenden Brusttumorzellen (*gain-of-function*), war für die funktionelle Analyse des KPNA2 Wirkungsspektrums ein *in vitro* Modell wünschenswert, mit dem der artifizielle Expressionsverlust (*loss-of-function*) in KPNA2 hoch-exprimierenden Brusttumorzellen analysiert werden konnte. Zu diesem Zweck wurde eine RNA Interferenz induzierter KPNA2 Expressionsverlust für die maligne Brustkrebszelllinie MCF7 etabliert (Elbashir et al., 2001). Die Kombination von zwei verschiedenen KPNA2 siRNA Oligonukleotiden ermöglichte einen effektiven *Knock Down* des KPNA2 Proteins von bis zu 93.4%. Erwartungsgemäß wurde ein KPNA2 *Knock Down* auf mRNA Ebene früher erreicht (nach 96 Stunden) als der tatsächliche KPNA2 Proteinverlust (nach 192 Stunden). Nachdem die bereits transkribierte KPNA2 mRNA durch den RNAi Dicer-Komplex degradiert worden ist (Elbashir et al., 2001) und die neu produzierte KPNA2 mRNA effektiv abgefangen werden kann, sind immer noch Restmengen des KPNA2 Proteins in der Zelle vorhanden. Der Zeitpunkt des effektiven KPNA2 Proteinverlusts ist demzufolge von der vorliegenden Proteinkonzentration abhängig und wird primär durch Protein abbauende Prozesse wie der Ubiquitinierung bestimmt (Hershko und Ciechanover, 1992). Die Einleitung der Ubiquitinierung wird wiederum durch die Halbwertszeit des KPNA2 Proteins beeinflusst, welche durch die Proteinstruktur diktiert wird (Lodish et al., 2001). Der späte Verlust des KPNA2 Proteins (192 Stunden) spricht für eine lange Proteinhalbwertzeit. Ein weiterer Grund für die Verzögerung zwischen mRNA-Abbau und Proteinverlust könnte die relativ starke KPNA2 Expression in MCF7 Wildtypzellen sein.

4.7 Phänotypische Konsequenzen der KPNA2 Expression auf Tumorzellen

Nachdem die Funktionalität der transienten MCF10A/KPNA2 Zellen, der stabilen MCF7/TR/KPNA2 Klone und der MCF7 RNAi Transfektanden bestätigt wurde, konnte mit der funktionellen Analyse der phänotypischen Auswirkungen der differenziellen KPNA2 Expression auf humane Brustkrebszellen begonnen werden. Durch die folgenden Analysen sollte das Zellverhalten mit Hinblick auf wichtige tumorrelevante Eigenschaften (Hanahan

und Weinberg, 2000) wie Proliferation, Apoptose, Adhäsion, Migration und der Kolonienbildung in Abhängigkeit der KPNA2 Expression untersucht werden.

Tumorzellen zeichnen sich durch eine von Wachstumsstimuli autonom regulierte Zellzykluskontrolle aus, die zu ungehinderter Replikation und gesteigertem Wachstum führen kann (Hanahan und Weinberg, 2000). Aus diesem Grund sollte die potenzielle Rolle des Kerntransporters KPNA2 für die Regulation der Zellproliferation analysiert werden.

Maligne MCF7 Wildtypzellen proliferierten schneller (ca.16%) als benigne MCF10A Wildtypzellen. Interessanterweise resultierte eine KPNA2 Überexpression in induzierten MCF7/TR/KPNA2 Klonen in einem weiteren Anstieg der Zellproliferation. Die maximale Steigerungsrate war hierbei 37.8% und im Durchschnitt wurde bei den MCF7/TR/KPNPA2 Klonen eine KPNA2 bedingte Proliferationssteigerung von 14.9% beobachtet. Es konnte somit gezeigt werden, dass maligne MCF7 Tumorzellen mit gesteigerter KPNA2 Grundexpression schneller proliferierten (16%) als benigne MCF10A Zellen mit niedriger KPNA2 Expression und dass eine induzierte KPNA2 Überexpression in MCF7/TR/KPNA2 Zellen mit einer weiteren Verdoppelung (14.9%) der Proliferationsrate assoziiert war. Dieser graduelle Effekt könnte durch einen verstärkten KPNA2 vermittelten Kernimport von proliferationsfördernden Transkriptionsfaktoren hervorgerufen werden. In der Tat konnte bereits gezeigt werden, dass KPNA2 für den Kernimport der Rho-GTPase RAC-1 verantwortlich ist (Sandrock et al., 2010). Nukleäres RAC-1 ist ein Schlüsselmediator für die Cyclin D1 vermittelte G1-Phasen Progression des Zellzyklus (Welsh, 2004). Ein gesteigerte Proliferation durch die RAC-1 vermittelte Regulierung des Onkogens Cyclin D1 bzw. der Tumorsuppressoren $p21^{cip1}$ und $p27^{kip1}$ wurde bereits für das humane Mammakarzinom beschrieben (Yi et al., 2010). Somit könnte eine tumorassoziierte KPNA2 Überexpression die nukleäre Translokation von RAC-1 forcieren und die Transkription von proliferationsfördernden RAC-1 Zielgenen modulieren. Daneben sind jedoch auch andere KPNA2 unabhängige Mechanismen für die beobachteten Proliferationsunterschiede in MCF10A und MCF7 Zellen denkbar.

Ein weiterer molekularer Mechanismus für die KPNA2 abhängige Proliferationssteigerung könnte in der forcierten Kerentranslokation von p65 begründet sein. Es wurde bereits gezeigt, dass KPNA2 direkt mit aktiviertem p65 interagiert (Cunningham et al., 2003). p65 ist ein wichtiger Faktor für die Zellzyklus Progression (Perkins, 1997) und im Mamakarzinom wurden eine mutationsbedingte p65 Überexpression sowie eine verstärkte Inaktivierung des p65-Inhibitors (IkB) nachgewiesen (Mathew et al., 1993; Rayet und Gelinas, 1999). Eine gesteigerte nukleäre Translokation von p65 kann zu einer forcierten Zielgentranskription führen und die Tumorgenese begünstigen (Kau et al., 2004). In MCF7 Brustkrebszellen konnten hohe Konzentrationen von nukleären p65 nachgewiesen werden (Sovak et al.,

1997), die jedoch nicht mit einer konstitutiven zytoplasmatischen p65 Aktivierung verbunden waren (Dejardin et al., 1999). Somit könnte eine gesteigerte KPNA2 Expression für die gesteigerte p65 Translokation verantwortlich sein und die Zellzyklusprogression forcieren. Aus diesem Grund sollte der Nachweis einer gesteigerten Kolokalisation von nukleärem KPNA2 und p65 in KPNA2 überexprimierenden Mammakarzinomzelllinien das Ziel zukünftiger Analysen sein.

Bemerkenswerterweise wurde die Proliferation von KPNA2 defizienten MCF7 Zellen vollständig inhibiert. Das Proliferationsverhalten der Kontroll-siRNA transfizierten MCF7 Zellen entsprach hingegen dem des MCF7 Wildtypen. Eine unspezifische Proliferationshemmung durch die Transfektionsbehandlung konnte somit ausgeschlossen werden. Als Positivkontrolle diente der *knock-down* der MAP-Kinase 1 (MAPK1) Expression. Der MAPK1 Signaltransduktionsweg ist für die Regulation der Proliferation entscheidend (Brunet et al., 1995). Ewartungsgemäß führte der Verlust der MAPK1 Expression zu einer deutlichen Minderung der Zellproliferation. Interessanterweise hatte ein KPNA2 Verlust einen stärkeren inhibierenden Effekt auf die Proliferation als der Verlust der proliferationsrelevanten MAP-Kinase 1. Der vollständige Verlust der Proliferationsfähigkeit von KPNA2 defizienten MCF7 Tumorzellen könnte demnach mit einer drastischen Einschränkung des Kernimports von KPNA2 Substraten mit proliferationsfördernder Wirkung funktionell assoziiert sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein RNA Interferenz induzierter Verlust des KPNA2 Kargo-proteins RAC-1 zu einem vollständigem Block der G1-Phasen Progression führt und die Proliferation von Fibroblasten inhibiert (Olson et al., 1995). Somit hatte der KPNA2 *Knock Down* den gleichen Effekt auf die Proliferation wie für RAC-1 beschrieben. Ein KPNA2 Verlust könnte somit mit einer eingeschränkten bzw. vollständigen Unterdrückung der nukleären Translokation von RAC-1 assoziiert sein, was dann funktionell in einer vollständigen Inhibierung des Zellzyklus resultieren könnte. Der RNAi vermittelte *knock-down* von p65 resultierte in einer Wachstumsinhibierung von Fibrosarkomzellen und bedingte die Tumorregression in Nacktmäusen (Higgins et al., 1993). Eine durch den KPNA2 Verlust gestörte Translokation von p65 könnte somit ebenfalls funktionell mit dem hier beobachteten Proliferationsblock KPNA2 defizienter MCF7 Brustkrebszellen verknüpft sein.

Obwohl der molekulare Mechanismus bis jetzt nicht bestätigt wurde, konnte die graduelle Wirkung der KPNA2 Expression auf das Proliferationsverhalten von MCF7 Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine KPNA2 Expressionssteigerung führte zu einer Proliferationssteigerung, wohingegen ein KPNA2 Verlust mit einer Inhibierung der Proliferation einherging. Eine Proliferationssteigerung in MCF10A/KPNA2 Transfektanden war auf Grund der Ergebnisse für MCF7 Zellen zu erwarten, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Es ist möglich, dass der Effekt in diesem transienten Modell durch mangelnde Trans-

fektionseffizienz nicht messbar war. Die für MCF7/TR/KPNA2 Klone gemessenen Effekte betonen den Vorteil des induzierbaren KPNA2 Expressionssystems. Das Auflösungsvermögen der Proliferationsmessungen konnte durch die Verwendung von nicht-induzierten MCF7/TR/KPNA2 Klonen als individuelle Negativkontrollen deutlich verbessert werden.

Eine fundamentale Eigenschaft von Tumorzellen ist die Fähigkeit der Vermeidung des programmierten Zelltods. In normalen Zellen registrieren extra- und intrazellulare Sensoren die Zellfitness und entscheiden über die Einleitung der Apoptose. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, um entartete Zellen aus dem Gewebeverband zu eliminieren. Apoptoseresistenz stellt somit eine wichtige Barriere für die Tumorgenese dar. Tumorzellen zeichnen sich deshalb oft durch eine geringere Sensibilität gegenüber pro-apoptotischen Prozessen aus (Hanahan und Weinberg, 2000). In dieser Arbeit sollte analysiert werden, welche Rolle KPNA2 für die Apoptoseresistenz von Tumorzellen spielen könnte. Dazu wurde die Sensibilität von benignen MCF10A und malignen MCF7 Wildtypzellen gegenüber der TNF α vermittelten Apoptose untersucht. TNF α ist ein wichtiger extrazellulärer Stimulus, der *in vivo*, bei ungünstigen extrazellulären Bedingungen wie z.B. Hypoxie, Apoptose einleiten kann (Ashkenazi und Dixit, 1999). In Tumorzellen ist die pro-apoptotische Wirkung von TNF α jedoch relativ schwach. Deshalb wurden die Zellen zusätzlich mit Cyclohexemid (CHX) behandelt, was die anti-apoptotische Signaltransduktion schwächen kann (Hehlgans und Pfeffer, 2005).

Die Bestimmung des Apoptoseverhaltens von MCF10A und MCF7 Wildtypzellen erfolgte zunächst auf zwei verschiedenen Ebenen, um eine valide Aussage über das Apoptoseverhalten nach pro-apoptotischem TNF α /CHX Stimulus treffen zu können: Zum einen wurde die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 gemessen und zum anderen die Externalisierung von Phosphatidylserin detektiert. Caspasen stellen die ultimativen Effektoren der Apoptose dar. Die Externalisierung von Phosphatidylserin fungiert als „Freßsignal“ für die Phagozytierung der apoptotischen Vesikel. Beide Vorgänge gelten als elementare Ereignisse des programmierten Zelltods (Thornberry und Lazebnik, 1998; Leventis und Grinstein, 2010).

Benigne MCF10A WT Zellen zeigten im Vergleich zu malignen MCF7 WT Zellen eine fast dreifach (FC=2.9) höhere Aktivierung der Effektorcaspasen 3/7 und eine vierfach (FC=4.0) stärkere Externalisierung von Phosphatidylserin. Es stellte sich nun die Frage, ob die gesteigerte Sensibilität von MCF10A WT Zellen bzw. die Apoptoseresistenz der MCF7 WT Zellen gegenüber TNF α /CHX-vermittelter Apoptose mit der differenziellen KPNA2 Expression in den beiden Zelltypen funktionell verknüpft sein könnte. Die NF κ B vermittelte Expression von anti-apoptotischen Faktoren, wie Caspasen-Inhibitoren (cIAP), BCLx und c-FLIP, kann die TNF α -induzierte Apoptose abschwächen oder sogar blocken (Karin und Lin,

2002). Eine KPNA2 Überexpression in MCF10A/KPNA2 Zellen sollte demnach in einer Desensibilisierung gegenüber TNF α /CHX stimulierter Apoptose resultieren. Die Analyse der Phosphatidylserin Externalisierung in MCF10A/KPNA2 Transfektanden zeigte allerdings keinen eindeutigen Effekt. Mit einer Verringerung des apoptotischen Zellanteils um 16%, zeichnete sich ein Trend ab, der aber noch validiert werden muss. Der starke Anstieg der nekrotischen Zellzahl der Mock und KPNA2 transfizierten MCF10A Zellen könnte auf eine schlechte Zell-Fitness hinweisen.

Bezogen auf die Hypothese, dass eine gesteigerte KPNA2 Expression mit einer verringerten Apoptoserate assoziiert sein könnte, ist der Umkehrschluss, dass ein KPNA2 Verlust zu einer gesteigerten Apoptosesensibilität führt. Um diesen denkbaren inversen Wirkungsmechanismus zu analysieren, wurde der KPNA2 Expressionsverlust in MCF7 Wildtypzellen durch RNA Interferenz induziert. Die KPNA2 defizienten MCF7 Zellen wurden anschließend einem schwachen pro-apoptotischen TNF α Stimulus (ohne CHX) ausgesetzt. Im Gegensatz zu der beobachteten TNF α Resistenz der Wildtypzellen und der Negativkontrolle, hatten KPNA2 defiziente MCF7 Zellen eine 40% gesteigerte Caspaseaktivierung nach dem TNF α -Stimulus. Eigentlich TNF α resistente MCF7 WT Zellen waren also nach KPNA2 Expressionsverlust anfälliger für diesen pro-apoptotischen Reiz. Eine gesteigerte Sensibilität gegenüber TNF α , könnte mit der eingeschränkten Kerntranslokation von p65, nach KPNA2 Expressionsverlust, assoziiert sein (Cunningham et al., 2003). Die Transkription von anti-apoptotischen Faktoren, wie den Caspase-Inhibitoren (cIAP), wäre so eingeschränkt und hätte gleichzeitig eine Stärkung der pro-apoptotischen Signalkaskade zur Folge. Für Fibroblasten aus p65 defizienten Mäusen wurde bereits eine gesteigerte Sensibilität gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose beschrieben (Beg et al., 1995). Bemerkenswert war zudem, dass es in KPNA2 defizienten MCF7 Zellen zu einer drastischen Steigerung (FC=2.5) der nicht stimulierten Apoptose kam. Die Zunahme der spontanen Apoptoserate korreliert mit der zuvor beobachteten Abnahme der vitalen Zellzahl in proliferationsinhibierten KPNA2 defizienten MCF7 Zellen. Beg und Kollegen beschrieben ähnliche Effekte in p65 defizienten Mäusen. Der p65 Verlust führte dort zu einem pränatalen letalen Phänotyp und war mit massiver spontaner Apoptose von Leberzellen verknüpft (Beg et al., 1995). Es konnte somit gezeigt werden, dass ein induzierter KPNA2 Verlust in der malignen Brustkrebszelllinie MCF7 funktionell mit einer Sensibilisierung gegenüber der TNF α vermittelten und der spontanen Apoptose assoziiert war. Im Umkehrschluss könnte eine gesteigerte KPNA2 Expression mit einer Förmierung der NF κ B vermittelten antiapoptotischen Signaltransduktion assoziiert sein und zu der Apoptoseresistenz von MCF7 Brustkrebszellen beitragen. Die direkte funktionelle Beziehung zwischen KPNA2 Expression und der p65 vermittelten Apoptoseresistenz von Brustkrebszellen muss jedoch noch durch Messung der

kern-локализированных p65 Менг, в зависимости от KPNA2 Expressionsstärke, подтверждается.

Die verminderte Zell-Matrixadhäsion ist eine weitere fundamentale Eigenschaft von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg, 2000; Pawlak und Helfman, 2001). Die Entwicklung von malignen Tumoren mit invasiven metastasierenden Tumorzellen ist, ausgehend von benignen Läsionen, durch die Überwindung der Zell-Matrixadhäsion charakterisiert. Für diese Progression, also dem Ausbrechen von Tumorzellen aus den Gewebeverband und die Invasion in umliegende Areale, spielt die Deregulation verschiedenster Adhäsionsfaktoren, wie z.B. von Integrinen, eine wichtige Rolle (Christofori und Semb, 1999; Cavallaro und Christofori, 2001). Es zeigte sich, dass die maligne Brustkrebszelllinie MCF7, welche im Vergleich zu benignen MCF10A Zellen eine fünfzehnfach gesteigerte KPNA2 Expression besitzt, zudem eine deutlich verminderte Adhäsionsrate (35.6%) hatte. Interessanterweise verringerte sich die Adhäsionsrate der benignen Zelllinie MCF10A nach KPNA2 Überexpression ebenfalls deutlich (21.1%). Das Adhäsionsverhalten der benignen, nicht-transformierten MCF10A/KPNA2 Zellen näherte sich demnach dem von malignen, transformierten MCF7 Brustkrebszellen an. Somit könnte eine funktionelle Beziehung zwischen der KPNA2 Überexpression und der Abnahme der Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen bestehen. Die Beobachtung, dass eine KPNA2 Expressionssteigerung in MCF7/TR/KPNA2 Klonen nicht zu einer weiteren Abnahme der Zelladhäsion führt, könnte mit dem graduellen Wirkungsspektrum von KPNA2 assoziiert sein. Es ist möglich, dass die in MCF7 Wildtypzellen beobachtete verminderte Adhäsionsfähigkeit nicht durch eine weitere KPNA2 Expressionssteigerung forciert werden kann. Die Transkription von RAC-1 Zielgenen, beispielsweise, nimmt entscheidenden Einfluss auf die Zelladhäsion durch die Regulation der Bildung von Lammellipodien und Filopodien (Ridley et al., 2003). Als molekulare Ursache für die Adhäsionsminderung in MCF10A/KPNA2 Zellen ist somit eine funktionelle Beziehung zwischen der KPNA2 Überexpression und einer dadurch gesteigerten Kerntranslokation der Rho GTPase RAC-1 denkbar (Sandrock et al., 2010). Der genaue molekulare Wirkmechanismus muss jedoch noch bestätigt werden.

Die Zellmigration ist für die Embryonalentwicklung, die Immunantwort und die Wundheilung von entscheidender Bedeutung (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Ridley et al., 2003). Daneben spielen Migrationsprozesse für die Tumorzellinvasion eine wichtige Rolle. Während der Zelltransformation nimmt die Migrationsfähigkeit epithelialer Zellen zu, was die Tumorinvasion und Ausbildung von Fernmetastasen erst ermöglicht (Feldner und Brandt, 2002). Migration ist ein komplexer Vorgang, bei dem die Ausbildung von Zellfortsätzen, die Reorganisation des Zytoskeletts und adhäsive Prozesse koordiniert werden müssen (Pankov et al., 2005). Der Wundheilungs-Test zeigte, dass maligne MCF7 Wildtypzellen eine deutlich

höhere Migrationsrate (68.9%) besaßen als benigne MCF10A Wildtypzellen. Bemerkenswerterweise resultierte eine KPNA2 Überexpression in MCF10A/KPNA2 Zellen ebenfalls in einer hochsignifikanten Steigerung (43.9%) der Migrationsrate. Das Migrationsverhalten benigner MCF10A/KPNA2 Zellen veränderte sich demnach in Richtung maligner MCF7 Brustkrebszellen. Des Weiteren konnte eine Migrationssteigerung in induzierten MCF7/TR/KPNA2 Klonen beobachtet werden. Die Steigerungsraten lagen hier zwischen 10.2% und 33.9%. Vergleicht man die Änderungsraten aller MCF7/TR/KPNA2 Klonen vor und nach KPNA2 Überexpression so zeigte sich eine hochsignifikante mediane Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit von 21% bis 25.1% (Tag1 bis Tag3). Eine Begründung für diese, im Vergleich zu MCF10A/KPNA2 Zellen, geringere Migrationssteigerung, könnte die graduelle Wirkung von KPNA2 sein. MCF7 Wildtypzellen haben eine fünffach höhere KPNA2 Expression als MCF10A Wildtypzellen. Im Vergleich zu den MCF7/TR/KPNA2 Klonen war die relative Steigerung der intrazellulären KPNA2 Proteinmenge in transfizierten MCF10A/KPNA2 Zellen demnach wesentlich höher, was gleichzeitig mit einer drastischeren Steigerung der Migrationsfähigkeit assoziiert war. Die beobachteten graduellen Effekte auf die Zellmigration in Brustkrebszellen, die KPNA2 niedrig, moderat und hoch exprimieren, könnte mit dem von der KPNA2 Proteinmenge abhängigen, veränderten Kernimportfrequenz von migrationsrelevanten Faktoren funktionell verknüpft sein. Wie bereits für die proliferativen und adhäsiven Prozesse diskutiert spielen Rho GTPasen und insbesondere das KPNA2 Kargoprotein RAC-1 eine entscheidende Rolle für die Zellmigration (Pankov et al., 2005; Sandrock et al., 2010). RAC-1 ist für die Regulation der Aktin-Polymerisation und migrationsrelevanter Zellfortsätze wie der Lammellipodien verantwortlich (Raftopoulou und Hall, 2004). Der genaue Mechanismus für die Regulation der RAC-1 Aktivität ist bis jetzt nicht verstanden. Ein möglicher Regulationsmechanismus könnte, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, der KPNA2 vermittelte RAC-1 Kernimport sein.

Die Messung der Kolonienbildungsfähigkeit dient zur Bewertung von Tumorzellen, bezüglich ihres Potenzials zur Tumorinvasion und Metastasierung. Dieser komplexe Prozess wird durch bereits diskutierte Eigenschaften wie der Proliferation, der Adhäsion und der Migration beeinflusst (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Hanahan und Weinberg, 2000; Pawlak und Helfman, 2001). Nachdem bereits der funktionelle Einfluss der KPNA2 Expression auf die Proliferation, Adhäsion und Migration von MCF10A bzw. MCF7 Brustkrebszelllinien gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob diese Effekte in ihrer Summe ein verändertes Kolonienbildungsverhalten reflektieren.

Tatsächlich war die Fähigkeit zur Kolonienbildung in MCF7 Wildtypzellen deutlich höher (130.6%) als in MCF10A Wildtypzellen. Bemerkenswerterweise konnte durch eine KPNA2 Überexpression die Anzahl der neu gebildeten Kolonien in MCF10A/KPNA2 Zellen drastisch

gesteigert werden (190%). Induzierte MCF7/TR/KPNA2 Klone hatten eine hochsignifikante mediane Steigerung der Kolonienbildungsfähigkeit von 40.6%. Daneben war eine morphologische Veränderung der Kolonienform und Koloniengröße bei KPNA2 überexprimierenden MCF10A Zellen zu beobachten. Eine genauere lichtmikroskopische Untersuchung von Einzelzellen ließ jedoch keine Unterschiede in Form und Größe von MCF10A/KPNA2 bzw. von induzierten MCF7TR/KPNA2 Zellen erkennen. Die fluoreszenzbasierte Analyse von aberranten Zytoskelettveränderungen könnte weiteren Aufschluss über die zellulären Auswirkungen der KPNA2 Überexpression auf Brusttumorzellen geben (Feldner und Brandt, 2002). Die Resultate lassen den Schluss zu, dass eine graduelle KPNA2 Expressionssteigerung ebenfalls mit einer graduellen Steigerung der Kolonienbildungsfähigkeit von Brusttumorzellen assoziiert ist. Eine tumorassoziierte KPNA2 Überexpression könnte somit das Invasions- und Metastasierungspotenzial von Brusttumorzellen forcieren. Die molekulare Ursache für die beobachteten Effekte könnte eine, KPNA2 Überexpression bedingte, veränderte RAC-1 und NF κ B Kerntranslokation sein, die wiederum proliferations-fördernde und adhäsionsmindernde Signalwegen forcieren kann (Perkins 1997; Ridley et al., 2003).

4.8 Schlussfolgerung für KPNA2

Basierend auf den Ergebnissen der bis jetzt veröffentlichten retrospektiven Studien zur prognostischen Qualität der KPNA2 Überexpression für Mammakarzinopatientinnen, konnte der onkogene Charakter dieses Kerntransporters zwar postuliert aber nicht nachgewiesen werden (Dahl et al., 2006; Dankof et al., 2007; Gluz et al., 2008). Die vorliegende Arbeit belegt eine durch die tumorspezifische KPNA2 Überexpression hervorgerufene Steigerung der Proliferation und Migration von humanen Brustkrebszellen. Des Weiteren konnte eine KPNA2 assoziierte Verminderung der Adhäsion beobachtet werden. Obwohl diese Effekte teilweise eher moderat waren, führten sie in ihrer Gesamtheit zu einer deutlichen Steigerung der Kolonienbildungsfähigkeit der analysierten Brusttumorzellen. Die hier gezeigten phänotypischen Veränderungen können das Invasions- und Metastasierungspotenzial von Tumorzellen forcieren. Gemeinsam mit der gezeigten Proliferationssteigerung und einer möglichen Apoptoseresistenz trägt das putative Onkogen KPNA2 zu fundamentalen Wachstumsvorteilen von Tumorzellen bei (Hanahan und Weinberg, 2000). Somit konnte die onkogene Wirkung von KPNA2 auf Brusttumorzellen auch *in vitro* verifiziert werden. Die molekularen Ursachen für die gezeigte onkogene Wirkung müssen durch zukünftige Analysen noch aufgedeckt werden.

4.9 Ausblick für KPNA2

Die Charakterisierung des Wirkungsspektrums eines so zentralen Moleküls wie dem Kerntransporter KPNA2 birgt aus analytischer Sicht Möglichkeiten und Probleme zugleich.

Einerseits ist anzunehmen, dass die Überexpression eines Moleküls, das potenziell für den Kernimport einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist, mit weit reichenden zellulären Folgen verknüpft sein kann. Andererseits erschwert diese Vielfalt die Aufklärung der molekularen Mechanismen der potenziellen onkogenen Wirkung von KPNA2. Die tumorspezifische KPNA2 Expression wird sehr wahrscheinlich mit einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen funktionell assoziiert sein. Die Expressionsanalyse von Proliferations-, Migrations-, Adhäsions- und apoptoserelevanten Faktoren könnte die gezeigten funktionellen phänotypischen Veränderungen auf mechanistischer Ebene bestätigen.

Neben der *house-keeping* Funktion von KPNA2 als Kernimportfaktor wurden zudem Kerntransport unabhängige Funktionen für die Oogenese, die Mitosespindelformation und die Kernhüllensbildung in *Drosophila* und *C. Elegans* *in vivo* nachgewiesen (Goldfarb et al., 2004). Derartige Funktionen wurden für humane Zellen zwar noch nicht bestätigt, unterstreichen aber dennoch das enorme zelluläre Wirkungsspektrum von KPNA2. Mit konkretem Bezug zur Kerntransportmaschinerie wurde bis jetzt die direkte Interaktion von KPNA2 mit NF κ B (p65) und RAC-1 nachgewiesen (Cunningham et al., 2003; Sandrock et al., 2010). Aus diesem Grund sollte der nächste Schritt die fokussierte Analyse der Beziehung zwischen KPNA2 und diesen Transportsubstraten sein. Über die fundamentale Rolle von NF κ B für die Entstehung und die Progression von malignen Erkrankungen wurde bereits viel publiziert. NF κ B (p65) wurde insbesonders im Brustkrebs vermehrt in Zellkernen von Tumorzellen gefunden (Kau et al., 2004). Die mechanistische Untersuchung des potenziellen Einflusses der KPNA2 vermittelten Kerntranslokation von p65 auf dessen Signaltransduktion wäre somit ein nächster wichtiger Schritt. Ein Fluoreszenzmikroskopie basierter Nachweis der zellulären Kolokalisation von KPNA2 und p65 vor und nach KPNA2 Überexpression mit anschließender p65 Zielgenexpressionsanalyse erscheint sinnvoll. Aufbauend auf die hier durchgeführte *in vitro* Charakterisierung ist eine weiterer wichtiger Schritt die *in vivo* Analyse der funktionellen Auswirkungen der KPNA2 Überexpression. Nacktmausmodelle, denen MCF7/TR/KPNA2 Zellen injiziert werden, könnten Aufschluss über das Tumor- und Metastasierungspotenzial KPNA2 überexprimierender Tumorzellen im lebenden Organismus, geben. Diese Versuche wären durch das in dieser Arbeit nachgewiesene gesteigerte Kolonienbildungsfähigkeit von KPNA2 überexprimierenden Tumorzellen indiziert.

5 Literaturverzeichnis

- Ahuja N und Issa JP. (2000). Aging, Methylation and Cancer. *Histol Histopathol* **15**: 835-842.
- Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. (1994). Identification of the Heme Compound Copurified With Deoxyribonucleic Acid (DNA) From Bloodstains, a Major Inhibitor of Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification. *J Forensic Sci* **39**: 362-372.
- Akiyama Y, Maesawa C, Ogasawara S, Terashima M, Masuda T. (2003). Cell-Type-Specific Repression of the Maspin Gene Is Disrupted Frequently by Demethylation at the Promoter Region in Gastric Intestinal Metaplasia and Cancer Cells. *Am J Pathol* **163**: 1911-1919.
- Al Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P. (2000). Identification and Characterization of Immunoglobulin G in Blood As a Major Inhibitor of Diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* **38**: 345-350.
- Antequera F und Bird A. (1993). CpG Islands. *EXS* **64**: 169-185.
- Ashkenazi A und Dixit VM. (1999). Apoptosis Control by Death and Decoy Receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 255-260.
- Avner P und Heard E. (2001). X-Chromosome Inactivation: Counting, Choice and Initiation. *Nat Rev Genet* **2**: 59-67.
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. (2003). Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. *J Clin Oncol* **21**: 1973-1979.
- Beckerle MC. (1986). Identification of a New Protein Localized at Sites of Cell-Substrate Adhesion. *J Cell Biol* **103**: 1679-1687.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. (1995b). Embryonic Lethality and Liver Degeneration in Mice Lacking the RelA Component of NF-Kappa B. *Nature* **376**: 167-170.
- Benedict WF, Murphree AL, Banerjee A, Spina CA, Sparkes MC, Sparkes RS. (1983). Patient With 13 Chromosome Deletion: Evidence That the Retinoblastoma Gene Is a Recessive Cancer Gene. *Science* **219**: 973-975.
- Bertucci F, Viens P, Hingamp P, Nasser V, Houlgate R, Birnbaum D. (2003). Breast Cancer Revisited Using DNA Array-Based Gene Expression Profiling. *Int J Cancer* **103**: 565-571.
- Bertz J, Dahm S, Haberland J, Krywinkiel K, Kurth B und Wolf U. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Robert Koch-Institut 2010.

Bharadwaj S, Thanawala R, Bon G, Falcioni R, Prasad GL. (2005). Resensitization of Breast Cancer Cells to Anoikis by Tropomyosin-1: Role of Rho Kinase-Dependent Cytoskeleton and Adhesion. *Oncogene* **24**: 8291-8303.

Bilak SR, Sernett SW, Bilak MM, Bellin RM, Stromer MH, Huiatt TW et. al. (1998). Properties of the Novel Intermediate Filament Protein Synemin and Its Identification in Mammalian Muscle. *Arch Biochem Biophys* **355**: 63-76.

Bird A. (2002). DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes Dev* **16**: 6-21.

Bishop JM. (1987). The Molecular Genetics of Cancer. *Science* **235**: 305-311.

Blackwood MA und Weber BL. (1998). BRCA1 and BRCA2: From Molecular Genetics to Clinical Medicine. *J Clin Oncol* **16**: 1969-1977.

Blake DJ und Martin-Rendon E. (2002). Intermediate Filaments and the Function of the Dystrophin-Protein Complex. *Trends Cardiovasc Med* **12**: 224-228.

Böcker, Denk, und Heitz. Pathologie. 1. Auflage. 1997. München: *Urban & Schwarzenberg*.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Brunet A, Brondello JM, L'Allemand G, Lenormand P, McKenzie F, Pages G et. al. (1995). [MAP Kinase Module: Role in the Control of Cell Proliferation]. *C R Seances Soc Biol Fil* **189**: 43-57.

Bryan TM und Cech TR. (1999). Telomerase and the Maintenance of Chromosome Ends. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 318-324.

Buerger H, Simon R, Schafer KL, Diallo R, Littmann R, Poremba C et. al. (2000). Genetic Relation of Lobular Carcinoma in Situ, Ductal Carcinoma in Situ, and Associated Invasive Carcinoma of the Breast. *Mol Pathol* **53**: 118-121.

Butt AJ, Caldon CE, McNeil CM, Swarbrick A, Musgrove EA, Sutherland RL. (2008). Cell Cycle Machinery: Links With Genesis and Treatment of Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol* **630**: 189-205.

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. (1999). Genetic Instability and Darwinian Selection in Tumours. *Trends Cell Biol* **9**: M57-M60.

Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR. (2006). CDH1 Promoter Hypermethylation and E-Cadherin Protein Expression in Infiltrating Breast Cancer. *BMC Cancer* **6**: 48.

Cao Y und Karin M. (2003). NF-KappaB in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**: 215-223.

Carter CL, Allen C, Henson DE. (1989a). Relation of Tumor Size, Lymph Node Status, and Survival in 24,740 Breast Cancer Cases. *Cancer* **63**: 181-187.

- Cavallaro U und Christofori G. (2001). Cell Adhesion in Tumor Invasion and Metastasis: Loss of the Glue Is Not Enough. *Biochim Biophys Acta* **1552**: 39-45.
- Cho KR und Vogelstein B. (1992). Genetic Alterations in the Adenoma--Carcinoma Sequence. *Cancer* **70**: 1727-1731.
- Chook YM und Blobel G. (2001). Karyopherins and Nuclear Import. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 703-715.
- Chow JC und Brown CJ. (2003). Forming Facultative Heterochromatin: Silencing of an X Chromosome in Mammalian Females. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2586-2603.
- Christofori G und Semb H. (1999). The Role of the Cell-Adhesion Molecule E-Cadherin As a Tumour-Suppressor Gene. *Trends Biochem Sci* **24**: 73-76.
- Cingolani G, Petosa C, Weis K, Muller CW. (1999). Structure of Importin-Beta Bound to the IBB Domain of Importin-Alpha. *Nature* **399**: 221-229.
- Clark SJ und Melki J. (2002). DNA Methylation and Gene Silencing in Cancer: Which Is the Guilty Party? *Oncogene* **21**: 5380-5387.
- Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin AS, Jr. (2000). Selective Activation of NF-Kappa B Subunits in Human Breast Cancer: Potential Roles for NF-Kappa B2/P52 and for Bcl-3. *Oncogene* **19**: 1123-1131.
- Constantinides PG, Jones PA, Gevers W. (1977). Functional Striated Muscle Cells From Non-Myoblast Precursors Following 5-Azacytidine Treatment. *Nature* **267**: 364-366.
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J. (1998). Crystallographic Analysis of the Recognition of a Nuclear Localization Signal by the Nuclear Import Factor Karyopherin Alpha. *Cell* **94**: 193-204.
- Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. (2004). Regulated Nucleosome Mobility and the Histone Code. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1037-1043.
- Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R et. al. (1997). Mapping of DNA Amplifications at 15 Chromosomal Localizations in 1875 Breast Tumors: Definition of Phenotypic Groups. *Cancer Res* **57**: 4360-4367.
- Coussens LM und Werb Z. (1996). Matrix Metalloproteinases and the Development of Cancer. *Chem Biol* **3**: 895-904.
- Cox D. (1972). Regression Models and Life Tables. *J Roy Statist Soc* **34**: 187-220.
- Cunningham MD, Cleaveland J, Nadler SG. (2003). An Intracellular Targeted NLS Peptide Inhibitor of Karyopherin Alpha:NF-Kappa B Interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **300**: 403-407.
- Dahl E, Kristiansen G, Gottlob K, Klaman I, Ebner E, Hinzmann B et. al. (2006). Molecular Profiling of Laser-Microdissected Matched Tumor and Normal Breast Tissue Identifies

Karyopherin Alpha2 As a Potential Novel Prognostic Marker in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 3950-3960.

Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, Betz B, Grube S, Kreutzfeld R et. al. (2005). Systematic Identification and Molecular Characterization of Genes Differentially Expressed in Breast and Ovarian Cancer. *J Pathol* **205**: 21-28.

Dankof A, Fritzsche FR, Dahl E, Pahl S, Wild P, Dietel M et. al. (2007). KPNA2 Protein Expression in Invasive Breast Carcinoma and Matched Peritumoral Ductal Carcinoma in Situ. *Virchows Arch* **451**: 877-881.

De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. (1999). DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes With a CpG-Rich Promoter. *Mol Cell Biol* **19**: 7327-7335.

Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP et. al. (1999). Regulation of NF-KappaB Activity by I KappaB-Related Proteins in Adenocarcinoma Cells. *Oncogene* **18**: 2567-2577.

Delaval K und Feil R. (2004). Epigenetic Regulation of Mammalian Genomic Imprinting. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 188-195.

Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. (2000). C-Myc Amplification in Breast Cancer: a Meta-Analysis of Its Occurrence and Prognostic Relevance. *Br J Cancer* **83**: 1688-1695.

Deugnier MA, Teuliere J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. (2002). The Importance of Being a Myoepithelial Cell. *Breast Cancer Res* **4**: 224-230.

Di Leo A, Cardoso F, Durbecq V, Giuliani R, Mano M, Atalay G et. al. (2002). Predictive Molecular Markers in the Adjuvant Therapy of Breast Cancer: State of the Art in the Year 2002. *Int J Clin Oncol* **7**: 245-253.

Dingwall C und Laskey RA. (1991). Nuclear Targeting Sequences--a Consensus? *Trends Biochem Sci* **16**: 478-481.

Dnistrian AM, Schwartz MK, Greenberg EJ, Smith CA, Schwartz DC. (1991). Evaluation of CA M26, CA M29, CA 15-3 and CEA As Circulating Tumor Markers in Breast Cancer Patients. *Tumour Biol* **12**: 82-90.

Dobrovic A und Simpfendorfer D. (1997). Methylation of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Res* **57**: 3347-3350.

Driouch K, Briffod M, Bieche I, Champeme MH, Lidereau R. (1998). Location of Several Putative Genes Possibly Involved in Human Breast Cancer Progression. *Cancer Res* **58**: 2081-2086.

Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. (2001). Multiple Ways of Silencing E-Cadherin Gene Expression in Lobular Carcinoma of the Breast. *Int J Cancer* **92**: 404-408.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. (2004). Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature* **429**: 457-463.

Ehrlich M. (2003). Expression of Various Genes Is Controlled by DNA Methylation During Mammalian Development. *J Cell Biochem* **88**: 899-910.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001a). Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **411**: 494-498.

Elston EW und Ellis IO. (1993). Method for Grading Breast Cancer. *J Clin Pathol* **46**: 189-190.

Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spryatos F, Champeme MH, Gest J et. al. (1986). Genetic Alteration of the C-Myc Protooncogene (MYC) in Human Primary Breast Carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4834-4838.

Esteller M. (2007). Cancer Epigenomics: DNA Methylation and Histone-Modification Maps. *Nat Rev Genet* **8**: 286-298.

Esteller M. (2008). Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* **358**: 1148-1159.

Esteller M und Almouzni G. (2005). How Epigenetics Integrates Nuclear Functions. Workshop on Epigenetics and Chromatin: Transcriptional Regulation and Beyond. *EMBO Rep* **6**: 624-628.

Esteller M und Herman JG. (2002). Cancer As an Epigenetic Disease: DNA Methylation and Chromatin Alterations in Human Tumours. *J Pathol* **196**: 1-7.

Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E et. al. (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *J Natl Cancer Inst* **92**: 564-569.

Etienne J, Brault D, Firmin S. (1990). ["Cis" and "Trans" Regulator Elements of Transcription]. *Ann Biol Clin (Paris)* **48**: 681-694.

Faller A. Der Körper des Menschen/ Einführung in Bau und Funktion. 13. Aufl. Stuttgart; New York . 1999. Thieme.

Fearon ER und Vogelstein B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767.

Feil R und Khosla S. (1999). Genomic Imprinting in Mammals: an Interplay Between Chromatin and DNA Methylation? *Trends Genet* **15**: 431-435.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. (2006). The Epigenetic Progenitor Origin of Human Cancer. *Nat Rev Genet* **7**: 21-33.

Feinberg AP und Vogelstein B. (1983). Hypomethylation Distinguishes Genes of Some Human Cancers From Their Normal Counterparts. *Nature* **301**: 89-92.

Feldner JC und Brandt BH. (2002). Cancer Cell Motility--on the Road From C-ErbB-2 Receptor Steered Signaling to Actin Reorganization. *Exp Cell Res* **272**: 93-108.

Feng Z, Kachnic L, Zhang J, Powell SN, Xia F. (2004). DNA Damage Induces P53-Dependent BRCA1 Nuclear Export. *J Biol Chem* **279**: 28574-28584.

Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, Pandita TK, Chan TA, Hermeking H et. al. (2000). High Frequency of Hypermethylation at the 14-3-3 Sigma Locus Leads to Gene Silencing in Breast Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6049-6054.

Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F et. al. (1998). Real-Time Quantitative RT-PCR After Laser-Assisted Cell Picking. *Nat Med* **4**: 1329-1333.

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. (2003). Many Cuts to Ruin: a Comprehensive Update of Caspase Substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100.

Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj LW, Lührmann R. (1995). The HIV-1 Rev Activation Domain Is a Nuclear Export Signal That Accesses an Export Pathway Used by Specific Cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-483.

Fischle W, Wang Y, Allis CD. (2003). Histone and Chromatin Cross-Talk. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 172-183.

Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. (1988). Relative Worth of Estrogen or Progesterone Receptor and Pathologic Characteristics of Differentiation As Indicators of Prognosis in Node Negative Breast Cancer Patients: Findings From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* **6**: 1076-1087.

Fitzpatrick SL, Brightwell J, Wittliff JL, Barrows GH, Schultz GS. (1984). Epidermal Growth Factor Binding by Breast Tumor Biopsies and Relationship to Estrogen Receptor and Progestin Receptor Levels. *Cancer Res* **44**: 3448-3453.

Fonseca R, Hartmann LC, Petersen IA, Donohue JH, Crotty TB, Gisvold JJ. (1997). Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *Ann Intern Med* **127**: 1013-1022.

Fornerod M, Boer J, van Baal S, Jaegle M, von Lindern M, Murti KG et. al. (1995). Relocation of the Carboxyterminal Part of CAN From the Nuclear Envelope to the Nucleus As a Result of Leukemia-Specific Chromosome Rearrangements. *Oncogene* **10**: 1739-1748.

Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. (1997). CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell* **90**: 1051-1060.

Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. (2000). Modulation of NF-Kappa B Activity and Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *J Immunol* **164**: 2200-2206.

Gardiner-Garden M und Frommer M. (1987). CpG Islands in Vertebrate Genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282.

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW et. al. (2003). Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation. *Science* **300**: 489-492.

Gluz O, Wild P, Meiler R, Diallo-Danebrock R, Ting E, Mohrmann S et. al. (2008). Nuclear Karyopherin Alpha2 Expression Predicts Poor Survival in Patients With Advanced Breast Cancer Irrespective of Treatment Intensity. *Int J Cancer* **123**: 1433-1438.

Godbout R, Dryja TP, Squire J, Gallie BL, Phillips RA. (1983). Somatic Inactivation of Genes on Chromosome 13 Is a Common Event in Retinoblastoma. *Nature* **304**: 451-453.

Goldberg B, Urnovitz HB, Stricker RB. (2000). Beyond Danger: Unmethylated CpG Dinucleotides and the Immunopathogenesis of Disease. *Immunol Lett* **73**: 13-18.

Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. (2004). Importin Alpha: a Multipurpose Nuclear-Transport Receptor. *Trends Cell Biol* **14**: 505-514.

Gorlich D. (1997). Nuclear Protein Import. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 412-419.

Gorlich D. (1998). Transport into and Out of the Cell Nucleus. *EMBO J* **17**: 2721-2727.

Gotzsche PC und Nielsen M. (2006). Screening for Breast Cancer With Mammography. *Cochrane Database Syst Rev* CD001877.

Gowher H, Leismann O, Jeltsch A. (2000). DNA of Drosophila Melanogaster Contains 5-Methylcytosine. *EMBO J* **19**: 6918-6923.

Granger BL und Lazarides E. (1980). Synemin: a New High Molecular Weight Protein Associated With Desmin and Vimentin Filaments in Muscle. *Cell* **22**: 727-738.

Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. (1989). Epigenetic Changes May Contribute to the Formation and Spontaneous Regression of Retinoblastoma. *Hum Genet* **83**: 155-158.

Guarino M. (2007). Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumour Invasion. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 2153-2160.

Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M et. al. (2006). A Population-Based Study of Tumor Gene Expression and Risk of Breast Cancer Death Among Lymph Node-Negative Patients. *Breast Cancer Res* **8**: R25.

Hanahan D und Folkman J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.

Hanahan D und Weinberg RA. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R et. al. (1999). Risk-Group Discrimination in Node-Negative Breast Cancer Using Invasion and Proliferation Markers: 6-Year Median Follow-Up. *Br J Cancer* **80**: 419-426.

Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Janicke F et. al. (2004). Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor Type 1 Predict Disease Outcome and Therapy Response in Primary Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* **5**: 348-352.

Harbeck N, Nimmrich I, Hartmann A, Ross JS, Cufer T, Grutzmann R et. al. (2008). Multicenter Study Using Paraffin-Embedded Tumor Tissue Testing PITX2 DNA Methylation As a Marker for Outcome Prediction in Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol* **26**: 5036-5042.

Harreman MT, Cohen PE, Hodel MR, Truscott GJ, Corbett AH, Hodel AE. (2003). Characterization of the Auto-Inhibitory Sequence Within the N-Terminal Domain of Importin Alpha. *J Biol Chem* **278**: 21361-21369.

Hehlgans T und Pfeffer K. (2005). The Intriguing Biology of the Tumour Necrosis Factor/Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily: Players, Rules and the Games. *Immunology* **115**: 1-20.

Herman JG und Baylin SB. (2003). Gene Silencing in Cancer in Association With Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med* **349**: 2042-2054.

Hermanek P, Wittekind C, Seib HJ. (1997). [Current TNM Aspects. 5. TNM Classification and Stage Grouping]. *Zentralbl Chir* **122**: 934-937.

Hermsen MA, Baak JP, Meijer GA, Weiss JM, Walboomers JW, Snijders PJ et. al. (1998). Genetic Analysis of 53 Lymph Node-Negative Breast Carcinomas by CGH and Relation to Clinical, Pathological, Morphometric, and DNA Cytometric Prognostic Factors. *J Pathol* **186**: 356-362.

Herold A, Truant R, Wiegand H, Cullen BR. (1998). Determination of the Functional Domain Organization of the Importin Alpha Nuclear Import Factor. *J Cell Biol* **143**: 309-318.

Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U. (2007). Intermediate Filaments: From Cell Architecture to Nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 562-573.

Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U. (2009). Intermediate Filaments: Primary Determinants of Cell Architecture and Plasticity. *J Clin Invest* **119**: 1772-1783.

Hershko A und Ciechanover A. (1992). The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annu Rev Biochem* **61**: 761-807.

Higgins KA, Perez JR, Coleman TA, Dorshkind K, McComas WA, Sarmiento UM et. al. (1993). Antisense Inhibition of the P65 Subunit of NF-Kappa B Blocks Tumorigenicity and Causes Tumor Regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9901-9905.

Hirako Y, Yamakawa H, Tsujimura Y, Nishizawa Y, Okumura M, Usukura J et. al. (2003). Characterization of Mammalian Synemin, an Intermediate Filament Protein Present in All

Four Classes of Muscle Cells and Some Neuroglial Cells: Co-Localization and Interaction With Type III Intermediate Filament Proteins and Keratins. *Cell Tissue Res* **313**: 195-207.

Hirano A, Emi M, Tsuneizumi M, Utada Y, Yoshimoto M, Kasumi F et. al. (2001). Allelic Losses of Loci at 3p25.1, 8p22, 13q12, 17p13.3, and 22q13 Correlate With Postoperative Recurrence in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **7**: 876-882.

Holliday R. (1987). The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science* **238**: 163-170.

Hoque MO, Kim MS, Ostrow KL, Liu J, Wisman GB, Park HL et. al. (2008). Genome-Wide Promoter Analysis Uncovers Portions of the Cancer Methylome. *Cancer Res* **68**: 2661-2670.

Izraeli S, Pfleiderer C, Lion T. (1991). Detection of Gene Expression by PCR Amplification of RNA Derived From Frozen Heparinized Whole Blood. *Nucleic Acids Res* **19**: 6051.

Jackson K, Yu MC, Arakawa K, Fiala E, Youn B, Fiegl H et. al. (2004). DNA Hypomethylation Is Prevalent Even in Low-Grade Breast Cancers. *Cancer Biol Ther* **3**: 1225-1231.

Jakel S und Gorlich D. (1998). Importin Beta, Transportin, RanBP5 and RanBP7 Mediate Nuclear Import of Ribosomal Proteins in Mammalian Cells. *EMBO J* **17**: 4491-4502.

Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M et. al. (2001). Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk, Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *J Natl Cancer Inst* **93**: 913-920.

Jenuwein T und Allis CD. (2001). Translating the Histone Code. *Science* **293**: 1074-1080.

Jones J, Nivitchanyong T, Giblin C, Ciccarone V, Judd D, Gorrien S et. al. (2005). Optimization of Tetracycline-Responsive Recombinant Protein Production and Effect on Cell Growth and ER Stress in Mammalian Cells. *Biotechnol Bioeng* **91**: 722-732.

Jones PA. (2002). DNA Methylation and Cancer. *Oncogene* **21**: 5358-5360.

Jones PA und Baylin SB. (2002c). The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nat Rev Genet* **3**: 415-428.

Jones PA und Baylin SB. (2002). The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nat Rev Genet* **3**: 415-428.

Jovanovic J, Ronneberg JA, Tost Jr, Kristensen V. (2010). The Epigenetics of Breast Cancer. *Molecular Oncology* **4**: 242-254.

Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. (1984). A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location. *Cell* **39**: 499-509.

Kaplan E und Meier P. (1958). Nonparametric Estimation From Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc* **53**: 457-481.

Karin M und Lin A. (2002). NF-KappaB at the Crossroads of Life and Death. *Nat Immunol* **3**: 221-227.

Kau TR, Way JC, Silver PA. (2004). Nuclear Transport and Cancer: From Mechanism to Intervention. *Nat Rev Cancer* **4**: 106-117.

Kim IS, Kim DH, Han SM, Chin MU, Nam HJ, Cho HP et. al. (2000). Truncated Form of Importin Alpha Identified in Breast Cancer Cell Inhibits Nuclear Import of P53. *J Biol Chem* **275**: 23139-23145.

Klein A, Wessel R, Graessmann M, Jurgens M, Petersen I, Schmutzler R et. al. (2007). Comparison of Gene Expression Data From Human and Mouse Breast Cancers: Identification of a Conserved Breast Tumor Gene Set. *Int J Cancer* **121**: 683-688.

Knippers. Molekulare Genetik. 8.Auflage. 2001. Georg Thieme Verlag, Germany.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Knudson AG, Jr. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 820-823.

Kohler M, Ansieau S, Prehn S, Leutz A, Haller H, Hartmann E. (1997). Cloning of Two Novel Human Importin-Alpha Subunits and Analysis of the Expression Pattern of the Importin-Alpha Protein Family. *FEBS Lett* **417**: 104-108.

Kraemer D, Wozniak RW, Blobel G, Radu A. (1994). The Human CAN Protein, a Putative Oncogene Product Associated With Myeloid Leukemogenesis, Is a Nuclear Pore Complex Protein That Faces the Cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1519-1523.

Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. (2009). Epigenetics and Cancer Treatment. *Eur J Pharmacol* **625**: 131-142.

Kundu TK und Rao MR. (1999). CpG Islands in Chromatin Organization and Gene Expression. *J Biochem* **125**: 217-222.

Lachner M und Jenuwein T. (2002). The Many Faces of Histone Lysine Methylation. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 286-298.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laird PW und Jaenisch R. (1994). DNA Methylation and Cancer. *Hum Mol Genet* **3 Spec No**: 1487-1495.

Lakhani SR und O'Hare MJ. (2001). The Mammary Myoepithelial Cell--Cinderella or Ugly Sister? *Breast Cancer Res* **3**: 1-4.

Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenebeele P. (2002). Alice in Caspase Land. A Phylogenetic Analysis of Caspases From Worm to Man. *Cell Death Differ* **9**: 358-361.

Lanford RE und Butel JS. (1984). Construction and Characterization of an SV40 Mutant Defective in Nuclear Transport of T Antigen. *Cell* **37**: 801-813.

Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. (2007). Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction With Importin Alpha. *J Biol Chem* **282**: 5101-5105.

Lauffenburger DA und Horwitz AF. (1996). Cell Migration: a Physically Integrated Molecular Process. *Cell* **84**: 359-369.

Leventis PA und Grinstein S. (2010). The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu Rev Biophys* **39**: 407-427.

Levine AJ. (1997). P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**: 323-331.

Locker GY. (1998). Hormonal Therapy of Breast Cancer. *Cancer Treat Rev* **24**: 221-240.

Lodish, Berg A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. und Darnell J.E. Molekulare Zellbiologie. Spektrum, akad. Verl. 4 2001; Berlin .

Lu W, Pochampally R, Chen L, Traidej M, Wang Y, Chen J. (2000). Nuclear Exclusion of P53 in a Subset of Tumors Requires MDM2 Function. *Oncogene* **19**: 232-240.

Lu YJ, Osin P, Lakhani SR, Di Palma S, Gusterson BA, Shipley JM. (1998). Comparative Genomic Hybridization Analysis of Lobular Carcinoma *in Situ* and Atypical Lobular Hyperplasia and Potential Roles for Gains and Losses of Genetic Material in Breast Neoplasia. *Cancer Res* **58**: 4721-4727.

Lui EL, Loo WT, Zhu L, Cheung MN, Chow LW. (2005). DNA Hypermethylation of TIMP3 Gene in Invasive Breast Ductal Carcinoma. *Biomed Pharmacother* **59 Suppl 2**: S363-S365.

Luscher B. (2001). Function and Regulation of the Transcription Factors of the Myc/Max/Mad Network. *Gene* **277**: 1-14.

Macara IG. (2001). Transport into and Out of the Nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 570-94, table.

Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. (2000). The Basic Pathology of Human Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**: 139-163.

Martinez N, Alonso A, Moragues MD, Ponton J, Schneider J. (1999). The Nuclear Pore Complex Protein Nup88 Is Overexpressed in Tumor Cells. *Cancer Res* **59**: 5408-5411.

Mathew S, Murty VV, Dalla-Favera R, Chaganti RS. (1993). Chromosomal Localization of Genes Encoding the Transcription Factors, C-Rel, NF-Kappa Bp50, NF-Kappa Bp65, and Lyt-10 by Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Oncogene* **8**: 191-193.

McCarty KS, Jr., Kinsel LB, Georgiade G, Leight G, McCarty KS, Sr. (1990). Long-Term Prognostic Implications of Sex-Steroid Receptors in Human Cancer. *Prog Clin Biol Res* **322**: 279-293.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC et. al. (1995). 5' CpG Island Methylation Is Associated With Transcriptional Silencing of the Tumour Suppressor P16/CDKN2/MTS1 in Human Cancers. *Nat Med* **1**: 686-692.

Messeguer R, Ganal MW, Steffens JC, Tanksley SD. (1991). Characterization of the Level, Target Sites and Inheritance of Cytosine Methylation in Tomato Nuclear DNA. *Plant Mol Biol* **16**: 753-770.

Mickey RM und Greenland S. (1989). The Impact of Confounder Selection Criteria on Effect Estimation. *Am J Epidemiol* **129**: 125-137.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S et. al. (1994). A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* **266**: 66-71.

Mitra I. Oxford Textbook of Oncology. Oxford University Press 2.Auflage 2002.

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J. (1993). Induction of Apoptosis in Fibroblasts by IL-1 Beta-Converting Enzyme, a Mammalian Homolog of the C. Elegans Cell Death Gene Ced-3. *Cell* **75**: 653-660.

Mizuno Y, Thompson TG, Guyon JR, Lidov HG, Brosius M, Imamura M et. al. (2001). Desmuslin, an Intermediate Filament Protein That Interacts With Alpha -Dystrobrevin and Desmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6156-6161.

Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Mu nM et. al. (1998). C-ErbB-2 Oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in Patients With Breast Cancer: Prognostic Value. *Breast Cancer Res Treat* **51**: 109-119.

Moll UM, Riou G, Levine AJ. (1992). Two Distinct Mechanisms Alter P53 in Breast Cancer: Mutation and Nuclear Exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7262-7266.

Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A et. al. (2009). The 70-Gene Prognosis-Signature Predicts Disease Outcome in Breast Cancer Patients With 1-3 Positive Lymph Nodes in an Independent Validation Study. *Breast Cancer Res Treat* **116**: 295-302.

Moore MS und Blobel G. (1993). The GTP-Binding Protein Ran/TC4 Is Required for Protein Import into the Nucleus. *Nature* **365**: 661-663.

Mosammaparast N, Jackson KR, Guo Y, Brame CJ, Shabanowitz J, Hunt DF et. al. (2001). Nuclear Import of Histone H2A and H2B Is Mediated by a Network of Karyopherins. *J Cell Biol* **153**: 251-262.

Mosammaparast N und Pemberton LF. (2004). Karyopherins: From Nuclear-Transport Mediators to Nuclear-Function Regulators. *Trends Cell Biol* **14**: 547-556.

Mostoslavsky R und Bergman Y. (1997). DNA Methylation: Regulation of Gene Expression and Role in the Immune System. *Biochim Biophys Acta* **1333**: F29-F50.

Moy B und Goss PE. (2006). Estrogen Receptor Pathway: Resistance to Endocrine Therapy and New Therapeutic Approaches. *Clin Cancer Res* **12**: 4790-4793.

Mullis K, Falloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.

Murphy N, Millar E, Lee CS. (2005). Gene Expression Profiling in Breast Cancer: Towards Individualising Patient Management. *Pathology* **37**: 271-277.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T et. al. (2006). A Collection of Breast Cancer Cell Lines for the Study of Functionally Distinct Cancer Subtypes. *Cancer Cell* **10**: 515-527.

Nguyen M, Lee MC, Wang JL, Tomlinson JS, Shao ZM, Alpaugh ML et. al. (2000). The Human Myoepithelial Cell Displays a Multifaceted Anti-Angiogenic Phenotype. *Oncogene* **19**: 3449-3459.

Nicholson RI und Johnston SR. (2005). Endocrine Therapy--Current Benefits and Limitations. *Breast Cancer Res Treat* **93 Suppl 1**: S3-10.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* **99**: 247-257.

Okano M, Xie S, Li E. (1998). Cloning and Characterization of a Family of Novel Mammalian DNA (Cytosine-5) Methyltransferases. *Nat Genet* **19**: 219-220.

Olson MF, Ashworth A, Hall A. (1995). An Essential Role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in Cell Cycle Progression Through G1. *Science* **269**: 1270-1272.

Omari MB, Coulombe PA, McLean WH. (2004). Intermediate Filament Proteins and Their Associated Diseases. *N Engl J Med* **351**: 2087-2100.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M et. al. (2004). A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* **351**: 2817-2826.

Pan Y, Jing R, Pitre A, Williams BJ, Skalli O. (2008). Intermediate Filament Protein Synemin Contributes to the Migratory Properties of Astrocytoma Cells by Influencing the Dynamics of the Actin Cytoskeleton. *FASEB J* **22**: 3196-3206.

Pankov R, Endo Y, Even-Ram S, Araki M, Clark K, Cukierman E et. al. (2005). A Rac Switch Regulates Random Versus Directionally Persistent Cell Migration. *J Cell Biol* **170**: 793-802.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.

Pathak DR, Osuch JR, He J. (2000). Breast Carcinoma Etiology: Current Knowledge and New Insights into the Effects of Reproductive and Hormonal Risk Factors in Black and White Populations. *Cancer* **88**: 1230-1238.

Pawlak G und Helfman DM. (2001). Cytoskeletal Changes in Cell Transformation and Tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 41-47.

Perkins ND. (1997). Achieving Transcriptional Specificity With NF-Kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1433-1448.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA et. al. (2000). Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **406**: 747-752.

Pradhan S und Esteve PO. (2003). Mammalian DNA (Cytosine-5) Methyltransferases and Their Expression. *Clin Immunol* **109**: 6-16.

Quensel C, Friedrich B, Sommer T, Hartmann E, Kohler M. (2004). In Vivo Analysis of Importin Alpha Proteins Reveals Cellular Proliferation Inhibition and Substrate Specificity. *Mol Cell Biol* **24**: 10246-10255.

Radford DM, Fair KL, Phillips NJ, Ritter JH, Steinbrueck T, Holt MS et. al. (1995). Allelotyping of Ductal Carcinoma in Situ of the Breast: Deletion of Loci on 8p, 13q, 16q, 17p and 17q. *Cancer Res* **55**: 3399-3405.

Raftopoulou M und Hall A. (2004). Cell Migration: Rho GTPases Lead the Way. *Dev Biol* **265**: 23-32.

Rayet B und Gelinas C. (1999). Aberrant Rel/NfkB Genes and Activity in Human Cancer. *Oncogene* **18**: 6938-6947.

Remmele W und Stegner HE. (1987). [Recommendation for Uniform Definition of an Immunoreactive Score (IRS) for Immunohistochemical Estrogen Receptor Detection (ER-ICA) in Breast Cancer Tissue]. *Pathologe* **8**: 138-140.

Richards EJ und Elgin SC. (2002). Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding Up the Usual Suspects. *Cell* **108**: 489-500.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G et. al. (2003). Cell Migration: Integrating Signals From Front to Back. *Science* **302**: 1704-1709.

Riggleman B, Wieschaus E, Schedl P. (1989). Molecular Analysis of the Armadillo Locus: Uniformly Distributed Transcripts and a Protein With Novel Internal Repeats Are Associated With a Drosophila Segment Polarity Gene. *Genes Dev* **3**: 96-113.

Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. (1991). Two Interdependent Basic Domains in Nucleoplasmin Nuclear Targeting Sequence: Identification of a Class of Bipartite Nuclear Targeting Sequence. *Cell* **64**: 615-623.

Rodenhiser DI. (2009). Epigenetic Contributions to Cancer Metastasis. *Clin Exp Metastasis* **26**: 5-18.

Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem* **242**: 84-89.

- Ronaghi M, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. (1998). PCR-Introduced Loop Structure As Primer in DNA Sequencing. *Biotechniques* **25**: 876-2, 884.
- Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N et. al. (2003). Breast Cancer Biomarkers and Molecular Medicine. *Expert Rev Mol Diagn* **3**: 573-585.
- Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N et. al. (2004). Breast Cancer Biomarkers and Molecular Medicine: Part II. *Expert Rev Mol Diagn* **4**: 169-188.
- Ross JS, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. (2005). Breast Cancer Biomarkers. *Adv Clin Chem* **40**: 99-125.
- Russo J, Yang X, Hu YF, Bove BA, Huang Y, Silva ID et. al. (1998). Biological and Molecular Basis of Human Breast Cancer. *Front Biosci* **3**: D944-D960.
- Sager R. (1985). Genetic Suppression of Tumor Formation. *Adv Cancer Res* **44**: 43-68.
- Sakai M, Sohda M, Miyazaki T, Suzuki S, Sano A, Tanaka N et. al. (2010). Significance of Karyopherin- $\{\text{Alpha}\}$ 2 (KPNA2) Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* **30**: 851-856.
- Sandrock K, Bielek H, Schradi K, Schmidt G, Klugbauer N. (2010). The Nuclear Import of the Small GTPase Rac1 Is Mediated by the Direct Interaction With Karyopherin Alpha2. *Traffic* **11**: 198-209.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santi DV, Norment A, Garrett CE. (1984). Covalent Bond Formation Between a DNA-Cytosine Methyltransferase and DNA Containing 5-Azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 6993-6997.
- Sarrio D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez-Estevez C, Guo M, Herman JG et. al. (2003). Epigenetic and Genetic Alterations of APC and CDH1 Genes in Lobular Breast Cancer: Relationships With Abnormal E-Cadherin and Catenin Expression and Microsatellite Instability. *Int J Cancer* **106**: 208-215.
- Schlamp CL, Poulsen GL, Nork TM, Nickells RW. (1997). Nuclear Exclusion of Wild-Type P53 in Immortalized Human Retinoblastoma Cells. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1530-1536.
- Schmitt-Graeff A, Jing R, Nitschke R, Desmouliere A, Skalli O. (2006). Synemin Expression Is Widespread in Liver Fibrosis and Is Induced in Proliferating and Malignant Biliary Epithelial Cells. *Hum Pathol* **37**: 1200-1210.
- Schmutzler RK, Fimmers R, Bierhoff E, Lohmar B, Homann A, Speiser P et. al. (1996). Association of Allelic Losses on Human Chromosomal Arms 11Q and 16Q in Sporadic Breast Cancer. *Int J Cancer* **69**: 307-311.
- Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. (2002). Smart Drugs: Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Cancer Cell* **1**: 117-123.

- Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R et. al. (2005). Distinct Hypermethylation Profile of Primary Breast Cancer Is Associated With Sentinel Lymph Node Metastasis. *Clin Cancer Res* **11**: 2156-2162.
- Shivakumar L und Armitage JO. (2006). Bcl-2 Gene Expression As a Predictor of Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* **6**: 455-457.
- Slamon DJ. (1987). Proto-Oncogenes and Human Cancers. *N Engl J Med* **317**: 955-957.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et. al. (2001). Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody Against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* **344**: 783-792.
- Sobin LH und Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours. Wiley 5 1997; New York.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A et. al. (2003). Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in Independent Gene Expression Data Sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8418-8423.
- Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J et. al. (2006). Gene Expression Profiling in Breast Cancer: Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade to Improve Prognosis. *J Natl Cancer Inst* **98**: 262-272.
- Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM et. al. (1997). Aberrant Nuclear Factor-KappaB/Rel Expression and the Pathogenesis of Breast Cancer. *J Clin Invest* **100**: 2952-2960.
- Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X et. al. (1998). Pro-Caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8. *J Biol Chem* **273**: 27084-27090.
- Stoelzle T, Schwab P, Trumpp A, Hynes NE. (2009). C-Myc Affects mRNA Translation, Cell Proliferation and Progenitor Cell Function in the Mammary Gland. *BMC Biol* **7**: 63.
- Strahl BD und Allis CD. (2000). The Language of Covalent Histone Modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Sun N, Huiatt TW, Paulin D, Li Z, Robson RM. (2009). Synemin Interacts With the LIM Domain Protein Zyxin and Is Essential for Cell Adhesion and Migration. *Exp Cell Res*.
- Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T et. al. (1994). P53-Dependent Apoptosis Suppresses Tumor Growth and Progression in Vivo. *Cell* **78**: 703-711.
- Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. (2004). DNA Methylation and Breast Cancer. *Biochem Pharmacol* **68**: 1187-1197.
- Takai D und Jones PA. (2002). Comprehensive Analysis of CpG Islands in Human Chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3740-3745.

Tang X, Khuri FR, Lee JJ, Kemp BL, Liu D, Hong WK et. al. (2000). Hypermethylation of the Death-Associated Protein (DAP) Kinase Promoter and Aggressiveness in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1511-1516.

Tavassoli FA. (1992). Classification of Metaplastic Carcinomas of the Breast. *Pathol Annu* **27 Pt 2**: 89-119.

Teng SC, Wu KJ, Tseng SF, Wong CW, Kao L. (2006). Importin KPNA2, NBS1, DNA Repair and Tumorigenesis. *J Mol Histol* **37**: 293-299.

Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T et. al. (1997). Localization of BRCA1 and a Splice Variant Identifies the Nuclear Localization Signal. *Mol Cell Biol* **17**: 444-452.

Thomssen C, Harbeck N, Dittmer J, Abraha-Spaeth SR, Papendick N, Paradiso A et. al. (2009). Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens. *J Natl. Cancer Inst* **101**: 1028-1029.

Thornberry NA und Lazebnik Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science* **281**: 1312-1316.

Titeux M, Brocheriou V, Xue Z, Gao J, Pellissier JF, Guicheney P et. al. (2001). Human Synemin Gene Generates Splice Variants Encoding Two Distinct Intermediate Filament Proteins. *Eur J Biochem* **268**: 6435-6449.

Tost J, Dunker J, Glynne Gut I. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques* 2003, **35**:152-156.

Tseng SF, Chang CY, Wu KJ, Teng SC. (2005). Importin KPNA2 Is Required for Proper Nuclear Localization and Multiple Functions of NBS1. *J Biol Chem* **280**: 39594-39600.

Umbrecht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. (2001). Hypermethylation of 14-3-3 Sigma (Stratifin) Is an Early Event in Breast Cancer. *Oncogene* **20**: 3348-3353.

't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M et. al. (2002). Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer. *Nature* **415**: 530-536.

Valgardsdottir R, Tryggvadottir L, Steinarsdottir M, Olafsdottir K, Jonasdottir S, Jonasson JG et. al. (1997). Genomic Instability and Poor Prognosis Associated With Abnormal TP53 in Breast Carcinomas. Molecular and Immunohistochemical Analysis. *APMIS* **105**: 121-130.

van der Watt PJ, Maske CP, Hendricks DT, Parker MI, Denny L, Govender D et. al. (2009). The Karyopherin Proteins, Crm1 and Karyopherin Beta1, Are Overexpressed in Cervical Cancer and Are Critical for Cancer Cell Survival and Proliferation. *Int J Cancer* **124**: 1829-1840.

Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B et. al. (2006). Aberrant Methylation of the Wnt Antagonist SFRP1 in Breast Cancer Is Associated With Unfavourable Prognosis. *Oncogene* **25**: 3479-3488.

Veeck J, Noetzel E, Bektas N, Jost E, Hartmann A, Knuchel R et. al. (2008). Promoter Hypermethylation of the SFRP2 Gene Is a High-Frequent Alteration and Tumor-Specific Epigenetic Marker in Human Breast Cancer. *Mol Cancer* **7**: 83.

Vlahou A, Laronga C, Wilson L, Gregory B, Fournier K, McGaughey D et. al. (2003). A Novel Approach Toward Development of a Rapid Blood Test for Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* **4**: 203-209.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L et. al. (2001). First-Line Herceptin Monotherapy in Metastatic Breast Cancer. *Oncology* **61 Suppl 2**: 37-42.

Walker RA und Dearing SJ. (1999). Expression of Epidermal Growth Factor Receptor mRNA and Protein in Primary Breast Carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **53**: 167-176.

Wang CI, Wang CL, Wang CW, Chen CD, Wu CC, Liang Y et. al. (2010). Importin Subunit Alpha-2 Is Identified As a Potential Biomarker for Non-Small Cell Lung Cancer by Integration of the Cancer Cell Secretome and Tissue Transcriptome. *Int J Cancer*.

Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F et. al. (2005). Gene-Expression Profiles to Predict Distant Metastasis of Lymph-Node-Negative Primary Breast Cancer. *Lancet* **365**: 671-679.

Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, Van't Veer LJ. (2003). Gene Expression Profiles of Primary Breast Tumors Maintained in Distant Metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15901-15905.

Weinberg RA. (1989). Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Res* **49**: 3713-3721.

Weinberg RA. (1995). The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* **81**: 323-330.

Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. (1975). An Atlas of Subgross Pathology of the Human Breast With Special Reference to Possible Precancerous Lesions. *J Natl Cancer Inst* **55**: 231-273.

Welsh CF. (2004). Rho GTPases As Key Transducers of Proliferative Signals in G1 Cell Cycle Regulation. *Breast Cancer Res Treat* **84**: 33-42.

Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS. (1995). Identification of a Signal for Rapid Export of Proteins From the Nucleus. *Cell* **82**: 463-473.

Whipple RA, Balzer EM, Cho EH, Matrone MA, Yoon JR, Martin SS. (2008). Vimentin Filaments Support Extension of Tubulin-Based Microtentacles in Detached Breast Tumor Cells. *Cancer Res* **68**: 5678-5688.

Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Muller HM, Fiegl H, Goebel G et. al. (2004). DNA Hypomethylation and Ovarian Cancer Biology. *Cancer Res* **64**: 4472-4480.

Widschwendter M und Jones PA. (2002). DNA Methylation and Breast Carcinogenesis. *Oncogene* **21**: 5462-5482.

Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR et. al. (2006). Gene Expression Profiling of Primary Cutaneous Melanoma and Clinical Outcome. *J Natl Cancer Inst* **98**: 472-482.

Wittekind CH, Meyer HJ und Bootz F. UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Berlin Heidelberg New York 6. Aufl. 2002.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N et. al. (1994). Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA2, to Chromosome 13q12-13. *Science* **265**: 2088-2090.

Yang X, Yan L, Davidson NE. (2001). DNA Methylation in Breast Cancer. *Endocr Relat Cancer* **8**: 115-127.

Yi C, Maksimoska J, Marmorstein R, Kissil JL. (2010). Development of Small-Molecule Inhibitors of the Group I P21-Activated Kinases, Emerging Therapeutic Targets in Cancer. *Biochem Pharmacol* **80**: 683-689.

Zannini L, Lecis D, Lisanti S, Benetti R, Buscemi G, Schneider C et. al. (2003). Karyopherin-Alpha2 Protein Interacts With Chk2 and Contributes to Its Nuclear Import. *J Biol Chem* **278**: 42346-42351.

Zugmaier G, Knabbe C und Aigner A. Das Mammakarzinom - Risikofaktoren, Prognose und medikamentöse Therapie. *Med Welt* 2003; 54:96-101.

6 Anhang

6.1 Eigenschaften der verwendeten Mammakarzinomkohorte

Tab. 6-1: Klinisch-pathologische Parameter für die Brustkrebskohorte der **SYNM** Methylierungsstudie

Parameter:	Kategorisierung	n ^a verfügbar	%
Alter bei Diagnose	Median 57 Jahre (Spannweite: 28-87)		
	<57 Jahre	96	49.2
	≥57 Jahre	99	50.8
Tumogröße^b			
	pT1	68	34.9
	pT2-4	108	55.4
	pTx ^c	19	9.7
Lymphknotenstatus^b			
	pN0	82	42.1
	PN1-3	74	37.9
	pNx	39	20.0
Histologische Tumorgraduierung^d			
	G1	12	6.2
	G2	87	44.6
	G3	79	40.5
	Gx	17	8.7
Histologischer Tumortyp			
	invasiv duktal	167	85.7
	invasiv lobulär	17	8.7
	andere	11	5.6
Östrogenrezeptorstatus			
	negativ (IRS ^e 0-2)	54	27.1
	positiv (IRS 3-12)	97	49.7
	IRSx	44	22.6
Progesteronrezeptorstatus			
	negativ (IRS 0-2)	56	28.7
	positiv (IRS 3-12)	95	48.7
	IRSx	44	22.6

^aFrauen mit primärem, unilateralem, invasiven Brustkrebs. ^bEntsprechend der TNM Klassifikation nach Sabin und Wittekind (Sabin und Wittekind, 1997). ^cStatus unbekannt. ^dNach Bloom und Richardson und modifiziert durch Elston und Ellis (Elston und Ellis, 1993). ^eIRS= Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner, 1987)

6.2 Abbildungen 6.1 und 6.2

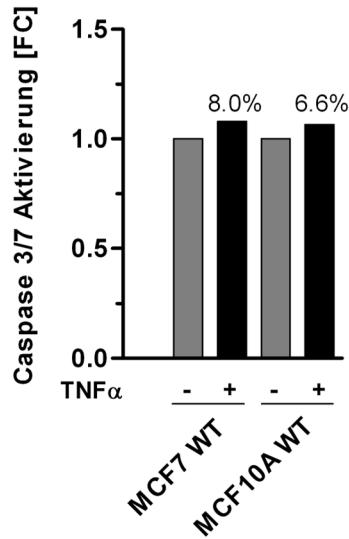


Abb. 6-1: Caspaseaktivierung in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen durch TNF α . Für die Messung der Caspase 3/7 Aktivität in MCF10A und MCF7 Wildtypzellen, wurden je Ansatz 5000 Zellen in 96-well Kulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden Adhäsionsphase für weitere 5 Stunden mit TNF α [100ng/ml] inkubiert. Die Detektion der Caspaseaktivität wurde mittels Fluoreszenz basiertem Caspase-Assay detektiert (499nm/521nm). Vergleich des Anstiegs der Caspaseaktivierung [FC] in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen nach 5 Stunden Stimulierung mit TNF α . Die Normierung erfolgte erneut auf die Werte der nicht stimulierten Zellen (FC=1). Aufgrund der marginalen Differenzen sind die exakten Werte nach TNF α Stimulierung (+) in Prozent angegeben

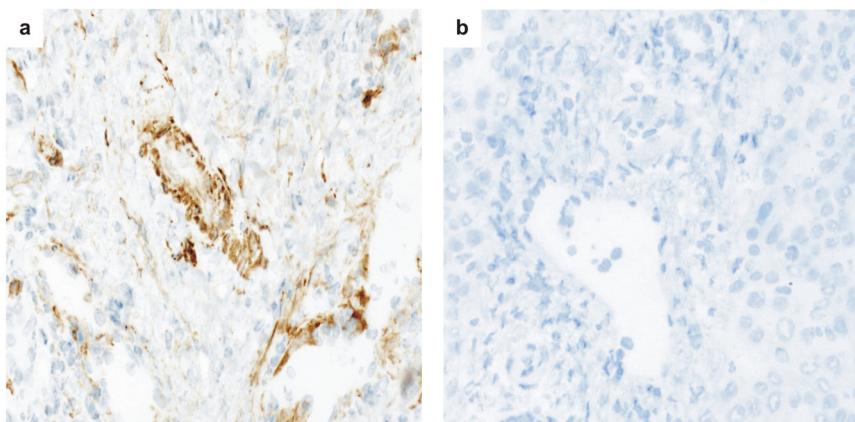


Abb. 6-2: Positivkontrolle für die Immunhistochemie mit dem SYNM Antikörper. **a:** SYNM Färbung eines schlecht differenzierten (G3) humanen Adenokarzinoms der Leber. **b:** Negativkontrolle der Färbung. Ohne Applikation des SYNM Primärantikörpers. Alle Schnitte mit Hämalaungegenfärbung. Original Vergrößerungen: 400x

6.3 Klassifikation von malignen Tumoren nach dem TNM-System

Tumore werden gemäß UICC in einer TNM-Klassifikation (Wittekind CH et al., 2002) in den Kategorien Tumogröße (**pT**), Nodal-Status (**pN**) und Fernmetastasen-Status (**pM**) unterschieden:

pT - Primärtumor

pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhaltspunkt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
pT1	Tumor bis 2 cm in größter Ausdehnung
pT1a	Tumor bis 0.5 cm
pT1b	Tumor 0.5 - 1 cm
pT1c	Tumor 1 - 2 cm
pT2	Tumor > 2 cm, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pT4a	mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	inflammatorisches Karzinom

pN – regionäre Lymphknoten

pNx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN1a	nur Mikrometastasen, keine > 0.2 cm
pN1b	Metastasen in Lymphknoten, zumindest eine > 0.2 cm
pN1bI	Metastasen in 1 - 3 Lymphknoten, eine > 0.2 cm aber alle < 2 cm
pN1bII	Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten, eine >0.2cm, aber alle <2cm
pN1bIII	Ausdehnung der Metastasen über die Lymphknotenkapsel hinaus (alle<2cm)
pN1bIV	Metastasen in Lymphknoten ≥ 2 cm in größter Ausdehnung
pN2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander fixiert
pN3	Metastasen in Lymphknoten entlang der <i>Arteria mammaria interna</i>

pM – Fernmetastasierung

pMx	vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	keine Fernmetastasen vorhanden
pM1	Fernmetastasen liegen vor

6.4 Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms

Neben der TNM-Klassifikation wird eine histo-pathologische Tumorgraduierung beschrieben. Dabei werden die Kriterien Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate bestimmt (Elston und Ellis, 1993) und daraufhin der Malignitätsgrad des Tumors beurteilt.

Tab. 6-2: Histopathologische Graduierung des Mammakarzinoms

Merkmal	Kriterium	Wert
Tubulusausbildung	75%	1
	10-75%	2
	<10%	3
Kernpolymorphie	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Stark	3
Mitoserate	0-5/10 HPF	1
	6-11/10HPF	2
	≥ 12/10 HPF	3
Summenscore		3-9

HPF: high power field (400-fache Vergrößerung)

6.5 Auswertesystem des histologischen Summenscores

Tab. 6-3: Auswertung des histopathologischen Summenscores

Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3, 4, 5	Gering	G1	Gut differenziert
6, 7	Mäßig	G2	Mäßig differenziert
8, 9	Hoch	G3	Entdifferenziert

6.6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Verteilung der Krebsneuerkrankungen in Deutschland.....	1
Abb. 1-2: Jährliche Krebsneuerkrankungen und Sterbefälle in Deutschland.....	2
Abb. 1-3: Schematische Darstellung der weiblichen Brustanatomie.....	3
Abb. 1-4: Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinom.....	4
Abb. 1-5: Die heterochromatische Konfiguration eines transkriptional inaktiven Promotorbereichs..	15
Abb. 1-6: Der Aufbau von Karyopherin α 2 (KPNA2)	21
Abb. 1-7: Der nukleozytoplasmatische Transportzyklus mit Importin α und Importin β	23
Abb. 2-1: <i>Real-Time</i> PCR Ergebniskurve.....	45
Abb. 2-2: Bisulfit-Konversion.....	46
Abb. 2-3: Prinzip der Sequenzänderung durch die Bisulfit-Konversion und der MSP	47
Abb. 2-4: Technisches Prinzip der Pyrosequenzierung.	49
Abb. 2-5: Darstellung eines typischen Pyrogramms	50
Abb. 2-6: Graphische Ausgabe einer typischen CASY1 Zellzahlbestimmung	62
Abb. 2-7: Vektorkarten des Tet On regulierten KPNA2 Expressionssystems.....	64
Abb. 2-8: Funktionsschema der Tetracyclin regulierten KPNA2 Expression.....	65
Abb. 2-9: Vektorkarte des pcDNA4/TO/lacz Vektors.....	67
Abb. 2-10: Anwendung der Zellkultureinsätze für den Wundheilungstest.	73
Abb. 3-1: Der SYNM Expressionsverlust auf einem Brustkrebs Dot Blot Array.....	75
Abb. 3-2: Der SYNM Expressionsverlust in invasiven Brusttumoren.....	76
Abb. 3-3: Die Charakterisierung der SYNM Proteinexpression in der humanen Brust.....	77
Abb. 3-4: Der SYNM Proteinexpressionsverlust im humanen Mammakarzinom.....	78
Abb. 3-5: SYNM Promotoranalyse und MSP Primer Design.....	79
Abb. 3-6: Die SYNM Hypermethylierung und Expression in humanen Brustkrebszelllinien.....	80
Abb. 3-7: Die SYNM Demethylierung und Re-Expression in humanen Brustkrebszelllinien.....	82
Abb. 3-8: Die SYNM Promotormethylierung im primärem humanem Brustkrebs.	83
Abb. 3-9: Der SYNM Promotormethylierung assoziierte SYNM Verlust im humanem Brustkrebs.	85
Abb. 3-10: Univariate Kaplan-Meier Analyse des RFÜ in Bezug zur SYNM Promotormethylierung....	89
Abb. 3-11: ie KPNA2 mRNA Expression in zehn humanen Mammakarzinomzelllinien	92

Abb. 3-12: Die KPNA2 Proteinexpression in MCF10A und MCF7.....	92
Abb. 3-13: Funktionstest des pT-Rex-DEST30/KPNA2 Expressionsvektors.	93
Abb. 3-14: Funktionstest der MCF10A und MCF7 Tet-Repressorklone	95
Abb. 3-15: Kontroll-PCR für stabile MCF7/TR/KPNA2 Transfektanden	97
Abb. 3-16: KPNA2 mRNA Expression in MCF7/TR/KPNA2- und MCF7/TR/Leer Klonen.....	98
Abb. 3-17: Optimierung der KPNA2 Induktion in MCF7/TR/KPNA2 Klonen.....	99
Abb. 3-18: KPNA2 Proteinexpression in MCF7/TR/KPNA2 Klonen.	100
Abb. 3-19: Zelluläre Lokalisation von KPNA2 in MCF7/TR/KPNA2 Klonen.....	102
Abb. 3-20: KPNA2 Dichte in MCF7/TR/KPNA2 Klonen	103
Abb. 3-21: Der RNA Interferenz induzierte KPNA2 Expressionsverlust in MCF7 WT Zellen	105
Abb. 3-22: Einfluss der KPNA2 Expression auf die Zellproliferation von MCF7 und MCF10A Zellen	107
Abb. 3-23: Einfluss KPNA2 Überexpression auf die Zellproliferation in MCF7/TR/KPNA2 Klonen..	109
Abb. 3-24: Der Einfluss des KPNA2 Verlust auf die Zellproliferation in MCF7 WT Zellen.....	110
Abb. 3-25: Caspaseaktivierung in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen.	112
Abb. 3-26: FACS-Auswertung der Apoptoseinduktion in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen	113
Abb. 3-27: FACS Analyse der Apoptoseinduktion in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen.	114
Abb. 3-28: Auswertung der FACS Analyse der Apoptoseraten von MCF10A/KPNA2 Zellen	115
Abb. 3-29: FACS Analyse der Apoptoseraten von transienten MCF10A/KPNA2 Zellen.....	116
Abb. 3-30: Die Apoptoserate von KPNA2 defizienten MCF7 Zellen	118
Abb. 3-31: Adhäsionstest mit MCF10A und MCF7 Zellen.	120
Abb. 3-32: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Adhäsion von MCF10A und MCF7 Zellen.....	121
Abb. 3-33: Migrationsverhalten von MCF10A Zellen	122
Abb. 3-34: Das Migrationsverhalten von stabilen MCF7/TR/KPNA2 Klonen.....	124
Abb. 3-35. Wundheilungstest mit dem MCF7/TR/KPNA2 Vollklon 12	125
Abb. 3-36: Der Einfluss von KPNA2 auf die Kolonienbildung in MCF10A und MCF7 Zellen.	127
Abb. 3-37: Der Einfluss von KPNA2 auf die Kolonienbildung in MCF7/TR/KPNA2 Klonen	128
Abb. 6-1: Caspaseaktivierung in MCF10A WT und MCF7 WT Zellen durch TNF α	168
Abb. 6-2: Positivkontrolle für die Immunhistochemie mit dem SYNM Antikörper.....	168

6.7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Tumor <i>Staging</i> nach dem TNM-System	5
Tab. 1-2: Eine Auswahl von aberrant methylierten Genen im humanen Mammakarzinom.....	17
Tab. 1-3: Die zelluläre Fehltranslokationen tumorassozierter Proteine.	25
Tab. 2-1: Verwendete Brustzelllinien und deren Ursprung	31
Tab 2-2. Standardansatz der PCR	42
Tab 2-3. Standard-Temperaturprofil der PCR.....	42
Tab 2-4: Standard <i>Real-Time</i> PCR Ansatz	43
Tab 2-5: <i>Real-Time</i> PCR Programm für das Gen <i>KPNA2</i>	44
Tab. 2-6: MSP-Reaktionsansatz	48
Tab. 2-7: MSP Temperaturprofil (<i>hot-start</i> Variante).....	48
Tab. 2-8: Restriktionsverdau für das Plasmid pTRexDest30/ <i>KPNA2</i>	54
Tab. 2-9: Absteigende Alkoholreihe für die IHC	56
Tab. 2-10: Aufsteigende Alkoholreihe für die Immunhistochemie.....	57
Tab. 2-11: Antikörper für die Immunodetektion	60
Tab. 2-12: Blasticidin Verdünnungsreihe für die Positivselektion von TR Klonen	65
Tab. 2-13: Transfektionsschema für den Vektor pcDNA6/TR.....	66
Tab. 2-14: Titrationsreihe für die stabile Transfektion.....	66
Tab. 2-15: Genetecin Verdünnungsreihe für die Positivselektion von TR/ <i>KPNA2</i> Klonen	68
Tab. 3-1: Die Korrelation von klinisch-pathologischen Parametern mit der <i>SYNM</i> Promotormethylierung.....	86
Tab. 3-2: Univariate Analyse prognostischer Faktoren und der <i>SYNM</i> Methylierung in Bezug zum rezidivfreien Überleben (RFÜ) und dem Gesamtüberleben (GÜ)	87
Tab. 3-3: Multivariates Cox Regressionsmodell prognostischer Faktoren und der <i>SYNM</i> Methylierung	90
Tab. 6-1: Klinisch-pathologische Parameter für die Brustkrebskohorte der <i>SYNM</i> Methylierungsstudie	167
Tab. 6-2: Histopathologische Graduierung des Mammakarzinoms	170
Tab. 6-3: Auswertung des histopathologischen Summenscores	170

6.8 Veröffentlichungen

1. **Noetzel E**, Rose M, Sevinc E, Hilgers RD, Hartmann A, Naami A et. al. (2010). Intermediate Filament Dynamics and Breast Cancer: Aberrant Promoter Methylation of the *Synemin* Gene Is Associated With Early Tumor Relapse. *Oncogene* **29**: 4814-4825.
2. Verjans E, **Noetzel E**, Bektas N, Schutz AK, Lue H, Lennartz B et. al. (2009). Dual Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Breast Cancer. *BMC Cancer* **9**: 230.
3. Veeck J, **Noetzel E**, Bektas N, Jost E, Hartmann A, Knuchel R et. al. (2008). Promoter Hypermethylation of the *SFRP2* Gene Is a High-Frequent Alteration and Tumor-Specific Epigenetic Marker in Human Breast Cancer. *Mol Cancer* **7**: 83.
4. **Noetzel E**, Veeck J, Horn F, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E. (2008). Promoter Methylation of *ID4*. A Marker for Recurrence-Free Survival in Human Breast Cancer. *Pathologe* **29** Suppl 2: 319-327.
5. Bektas N, **Noetzel E**, Veeck J, Press MF, Kristiansen G, Naami A et. al. (2008). The Ubiquitin-Like Molecule Interferon-Stimulated Gene 15 (*ISG15*) Is a Potential Prognostic Marker in Human Breast Cancer. *Breast Cancer Res* **10**: R58.
6. **Noetzel E**, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A et. al. (2008). Promoter Methylation-Associated Loss of *ID4* Expression Is a Marker of Tumour Recurrence in Human Breast Cancer. *BMC Cancer* **8**: 154.
7. Veeck J, Geisler C, **Noetzel E**, Alkaya S, Hartmann A, Knuchel R et. al. (2008). Epigenetic Inactivation of the Secreted Frizzled-Related Protein-5 (*SFRP5*) Gene in Human Breast Cancer Is Associated With Unfavorable Prognosis. *Carcinogenesis* **29**: 991-998.

Tagungsbeiträge (Vorträge)

1. **Noetzel E**, Sevinc E, Hartmann A, Naami A, Knüchel-R und Dahl E. Die tumorspezifische Promotormethylierung des *Synemin*-Gens ist ein Marker für ein erhöhtes Rezidivrisiko beim humanen Mammakarzinom. 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 27.-30.Mai 2010, Berlin.
2. **Noetzel E**, Veeck J, Horn F, Hartmann A, Knüchel R und Dahl E. Promotormethylierung von *ID4*: Ein Marker für die Rezidivbildung des humanen Mammakarzinoms. Beste Forschungsbeiträge: Gynäkopathologie. 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 27.-30.Mai 2010, Berlin.

Tagungsbeiträge (Poster)

1. **Noetzel E**, Schütz A, Bernhagen J, Hartmann A, Knüchel-R und Dahl E. S100A9 is a novel biomarker for poor survival of breast cancer patients. 101th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR). 17.-21. April 2010, Washington, USA.
2. **Noetzel E**, Veeck J, Hartmann A, Galm O, Knüchel-R und Dahl E. Promotor methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of early tumor recurrence in human breast cancer. Biomedica Life Science Summit. 17.-18. März 2010, Aachen.
3. **Noetzel E**, Veeck J, Jost E, Knüchel-R und Dahl E. Promotor hypermethylation of *SFRP2* is a high-frequent and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. 3th bi-annual Symposium on DNA Methylation and Cancer, EPiPHAMY. 09. Oktober 2009, Aachen.
4. **Noetzel E**, Veeck J, Hartmann A, Galm O, Knüchel-R und Dahl E. Promotor methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of early tumor recurrence in human breast cancer. 3rd Mildred Scheel Cancer Conference. 18.-20. Juni 2008, Königswinter, Bonn.
3. **Noetzel E**, Veeck J, Hartmann A, Galm O, Knüchel-R und Dahl E. Promotor methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of early tumor recurrence in human breast cancer 2nd bi-annual Symposium on DNA Methylation and Cancer, EPiPHAMY. 26. Oktober 2007, Ghent, Belgien.

6.9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Aachen, den 13. Oktober 2010

Erik Noetzel

6.10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Noetzel
Vorname: Erik Alexander
Geburtstag: 18.10.1979
Geburtsort: Mönchengladbach / Rheydt
Staatsangehörigkeit: Deutsch
E-mail: Erik.Noetzel@rwth-aachen.de

Schule:

1999: Abitur

Studium:

ab 2000 bis 2006: Biologiestudium an der RWTH Aachen (Diplom Biologe)

Promotion:

ab 2007: Promotion am Institut für Pathologie, AG Molekulare Onkologie,
Universitätsklinikum der RWTH Aachen

6.11 Danksagung

Herrn Professor Dr. Edgar Dahl (Institut für Pathologie der RWTH Aachen) danke ich sehr für die Übernahme des Referates und für die immer motivierende Unterstützung während meiner Promotion.

Herrn Professor Dr. Werner Baumgartner (Institut für Biologie II der RWTH Aachen) möchte ich für die freundliche und direkte Übernahme des Koreferates danken.

Frau Professor Dr. Ruth Knüchel-Clarke danke ich für den stets positiven Zuspruch und die Möglichkeit, am Institut für Pathologie meine Promotion ablegen zu dürfen.

Den Kooperationspartnern der AG Molekulare Onkologie, Prof. Dr. Arndt Hartmann (Pathologisches Institut, UK Erlangen), Prof. Dr. Matthias Dürst (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, UK Jena), Dr. Dieter Niederacher (Frauenklinik, UK Düsseldorf) sowie Frau Dr. Monika Klinkhammer-Schalke (Tumorzentrum Regensburg), danke ich sehr für die freundliche Bereitstellung von humanen Gewebeproben und klinischen Befunden.

Herrn Dr. Till Braunschweig (Institut für Pathologie, UK Aachen) bin ich dankbar für die geduldige Beantwortung meiner Fragen zur Allgemeinen Pathologie, zur Mammapathologie und zur Mikroskopie.

Danke an alle Doktoranden für die stets produktive Arbeitsstimmung. Dem ganzen Team der Pathologie, insbesondere Sonja von Serényi, Sevim Alkaya und Inge Losen, möchte ich für die stets angenehme, gutgelaunte und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken. Ein besseres Team kann man sich wirklich nicht wünschen.

Herrn Dr. Jürgen Veeck möchte ich ebenfalls für seine uneingeschränkte Unterstützung herzlich danken.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dipl.-Biol. Michael Rose. Danke für die produktive und immer anregende Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich auch meiner Familie herzlich danken, die mich während jeder Phase des Studiums unterstützt hat und ohne die mein gesamtes Studium nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt jedoch Kathy. Schön, dass Du immer da bist.