

**Die funktionelle Charakterisierung des putativen Tumorsuppressors
DKK3 im humanen Mammakarzinom sowie die Identifizierung
potentieller SFRP1-Mimetika für die Brustkrebstherapie**

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

vorgelegt von
Eva Lorsy M. Sc. Biologie
aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Edgar Dahl
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Björn Usadel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2017

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VI
Summary	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Das humane Mammakarzinom	1
1.1.1 Die Anatomie der weiblichen Brust	1
1.1.2 Epidemiologie des humanen Mammakarzinoms	2
1.1.3 Definition und Klassifizierung des humanen Mammakarzinoms	3
1.1.3.1 Histopathologische Klassifizierung	4
1.1.3.2 Molekulare Klassifizierung	5
1.1.4 Therapie des Mammakarzinoms	6
1.2 Allgemeine Tumorgenese	9
1.2.1 Molekulargenetische Grundlagen der Tumorgenese	11
1.2.1.1 Proto-Onkogene	12
1.2.1.2 Tumorsuppressorgene	13
1.3 Epigenetik	15
1.3.1 Grundlagen der Epigenetik	15
1.3.2 DNA-Methylierung	16
1.4 Der WNT-Signalweg	17
1.4.1 Der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg	17
1.4.2 WNT/PCP-Signalweg	20
1.5 Die Dickkopf-Familie	21
1.6 Die SFRP-Familie	23
1.7 Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Klinisches Patientenmaterial	27
2.1.1 Kryokonserviertes Frischgewebe	27
2.1.2 Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe	27
2.1.3 <i>In silico</i> Mammakarzinom-Kollektiv	28
2.2 Bakterienstamm	28

2.3 Humane Mammakarzinom-Zelllinien.....	29
2.4 Geräte, Software, Lösungsmittel und Chemikalien.....	30
2.4.1 Geräte	30
2.4.2 Software und Datenbanken	31
2.4.3 Lösungsmittel	31
2.4.4 Chemikalien.....	32
2.5 Puffer und Lösungen.....	33
2.6 Medien für die Zellkultur.....	34
2.7 Medien für Anzucht von <i>E. coli</i>	34
2.8 Antikörper	34
2.9 Inhibitoren.....	35
2.10 Molekularbiologische und Proteinchemische Kits und Reagenzien	35
2.11 Oligonukleotide	35
2.12 <i>DKK3</i> -Überexpressionsvektor	37
2.13 Molekulargenetische Methoden	38
2.13.1 DNA-Isolation aus kryoasserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien.....	38
2.13.2 Gesamt-RNA-Isolation aus kryoasserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien.....	38
2.13.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen.....	39
2.13.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	39
2.13.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.13.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	41
2.13.7 Semiquantitative <i>Real-Time</i> PCR	41
2.13.8 Bisulfit-Konversion genomischer DNA aus humanem Gewebe.....	44
2.13.9 DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung.....	45
2.13.10 Transformation in <i>E. coli</i>	48
2.13.11 Inokulation von Flüssigkulturen transformierter <i>E. coli</i>	48
2.13.12 Plasmid-Mini-Präparation mittels Kochlyse-Verfahren	49
2.13.13 Plasmid-Maxi-Präparation	49
2.13.14 DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	49
2.13.15 <i>Microarray</i> -basierte Genexpressionsanalyse	51
2.14 Proteinchemische und immunologische Methoden	51
2.14.1 Herstellung von Gewebeschnitten aus humanem Material	51

2.14.2 Methylenblau-Färbung von humanem Frischgewebe	52
2.14.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) von Gewebeschnitten	52
2.14.4 Immunhistochemie (IHC) an humanem FFPE-Gewebe	52
2.14.5 Isolation von Gesamt- sowie sezerniertem Protein für die SDS-Gelelektrophorese	54
2.14.6 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen mittels Bicinchoninsäure (BCA)	54
2.14.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.14.8 <i>Western Blot</i>	56
2.15 Zellbiologische Methoden	57
2.15.1 Kultivierung humaner Zelllinien.....	57
2.15.2 Ernte humaner Zelllinien.....	58
2.15.3 Kryokonservierung humaner Zelllinien.....	58
2.15.4 Zellzahlbestimmung.....	58
2.15.5 Generierung stabil genetisch-veränderter Transfektanden	59
2.15.6 Zellpräparation für die Rasterelektronen-Mikroskopie (REM).....	61
2.16 Funktionelle <i>in vitro</i> -Experimente	62
2.16.1 Koloniebildungstest	62
2.16.2 Bestimmung des Zellwachstums	63
2.16.3 Caspase 3/7-Aktivitätsmessung.....	64
2.16.4 Zell-Matrix-Adhäsionstest	64
2.16.5 Wundheilungstest.....	65
2.17 Statistische Methoden.....	66
3. Ergebnisse.....	67
3.1 Charakterisierung des putativen Tumorsuppressors DKK3 im humanen Mammakarzinom	67
3.1.1 Verlust der DKK3-Expression im humanen Mammakarzinom.....	68
3.1.2 DNA-Hypermethylierung der <i>DKK3</i> -Gensequenz	73
3.1.3 Die prognostische Relevanz von DKK3 für das humane Mammakarzinom.....	78
3.1.4 Die biologische Relevanz des <i>DKK3</i> -Expressionsverlustes für die Tumorgenese des humanen Mammakarzinoms.....	80
3.1.4.1 Generierung stabiler <i>in vitro</i> -Mammakarzinom-Modelle	80
3.1.4.2 Der Einfluss der DKK3-Reexpression auf das Koloniewachstum humaner Mammakarzinomzellen.....	82
3.1.4.3 Der Einfluss der DKK3-Reexpression auf das Zellwachstum humaner Mammakarzinomzellen.....	86

3.1.4.4 Der Einfluss der DKK3-Reexpression auf die Apoptose-Induktion in humanen Mammakarzinomzellen	87
3.1.4.5 Der Einfluss der DKK3-Reexpression auf die Zell-Matrix-Adhäsion humaner Mammakarzinomzellen	89
3.1.4.6 Der Einfluss der DKK3-Reexpression auf die Migration basaler Mammakarzinomzellen	90
3.1.4.7 Der Einfluss von DKK3 auf die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker in basalen Mammakarzinomzellen	93
3.2 Identifizierung und Charakterisierung potentieller SFRP1-Mimetika für die Therapie des humanen Mammakarzinoms	95
3.2.1 Etablierung eines Zellkultur-Analyseverfahrens zur Validierung der potentiellen SFRP1-Mimetika	96
3.2.2 Validierung der potentiellen SFRP1-Mimetika anhand ihrer dosis-abhängigen Wachstumsinhibition im BT-20-Zellkulturmodell	99
3.2.3 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum weiterer humaner Mammakarzinom-Zelllinien	103
3.2.4 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Genexpressionsprofil des BT-20-Zellkulturmodells	106
3.2.4.1 Identifizierung zu SFRP1 ko- bzw. anti-regulierter Gene	106
3.2.4.2 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf die mRNA-Expression von <i>PCDH10</i>	109
3.2.5 Funktionelle Charakterisierung der potentiellen SFRP1-Mimetika	111
3.2.5.1 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Koloniebildungsvermögen	111
3.2.5.2 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf die Apoptose-Induktion ..	113
3.2.5.3 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Migrationsverhalten ..	115
3.2.6 Zusammenfassung der beobachteten, durch die vier potentiellen SFRP1-Mimetika vermittelten Effekte	118
4. Diskussion	119
4.1 Charakterisierung des putativen Tumorsuppressors DKK3 im humanen Mammakarzinom	119
4.2 Identifizierung und Charakterisierung potentieller SFRP1-Mimetika für die Therapie des humanen Mammakarzinoms	129
5. Literaturverzeichnis	138
6. Anhang	162

6.1 Eigenschaften der verwendeten Patientenkohorten	162
6.2 Klassifizierung maligner Tumoren der Brust.....	167
6.2.1 <i>Staging</i> des humanen Mammakarzinoms	167
6.2.2 <i>Grading</i> des humanen Mammakarzinoms	168
6.3 Auflistung der über SFRP1-regulierten Transkripte	169
6.4 Abbildungsverzeichnis	171
6.5 Tabellenverzeichnis	174
6.6 Eidesstattliche Erklärung	177

Zusammenfassung

Sowohl das oftmalige Auftreten von Resistenzen gegenüber den in Anwendung befindlichen Therapien für humane Brustkrebserkrankungen als auch ein Mangel an effektiven, zielgerichteten Behandlungsmöglichkeiten, insbesondere für triple-negative Tumoren, unterstreichen den Bedarf an neuen Therapien für das humane Mammakarzinom. Einen vielversprechenden, therapeutischen Ansatzpunkt stellt der WNT-Signalweg dar, dessen Deregulation in vielen humanen Tumorentitäten, einschließlich des Mammakarzinoms, beobachtet wird und zudem mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert ist. Ursächlich für diese Deregulation ist in Brusttumoren oftmals ein Expressionsverlust seiner Antagonisten, zu denen unter anderem DKK3 und SFRP1 zählen.

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist es fundamental, zunächst die den jeweiligen Mammakarzinom-Subtypen zu Grunde liegenden molekularen Entstehungs- und Progressionsmechanismen zu entschlüsseln. Um zu diesem Ziel beizutragen, galt es im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmals eine umfassende Charakterisierung des putativen Tumorsuppressors DKK3 in den einzelnen Subgruppen des humanen Mammakarzinom durchzuführen. Die unter Verwendung von drei unabhängigen Patientenkohorten (n=30, n=463 und n=791) durchgeführte Subtyp-spezifische DKK3-Expressionsanalyse offenbarte sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene einen im Vergleich zur Normalgewebe-Expression signifikanten DKK3-Verlust in allen klinisch-relevanten Brustkrebs-Subtypen, mit der jeweils niedrigsten Expression in basalen Mammakarzinomen. Um die diesem differenziellen Expressionsverlust zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu identifizieren, erfolgte eine Methylierungsanalyse des gesamten transkriptionsregulierenden Genbereichs der beiden, den *DKK3*-Promotor-überspannenden CpG-Inseln unter Verwendung zweier unabhängiger Patientenkohorten (n=33 und n=497). Während die Methylierung der nicht-basalen Fälle signifikant mit einem DKK3-Expressionsverlust korrelierte, wiesen basale Karzinome wider Erwarten die geringste Methylierungsfrequenz auf. Dies deutete auf einen anderweitigen Mechanismus der DKK3-Inaktivierung in diesen Tumoren hin. Die signifikante Korrelation einer niedrigen *DKK3*-mRNA-Expression mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben in luminalen und basalen Mammakarzinomen wies indessen auf eine mögliche kausale Involvierung eines DKK3-Verlustes in die Tumorgenese dieser beiden Subtypen hin. Diese Hypothese sollte im Rahmen von funktionellen *in vitro*-Tests unter Verwendung von jeweils zwei stabilen *gain-of-function*-Brusttumor-Modellen der beiden Subgruppen „luminal“ und „basal“ analysiert werden. Interessanterweise wurden die deutlichsten Effekte auf das Zellwachstum und die Apoptoserate infolge forcierter DKK3-Reexpression in den beiden basalen Zelllinien beobachtet. Zusätzlich konnte in basalen Mammakarzinomzellen eine DKK3-vermittelte Inhibition Progressions-assoziiierter Tumoreigenschaften beobachtet werden, die sich in einer modifizierten Zellmorphologie, verbunden

mit einer verstärkten Zell-Matrix-Adhäsion, sowie einer reduzierten Zellmigration äußerte. Diese Beobachtungen ließen auf eine mögliche partielle Mesenchymale-Epitheliale-Transition in *DKK3*-transfizierten Brustkrebszellen schließen, die auf molekularer Ebene durch eine gesteigerte Expression epithelialer Marker, wie E-Cadherin und Claudin 1, sowie einem Verlust des mesenchymalen Transkriptionsfaktors Snail 1 gestützt wurde. Zusammengefasst deuten die im Rahmen dieser Studie generierten Daten auf eine mögliche funktionelle Relevanz eines *DKK3*-Verlustes insbesondere für die Tumorgenese von Mammakarzinomen des basalen Subtyps hin und könnten als Grundlage für weiterführende Studien, welche die diesen Effekten zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im Detail entschlüsseln sollten, dazu beitragen, zielgerichtete Therapien für den schwer therapierbaren basalen Brustkrebs-Subtyp zu entwickeln.

Ziel des zweiten Teilvorhabens der vorliegenden Arbeit, das in Kooperation mit dem *Lead Discovery Center* (LDC) durchgeführt wurde, war die Identifizierung sowie funktionelle Charakterisierung spezifischer Wirkstoffmoleküle, deren Wirkungsspektrum dem des Tumorsuppressor-Proteins SFRP1 entspricht. Diese sogenannten SFRP1-Mimetika sollen der zukünftigen Entwicklung neuartiger Medikamente für die Therapie SFRP1-defizienter Brusttumoren dienen. Zwölf am LDC anhand eines zellulären Primärscreens identifizierte, potentielle SFRP1-Mimetika wurden nachfolgend im Zuge dieser Dissertation mittels weiterer Experimente bezüglich ihrer Wirkung als spezifische Mimetika der SFRP1-Funktion validiert. Basierend auf den Ergebnissen einer initialen Zellwachstums-Analyse, wurden aus diesen zwölf Testsubstanzen vier vielversprechende putative SFRP1-Mimetika für die nachfolgenden funktionellen *in vitro*-Experimente ausgewählt. Alle vier Testsubstanzen vermittelten eine differenzielle, dosisabhängige Wachstumsinhibition *SFRP1*-negativer und *SFRP1*-positiver Brustkrebszellen, mit einem erwartungsgemäß stärkeren Effekt aller Kandidaten auf SFRP1-defiziente Zellen. Darüber hinaus konnte ein dosisabhängiger Einfluss der vier Kandidaten auf die Expression von *PCDH10*, ein im Zuge einer vorausgegangenen *Microarray*-Analyse identifiziertes Marker-Gen der SFRP1-Wirkung, beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese einer SFRP1-analogen Wirkung dieser vier Wirkstoffmoleküle. Zudem konnten für alle vier putativen SFRP1-Mimetika weitere tumorsuppressive Effekte nachgewiesen werden, die sich in einem verminderten Koloniewachstum, einer erhöhten Apoptoserate sowie einer reduzierten Zellmigration humaner Brustkrebszellen äußerten. Da die Wirkungsprofile der Testsubstanzen jedoch untereinander variierten, sind weiterführende Studien nötig sind, um ihre genauen Wirkmechanismen zu entschlüsseln. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass es in der vorliegenden Arbeit mit den Substanzen 064, 366, 848 und 994 gelungen ist, vier vielversprechende, putative SFRP1-Mimetika zu identifizieren, die als Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuartiger Medikamente für die Therapie SFRP1-defizienter Mammakarzinome dienen könnten.

Summary

The clinical need to develop new drugs for the treatment of human breast cancer is emphasized by the frequent occurrence of resistances against currently used pharmaceuticals as well as a lack of effective targeted therapies, especially for mammary carcinomas of the basal subtype. Targeting of the tumor-promoting WNT signaling pathway activity might represent a promising therapeutic strategy. A deregulation of this pathway is observed in many tumor entities, including breast cancer, and is associated with an unfavorable patient prognosis. Aberrant WNT pathway activation is frequently attributed to an expression loss of its antagonists, including DKK3 and SFRP1.

Profound understanding of the molecular alterations underlying the particular subtype-specific breast carcinogenesis is essential for the development of new therapeutic strategies. To contribute to this goal, one aim of the present study was the comprehensive subtype-specific characterization of the putative tumor suppressor DKK3 in human breast cancer. A subtype-specific expression analysis using three independent tissue cohorts (n=30, n=463 and n=791) revealed a significant loss of DKK3 on mRNA and protein level in all clinically relevant breast cancer subtypes compared to healthy breast tissue controls, with the most abundant reduction in basal breast cancer cases respectively. To investigate the molecular mechanisms underlying the differential expression loss observed, a methylation analysis of both transcription-regulating CpG-islands in the *DKK3* promoter and its proximal regions was performed using two independent patient cohorts (n=33 and n=497). While methylation in this region was significantly correlated with a loss of *DKK3* expression in non-basal cases, basal carcinomas surprisingly presented the lowest methylation frequency indicating a different mechanism of DKK3 inactivation in these tumors. A significant correlation between a low *DKK3* mRNA expression and a reduced recurrence-free survival of luminal and basal-like breast cancer cases suggested a possible causal involvement of DKK3 in the tumorigenesis of these two breast cancer subtypes. This hypothesis was addressed by performing functional *in vitro* tests using two luminal and two basal stably transfected gain-of-function breast cancer models. Interestingly, ectopic DKK3 expression resulted in most pronounced effects on cell growth and apoptosis in basal breast cancer cells. In addition, DKK3 reexpression mediated inhibition of progression-associated characteristics of basal breast cancer cell lines resulting in a modified cell morphology, an enhanced cell-matrix adhesion and a reduced cell migration. These observations indicated a possible partial mesenchymal-to-epithelial transition in *DKK3*-transfected breast cancer cells, supported by an increased expression of epithelial markers like E-Cadherin and Claudin 1 as well as loss of the mesenchymal transcription factor Snail 1. In conclusion, the findings of this study suggest a possible functional involvement of a DKK3 expression loss especially in the tumorigenesis of basal breast cancers. These data provide the basis for future studies investigating the underlying molecular effects of DKK3 in detail and

might therefore contribute to the development of targeted therapies for basal breast carcinomas.

The second sub-project of the present dissertation was realized in cooperation with the *Lead Discovery Center* (LDC) in Dortmund. The aim of this study was the identification and functional characterization of specific substances mimicking the tumor suppressive effects of SFRP1. These so called SFRP1-mimetics should conduce to the future development of new drugs for the treatment of SFRP1-deficient breast cancers. The LDC initially identified twelve potential SFRP1-mimetics in a cellular primary screen. In the present study, these candidate substances were further validated in additional experiments regarding their potential SFRP1-analogous effects. Based on the results of an initial cell growth analysis, four promising molecules of these twelve putative SFRP1-mimetics were selected for a subsequent comprehensive functional *in vitro* analysis. All four candidates exhibited a differential, dose-dependent, growth-inhibitory capacity on *SFRP1*-negative and *SFRP1*-positive breast cancer cell culture models, with a pronounced effect on *SFRP1*-deficient cells. Moreover, all candidate substances influenced the expression of *PCDH10*, a marker gene of the SFRP1-function identified in a recent microarray analysis, in a dose-dependent manner. These data were in line with a potential SFRP1-analogous mode of action of the candidate molecules. In addition, further tumor-suppressive effects were verified for all four potential SFRP1-mimetics resulting in a decreased colony growth, an increased apoptosis and a reduced cell migration. However, the substances had varying effects on the different tumor cell characteristics analyzed so that further studies are needed to investigate their defined mechanisms of action. In conclusion, four promising, putative SFRP1-mimetics, namely 064, 366, 848 and 994 were identified in the present study that have the potential to be used as initial substances for the development of new drugs for the therapy of SFRP1-deficient mammary carcinomas.

Abkürzungsverzeichnis

ADAM10	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase 10</i>
ADR	Adriamycin-resistent
AG	Arbeitsgruppe
APC	Adenomatöse <i>Polyposis coli</i>
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Bicinchoninsäure)
<i>BMPER</i>	<i>Bone Morphogenetic Protein-Binding Endothelial Regulator</i>
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1/2</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDS	codierende Sequenz
CK1 α	Casein-Kinase-1 α
CMV	Cytomegalievirus
<i>COL12A1</i>	<i>Collagen Type XII Alpha 1</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid
CT	<i>Cycle Threshold</i> (Zyklusschwelle)
CTG	<i>Cell Titer Glow</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	duktales Karzinoma <i>in situ</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DKK1/2/3/4	Dickkopf 1/2/3/4
DKKL1	<i>Dickkopf-Like 1/Soggy</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
DVL	<i>Dishevelled</i>
DTT	Diithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ER	<i>Estrogen Receptor</i> (Östrogen-Rezeptor)
ERBB2	Erb-B2-Rezeptor-Tyrosin-Kinase 2
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
FC	<i>Fold Change</i> (Änderungsgrad)
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung

FKS	Fetales Kälberserum
<i>FRAS1</i>	<i>Fraser Syndrome 1</i>
x g	Gravitationsfaktor
G1/2/3	Grad 1/2/3 (histologischer Grad)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEP	<i>Gene expression profiling</i>
GnRh	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormon</i>
gpNMB	<i>Glycoprotein Neuromedin B</i>
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HDACs	Histon-Deacetylasen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
His	Histidin
HMTs	Histon-Methyltransferasen
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR	Hazard Rate
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HTS	<i>High Throughput Screen</i>
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
iCRT 14	<i>Inhibitor of β-Catenin-Responsive Transcription (CRT) 14</i>
IDC	invasiv-duktales Karzinom
<i>IGFBP5</i>	<i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5</i>
IHC	Immunhistochemie
ILC	invasiv-lobuläres Karzinom
<i>IL1R1</i>	<i>Interleukin 1 Receptor Type 1</i>
IRS	immunreaktiver Score
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
<i>KCNK2</i>	<i>Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 2</i>
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
Ki-67	von <i>MKI67 (Marker of proliferation Ki-67)</i> codiertes Protein
KRM1/2	Kremen 1/2
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LCIS	lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
LDC	<i>Lead Discovery Center</i>
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
LRP5/6	<i>Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCS	<i>Multi-cloning site</i> (multiple Kolinierungsstelle)
MET	mesenchymal-epitheliale-Transition
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MSP	methylierungsspezifische PCR
mTOR-Kinase	<i>mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>
n	Anzahl
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
<i>P</i>	Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAM50	Gensignatur von 50 Genen zur molekularen Klassifizierung von humanen Mammakarzinomen
PARPi	PARP-Inhibitor
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCDH10	Protocadherin 10
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit
<i>PLS3</i>	<i>Plastin 3</i>
pM	Fernmetastasierung (histopathologisch bestimmt)
pN	Nodalstatus (histopathologisch bestimmt)
PPi	Pyrophosphat
PR	Progesteronrezeptor
pT	Tumorgroße (histopathologisch bestimmt)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAC1	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RB1	Retinoblastoma 1
REIC	<i>Reduced Expression in Immortalized Cells</i>
RFÜ	rezidivfreies Überleben
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RHOA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase</i>
ROR2	<i>Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
<i>RUNX3</i>	<i>Runt Related Transcription Factor 3</i>
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFRP1/2/3/4/5	<i>Secreted Frizzled-Related Protein 1/2/3/4/5</i>
<i>SLC6A14</i>	<i>Solute Carrier Family 6 Member 14</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
SOX2	SRY-Box 2
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCF/LEF	<i>T-Cell Factor/Lymphoid enhancing Factor</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TDLE	Terminalduktus-Lobulus-Einheit
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNBC	<i>Triple-Negative Breast Cancer</i> (Triple-negativer Brustkrebs)
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>
β -TRCP	<i>β-Transduction Repeat-containing</i>
U	Einheiten
ü. N.	über Nacht
UICC	<i>Union International Contre Le Cancer</i>
UKA	Uniklinik Aachen
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett

VE	vollentsalzt
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i>
VEGFR-1/2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1/2</i>
v/v	Volumenkonzentration
WIF	<i>WNT Inhibitory Factor</i>
WNT	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
z. B.	zum Beispiel
ZEB1/2	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>
$\Delta zF72$	Differenz der zellfreien Flächen zum Zeitpunkt T = 72h
ZO-1	Zona Occludens 1 (auch <i>Tight Junction Protein 1</i> genannt)
ΔZW	Differenz des Zellwachstums

1. Einleitung

1.1 Das humane Mammakarzinom

1.1.1 Die Anatomie der weiblichen Brust

Die weibliche Brust liegt auf dem Rippenbogen sowie dem Brustmuskel (*Musculus pectoralis major*) auf und setzt sich aus der Brustdrüse (*Glandula mammaria*), Fettgewebereichem Bindegewebe sowie zahlreichen Lymph- und Blutgefäßen zusammen (Abbildung 1-1). Die Brustdrüse selbst ist differenziert in ein ausgedehntes duktales Gangsystem sowie einen lobulären Anteil und wird durch das umgebende Stroma in 10 - 20 tubulo-alveoläre Einzeldrüsen (*Lobi*) unterteilt. Jeder Lobus mündet über einen eigenen Ausführgang (*Ductus lactifer colligens*) in der Brustwarze (*Papilla mammae*). Kurz vor der Mündung weiten sich die Ausführgänge jeweils zu einem spindelförmigen Milchsäckchen (*Sinus lactifer*) (Abbildung 1-1A) [1, 2].

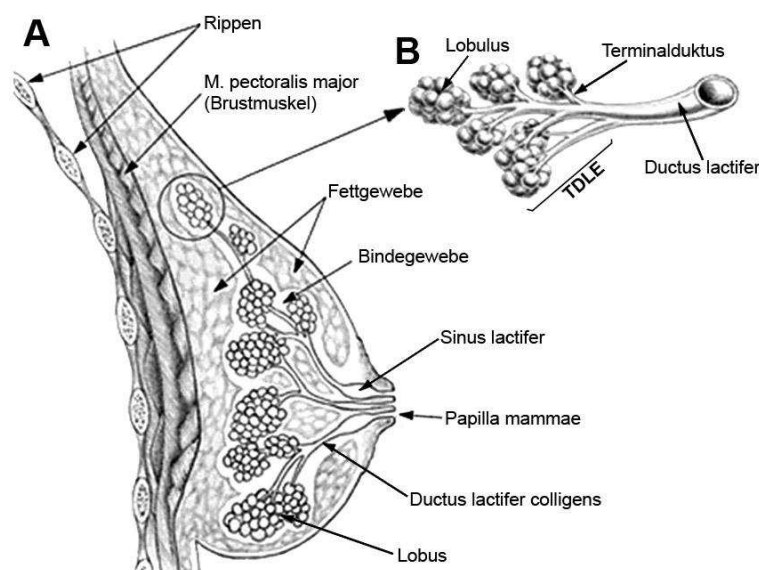


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der weiblichen Brustanatomie. (A) Sagittalschnitt der weiblichen Brust. (B) Darstellung mehrerer Terminalduktus-Lobulus-Einheiten (TDLE). Verändert nach [3].

Das weit verzweigte Milchgangsystem (*Ductus lactiferi*) endet jeweils über einen Terminalduktus in den einzelnen Lobuli. Jeweils ein Lobulus bildet zusammen mit seinem zugehörigen Terminalduktus die Terminalduktus-Lobulus-Einheit (TDLE), welche die milchproduzierende Funktionseinheit der Brust darstellt (Abbildung 1-1B).

Sowohl das Gangsystem als auch die lobulären Endstücke sind gegenüber dem umliegenden Stroma über die Basalmembran abgegrenzt und mit einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet, dass sich aus einer inneren (luminalen) Epithelschicht mit prismatischen Zellen und dem äußeren (basalen) Myoepithel zusammensetzt. Die intralobulären Epithelien besitzen zudem Hormonrezeptoren für Östrogene (ER) sowie Progesteron (PR). Dadurch unterliegt vor allem die TDLE während jedem weiblichen Zyklus bis zur Menopause einem hohen hormonellen Einfluss. Als Folge dessen zeigen die Zellen der TDLE eine gesteigerte Proliferations- und Differenzierungsaktivität, so dass dieser Bereich besonders häufig der Ausgangspunkt einer gut-(benignen) oder bösartigen (malignen) Tumorerkrankung der Brust ist [1, 2, 4].

1.1.2 Epidemiologie des humanen Mammakarzinoms

Das humane Mammakarzinom stellt weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar [5]. Alleine in Deutschland betrafen im Jahre 2012 69.550 Fälle der insgesamt 225.890 erfassten Krebsneuerkrankungen der Frau die Brustdrüse, das sind rund 31 % (siehe Abbildung 1-2). Auf Grundlage der aktuellen Inzidenzraten erkrankt etwa jede achte Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, wobei drei von zehn betroffenen Frauen bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt sind [6].

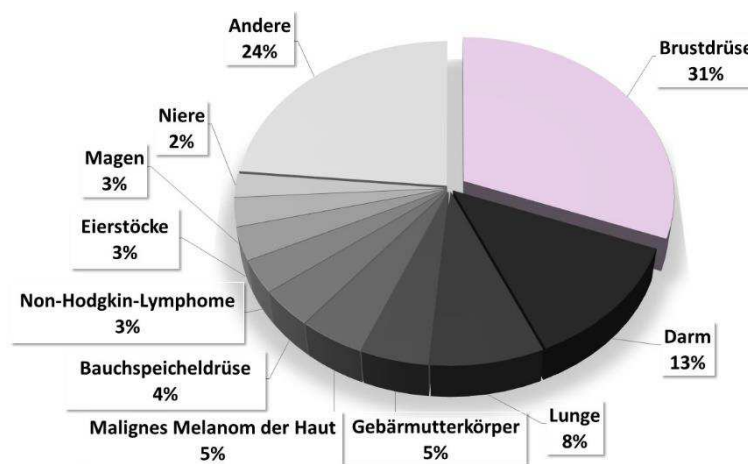


Abbildung 1-2: Verteilung der zehn häufigsten Krebsneuerkrankungen der Frau im Jahre 2012 in Deutschland. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der zehn häufigsten Tumorlokalisationen aller weiblichen Krebsneuerkrankungs-Fälle im Jahre 2012 in Deutschland. Die Abbildung basiert auf Daten der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [6].

Es gibt zahlreiche Risikofaktoren, die die Entstehung einer bösartigen Erkrankung der Brustdrüse begünstigen. Es wird unterschieden zwischen Faktoren des Lebensstils, wie Übergewicht, Bewegungsmangel und ein erhöhter Alkohol- und Tabakkonsum, sowie

hormonellen Einflüssen und der genetischen Disposition [5, 7-9]. Zu den hormonellen Einflüssen zählen eine frühe Menarche sowie eine späte Menopause, da diese jeweils den Zeitraum verlängern, in dem die Brust den hormonellen Schwankungen des weiblichen Zyklus ausgesetzt ist. Zusätzlich erhöhen Nulliparität bzw. eine späte erste Geburt sowie eine Hormonersatztherapie während der Wechseljahre ebenfalls das Brustkrebsrisiko, wohingegen hormonhaltige Ovulationshemmer nur einen geringfügigen Einfluss haben [10-13]. 5 - 10 % aller Brustkrebserkrankungen sind auf eine familiäre, genetische Vorbelastung zurückzuführen, zu der insbesondere Mutationen der beiden Gene *BRCA1* und *BRCA2* (engl. *breast cancer 1/2*) gehören [14, 15].

Zwischen 2005 und 2009 wurde in Deutschland flächendeckend das Mammographie-Screening-Programm für die Brustkrebs-Früherkennung eingeführt. Infolgedessen stieg die Inzidenzrate des Mammakarzinoms zunächst sprunghaft an, vermutlich zurückzuführen auf eine verbesserte Früherkennung noch kleiner Tumoren [6]. Seit 2009 ist die Inzidenzrate jedoch wieder leicht rückläufig (siehe Abbildung 1-3).

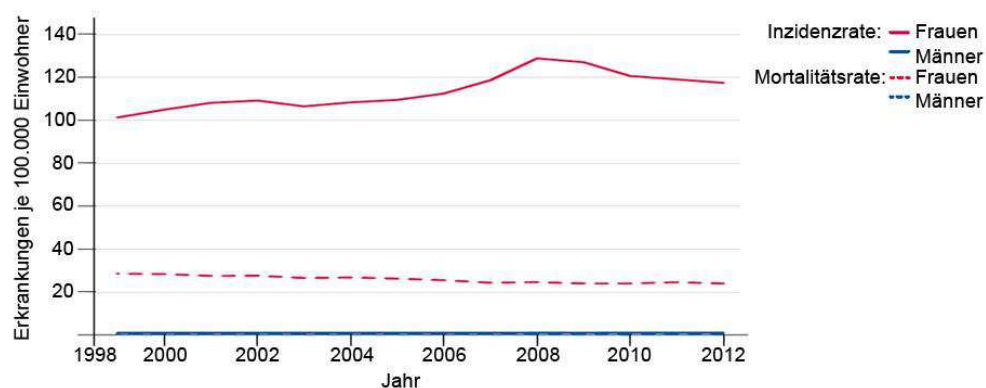


Abbildung 1-3: Altersstandardisierte, Brustkrebs-spezifische Inzidenz- und Mortalitätsrate in Deutschland in den Jahren 1999 – 2012. Aufgetragen sind die altersstandardisierten, Brustkrebs-spezifischen Neuerkrankungs- sowie Sterbefälle pro 100.000 Einwohnern in den Jahren 1999 bis 2012 in Deutschland, jeweils unterteilt nach dem Geschlecht. Verändert nach [6].

Trotz eines Anstiegs der altersstandardisierten, Brustkrebs-spezifischen Inzidenzrate zwischen 1999 und 2012 in Deutschland um knapp 20 %, konnte ein leichter Rückgang der altersstandardisierten, Brustkrebs-bedingten Mortalität verzeichnet werden (Abbildung 1-3). Dies lässt sich vor allem auf Fortschritte in der Therapie zurückführen [5, 6].

1.1.3 Definition und Klassifizierung des humanen Mammakarzinoms

Der Begriff Tumor oder Neoplasie bezeichnet die abnorme Vergrößerung eines Gewebes aufgrund einer deregulierten Zellproliferation und/oder einer verminderten Apoptose. Es wird unterschieden zwischen einem gutartigen (benignen) Tumor ohne Gewebeeinfiltration und

einem bösartigen (malignen), welcher invasiv in das umgebende Gewebe wächst und dieses zerstört. Neoplasien können als solide Tumoren auftreten, die primär einen Zellverband ausbilden, oder als nicht-solide Tumoren des hämatopoetischen Systems (Leukämien). Innerhalb der soliden Tumoren wird unterschieden zwischen Sarkomen, die einen mesodermalen Ursprung aufweisen, und Karzinomen, welche maligne Neoplasien epithelialer Gewebe darstellen. Zusätzlich erfolgt die Klassifizierung der Tumoren nach ihren Ursprungsgeweben [16].

Der Begriff „Mammakarzinom“ umfasst eine Gruppe heterogener Erkrankungen der Brustdrüse, die sich sowohl aus histopathologischer als auch molekulargenetischer Sicht differenzieren lassen [17, 18]. Daraus abgeleitet existieren zwischen den einzelnen Subgruppen der Brustkrebserkrankung Unterschiede im Krankheitsverlauf sowie den möglichen Therapieoptionen.

1.1.3.1 Histopathologische Klassifizierung

Die histopathologische Klassifizierung von Tumoren erfolgt anhand ihres Wachstums-musters (engl. *Typing*), ihres histologischen Tumorgades (engl. *Grading*) sowie dem Ausmaß ihrer Ausbreitung im Körper (engl. *Staging*).

Typing

Unterschieden wird zwischen invasiven und nicht-invasiven (*in situ*) Formen des Mammakarzinoms sowie der jeweiligen Lokalisation (lobulär und duktal). Die Begrifflichkeiten „lobulär“ und „duktal“ beziehen sich in diesem Zusammenhang nicht auf den mikro-anatomischen Ursprung des Tumors, sondern vielmehr auf dessen Wachstumsmuster: Während das duktales Karzinom *in situ* (DCIS) intraduktal wächst und sich segmental in den Drüsengängen ausbreitet, zeigt das lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS) häufig ein multi-zentrisches Wachstumsverhalten innerhalb mehrerer Lobi [17, 19]. *In situ*-Tumoren stellen nicht-invasive Präkanzerosen dar, welche sich im Verlauf der Tumorgenese zu invasiven Karzinomen entwickeln [20]. So wird das DCIS als Vorläufer des invasiv-duktales Karzinoms (IDC) beschrieben, welches mit einer Prävalenz von 50 - 80 % das am häufigsten auftretende invasive Mammakarzinom darstellt. Gefolgt wird das IDC vom invasiv-lobulären Karzinom (ILC, Prävalenz 5 - 15 %). Seltener histologische Varianten stellen die muzinösen, medullären und fibrozystischen Mammakarzinome dar [17, 21]. Die alleinige Einteilung in die histologischen Tumortypen basierend auf ihrem Wachstumsmuster hat im Hinblick auf eine Therapieentscheidung jedoch nur eine begrenzte klinische Relevanz, weshalb zusätzlich die Stratifizierung der Karzinome anhand ihres Tumorgades sowie ihrer anatomischen Ausbreitung im Körper erfolgt.

Grading

Zur Einschätzung der Aggressivität (Malignität) humaner Mammakarzinome werden die Tumoren hinsichtlich ihres histologischen Grades eingeteilt. Dieser ergibt sich aus der Differenzierung der Zellen (Tubulusbildung und Zellkernpolymorphie) und ihrer proliferativen Aktivität (Mitoserate). Das nach Elston und Ellis definierte Bewertungssystem des Tumorgades teilt Karzinome anhand eines Summenscores in die prognostisch relevanten Klassen Grad 1 bis 3 ein. Grad 1 entspricht einem gut differenzierten Tumor mit geringer Malignität, während Grad 3-Tumoren mit einer schlechten Differenzierung, der höchsten Malignität sowie einer ungünstigen Prognose assoziiert sind (siehe Abschnitt 6.2.2 des Anhangs) [22].

Staging

Eine weitere klinisch relevante Klassifizierung humaner Mammakarzinome stellt das TNM-System nach Sobin und Wittekind dar, welches die anatomische Ausbreitung der Tumoren bewertet [23]. Die Einteilung der Neoplasien in die einzelnen Stadien erfolgt anhand der Ausdehnung des Primärtumors (pT), der Infiltration regionärer und juxta-regionärer Lymphknoten (pN) sowie dem Vorliegen einer Fernmetastasierung (pM) gemäß UICC (siehe 6.2.1 des Anhangs). Hierbei stellt vor allem der axilläre Lymphknoten-Status einen starken prognostischen Faktor im Hinblick auf das rezidivfreie sowie das Gesamtüberleben dar: So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit einer nodal-negativen Brustkrebs-erkrankung bei über 80 %, sinkt bei zunehmender Anzahl positiver Lymphknoten jedoch drastisch auf unter 30 % bei ≥ 13 betroffenen Lymphknoten ab [24, 25].

1.1.3.2 Molekulare Klassifizierung

Die Heterogenität der Brustkrebserkrankung spiegelt sich nicht nur in ihrer Histopathologie wieder, sondern ist ebenfalls auf molekularer Ebene nachweisbar. So wurde im Jahre 2000 von Perou und Kollegen erstmals eine molekulare Klassifizierung humaner Mammakarzinome auf Basis von Genexpressionsprofilen beschrieben [26]. In den folgenden Jahren erfolgte auf Grundlage dieser Studie die Entwicklung einer molekularen Signatur aus 50 Genen (PAM50), die eine Einteilung in die fünf intrinsischen Brustkrebs-Subtypen Luminal A, Luminal B, *HER2-enriched*, *Basal-like* und *Normal-like* mit Hilfe einer cDNA-Microarray-Expressionsanalyse ermöglicht [27-29]. Diese molekularen Subtypen sind mit verschiedenen Charakteristika assoziiert, wobei sich vor allem eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf als klinisch bedeutsam erwiesen hat. Während Luminal A-Tumoren mit einer guten Prognose verknüpft sind, ist diese in Karzinomen der Subtypen Luminal B, *HER2-enriched* und *Basal-*

like vergleichsweise ungünstig. Des Weiteren konnte eine prädiktive Relevanz der molekularen Klassifikation hinsichtlich des Ansprechens der Mammakarzinome auf eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie herausgestellt werden [30, 31]. In neueren Studien wird zudem die Bedeutung eines weiteren Subtyps namens *Claudin-low* diskutiert, welcher durch eine geringe Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen charakterisiert und mit einer hohen Metastasierungsrate assoziiert wird [32-34]. Hingegen ist die Existenz des Subtypen *Normal-like* bislang noch umstritten [31, 35].

Alternativ zur molekularen Klassifizierung über eine kostenintensive *Microarray*-Expressionsanalyse erfolgt für eine routinemäßige Anwendbarkeit die Einteilung gemäß der Immunhistochemie (IHC)-basierten Surrogat-Definition nach Cheang *et al.* [29]. Diese beruht, wie in Tabelle 1-1 angegeben, auf dem Hormonrezeptor- und HER2-Status der Tumoren sowie dem prozentualen Anteil an Zellkernen, welche positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 sind [36, 37]. Die Klassifizierung gemäß der IHC-basierten Surrogat-Definition ist nicht identisch mit einer Stratifizierung der Tumoren nach PAM50-Definition, stellt jedoch laut Konsens der St. Gallen-Konferenz 2011 eine annehmbare Approximation dar [36].

Tabelle 1-1: Die molekulare Subtypen des humanen Mammakarzinoms [37].

Intrinsischer Subtyp (GEP)	IHC-basierte Klassifikation (St. Gallen 2011)	Übereinstimmung GEP/IHC [%]
Luminal A	„ Luminal A “ ER- oder/und PR-positiv HER2 negativ Ki-67 < 14 %	73–100 %
Luminal B	„ Luminal B (HER2-negativ) “ ER- oder/und PR-positiv HER2 negativ Ki-67 ≥ 14 % „ Luminal B (HER2-positiv) “ ER- oder/und PR-positiv HER2 positiv	73–100 %
HER2-enriched	„ HER2-positiv (nicht luminal) “ ER- und PR-negativ HER2-positiv	41–69 %
Basal-like	„ Triple-negativ (TNBC) “ ER- und PR-negativ HER2-negativ	80 %

GEP: *Gene expression profiling*, IHC: Immunhistochemie, ER: Östrogenrezeptor, PR: Progesteronrezeptor, HER2: *Human epidermal growth factor receptor 2*, TNBC: Triple-negativer Brustkrebs

1.1.4 Therapie des Mammakarzinoms

Die individualisierte Therapie des humanen Mammakarzinoms ist abhängig von zahlreichen Faktoren. Neben dem allgemeinen Gesundheitszustand, dem Alter sowie dem

Menopausen-Status der Patientinnen sind vor allem prädiktive und prognostische Marker, welche sich auf individuelle Tumoreigenschaften beziehen, von hoher Relevanz. Prädiktive Faktoren, zu denen z. B. der Hormonrezeptor- und HER2-Status gehören, dienen dazu abzuschätzen, ob ein Tumor auf eine bestimmte Behandlung ansprechen könnte. Zu den prognostischen Markern zählen unter anderem das Tumorstadium gemäß TNM-Klassifikation und der histologische Tumorgrad (siehe Abschnitt 1.1.3.1). Sie werden herangezogen, um den statistisch wahrscheinlichen Krankheitsverlauf der Brustkrebserkrankung vorherzusagen und so den Nutzen einer Therapie abzuwägen. So ist z. B. bei Auftreten von Fernmetastasen in der Regel keine Langzeitheilung mehr möglich [38]. Daher beschränkt sich die Therapie in diesem Fall meist darauf ein Fortschreiten der Krankheit aufzuhalten und eine möglichst hohe Lebensqualität der Patienten zu erhalten. Ist die Neoplasie hingegen lokal begrenzt und wird in einem sehr frühen Stadium diagnostiziert, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 98 % [38-40].

Sind noch keine Fernmetastasen aufgetreten, ist die Exzision des erkrankten Brustgewebes inklusive eines tumorfreien Resektionsrandes die Basis einer jeden Behandlung. Meist wird eine brusterhaltende Operation angestrebt, in manchen Fällen ist jedoch eine vollständige Mastektomie unumgänglich. Bei invasiven Karzinomen erfolgt zusätzlich die Dissektion axillärer Sentinel-Lymphknoten, um eine mögliche Metastasierung des Mammakarzinoms sowie das Rezidiv-Risiko abschätzen zu können. Zur Entfernung eventuell noch vorhandener Tumorzellen im Brustgewebe wird nach der Operation in der Regel eine lokale Bestrahlung durchgeführt [38, 39]. Die Radiotherapie der Brust reduziert nachgewiesenermaßen sowohl das Auftreten eines Rezidivs als auch die Mortalitätsrate [41, 42].

Darüber hinaus werden therapiebegleitend systemische Therapien eingesetzt, um einem Auftreten von Rezidiven sowie einer eventuellen Metastasierung vorzubeugen [38, 39]. Neben der adjuvanten Behandlungsform wird die systemische Therapie häufig zusätzlich neoadjuvant angewendet, um die Tumorgröße vor einer Operation zu verringern sowie frühe Informationen über die Biologie der Neoplasie und deren Sensitivität gegenüber den zu Verfügung stehenden medikamentösen Behandlungen abzuschätzen [43]. Die Wahl der systemischen Therapie erfolgt nach Empfehlung der St. Gallen-Konferenz 2013 auf Basis der molekularen Klassifizierung des Tumors (siehe Tabelle 1-2). Es wird unterschieden zwischen (Anti-) Hormonbehandlungen (endokrin), Immuntherapien sowie der Gabe von Zytostatika. Um den Behandlungserfolg zu steigern und Resistenzen zu umgehen, wird häufig eine Kombination mehrerer Therapien eingesetzt [38, 39, 44].

Tabelle 1-2: Je nach molekularem Subtyp empfohlene systemische Therapie [44].

Molekularer Subtyp (IHC-Klassifikation)	Therapieansatz
„Luminal A“	Häufig alleiniger Einsatz endokriner Therapie
„Luminal B (HER2-negativ)“	Endokrine Therapie für alle, meist zusätzlich Chemotherapie
„Luminal B (HER2-positiv)“	Chemotherapie + anti-HER2 + endokrine Therapie
„HER2-positiv (nicht luminal)“	Chemotherapie + anti-HER2
„Triple-negativ (TNBC)“	Chemotherapie

Die systemische Behandlung mit Chemotherapeutika ist mit zahlreichen schweren Nebenwirkungen verbunden, da diese unspezifisch wirken, das heißt auch gesunde Körperzellen schädigen. Je nach Brustkrebs-Subtyp existieren bereits Alternativen zu einer zytostatischen Behandlung, die als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt werden. So erfolgt die Behandlung luminaler Tumoren endokrin, eine Therapie, die für Patienten in der Regel sehr viel verträglicher ist als die Chemotherapie. Hierzu zählt z. B. die Applikation des Anti-Östrogens Tamoxifen sowie verschiedener Aromatasehemmer [38, 39]. Zusätzlich kommen zielgerichtete Therapien zur Anwendung. Diese adressieren spezifisch molekulare Charakteristika von Tumorzellen, die in gesunden Körperzellen nicht oder zumindest vermindert auftreten. Ein prominentes Beispiel ist der anti-HER2-Antikörper Trastuzumab. Dieser bindet an den in 20 – 30 % aller Brusttumoren überexprimierten Wachstumsrezeptor HER2/NEU, wodurch das Zellwachstum gehemmt und die Tumorzellen vom körpereigenen Immunsystem zerstört werden. Durch den standardisierten Einsatz von Trastuzumab konnte die Rezidivrate HER2-positiver Tumoren um 50 % reduziert werden [16, 45]. Für die Therapie HER2-negativer Karzinome steht der monoklonale Antikörper Bevacizumab zur Verfügung. Dieser richtet sich gegen den Wachstumsfaktor *Vascular Endothelial Growth Factor-A* (VEGF-A) und blockiert dessen Bindung an die Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1 und 2. Vor allem TNBC-Karzinome sind mit einer erhöhten VEGF-A-Expression assoziiert [46]. Der Nutzen dieser Behandlung für Brustkrebspatienten ist jedoch umstritten. So verhindert eine Therapie mit Bevacizumab zwar das Fortschreiten der Erkrankung für mehrere Monate, auf das Gesamtüberleben hat die Behandlung hingegen keinen Einfluss und ist zudem mit starken Nebenwirkungen verbunden [47-49]. Bevacizumab wird in Deutschland in einer Kombination mit Zytostatika für die Therapie metastatischer, HER2-negativer Mammakarzinome eingesetzt [39]. Hingegen wurde die Zulassung dieses Medikaments zur Behandlung von Brusttumoren in den USA bereits im Jahre 2011 zurückgenommen [50]. Darüber hinaus existieren für die Behandlung von primären, triple-negativen Mammakarzinomen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine zugelassenen Alternativen zur Chemotherapie [34, 39, 46].

Sowohl der Mangel an effektiven zielgerichteten Therapien für TNBC-Tumoren als auch die bei allen systemischen Therapien oftmals auftretenden Resistenzen stellen ein großes Problem für die Behandlung von humanen Brustkrebskrankungen dar [46]. Daher ist die Entwicklung neuer, zielgerichteter und damit weniger toxischen Therapien, insbesondere für Karzinome des Subtyps TNBC, ein Schwerpunkt der aktuellen Brustkrebs-Forschung. Im Fokus sind hier vor allem Substanzen die spezifisch tumorrelevante Signalwege und Prozesse inhibieren. Ein Beispiel stellt das von der Firma *Celldex Therapeutics* entwickelte *Glembatumumab Vedotin* dar, dessen Entwicklung sich in der klinischen Phase II-Studie befindet [51, 52]. Das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat bindet gezielt an Tumorzellen, die das transmembrane Glykoprotein Neuromedin B (gpNMB) auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. gpNMB ist in 40 - 60 % aller Brusttumoren überexprimiert und mit einer ungünstigen Überlebensprognose assoziiert.

1.2 Allgemeine Tumorgenese

Neoplasien entstehen aus einer ursprünglich gesunden Zelle. Dabei ist die Entwicklung des Tumors in der Regel ein graduell verlaufender mehrstufiger Prozess. Im Rahmen vorangegangener Studien konnte das Modell der mehrstufigen Tumorgenese bereits für zahlreiche Tumorentitäten, einschließlich dem Mammakarzinom, belegt werden [16]. So dokumentiert die histologische Auswertung verschiedener Zwischenstufen der Brustkrebs-erkrankung die Entwicklung eines invasiv-wachsenden, metastasierenden Karzinoms über mehrere nicht-maligne Vorstufen, auf deren Grundlage Russo und Kollegen schließlich das Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinoms entwickelten [20] (siehe Abbildung 1-4).

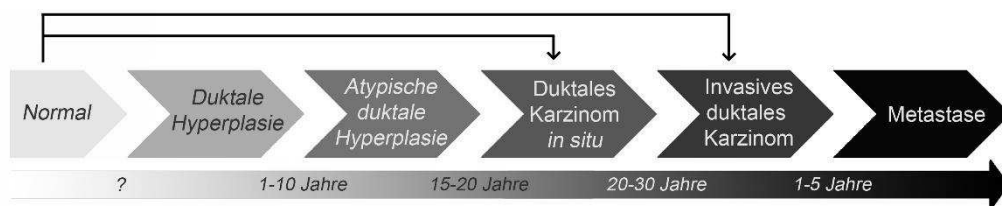


Abbildung 1-4: Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinoms. Dargestellt ist das *multi-step*-Modell der Tumorprogression vom Normalgewebe hin zum invasiv-duktalem Karzinom mit anschließender Metastasierung. In der humanen Brust repräsentieren die duktale Hyperplasie und die atypisch duktale Hyperplasie häufig die initialen Stufen des neoplastischen Wachstums, sind jedoch für die Tumorgenese nicht zwingend erforderlich (verändert nach [20]).

Die initialen Stufen des neoplastischen Wachstums der Brust stellen benigne, abnorme Gewebsvergrößerungen (Hyperplasien) dar. Diese entwickeln sich zunächst zu einer prä-invasiven Form des malignen Tumors, dem Karzinom *in situ*. Im weiteren Verlauf der

Kanzerogenese durchbrechen die Tumorzellen die Basalmembran, welche das Drüsenepithel vom Stroma abgrenzt. Nun liegt ein invasives Mammakarzinom vor, das unbehandelt innerhalb weniger Jahre metastasiert. Die neoplastische Progression verläuft jedoch nicht in allen Fällen linear, so dass sowohl Hyperplasien als auch das Karzinom *in situ* keine zwingenden Zwischenstufen darstellen [20].

Im Verlauf der mehrstufigen Tumorgenese erwerben die Zellen eines Tumors essentielle Eigenschaften, die ihr Wachstum und Überleben sowie ihre Ausbreitung im Körper ermöglichen. Erstmals formuliert wurden sechs dieser elementaren Tumor-Charakteristika (engl. *hallmarks of cancer*) im Rahmen eines von Hanahan und Weinberg im Jahre 2000 entwickelten Modells [53] (siehe Abbildung 1-5).

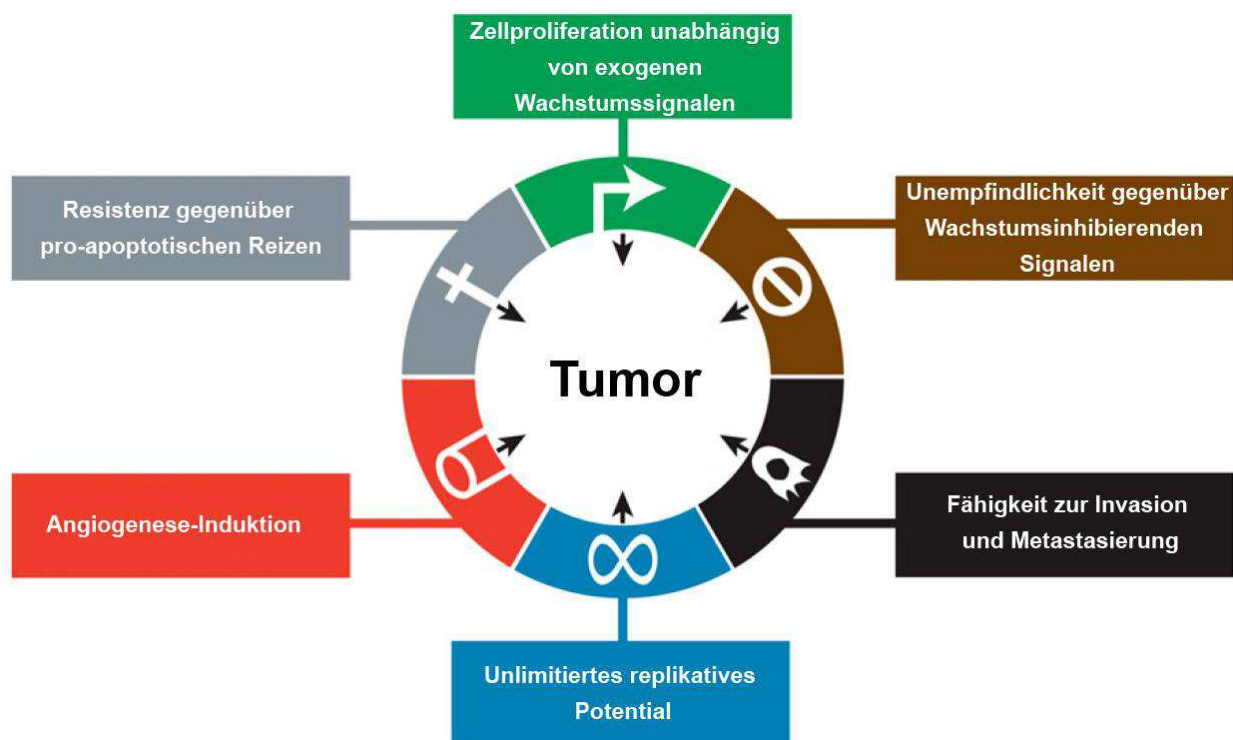


Abbildung 1-5: Darstellung elementarer Tumoreigenschaften. Abgebildet sind die im Jahre 2000 von Hanahan und Weinberg formulierten sechs essentiellen Tumor-Charakteristika, die Tumorzellen im Laufe der Progression zum malignen Karzinom erwerben. Verändert nach [53].

In der frühen Tumorgenese sind neo-plastische Zellen vor allem durch ein ungehemmtes Zellwachstum gekennzeichnet. Die Deregulation des Wachstumsprogrammes erfolgt durch den Erwerb 1) einer von exogenen Wachstumssignalen unabhängigen Zellproliferation, 2) einer Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, 3) einer Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Reizen und 4) einem unlimitierten replikativen Potential. Zudem ist die Stimulation der Gefäßneubildung (Neoangiogenese) essentiell, um eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des heranwachsenden Tumorgewebes zu gewährleisten. In der späten Tumorgenese kommt es zur Ausbreitung der transformierten Zellen im

Organismus (maligne Progression) [16]. Karzinomzellen verlieren hierbei ihren epithelialen Charakter und präsentieren zunehmend mesenchymale Merkmale, die ihnen die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung verleihen [54]. Dieser Prozess wird epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) genannt. Im Jahre 2011 wurde das ursprüngliche Modell von Hanahan und Weinberg um zwei weitere elementare Eigenschaften ergänzt: Die Reprogrammierung des zellulären Energiestoffwechsels zur Förderung der Proliferation und die Umgehung einer Zerstörung durch das Immunsystem [55].

Der graduelle Erwerb dieser Tumoreigenschaften im Zuge der mehrstufigen Tumorgenese verläuft als evolutionäre Anpassung der Tumorzellen an ihre Umgebung und wird über das im Jahre 1976 von Nowell entwickelte Konzept der klonalen Evolution von Tumoren beschrieben, welches auf den Grundprinzipien der klassischen Evolutionstheorie nach Darwin beruht [56]: Durch genetische oder epigenetische Aberrationen gewinnt die Ursprungszelle einen Wachstums- und Überlebensvorteil gegenüber ihrer Umgebung. Durch eine Akkumulation dieser molekularen Modifikationen, Einflüssen des Mikroumfeldes und Selektion der am besten angepassten Tumorzellen entsteht schließlich aus den Klonen dieser Ursprungszelle eine Neoplasie mit phänotypischer Variabilität, welche die oben genannten Tumorcharakteristika aufweist und den Kontrollmechanismen des Wirtes weitestgehend entzogen ist. Hinsichtlich der Einzelzell-Eigenschaften von Neoplasien werden zwei unterschiedliche Hypothesen diskutiert, die sowohl für die Diagnose als auch die Therapie eines Tumors von großer Relevanz sind [16]: Nach dem stochastischen Modell können alle Zellen eines Tumors mit einer gleich hohen Wahrscheinlichkeit proliferieren und zum Ursprung einer neuen Neoplasie werden. Dieser Hypothese zufolge sind die Tumorzellen relativ homogen und würden demnach alle gleichermaßen auf eine Behandlung ansprechen. Dem gegenüber steht die Krebsstammzelltheorie, welche davon ausgeht, dass nur einzelne Tumorzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und dadurch das Potential zu einer neuen Neoplasie anzuwachsen. Diesem Modell folgend unterscheiden sich die Tumorstammzellen biologisch und funktionell von den übrigen neoplastischen Zellen (Progenitorzellen) und dementsprechend auch in ihrem Ansprechen auf therapeutische Ansätze. Diese Hypothese bietet eine Erklärung für das Auftreten von Rezidiven und wird daher als die wahrscheinlichere angesehen. In der Tat konnte die Existenz von Tumorstammzellen bereits in einigen humanen Tumorentitäten nachgewiesen werden [57, 58].

1.2.1 Molekulargenetische Grundlagen der Tumorgenese

Die Transformation einer ursprünglich gesunden Zelle in einen Tumor ist das Ergebnis einer Akkumulation von genetischen und epigenetischen Modifikationen im Genom der Tumorzelle. So lassen sich in Brusttumoren im Schnitt allein 80 Mutationen nachweisen, die eine Änderung

der Aminosäuresequenz zur Folge haben [59]. Die Mehrzahl dieser Mutationen sind jedoch sogenannte *Passenger*-Mutationen, die nicht ursächlich in die Kanzerogenese involviert sind. Diese „mitgeschleppten“ Mutationen sind von den für die Entstehung und/oder Progression des Tumors verantwortlichen *Driver*-Mutationen abzugrenzen. Kausal in die Tumorgenese involvierte Gene werden als Tumorgene bezeichnet und können sowohl von *Driver*-Mutationen betroffen als auch über andere Mechanismen in ihrer Funktion gestört sein. Genetische Veränderungen der Tumorgene liegen mitunter bereits in der Zygote vor (Keimbahnmutationen) oder treten erst nach dem Zygotenstadium auf (somatische Mutationen). Die beiden antagonistischen Hauptgruppen der Tumorgene, die (Proto-)Onkogene und Tumorsuppressorgene, sind als diagnostische Marker sowie als mögliche therapeutische Zielstrukturen im Fokus der molekularen Krebsforschung [16, 60].

1.2.1.1 Proto-Onkogene

Onkogene sind definiert als Gene, deren funktionelle Aktivität in Tumorzellen durch Mutationen oder chromosomale Veränderungen gesteigert ist („*gain of function*“) und dadurch kausal am Prozess der Tumorgenese beteiligt sind. Als Proto-Onkogene werden die entsprechenden zellulären, unveränderten Gene bezeichnet, die häufig in die Aktivierung des Zellzyklus sowie die Zellteilung und –differenzierung involviert sind [61]. Mutationen in Proto-Onkogenen haben meist einen dominanten phänotypischen Effekt, so dass in der Regel das Vorliegen eines mutierten Allels für die phänotypische Ausprägung ausreicht. Einer aberranten Aktivität von Onkogenen liegen vielfältige Mechanismen zugrunde [16, 60], die im Folgenden anhand von prominenten Beispielen erläutert werden sollen:

Wie bereits in Abschnitt 1.1.4 erwähnt, tritt in 20 – 30 % aller Brusttumoren eine Amplifikation des für die Tyrosinkinase HER2/NEU codierenden Proto-Onkogens *ERBB2* auf [16]. Diese resultiert in einer erhöhten Anzahl des Rezeptors HER2/NEU in der Zellmembran von Tumorzellen, welche eine Hypersensitivität gegenüber exogenen Wachstumssignalen und dementsprechend eine deregulierte Zellproliferation zur Folge hat. Für die Therapie HER2-positiver Mammakarzinome ist in der EU bereits seit dem Jahre 2000 der anti-HER2-Antikörper Trastuzumab zugelassen, dessen Anwendung nachweislich sowohl das rezidivfreie als auch das Gesamtüberleben von Patienten erhöht [16, 45, 62].

Als Ursachen einer Deregulation des Proto-Onkogens *c-MYC*, welches in vielen Tumoren inklusive dem Mammakarzinom häufig mit einer ungünstigen Patientenprognose assoziiert ist [63], werden mehrere Mechanismen beschrieben. Neben einer Amplifikation des *c-MYC*-Lokus, die in ca. 16 % aller Brusttumoren vorliegt, wurde ebenso eine aberrante Stabilisierung der *c-MYC*-mRNA sowie des *c-MYC*-Proteins in Tumorzellen nachgewiesen [64, 65]. Zudem wird die Transkription von *c-MYC* über Signalwege reguliert, deren Aktivität in

Mammakarzinomen häufig erhöht ist, wie beispielsweise den WNT- und Notch-Signalweg [16]. Als Transkriptionsfaktor beeinflusst c-MYC die Expression zahlreicher Gene, die unter anderem in die Zellzykluskontrolle sowie die Regulation des Zellmetabolismus involviert sind [63]. Eine gegen c-MYC gerichtete *Antisense*-Therapie des Mammakarzinoms war bereits Grundlage mehrerer Studien [66-68]. Während *in vitro*- und *in vivo*-Experimente mit c-MYC-*antisense*-Oligonukleotiden vielversprechende Ergebnisse lieferten, konnte in klinischen Studien jedoch bisher kein signifikanter Nutzen für die Behandlung von Brusttumoren nachgewiesen werden [68].

Missense-Mutationen im *PIK3CA*-Gen stellen den hauptsächlichen Mechanismus dar, der zu einer erhöhten Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) führt und in rund 26 % aller Brusttumoren beobachtet wird. *PIK3CA* codiert für die katalytische Untereinheit eines PI3K-Isoenzyms, welches einen zentralen Knotenpunkt der zellulären Signalübertragung mehrerer Signalwege darstellt und unter anderem die Aktivität der tumorrelevanten PI3K/Akt-Signaltransduktion fördert [16, 69]. Eines der Schlüsselproteine dieses Signalweges stellt die mTOR-Kinase dar. Bereits seit einigen Jahren wird der mTOR-Inhibitor *Everolimus*, der von Novartis unter dem Namen *Afinitor*® vermarktet wird, erfolgreich in Kombination mit einer endokrinen Behandlung für die Therapie Hormonrezeptor-positiver, metastatischer Mammakarzinome eingesetzt [39, 70].

1.2.1.2 Tumorsuppressorgene

Im Gegensatz zu den Onkogenen erfahren Tumorsuppressorgene im Verlauf der Tumorgenese einen Funktionsverlust („*loss of function*“), welcher zu einem vermehrten Wachstum von Neoplasien und/oder ihrer Progression beiträgt [16]. Um eine phänotypische Ausprägung hervorzurufen, müssen in der Regel beide Allele des Tumorsuppressorgens inaktiviert vorliegen. Diesbezüglich stellte Knudson im Jahre 1971 die Theorie der „zwei Ereignisse“ (engl. „*Two Hits*“) auf, die bis heute für die Mehrzahl der Tumorsuppressorgene Gültigkeit besitzt [71]. Die auf einer Stammbaumanalyse von Retinoblastom-Patienten basierte Hypothese besagt, dass zunächst in einem der beiden Allele des Tumorsuppressorgens eine chromosomale Veränderung auftritt, die jedoch noch keinen Funktionsverlust des Tumorsuppressors zur Folge hat. Erst die Inaktivierung des verbleibenden, zweiten Allels führt zum Verlust der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity*, LOH) und fördert so die Tumorentstehung. Dabei können sich die Ereignisse für den Funktionsverlust sowohl mechanistisch unterscheiden (Mutationen oder epigenetische Veränderungen) als auch zeitlich unabhängig voneinander in Form von Keimbahn- oder somatischen Modifikationen auftreten. Knudsons Hypothese konnte im Jahre 1987 durch die Identifizierung des verantwortlichen Gens *Retinoblastom 1* (*RB1*) auf molekularer Ebene bestätigt werden [72].

Das am häufigsten mutierte Tumorgen ist *TP53*, für das in 40 - 45 % aller menschlichen Tumoren Mutationen beschrieben sind [73]. Das entsprechende Genprodukt ist der Transkriptionsfaktor p53, der als Kontrollinstanz des Zellzyklus fungiert: Liegen in einer Zelle DNA-Schäden vor, verhindert p53 über die Expression entsprechender Zielgene die Replikation der DNA oder bewirkt bei zu großen Schäden eine Apoptose-Induktion [73]. In Mammakarzinomen können in ca. 28 % aller Fälle Mutationen im *TP53*-Gen beobachtet werden, welche meistens bereits in frühen Tumorstadien auffindbar und mit einer ungünstigen Patientenprognose assoziiert sind [74, 75]. In einer Mehrzahl von Tumoren liegt ein mono-allelischer Verlust des *TP53*-Gens vor, der zusammen mit einer Punktmutation im zweiten, verbliebenen Allel zum vollständigen Funktionsverlust des Tumorsuppressors führt. *TP53*-Mutationen sind mit dem sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom verknüpft. Betroffene zeigen in 70 % aller Fälle eine Keimbahnmutation in einem Allel des *TP53*-Gens, die bereits in jungen Jahren in mehreren neoplastischen Erkrankungen unterschiedlicher Entitäten resultiert [76]. Für die Entwicklung zielgerichteter Therapien p53-defizienter Tumoren werden unterschiedliche Strategien verfolgt, zu denen auch die Wiederherstellung der tumorsuppressiven Funktion von p53 über Impfungen oder eine Gentherapie gehört [77, 78]. Seit dem Jahre 2003 wird in China das Gentherapie-Pharmazeutikum *Genedicine*, welches auf Einschleusung von *TP53* über einen adenoviralen Vektor basiert, für die Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen eingesetzt [79, 80]. Das Medikament ist jedoch zurzeit nur in China zugelassen. Obwohl es bereits Ende des Jahres 2006 bei 4.000 Patienten in China zur Anwendung kam, liegen bisher keine Daten einer abgeschlossenen Phase III-Studie vor, welche in den meisten Ländern für eine Zulassung erforderlich ist [77].

In der Mehrzahl der Fälle beruht die Entstehung eines Mammakarzinoms auf somatischen Veränderungen des Genoms. 5 - 10 % aller Brustkrebserkrankungen können jedoch auf eine erbliche Disposition zurückgeführt werden [16]. Zu nennen sind hier insbesondere die beiden Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* (engl. *breast cancer 1/2*), deren Mutationen mit einem gehäuftem Auftreten von Mamma- und Ovarialkarzinomen verknüpft sind. Frauen, die eine Keimbahnmutation in einem oder beiden dieser Gene aufweisen, haben im Vergleich zu Frauen ohne genetische Disposition in diesen Loci ein um den Faktor acht erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken [81]. Zudem sind Mammakarzinome, die infolge einer *BRCA1/2*-Mutation auftreten, assoziiert mit einem frühen Erkrankungsalter, einer beidseitigen Brustkrebserkrankung sowie dem schwer therapierbaren, triple-negativen Brustkrebs-Subtyp [38, 82]. Die BRCA-Proteine stellen einen wichtigen Faktor für die Reparatur von DNA-Strangbrüchen über den Mechanismus der homologen Rekombination dar [16]. Einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie von BRCA-defizienten Tumoren bietet daher die Behandlung mit PARP-Inhibitoren (PARPi) [83]. Diese führen über die zusätzliche Hemmung weiterer DNA-Reparaturwege zu einer synthetischen Letalität der Krebszellen. So

wird der PARPi *Olaparib* bereits seit Ende des Jahres 2014 für die Therapie fortgeschrittener, *BRCA1/2*-mutierter Ovarialkarzinome eingesetzt [39, 84].

Neben genetischen Aberrationen tragen, insbesondere bei Tumorsuppressorgenen, epigenetische Modifikationen des Genoms in einem hohen Maße zu einem Funktionsverlust von Tumorgenen bei [85]. Neben den hier bereits erwähnten Tumorsuppressorgenen *RB1* und *BRCA1*, werden in Neoplasien vor allem Zellzyklusregulatoren, DNA-Reparaturgene sowie Inhibitoren tumorrelevanter Signalwege, wie der WNT-Signaltransduktion, über epigenetische Mechanismen inaktiviert [86-88].

1.3 Epigenetik

1.3.1 Grundlagen der Epigenetik

Unter dem Begriff Epigenetik werden alle molekularen Modifikationen zusammengefasst, die in einer hereditär veränderten Expression von Genen resultieren, ohne jedoch die Nukleotidsequenz der DNA zu verändern [89]. Heutzutage sind zahlreiche zelluläre Prozesse bekannt, deren Regulation über epigenetische Mechanismen erfolgt. Hierzu gehören beispielsweise die Embryonalentwicklung, die Immunantwort, die zelluläre Differenzierung sowie die X-Chromosomen-Inaktivierung in weiblichen Zellkernen [90, 91]. Zu den zentralen, epigenetischen Mechanismen werden die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikation sowie die RNA-Interferenz gezählt, welche synergistisch zusammenwirken und in der Regel reversibel sind (siehe Abbildung 1-6) [91-94].

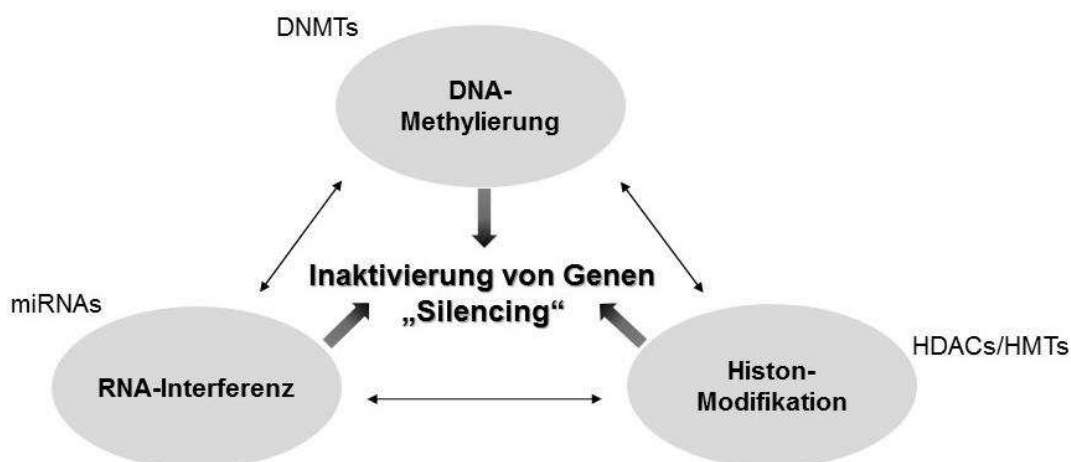


Abbildung 1-6: Das Zusammenspiel epigenetischer Mechanismen zur Inaktivierung von Genen. Die epigenetische Inaktivierung (engl. „*Silencing*“) von Genen wird über die drei Hauptmechanismen DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und RNA-Interferenz vermittelt. Zu den involvierten Enzymen gehören die DNA-Methyltransferasen (DNMTs), Histon-Deacetylasen (HDACs) und Histon-Methyl-

transferasen (HMTs), welche synergistisch zusammenwirken. Hinzu kommt die posttranskriptionelle Regulation der mRNA-Stabilität über die Interferenz mit microRNAs (miRNAs), welche wiederum ebenfalls die DNA-Methylierung und die Histon-Modifikation beeinflusst. Verändert nach [92, 95].

Aberrante epigenetische Modifikationen können in zahlreichen humanen Erkrankungen beobachtet werden [83]. So ist beispielweise ein verändertes DNA-Methylierungsmuster kennzeichnend für Neoplasien unterschiedlichen Ursprungs [85].

1.3.2 DNA-Methylierung

Die am besten untersuchte epigenetische Modifikation stellt die Cytosin-Methylierung dar, die fast ausschließlich in der palindromischen Sequenz eines Dinukleotids aus Cytosin und Guanin (CpG) zu finden ist [83]. Die Methylierung der Cytosin-Reste erfolgt postreplikativ durch Addition einer Methylgruppe an das fünfte Kohlenstoffatom der Cytosin-Pyrimidin-Ringe. Dieser Prozess wird katalysiert durch Mitglieder der Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) unter Nutzung von S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppen-Donor [96].

CpG-Dinukleotide umfassen nur etwa 1 % der humanen DNA-Sequenz und sind innerhalb des Genoms ungleich verteilt [85, 91]. In CpG-reichen Sequenzen bilden sich sogenannte CpG-Inseln, die als Bereiche mit einer Länge von über 500 Basenpaaren, einem C/G-Gehalt von über 55 % sowie einem Verhältnis der beobachteten CpG-Dinukleotide zu ihrer statistisch erwarteten Häufigkeit von mehr als 0,65 definiert sind [97]. CpG-Inseln sind häufig innerhalb von Gen-Promotoren oder deren proximaler Sequenzumgebung lokalisiert, wo ihre Hypermethylierung in der Regel mit einer Inaktivierung des jeweiligen Gens verbunden ist [85, 91]. Außerhalb der Promotorsequenz existieren zusätzlich sogenannte „CpG-Island shores“, die sowohl *upstream* des Promotors als auch im transkribierten Bereich des Gens lokalisiert sein können. Aufgrund ihrer Position innerhalb regulatorischer Elemente (z. B. *Enhancer*-Sequenzen) kann eine Methylierung der CpG-Island shores ebenfalls die Genexpression beeinflussen [91, 92, 98]. Basis der über DNA-Methylierung vermittelten Expressionsinhibition ist eine räumliche Veränderung der Erkennungssequenzen für spezifische Transkriptionsfaktoren, in deren Folge die Transkription graduell abnimmt [91, 92, 99]. Zusätzlich binden Repressor-Proteine über spezielle Methyl-CpG-Bindungsdomänen an die methylierten CpG-Dinukleotide. Diese Proteine interagieren mit einer Vielzahl weiterer Proteine und bewirken unter anderem, in einer Wechselwirkung mit Histon-Deacetylasen, die Verdichtung des Chromatins zu kompakten Nukleosomen, was in einer unmittelbaren inhibitorischen Wirkung auf die Transkription umliegender Gene resultiert [91, 92, 99].

Das Methylierungsmuster der DNA wird bereits früh in der Embryogenese festgelegt [90]. Dabei liegt die Mehrzahl der in Gen-Promotoren lokalisierten CpG-Inseln unmethyliert vor [91]. Davon ausgenommen sind jedoch die Promotorregionen entwicklungs- oder gewebe-

spezifischer Gene, deren Expression häufig über den Mechanismus der DNA-Methylierung reguliert wird. Ein Beispiel ist das genomische *Imprinting* maternaler und paternaler Gene, bei dem eines der beiden parentalen Allele hypermethyliert wird, um eine monoallelische Genexpression zu gewährleisten [85].

Eine Veränderung des DNA-Methylierungsmusters ist mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert, insbesondere der Entstehung von Neoplasien. Für Tumorzellen ist vor allem eine globale DNA-Hypomethylierung des Genoms (20 - 60 % weniger 5'-Methylcytosin im Vergleich zu normalen Zellen) kennzeichnend, von der in der Regel repetitive Sequenzen betroffen sind und die in einer chromosomalen Instabilität resultiert [85, 91]. Gleichzeitig führt jedoch eine DNA-Hypermethylierung in regulatorischen Bereiche von Tumorsuppressorgenen zu deren Expressionsverlust und fördert so ebenfalls die Entstehung und Progression von Tumoren [85, 91, 100].

1.4 Der WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg kontrolliert diverse biologische Prozesse wie die Proliferation, Apoptose, Migration, Adhäsion sowie Differenzierung und spielt dadurch sowohl in der Embryogenese als auch für die Homöostase adulter Gewebe eine wichtige Rolle [101-104]. Seinen Namen verdankt dieser Signalweg seinen sezernierten Liganden, den Vertretern der WNT-Familie, von denen im Menschen insgesamt 19 verschiedene, sekretierte Isoformen bekannt sind [104]. Der WNT-Signalweg wird in eine kanonische/ β -Catenin-abhängige sowie mehrere nicht-kanonische/ β -Catenin-unabhängige Signalkaskaden unterteilt, deren Regulation über die Bindung der WNT-Proteine an unterschiedliche Rezeptoren vermittelt wird [104-106]. Eine Deregulation des WNT-Signalweges, verursacht durch Mutationen und/oder eine aberrante Expression involvierter Proteine, wird mit einer Vielzahl an Erkrankungen in Verbindung gebracht, nicht zuletzt der Entstehung und Progression von Neoplasien [101-103].

Abbildung 1-7 zeigt die schematische Darstellung des kanonischen sowie eines der nicht-kanonischen WNT-Signalwege (PCP-Signalweg). Diese sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.4.1 Der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg

Die bisher am besten verstandene WNT-Signaltransduktion ist der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg, welcher in Abbildung 1-7A und B illustriert ist. Das zentrale Molekül dieser Signalkaskade stellt β -Catenin dar, dessen zytoplasmatische Konzentration über einen Destruktionskomplex reguliert wird [101, 107]. Dieser Multiprotein-Komplex besteht

neben weiteren Proteinen aus APC (Adenomatöse Polyposis coli), Axin sowie den beiden Kinasen CK1 α (Casein-Kinase-1 α) und GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase-3 β).

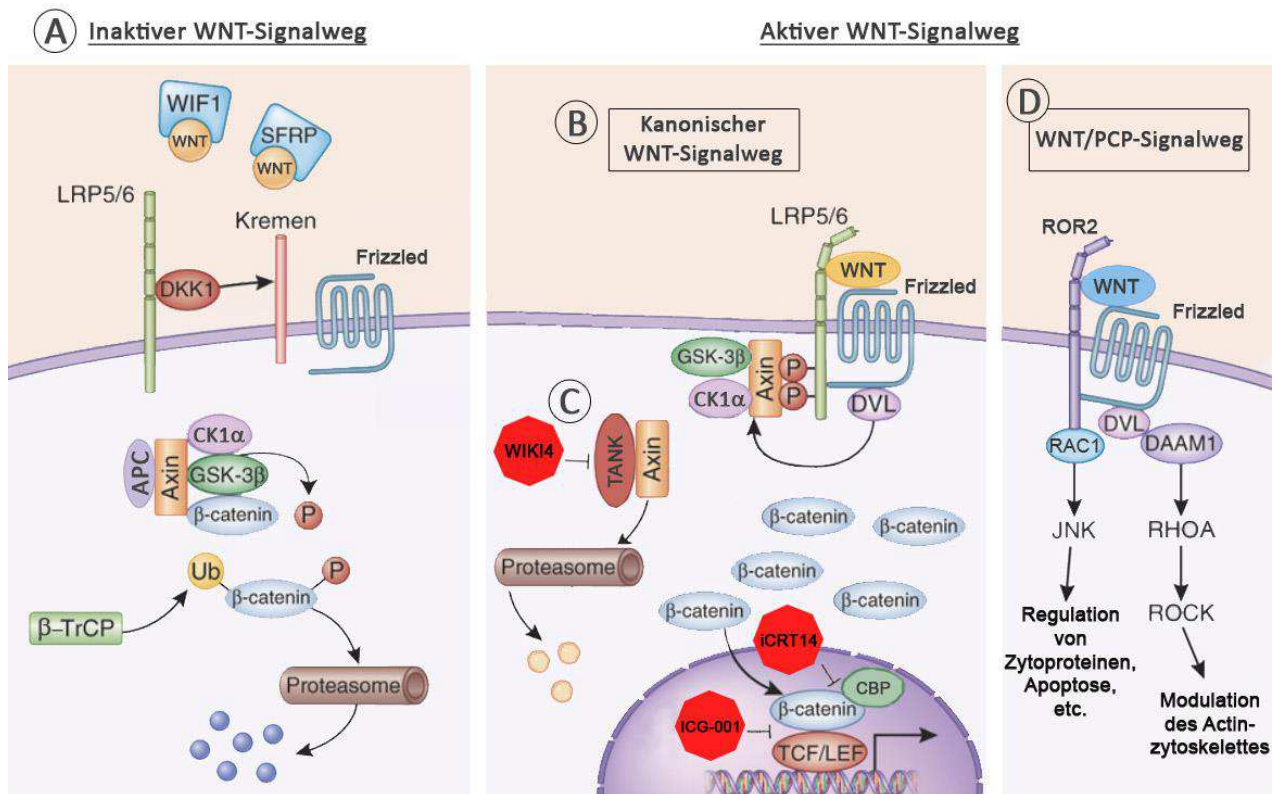


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung des WNT-Signalweges. (A) Die Inhibition des WNT-Signales durch WIF1 und SFRPs bzw. die Hemmung der WNT-Rezeptoren LRP5/6 durch DKK1 und dessen Ko-Rezeptor Kremen resultiert in der Inaktivierung des kanonischen WNT-Signalweges. Infolge dessen kommt es zum kontinuierlichen Abbau von β -Catenin durch den Destruktionskomplex, bestehend aus APC, Axin, CK1 α und GSK-3 β , sowie der Ubiquitin-Ligase β -TrCP. (B) Die Bindung der WNT-Moleküle an die Rezeptoren *Frizzled* und LRP5/6 aktiviert den kanonischen WNT-Signalweg. Dies resultiert in der Hemmung des Destruktionskomplexes und dadurch einer Akkumulation von β -Catenin, welches in den Nukleus transloziert und dort in einer Interaktion mit CBP und dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF die Transkription der WNT-Zielgene induziert. ICG-001 und iCRT14 fungieren jeweils als niedermolekulare Inhibitoren der WNT/ β -Catenin-abhängigen Transkription (C) Die Aktivität des Destruktionskomplexes wird zusätzlich über Tankyrasen (TANK) kontrolliert. Diese fördern über die Ubiquitinierung von Axin dessen Abbau im Proteasom und dadurch die Destabilisierung des Destruktionskomplexes. WIK14 stabilisiert über die Inhibition von TANK den Destruktionskomplex und hemmt so die WNT-Signaltransduktion (D) Die Bindung der WNT-Moleküle an die beiden Rezeptoren *Frizzled* und ROR2 aktiviert den PCP/WNT-Signalweg: DVL wird an den Rezeptor-Komplex rekrutiert, was zur Aktivierung der kleinen GTPasen RAC1 und RHOA führt, die über ROCK und JNK das Aktinzytoskelett sowie weitere zelluläre Prozesse wie die Apoptose modulieren. Verändert nach [106].

In differenzierten Zellen adulter Gewebe liegt der WNT-Signalweg meist inaktiviert vor (siehe Abbildung 1-7A) [108]. Die Inhibition erfolgt in der Regel extrazellulär durch Antagonisten der Signaltransduktion, die auf Basis des Inhibitionsmechanismus in zwei Klassen unterteilt werden können [109, 110]: Die Vertreter der SFRP (*Secreted Frizzled-Related Protein*)-Familie, WIF (*WNT-Inhibitory Factor*) und Cerberus interagieren direkt mit den WNT-Molekülen und verhindern so die Aktivierung des Transmembranrezeptor-Komplexes, welcher

sich aus dem Ko-Rezeptor LRP5/6 sowie einem der zehn Vertreter der *Frizzled*-Rezeptoren zusammensetzt. Hingegen bindet die Mehrzahl der Mitglieder der Dickkopf (DKK)-Familie an den Ko-Rezeptor LRP5 oder LRP6 (*Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6*), so dass deren Interaktion mit *Frizzled* unterbunden und LRP5/6 in Anwesenheit der DKK-Ko-Rezeptoren Kremen 1 oder 2 (KRM1/2) zusätzlich über einen endozytotischen Prozess degradiert werden [111]. Liegt kein WNT-Signal vor, wird β -Catenin über die beiden Kinasen des Destruktionskomplexes mehrfach phosphoryliert und infolge dessen von der Ubiquitin-Ligase β -TRCP (*β -Transducin Repeat-containing Protein*) poly-ubiquitiniert [101, 102, 107]. Die Ubiquitinierung resultiert letztendlich in der proteasomalen Degradation von β -Catenin.

In Abwesenheit der WNT-Antagonisten können WNT-Moleküle an den Transmembranrezeptor-Komplex binden und die intrazelluläre WNT-Signaltransduktion auslösen (siehe Abbildung 1 7B) [98, 100, 104]. Diese mündet in der Rekrutierung des zytoplasmatischen Moleküls *Dishevelled* (DVL) an den *Frizzled*-Rezeptor sowie der Bindung von Axin an den LRP5/6-Ko-Rezeptor. Die Interaktion von Axin mit DVL führt schließlich zur Dissoziation des Destruktionskomplexes und infolgedessen zu einer Akkumulation zytoplasmatischen β -Catenins. Dieses transloziert in den Nukleus und aktiviert dort über eine Wechselwirkung mit dem Ko-Faktor CBP (*CREB-Binding Protein*) einen Transkriptionsfaktor der TCF/LEF-Familie (*T-Cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor*). Die Expression von Zielgenen des WNT-Signalweges, wie *c-MYC*, *Cyclin D1* oder *MET*, resultiert unter anderem in einem erhöhten Zellwachstum, vermittelt über eine Deregulation der Zellproliferation und des Apoptose-Weges [104]. Zahlreiche direkte oder indirekte Zielgene sind zudem selbst Komponenten des WNT-Signalweges, beispielsweise *DKK1*, *Axin2* und *β -TRCP*, was eine Kontrolle der Signaltransduktion über einen „*Feedback-Loop*“ zur Folge hat [101, 112].

In zahlreichen humanen Tumorentitäten lässt sich eine Deregulation des WNT-Signalweges feststellen. So zeigen etwa 40 - 60 % aller Mammakarzinome eine aberrante Aktivität der kanonischen WNT-Signaltransduktion, welche mit einer Förderung des onkogenen Potentials und infolge dessen einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [110, 111]. Die Inhibition dieses Signalweges stellt daher einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Behandlung einer Vielzahl von humanen Tumoren dar, so dass einige der in der Entwicklung befindlichen Krebs-Therapien gegen diese Signaltransduktion gerichtet sind [105, 112, 113]. Zu nennen sind hier neben monoklonalen Antikörpern und *anti-sense*-Oligonukleotiden insbesondere sogenannte „*small molecules*“, die als spezifische Inhibitoren oder Aktivatoren an unterschiedlichen Punkten der WNT-Signalkaskade ansetzen. Als Beispiele sind die drei im Rahmen dieser Dissertation verwendeten WNT-Signalweg-Inhibitoren WIKI4, ICG-001 und iCRT 14 zu nennen (siehe Abbildung 1-7B und C): WIKI4 fungiert als Tankyrase-Inhibitor und fördert auf diesem Wege die Stabilisation des Destruktionskomplexes und somit die Degradation von β -Catenin [113]. Im Gegensatz dazu wirken sowohl ICG-001 als auch iCRT 14

downstream der β -Catenin-Stabilisierung und hemmen spezifisch die β -Catenin-abhängige Transkription der WNT-Zielgene. Während ICG-001 die Interaktion von β -Catenin und dem Ko-Faktor CBP blockiert [114], inhibiert iCRT 14 spezifisch die β -Catenin-TCF-Interaktion [115].

1.4.2 WNT/PCP-Signalweg

Neben dem kanonischen WNT-Signalweg existieren mehrere β -Catenin-unabhängige WNT-Signalkaskaden. Einen der bislang am besten verstandenen, nicht-kanonischen WNT-Signalwege stellt die *Planar Cell Polarity* (PCP)-Signaltransduktion dar, die diesen Namen aufgrund ihrer Bedeutung für die Ausbildung der planaren Zellpolarität in den Augen und Flügeln der Fruchtfliege *Drosophila* trägt [116]. In Vertebraten ist der PCP-Signalweg ebenfalls für zahlreiche Entwicklungsprozesse von entscheidender Bedeutung, so beispielsweise für die Organisation der Haarsinneszellen im Innenohr, der Schließung des Neuralrohrs und der Haar-Orientierung bei Säugetieren [117].

Die WNT/PCP-Signaltransduktion wird über die Bindung der WNT-Proteine an einen Transmembranrezeptor-Komplex, bestehend aus *Frizzled* und dem Ko-Rezeptor ROR2, ausgelöst (siehe Abbildung 1-7D) [105, 118]: Nach Rekrutierung an den *Frizzled*-ROR2-Komplex, aktiviert das Adapterprotein DVL über zwei parallele Signalkaskaden monomere GTPasen der RHO-Familie, namentlich RHOA und RAC1 [119, 120]. Die Aktivierung von RHOA resultiert über die Rho-assoziierte Kinase (ROCK) in der Modulation des Aktinzytoskelettes und beeinflusst dadurch die Migration sowie die adhäsiven Eigenschaften von Zellen [121]. RAC1 kommt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Organisation des Aktinzytoskelettes zu. Zudem reguliert diese GTPase über die Aktivierung der C-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) zahlreiche weitere physiologische Prozesse, unter anderem die Apoptose-Induktion [121-123].

Die Rolle des PCP-Signalweges für die Entwicklung humaner Tumoren wird derzeit kontrovers diskutiert. Einerseits ist eine antagonistische Wirkung des PCP-Signalweges auf die kanonischen WNT-Signaltransduktion beschrieben, was auf eine tumorsuppressive Funktion dieses Signalweges, insbesondere in der Tumorentstehung, hindeutet. Andererseits belegen zahlreiche Studien die Relevanz des PCP-Signalweges für die Ausprägung Progressions-assoziiierter Karzinomeigenschaften, wie die Förderung der tumorösen Infiltration umliegender Gewebe sowie die Metastasierung [124-128]. Hieraus entwickelte sich ein komplexes Modell, das eine biphasische Funktion des PCP-Signalweges in der Tumorgenese postuliert (siehe Abbildung 1-8).

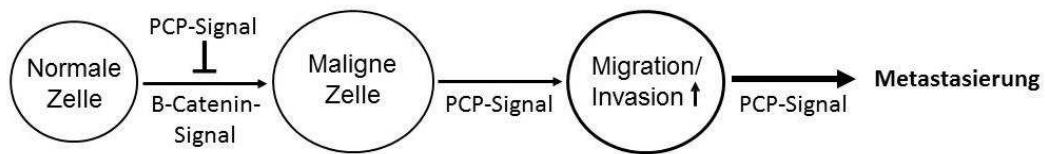


Abbildung 1-8: Modell der potentiellen biphasischen Rolle des PCP-Signalweges in der humanen Tumorgenese. In frühen Tumorstadien trägt die aberrante Aktivität des kanonischen WNT-Signalweges zur Transformation normaler Zellen bei. In diesem Stadium kommt der PCP-Signaltransduktion als Antagonist des kanonischen WNT-Signalweges eine tumorsuppressive Rolle zu. Hingegen fördert die Aktivität des PCP-Signalweges während der malignen Progression die Migration und Invasion, welche die spätere Metastasierung des Karzinoms ermöglicht. Verändert nach [124].

1.5 Die Dickkopf-Familie

Während einer Studie zur Embryonalentwicklung von Vertebraten entdeckten Niehrs und Kollegen 1998 ein Gen, dessen Überexpression in *Xenopus*-Embryonen zu einer Vergrößerung des Kopfes führte [129]. Das daraufhin Dickkopf 1 (DKK1) genannte Genprodukt ist Teil einer Familie sekretierter Glykoproteine, die sich aus den vier Dickkopf-Proteinen DKK1-4, sowie einem mit DKK3 verwandten Protein namens Soggy (DKKL1) zusammensetzt. Während für DKK1-4 jeweils eine antagonistische Wirkung auf den WNT-Signalweg nachgewiesen werden konnte, ist die biologische Funktion von DKKL1 bisher noch größtenteils unbekannt [111, 130]. Strukturell sind alle Mitglieder der DKK-Familie durch ein N-terminales Signalpeptid sowie, mit Ausnahme von DKKL1, durch zwei Cystein-reiche Domänen charakterisiert (siehe Abbildung 1-9). Diese beiden funktionellen Domänen sind durch eine Linker-Region mit variabler Länge voneinander getrennt. Während diese in DKK1, 2 und 4 jeweils zwischen 51 und 56 Aminosäuren lang ist, beträgt die Länge im DKK3-Protein lediglich 13 Aminosäurereste [111, 130]. Aufgrund dieser strukturellen Divergenz nimmt DKK3 im Vergleich zu den übrigen Vertretern der Dickkopf-Familie eine Sonderstellung ein, die sich als Folge ebenfalls in einer divergenten biologischen Funktion widerspiegelt und im Folgenden genauer erörtert werden soll.

Sowohl DKK1, 2 als auch 4 interagieren nachweislich mit den beiden Transmembranrezeptoren LRP5/6 und KRM1/2. Auf diese Weise nehmen sie Einfluss auf die zytosplasmatische β -Catenin-Konzentration sowie daraus resultierend auf die Expression kanonischer WNT-Zielgene (siehe Abschnitt 1.4.1) [111, 131-133]. Abseits ihrer Funktion als potente Inhibitoren des kanonischen WNT-Signalweges, üben diese drei Dickkopf-Proteine jedoch aufgrund ihrer Rezeptorspezifität keinen Einfluss auf den WNT/PCP-Signalweg aus [111].

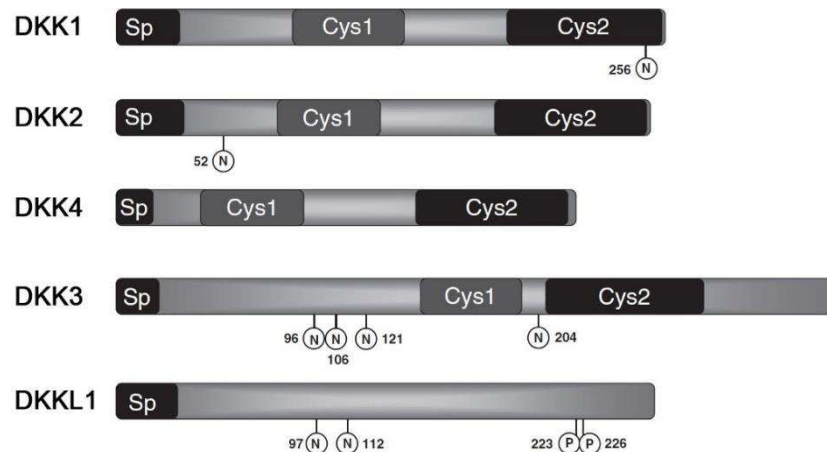


Abbildung 1-9: Strukturelle Homologie der Vertreter der Dickkopf-Familie. Die Mitglieder der Dickkopf-Familie weisen alle ein N-terminales Signalpeptid sowie, mit Ausnahme von DKKL1, zwei Cystein-reiche Domänen auf. Außer DKK4 besitzen zudem alle Vertreter eine oder mehrere N-Glykosylierungsstellen. Sp: Signalpeptid, Cys: Cystein-reiche Domäne, N: N-Glykosylierungsstelle, P: Phosphorylierungsstelle. Verändert nach [130].

Im Gegensatz zu den übrigen DKK-Vertretern bindet DKK3 an der Zelloberfläche weder LRP5/6 oder KRM1/2, noch wurde bis heute ein anderer mit DKK3 interagierender Transmembranrezeptor identifiziert [130, 134]. Zudem ist der Einfluss von DKK3 auf den kanonischen WNT- sowie den nicht-kanonischen PCP-Signalweg noch nicht abschließend geklärt. In Zelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms, des Osteosarkoms und in testikulären Sertolizellen konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von DKK3 in einer Zunahme der β -Catenin-Konzentration sowie einer erhöhten Expression von Zielgenen der kanonischen WNT-Signaltransduktion resultiert [135-138]. Im Gegensatz dazu zeigte DKK3 in mehreren WNT-Reportergergen-Assays keinen Einfluss auf die Aktivität des kanonischen WNT-Signalweges weder in *Xenopus*-Embryonen noch in humanen Zelllinien [132, 139, 140]. Zusätzlich wurde in Prostatakrebszellen infolge forcierter DKK3-Reexpression eine über JNK-vermittelte, β -Catenin-unabhängige Apoptose-Induktion beobachtet, was auf eine mögliche Funktion von DKK3 im WNT/PCP-Signalweg schließen lässt [141]. In Brustkrebszellen konnte wiederum ein Einfluss auf die WNT/ β -Catenin- und ebenso auf die WNT/PCP-Signaltransduktion gezeigt werden [142, 143]. Die biologische Funktion von DKK3 scheint demnach sowohl gewebe- als auch kontextabhängig zu sein. Der genaue Wirkmechanismus von DKK3 sowie der physiologische bzw. patho-physiologische Kontext der DKK3-Wirkung sind indessen noch nicht ausreichend geklärt und bedürfen der Untersuchung in weiterführenden Studien.

Als Antagonisten des für die Tumorgenese zahlreicher humaner Tumorentitäten relevanten WNT-Signalweges stellen die Vertreter der Dickkopf-Familie putative Tumorsuppressoren dar. Tatsächlich kann in zahlreichen neoplastischen Geweben eine aberrante Expression der Dickkopf-Proteine beobachtet werden [111, 130]. Während die Expression der übrigen Vertreter der Dickkopf-Familie jedoch in Tumorgeweben nicht konstant herabreguliert, sondern

ebenfalls gewebs- sowie kontextspezifisch erhöht vorliegen kann, wurde ein DKK3-Expressionsverlust in nahezu jedem soliden Tumor sowie in hämatologischen Erkrankungen beobachtet [130]. DKK3 wird deshalb auch REIC (*Reduced Expression in Immortalized Cells*) genannt [144]. In vielen Tumorentitäten wird als ursächlicher Mechanismus des Expressionsverlustes eine Hypermethylierung des Promotors beschrieben [130]. Hingegen weist eine Diskrepanz zwischen DKK3-Expressionsverlust und einer geringen Promotor-Methylierungsfrequenz in mehreren Tumorgeweben möglicherweise auf zusätzliche Regulationsmechanismen der *DKK3*-Transkription hin [130, 145]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Reexpression von DKK3 in zahlreichen Tumorentitäten, wie dem Mamma- oder Lungenkarzinom, in der Induktion tumorsuppressiver Prozesse resultiert. Hierzu gehören unter anderem eine Hemmung des Zellwachstums infolge einer erhöhten Apoptose-Induktion sowie eine Inhibition verschiedener Progressions-assoziiierter Tumoreigenschaften, beispielsweise eine reduzierte Zell-Migration in DKK3-reexprimierenden Zellen [130, 137, 142].

1.6 Die SFRP-Familie

Die Familie der *Secreted Frizzled-Related Proteins* (SFRPs) vereint mehrere sezernierte Modulatoren der WNT-Signaltransduktion. Auf Basis von Sequenzvergleichen und phylogenetischen Analysen werden drei Subgruppen der SFRPs unterschieden: So weisen SFRP1, SFRP2 und SFRP5 untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf, während die miteinander verwandten Proteine SFRP3 und SFRP4 eine phylogenetisch distinkte Gruppe bilden. Die dritte Subgruppe stellen *Crescent* und *Sizzled* dar, welche jedoch in Säugetieren nicht nachweisbar sind [146]. Ihren Namen verdanken die SFRP-Proteine ihrer N-terminalen, Cystein-reichen Domäne (CRD), die eine Sequenzhomologie von 30 - 50 % zur extrazellulären CRD der *Frizzled*-Rezeptoren aufweist (siehe Abbildung 1-10) [146, 147]. Aufgrund dieser hohen Sequenzähnlichkeit können SFRP-Proteine sowohl sekretierte WNT-Moleküle binden und dadurch deren Interaktion mit den *Frizzled*-Rezeptoren verhindern als auch direkt mit *Frizzled* selbst interagieren, was zur Bildung eines dysfunktionalen Komplexes führt. Über diese beiden Mechanismen regulieren die SFRPs den kanonischen sowie mehrere nicht-kanonische WNT-Signalwege [109, 146, 148].

Darüber hinaus besitzen die SFRPs eine zweite, C-terminal gelegene Domäne, welche eine schwache Sequenzhomologie zu Netrin, einem Axon-Lenkungs-Protein, aufweist (siehe Abbildung 1-10). Dieses Netrin-ähnliche Motiv (NTR) ist ebenfalls in anderen Proteinen zu finden, beispielsweise in Gewebe-Inhibitoren der Metalloproteasen (engl. *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, TIMPs) [149]. Diese Homologie weist auf eine zusätzliche Funktion der SFRPs in der Stabilisation der extrazellulären Matrix hin [150].



Abbildung 1-10: Strukturelle Homologie der Vertreter der SFRP-Familie zu den *Frizzled*-Rezeptoren. SFRPs besitzen, neben einem Signalpeptid für die Sekretion (schwarz), zwei Domänen: Die Netrin-ähnliche Domäne (NTR) am C-Terminus sowie die Cystein-reiche Domäne (CRD) am N-Terminus, welche eine Sequenzhomologie zur extrazellulären CRD der *Frizzled*-Rezeptoren aufweist. CD: Zytoplasmatische Domäne; Dunkelgrau gestreift: Transmembran-Domäne. Verändert nach [109].

Das funktionelle Wirkungsspektrum variiert zwischen den einzelnen Vertretern der SFRP-Familie, vermutlich bedingt durch unterschiedlich starke Affinitäten zwischen den SFRP-Proteinen und den einzelnen WNT-Molekülen bzw. *Frizzled*-Rezeptoren [146]. So regulieren beispielsweise SFRP1 und SFRP2 differenzielle zelluläre Prozesse. Während SFRP1 in Brusttumorzellen die intrazelluläre β -Catenin-Konzentration senkt und Apoptose fördert, induziert SFRP2 eine Akkumulation von β -Catenin sowie eine Steigerung der Apoptose-Resistenz von Mammakarzinom-Zellen [151]. Als möglicher Mechanismus der SFRP2-vermittelten Aktivierung der WNT/ β -Catenin-Signaltransduktion wird die Inhibition des antagonistisch wirkenden PCP-Signalweges diskutiert [146]. Darüber hinaus konnte in *Xenopus* gezeigt werden, dass sowohl *Crescent* und *Sizzled* als auch SFRP3 die extrazelluläre Diffusion der WNT-Proteine verbessern und somit das WNT-Signal fördern können [110, 152]. Als Modulatoren der WNT-Signaltransduktion sind SFRP-Proteine vor allem in die embryonale Entwicklung involviert, stellen jedoch ebenso wichtige Faktoren für die Aufrechterhaltung der Homöostase adulter Gewebe dar. Dementsprechend ist ein Verlust der SFRP-Expression mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert, so beispielsweise Krebs, Knochenerkrankungen und Netzhautdegenerationen [146, 153].

SFRP1 stellt den bisher am besten untersuchten Vertreter der SFRP-Familie dar. Er fungiert als biphasischer Modulator des WNT-Signals, der in hohen Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung auf die kanonische WNT-Signaltransduktion ausübt, die Aktivität dieses Signalweges in niedrigen Konzentrationen hingegen fördert [154]. Neben der Funktion als Regulator des WNT-Signalweges wirkt SFRP1 zusätzlich als Inhibitor weiterer Proteine. Hierzu zählt beispielsweise RANKL, ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie, das unter anderem die Osteoklasten-Bildung fördert, so dass ein Verlust der SFRP1-Expression auch mit der Entstehung von Osteoporose assoziiert ist [146]. Gleichermäßen kann eine reduzierte Expression von SFRP1 in zahlreichen Tumorentitäten, einschließlich des Mammakarzinoms, beobachtet werden [153, 155, 156]. Das *SFRP1*-Gen ist auf Chromosom 8p12 lokalisiert, eine Region die in Tumorerkrankungen häufig Deletionen aufweist, unter anderem im Brust- und Harnblasenkrebs [157-159]. Zudem kann in zahlreichen Tumorentitäten eine Hypermethylierung des *SFRP1*-Promotors beobachtet werden, die mit einem Expressionsverlust

von SFRP1 einhergeht und mit einer schlechten Überlebensprognose von Krebspatienten assoziiert ist [156, 160-162].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Mammakarzinom stellt weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar. Zwar konnte dank kontinuierlich verbesserter Früherkennungs- und Behandlungsmöglichkeiten die Mortalitätsrate in den letzten Jahrzehnten gesenkt werden, jedoch versterben jährlich nach wie vor über 17.000 Frauen alleine in Deutschland an den Folgen eines Brusttumors. Ursächlich für die hohe Mortalität ist unter anderem das oftmalige Auftreten von Resistenzen gegenüber einzelnen Pharmazeutika sowie ein Mangel an effektiven, zielgerichteten Therapien zur Behandlung triple-negativer Tumoren, für die bislang nur die mit schweren Nebenwirkungen verbundene Chemotherapie zur Verfügung steht. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer, zielgerichteter und damit weniger toxischer Therapien für das humane Mammakarzinom. Im Fokus stehen hierbei vor allem Substanzen, die spezifisch tumorrelevante Signalwege und Prozesse inhibieren. Einen möglichen Ansatzpunkt stellt der WNT-Signalweg dar, dessen Deregulation in vielen humanen Tumorentitäten, einschließlich des Mammakarzinoms, beobachtet werden kann und zudem mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert ist. Ursache dieser Deregulation ist nicht zuletzt eine verminderte Expression der Antagonisten dieser Signaltransduktion, zu denen unter anderem DKK3 und SFRP1 gehören.

Ein Verlust der DKK3-Expression konnte bereits in einer Vielzahl an humanen Tumorgeweben, einschließlich des Mammakarzinoms, nachgewiesen werden. Die funktionelle Bedeutung dieses Verlustes für die Entstehung und Progression von Brusttumoren ist jedoch bislang nur unzureichend geklärt. Zwar belegen mehrere Publikationen eine tumorsuppressive Wirkung von DKK3 in humanen Mammakarzinomzellen, jedoch berücksichtigten diese Studien jeweils nicht die Heterogenität der Brustkrebserkrankung. Folglich bestand ein Teilziel dieser Arbeit in der erstmaligen Analyse einer eventuell Subtyp-spezifischen Bedeutung eines DKK3-Verlustes für die Karzinogenese humaner Brusttumoren. Zu diesem Zweck galt es zunächst die DKK3-Expression sowie zusätzlich die Methylierung des *DKK3*-Gens, als möglichen Mechanismus der DKK3-Inaktivierung, in den distinkten molekularen Mammakarzinom-Subtypen zu untersuchen, um putative Subtyp-spezifische Unterschiede aufzudecken. Eine potentielle klinische Nutzbarkeit eines DKK3-Verlustes als prognostischen Marker für einzelnen Subgruppen des humanen Mammakarzinoms sollte mit Hilfe univariater Kaplan-Meier-Überlebensanalysen überprüft werden. Zwecks Evaluierung einer möglicherweise funktionellen Involvierung von DKK3 in die Tumorgenese luminaler und basaler Brusttumoren galt es stabile *gain-of-function*-Zellkulturmodelle zu generieren. Diese

sollten im Rahmen von *in vitro*-Experimenten eingesetzt werden, um putative DKK3-vermittelte Effekte auf fundamentale, während der Entstehung und Progression humaner Brusttumoren veränderte zelluläre Prozesse, wie das Zellwachstum, die Zell-Matrix-Adhäsion sowie die Migration, zu untersuchen. Im Hinblick auf eine mögliche Involvierung eines DKK3-Expressionsverlustes in den komplexen Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) galt es zusätzlich die potentiell durch eine ektopische DKK3-Reexpression hervorgerufene Expressionsänderung klassischer EMT-Marker in den erzeugten stabilen Brusttumor-Modellen zu analysieren. Die im Rahmen dieses Teilvorhabens der vorliegenden Dissertation generierten Daten sollen dazu beitragen, die dem jeweiligen Brustkrebs-Subtypen zu Grunde liegenden molekularen Entstehungs- und Progressionsmechanismen zu entschlüsseln, um auf diese Weise mittelfristig die Entwicklung neuartiger Therapien, insbesondere für Brustkrebserkrankungen mit Resistenzen gegenüber derzeit verfügbaren Therapeutika sowie triple-negative Tumoren, zu ermöglichen.

Die funktionelle Bedeutung eines SFRP1-Verlustes für die Tumorgenese humaner Mammakarzinome konnte bereits in einer vorangegangenen, umfassenden Studie der AG Dahl belegt werden. Auf Basis dieser Studie galt es im Rahmen der vorliegenden Dissertation, in Kooperation mit dem *Lead Discovery Center* (LDC) in Dortmund, niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, deren Wirkungsspektrum dem von SFRP1 entspricht. Diese sogenannten SFRP1-Mimetika sollen der zukünftigen Entwicklung neuartiger Medikamente für die Therapie SFRP1-defizienter Brusttumoren dienen. Sowohl der *Primärscreen* zur Identifizierung der putativen SFRP1-Mimetika als auch ihre Validierung anhand einer WNT-Reporter-Gen-Studie erfolgten im LDC. Zwölf ausgewählte Testsubstanzen sollten nachfolgend am Institut für Pathologie des UKA im Rahmen zusätzlicher Experimente auf ihre Wirkung als spezifische Mimetika der SFRP1-Funktion hin untersucht werden. Zu diesem Zweck galt es sowohl die dosisabhängigen Effekte der potentiellen Testsubstanzen auf das Zellwachstum *SFRP1*-positiver sowie *SFRP1*-negativer Mammakarzinomzellen als auch deren Einfluss auf weitere elementare Tumoreigenschaften, wie eine gesteigerte Koloniebildung und Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Reizen sowie eine erhöhte Zellmotilität zu analysieren. Darüber hinaus sollten die putativen SFRP1-Mimetika anhand von Expressionsanalysen validiert werden. Hierzu galt es zunächst mit Hilfe einer *Microarray*-Analyse Marker-Gene der SFRP1-Wirkung zu identifizieren, um anschließend den konzentrationsabhängigen Einfluss der Testsubstanzen auf die Expression dieser Gene zu messen. Zur Beurteilung der jeweiligen Effekte der Testsubstanzen dienten sowohl bereits publizierte WNT-Signalweg-Inhibitoren als auch die Wirkung einer forcierten SFRP1-Reexpression als Referenz. Die im Zuge dieses Teilvorhabens der vorliegenden Arbeit identifizierten SFRP1-Mimetika sollen zukünftig zur Entwicklung neuartiger Medikamente zur Therapie SFRP1-defizienter Mammakarzinome beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Klinisches Patientenmaterial

2.1.1 Kryokonserviertes Frischgewebe

Die in dieser Dissertation für die *DKK3*-mRNA-Expressionsstudie sowie die Analyse der DNA-Methylierung des *DKK3*-Gens genutzten kryokonservierten Brust-Normal- und Brusttumorgewebe wurden von der RWTH zentralisierten Biobank (RWTH cBMB) der Uniklinik RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Alle Gewebeproben stammten von weiblichen Patientinnen, bei denen zwischen 2010 und 2011 ein primäres Mammakarzinom diagnostiziert worden war und die eine Einverständniserklärung zur Kryokonservierung und Verwendung ihres Gewebes für Forschungszwecke unterzeichnet hatten. Für die Untersuchungen des Brustgewebe-Materials lag zudem ein positives Votum seitens der Ethikkommission der Uniklinik RWTH Aachen (EK-206/09) vor. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Beurteilung des Normal- sowie Tumorepithel-Anteils wurden 6 µm Gewebeschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Nur Mammakarzinomproben mit einem Tumorzellanteil von über 70 % und Brust-Normalgewebeproben mit einem Anteil von über 30 % Brustepithel wurden für die vorliegende Studie genutzt. Die klinisch-pathologischen Parameter des Mammakarzinom-RNA-Kollektivs sind in Tabelle 6-1, die des DNA-Kollektivs in Tabelle 6-3 des Anhangs aufgeführt. Die Tumor-Klassifizierung erfolgte nach dem etablierten TNM-System [23] und der histologische Grad wurde nach dem System von Bloom und Richardson, welches durch Elston und Ellis modifiziert wurde, bestimmt [22]. Für die Subtyp-spezifische Analyse wurden die Tumorproben zusätzlich basierend auf immunhistochemischen (IHC) und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs (FISH)-Daten in die Brustkrebs-Subtypen „Luminal“, „HER2-positiv“ und „TNBC“ (triple-negativer Brustkrebs) unterteilt [37, 163].

2.1.2 Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe

Die *DKK3*-Proteinexpression in humanen Mammakarzinomgeweben wurde durch immunhistochemische Färbung eines bereits beschriebenen TMAs (*Tissue Microarrays*) mit insgesamt 772 Brusttumorproben untersucht [164, 165]. Für 463 dieser Fälle lagen auswertbare *DKK3*-Proteinexpressions-Daten sowie Informationen über ER-, PR- und HER2-Status zur Klassifizierung in die drei Brustkrebs-Subtypen „Luminal“, „HER2-positiv“ und

„TNBC“ vor. Die klinisch-pathologischen Parameter des TMA-Kollektivs sind in Tabelle 6-2 des Anhangs aufgeführt. Die Tumor-Klassifizierung erfolgte nach dem etablierten TNM-System [23] und der histologische Grad wurde nach dem System von Bloom und Richardson, welches durch Elston und Ellis modifiziert wurde, bestimmt [22]. Die Untersuchung der DKK3-Proteinexpression in humanen nicht malignen Brustgewebeproben erfolgt durch immun-histochemische Färbung einzelner Gewebeschnitte. Die Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) Brust-Normalgewebe entstammen dem diagnostischen Archiv des Instituts für Pathologie der RWTH Aachen. Alle Patientinnen hatten eine schriftliche Einverständniserklärung zur Lagerung und Verwendung ihres Gewebes für Forschungszwecke unterzeichnet. Für die Untersuchungen des Brustgewebe-Materials lag zudem ein positives Votum seitens der Ethikkommission der Uniklinik RWTH Aachen (EK-206/09) vor.

2.1.3 *In silico* Mammakarzinom-Kollektiv

Um die eigenständig generierten *DKK3*-mRNA-Expressionsdaten zu validieren wurden *Illumina-HiSeq*-Expressionsdaten für *DKK3* sowie die korrespondierenden klinischen Daten für 791 primäre PAM50-klassifizierte Brustkrebsfälle und 113 Normalgewebe einer unabhängigen Studie genutzt [166]. Zur Validierung der eigenständig generierten DNA-Methylierungsdaten des *DKK3*-Gens dienten die *Illumina-Infinium450k*-Methylierungsdaten für *DKK3* von 497 primären PAM50-klassifizierten Brustkrebsfällen und 84 Normalgeweben derselben Studie. Sowohl die *Illumina-HiSeq*-Expressionsdaten als auch die *Illumina-Infinium450k*-Methylierungsdaten für *DKK3* wurden über das *cBio Cancer Genomics Portal* (<http://cbioportal.org>, [167]) bezogen, während die korrespondierenden klinischen Parameter über das „*The Cancer Genome Atlas*“ Daten-Portal (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaDownload.jsp>) verfügbar sind. Die klinisch-pathologischen-Parameter des *in silico*-Kollektivs für die *DKK3*-mRNA-Expressionsstudie sind zusätzlich in Tabelle 6-4, die des *in silico*-Kollektivs für die *DKK3*-Gen-Methylierungsstudie in Tabelle 6-5 des Anhangs aufgeführt.

2.2 Bakterienstamm

Zwecks Plasmid-Vermehrung wurden kompetente Zellen des Bakterienstamms *Escherichia coli* JM83 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) genutzt.

2.3 Humane Mammakarzinom-Zelllinien

Die in dieser Studie verwendeten humanen Mammakarzinom-Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, US) bezogen und gemäß den Angaben des Anbieters kultiviert. Alle Zelllinien wurden regelmäßig mit Hilfe des PCR-basierten *Venor[®] GeM Mycoplasma Detection Kit* (Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland) auf Mycoplasmen-Infektionen hin überprüft. Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Verwendete humane Mammakarzinom-Zelllinien und ihre Ursprungsgewebe

Zelllinie	Ursprungsgewebe [168]
BT-20	Invasiv-duktales Karzinom, Primärtumor
BT-474	Invasiv-duktales Karzinom, Primärtumor
BT-549	papilläres invasiv-duktales Karzinom, Primärtumor
HCC1937	duktales Karzinom, Primärtumor
Hs578T	Invasiv-duktales Karzinom, Primärtumor
MCF-7	Invasiv-duktales Karzinom, pleurale Effusion
MCF-10A	benigne Veränderung der Brust
MCF-12A	benigne Veränderung der Brust
MDA-MB-231	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-415	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-436	Invasiv-duktales Karzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-453	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-468	Adenokarzinom, pleurale Effusion
SKBR3	Adenokarzinom, pleurale Effusion
T47D	Invasiv-duktales Karzinom, pleurale Effusion
UACC812	Invasiv-duktales Karzinom, Primärtumor

Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit Einzelklone zweier bereits generierter stabiler *SFRP1*- bzw. *DKK3*-Überexpressions-Zellkulturmodelle genutzt. Diese sind in Tabelle 2-2 zusammen mit den entsprechenden transfizierten Vektoren sowie den Selektiva und den eingesetzten Selektivum-Konzentrationen aufgelistet.

Tabelle 2-2: Verwendete Transfektanden humaner Mammakarzinom-Zelllinien

Zelllinie	Transfizierter Vektor	Selektivum/eingesetzte Konzentration
BT-20 [169]	<i>SFRP1</i> -pEF6/V5-His	Blasticidin / 8 µg/ml
MCF-7 [170]	<i>DKK3</i> -pcDNA3.1/V5-His-TOPO	G418 / 750 µg/ml

2.4 Geräte, Software, Lösungsmittel und Chemikalien

2.4.1 Geräte

Tabelle 2-3: Geräte

Gerät	Hersteller
Axiovert 200 Mikroskop	Zeiss, Jena
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Brutschrank (20 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 37 °C)	Bio-Rad, München
CASY® Cell Counter und Analyzer	OLS OMNI Life Science, Bremen
Digital pH-Meter	Schärfe System, Reutlingen
Einfrierhilfe Mr. Frosty	Thermo Scientific, USA
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Wesseling
Eppendorfzentrifuge 5415C (Rotor: UE001)	Eppendorf, Wesseling
Gel-Dokumentationseinheit	MWG Biotech AG, Ebersberg
Gene Pulser II Electroporation System	Bio-Rad, München
Kryotom HM560	Microm Laborgeräte, Walldorf
Laborwaage	Laborgeräte, Walldorf
LightCycler iQ5	Bio-Rad, München
Megafuge 1.0 (Rotor: BS4402/A)	Sartorius, Göttingen
Microplate-Reader Infinite® 200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
NanoDrop ND1000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
PyroMark Q96 MD Vacuum Prep Tool-Station	Qiagen, Hilfen
Rasterelektronen-Mikroskop ESEM XL 30 FEG	FEI Philips, Eindhoven, Niederlande
Reinraumwerkbank Hera Safe	Hera Safe Heraeus/Kendro, Düsseldorf
Schüttler MTS4	IKA-Werke, Staufen
Sputter Coater EM SCD500	Leica, Wetzlar, Germany
Stromversorgungsgerät	Gibco / BRL, Eggenstein
Thermoblock DRI-BlockDB-2A	Techne, Burkhardtsdorf
Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling
Tischzentrifuge 4515D	Eppendorf, Wesseling
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS HD2070,	Bandelin electronic, Berlin
UV-Leuchttisch TFX	Vilber Lourmat, Frankreich
Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
X-Cell SureLock™ Mini-Cell System	Invitrogen, Karlsruhe

2.4.2 Software und Datenbanken

Tabelle 2-4: Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Webadresse/Hersteller
ADOBE Photoshop CS2	Adobe Systems, USA
Affymetrix Transcriptome Analysis Console	Affymetrix, Santa Clara CA, USA
analysIS pro	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
cBioPortal Datenbank	http://www.cbioportal.org/public-portal/
ENSEMBL Datenbank	http://www.ensembl.org
Genomatix Datenbank	http://www.genomatix.de
GeneCards Datenbank	http://www.genecards.org
GOBO-Datenbank	http://co.bmc.lu.se/gobo/
GraphPad Prism 5.0 Gold Statistik Software	GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA
ImageJ	National Institute of Health, USA
Kaplan-Meier-Plotter Datenbank	http://kmplot.com/analysis/
Methprimer Online Portal	http://www.urogene.org/methprimer
Primer3 Online Portal	http://primer3.ut.ee/
PUBmed Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
PSQ Assay Design Software	Qiagen, Hilden
Pyro Q-CpG Software	Qiagen, Hilden
SPSS Statistics 20.0	IBM Cooperation, Armonk, NY, USA
The Human Protein Atlas Datenbank	http://www.proteinatlas.org/
UCSC Genome Cancer Browser Datenbank	https://genome-cancer.ucsc.edu/

2.4.3 Lösungsmittel

Tabelle 2-5: Lösungsmittel

Chemikalie	Hersteller
Chloroform	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	VWR, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.4.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, insofern nicht anders aufgeführt, in der reinsten erwerbbaeren Form verwendet und, falls in der folgenden Tabelle nicht aufgelistet, von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2-6: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Cambrex, Rockham, ME, USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Antibody Diluent	Dako Corporation, Glostrup, Dänemark
Bacto-Agar	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Invitrogen, Karlsruhe
Blasticidin	Roth, Karlsruhe
DAB Quanto	Dako Corporation, Glostrup, Dänemark
Diithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FKS)	Seromed Biochrom, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
FuGENE HD Transfektions-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Genitacin (G418)	Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin-Sepharose High Performance Beads	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Gluteraldehyd	Agar Scientific, Wetzlar
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
Hexamethyldisilazane	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Cölbe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Phosphat-Puffer	Merck, Darmstadt
Penicillin; Streptomycin	Biochrom, Berlin
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Precision Plus Protein™ Standard All Blue	Bio-Rad, München
Staurosporin	Selleckchem, Houston, TX, USA
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Niederlande
Tris	Trichostatin
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Ultravision Hydrogen Peroxidase Block	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen
Zitronensäure	Fluka, Neu-Ulm

2.5 Puffer und Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden falls notwendig sterilfiltriert oder autoklaviert. Nicht aufgeführte Puffer und Lösungen sind entweder im Methodenteil beschrieben oder wurden kommerziell erworben.

Tabelle 2-7: Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10×PBS-Puffer (pH 7,5)	160 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 M NaCl
10×TBS-Puffer (pH 7,6)	500 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl
Natriumcitrat-Puffer	10 mM Natriumcitrat, 0,05 % Tween 20, pH 6,0
DEPC-H ₂ O	0,1 % (w/v) DEPC in H ₂ O, ü. N. gerührt, autoklaviert
Eosin-Lösung	1 g Eosin in 100 ml H ₂ O
Lysispuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 15 % (w/v) Saccharose, 2g/ml Lysozym, 0,2 mg/ml RNase, 0,1 mg/ml BSA
Mayers-Hämalaun-Lösung	1 g Hämatoxylin, 200 mg Na-Iodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure, in 1 l H ₂ O
Methylenblau-Lösung	0,1 % (w/v) Methylenblau in 100 % Ethanol
Tris-Puffer (pH 7,6)	10 mM Tris-HCl, mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen

Tabelle 2-8: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10×TBE-Puffer	890 mM Tris, 20 mM EDTA, 890 mM Borsäure (pH 8,3)
5×Ladepuffer	2,5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 90 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 0,01 % Xylencyanol
Agarose-Lösung	2 % (w/v) Agarose in 1×TBE-Puffer
Ethidiumbromid-Lösung	350 µg Ethidiumbromid in 1 l 1×TBE-Puffer

Tabelle 2-9: Puffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1×MOPS-Laufpuffer	50 ml NuPage 20×MOPS-Laufpuffer (Invitrogen) in 950 ml H ₂ O
Blocking-Lösung	5 % (w/v) Milchpulver in 1×TBS, 0,5 % Tween 20
NuPage-Probenpuffer	1 ml 4×NuPage-SDS Puffer (Invitrogen), 200 µl 1 M DTT, ad. 2,8 ml ddH ₂ O
Ponceau S-Lösung	0,5 g Ponceau S in 1 ml Eisessig auf 100 ml mit dH ₂ O aufgefüllt
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 250 mM NaCl, 2 % (v/v) NP-40, 0,1 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 2,5 mM EDTA
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol ad. 1 l ddH ₂ O
Waschpuffer	1×TBS, 0,5 % Tween 20

Tabelle 2-10: Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10× PBS-Puffer (pH 7,5)	160 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 M NaCl
Kristallviolett-Lösung	0,25 % (w/v) Kristallviolett in 10 % Formaldehyd / 80 % Methanol / 10 % H ₂ O
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in 1×PBS

2.6 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2-11: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium und Zusätze
BT-20, MDA-MB-231, MDA-MB-463	DMEM 1,0 g/l Glukose; 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin
BT-474	DMEM 4,5 g/l Glukose; 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 10 µg/ml Insulin, 1 mM Natriumpyruvat
BT-549, MDA-MB-415, MDA-MB-436	RPMI 1640, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 5 µg/ml Insulin
HCC-1937, MDA-MB-453, T47D	RPMI 1640, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin
Hs-578T	DMEM 1,0 g/l Glukose; 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 10 µg/ml Insulin, 1 mM Natriumpyruvat
MCF-7	RPMI 1640, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 10 µg/ml Insulin, 1 mM Natriumpyruvat
MCF-10A	DMEM/F-12, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 10 µg/ml Insulin
MCF-12A	DMEM 1,0 g/l Glukose; 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 10 µg/ml Insulin, 20 ng/ml EGF, 0.5 mg/ml Hydrocortison
SKBr3	McCoys5A, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 20 ng/ml EGF, 0.5 mg/ml Hydrocortison
UACC812	RPMI 1640, 20 % FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 20 ng/ml EGF

2.7 Medien für Anzucht von *E. coli*

Tabelle 2-12: Zusammensetzung der Medien für die Bakterienkultivierung

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt; ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,4)
LB-Agar	10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 15 g Bacto-Agar; ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,4)
SOC-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose; ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,0)

2.8 Antikörper

Tabelle 2-13: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Klonalität	Wirtsspezies	Hersteller
DKK3 (AF1118)	polyklonal	Ziege	R&D Systems
β-Aktin (A5441)	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich

Tabelle 2-14: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Klonalität	Wirtsspezies	Hersteller
Anti-Maus/HRP (P0447)	polyklonal	Ziege	Dako
Anti-Ziege/HRP (P0449)	polyklonal	Kaninchen	Dako

2.9 Inhibitoren

Tabelle 2-15: Verwendete Inhibitoren

Bezeichnung	Zielstruktur des Inhibitors	Hersteller
ICG-001	β -Catenin-CBP-Interaktion [114]	Selleckchem
WIKI4	Auto-ADP-Ribosylierung der Tankyrase 1/2 [113]	Abcam
iCRT-14	β -Catenin-TCF-Interaktion [115]	Tocris Bioscience
WAY-316606	SFRP1 [171]	Chemscene

2.10 Molekularbiologische und Proteinchemische Kits und Reagenzien

Tabelle 2-16: Molekularbiologische und proteinchemische Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Kit	Applied Biosystems, CA, USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific Fremont, CA, USA
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
IQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
Mycoplasmen-Detektions PCR Kit™	Minevra Biolabs, Berlin
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Machery-Nagel, Düren
PyroMark PCR Kits	Qiagen, Hilden
PyroMark Gold Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
ZR DNA Methylation Kit	Zymo Research, Bad Homburg

2.11 Oligonukleotide

Tabelle 2-17: Oligonukleotide zum Nachweis der stabilen genomischen Plasmid-Integration

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T _A [°C]	Zyklen	Produkt [bp]
<i>DKK3</i> F	ACAGCCACAGCCTGGTGTA	61	35	313
<i>DKK3</i> R	AGACCGAGGAGAGGGTTAGG			
<i>Leer</i> F	GCTCGGATCCACTAGTCCAG	62	35	156
<i>Leer</i> R	ATGACCGGTACGCGTAGAAT			

T_A: Anlagerungs-Temperatur, bp: Basenpaare, F: *Forward*, R: *Reverse*

Tabelle 2-18: Oligonukleotide für die *Real-Time* PCR

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T _A [°C]	Zyklen	Produkt [bp]
<i>BMPER</i> F	GGTGAAGTCCTCCAGATTCCA	60	40	225
<i>BMPER</i> R	TTGAGGAGTCGAAGGGGTTG			
<i>Claudin 1</i> F	CTATGACCCTATGACCCCAGT	60	40	158
<i>Claudin 1</i> R	TTGGATAGGGCCTTGGTGTT			
<i>COL12A1</i> F	CAGAATAACGGTGGACCCTACA	60	40	285
<i>COL12A1</i> R	CTCCAAGAGCCATCCACGAG			
<i>DKK3</i> F	AAGGCAGAAGGAGCCACGAGTGC	60	40	182
<i>DKK3</i> R	GGCCATTTTGGTGCAGTGACCCCA			
<i>E-Cadherin</i> F	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG	60	40	200
<i>E-Cadherin</i> R	GTGTATGTGGCAATGCGTTC			
<i>FRAS1</i> F	GTGTGCTCTTGCAATCATGG	60	40	245
<i>FRAS1</i> R	GGCTGACACTGAGCTGTGAA			
<i>GAPDH</i> F	TCACTTTATGGTCTGATCCTGAAC	60	40	108
<i>GAPDH</i> R	AATGAAGGGGTCATTGATGG			
<i>IGFBP5</i> F	CTACCGCGAGCAAGTCAAGA	60	40	321
<i>IGFBP5</i> R	CCGACAAACTTGGACTGGGT			
<i>IL1R1</i> F	TTGATGTTTCGTCCCTGTCCT	60	40	295
<i>IL1R1</i> R	TCTCCTGCAACGGGTAGTTT			
<i>KCNK2</i> F	GTTTCCCATCTTCGCTTCGC	60	40	335
<i>KCNK2</i> R	AATGCTTTGAACACGGTGCC			
<i>Occludin</i> F	CTATAAATCCACGCCGGTTC	60	40	243
<i>Occludin</i> R	GGTGGATATTCCCTGATCCA			
<i>PCDH10</i> F	TACGGACACTGAGCACAACC	60	40	274
<i>PCDH10</i> R	ACGGTTGGTGGCATCATGAT			
<i>PLS3</i> F	ACAGCAACGGATTTCATTTGTGA	60	40	291
<i>PLS3</i> R	TGAAGTTCCACCCAGAGCAC			
<i>SFRP1</i> F	AGATGCTTAAGTGTGACAAGTTCC	60	40	130
<i>SFRP1</i> R	TCAGATTTCAACTCGTTGTCACAG			
<i>SLC6A14</i> F	CTGGAGTGTTCCTACTGGGACA	60	40	353
<i>SLC6A14</i> R	GGCTGATAAATTTCACTGCCGT			
<i>Snail 1</i> F	CTGGGTGCCCTCAAGATG	60	40	129
<i>Snail 1</i> R	AGAAGGGCTTCTCGCCAGT			
<i>Vimentin</i> F	TCCACGAAGAGGAAATCCAG	60	40	314
<i>Vimentin</i> R	TTCCAGGGACTCATTGGTTC			
<i>ZO-1</i> F	GCAAAAATTACAATTAGAAGGAAGAA	60	40	300
<i>ZO-1</i> R	TCGAAGACCATATTCTTCATTTTC			

T_A: Anlagerungs-Temperatur, bp: Basenpaare, F: *Forward*, R: *Reverse***Tabelle 2-19: Oligonukleotide für die Pyrosequenzierung**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T _A [°C]	Zyklen	Produkt [bp]
<i>DKK3</i> F	TTTGGGGTTATTTTGTGTG	56	45	93
<i>DKK3</i> R	RAACCRAACTTAACATAAAACC-bio			
<i>DKK3</i> Seq	GGTTATTTTGTGTGTTTGTG			

T_A: Anlagerungs-Temperatur, bp: Basenpaare, F: *Forward*, R: *Reverse*, Seq: Sequenzierung; bio: Biotinyliert

Tabelle 2-20: Oligonukleotide für Sanger-Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
<i>DKK3</i> Seq1	GGAGACCCAAGCTGGCTAGT
<i>DKK3</i> Seq2	ACACAGACACGAAGGTTGGAA
<i>DKK3</i> Seq3	TGCTGTGCCTTCCAGAGAG

Seq: Sequenzierung

2.12 *DKK3*-Überexpressionsvektor

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Generierung der stabilen *DKK3*-Überexpressionsmodelle wurde der pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektor der Firma Invitrogen (Karlsruhe) genutzt. Der 5,5 kb große Vektor (Abbildung 2-1) enthält die beiden Überexpressions-Promotoren P_{CMV} und T7. Die Selektion prokaryotischer bzw. eukaryotischer Zellen wird über eine Ampicillin-Resistenz-Kassette sowie ein Neomycin-Resistenz-Gen ermöglicht. Die Vollängen cDNA des *DKK3*-Gens war über Restriktionsenzym-Schnittstellen bereits in die *Multiple-Cloning-Site* des Vektors kloniert und stand gemeinsam mit dem C-terminalen V5-Epitop und Hexa-Histidin-Tag unter Kontrolle des CMV-Promotors. Das klonierte *DKK3*-Vektorkonstrukt wurde freundlicherweise von Bang H. Hoang, New York, zur Verfügung gestellt [136].

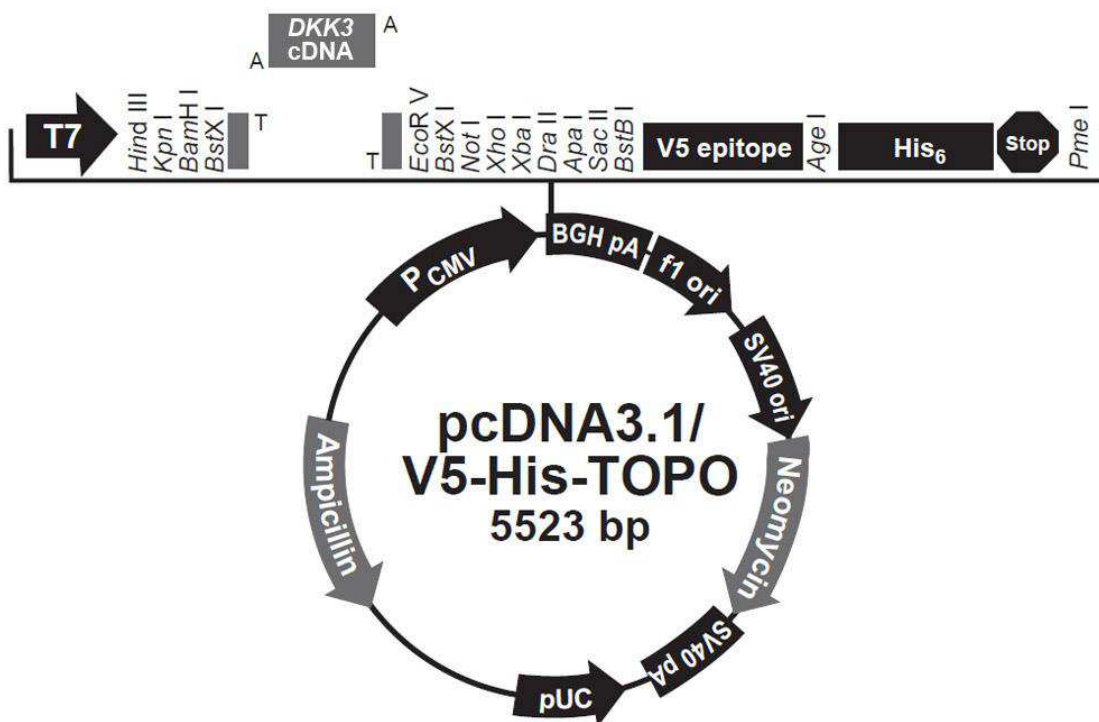


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des *DKK3*-pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektors. Für die Überexpression des *DKK3*-Gens wurde die Vollängen *DKK3*-cDNA über Restriktionsenzym-Schnittstellen in den Vektor kloniert. Das klonierte *DKK3*-Vektorkonstrukt stand für diese Studie bereits zur Verfügung [136].

2.13 Molekulargenetische Methoden

2.13.1 DNA-Isolation aus kryoasserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Die Isolation genomischer DNA aus kryoasservierten Frischgeweben sowie humanen Mammakarzinom-Zelllinien erfolgte mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini Kits* (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Zwecks Extraktion genomischer DNA aus Kryogewebe wurden zehn Gewebeschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt (siehe Abschnitt 2.14.1) und diese anschließend in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß mit 25 µl Proteinase K sowie 180 µl ATL-Puffer versetzt. Die Zellyse erfolgte ü. N. bei 56 °C und 800 rpm im Thermomixer. Zwecks Verdau ko-präzipitierter RNA wurden dem Ansatz am nächsten Tag 20 U RNase A in 180 µl ATL-Puffer hinzugefügt und dieser für 2 min bei RT inkubiert. Die Inaktivierung der RNase erfolgte durch einen Inkubationsschritt bei 70 °C für 10 min. Zwecks Präzipitation der DNA wurden im Anschluss 200 µl reiner EtOH hinzugefügt und der Ansatz auf eine QIAamp-Säule geladen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 6.000 x g wurde die an der Säulen-Matrix gebundene DNA zweimalig gewaschen und anschließend in 50 µl eines auf 70 °C erwärmten TRIS-Puffers (10 mM; pH 7,6) eluiert. Zur Isolation genomischer DNA aus humanen Zelllinien wurden 5 x 10⁶ Zellen trypsiniert, pelletiert und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 20 µl Proteinase K, 8 µl RNase A (50 mg/ml) sowie 200 µl AL-Puffer mit anschließender Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 56 °C. Die folgende DNA-Extraktion wurde unter identischen Bedingungen wie die DNA-Isolation aus humanem Frischgewebe durchgeführt. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.13.2 Gesamt-RNA-Isolation aus kryoasserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Die Isolation von Gesamt-RNA aus humanem, kryokonservierten Frischgewebe sowie Mammakarzinom-Zelllinien erfolgte unter Verwendung von TRIzol®-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben. Zwecks Extraktion der RNA aus Kryogewebe wurden zehn Gewebeschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt (siehe Abschnitt 2.14.1) und diese in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß mit 1 ml TRIzol®-Reagenz homogenisiert. Zur RNA-Isolation aus humanen Mammakarzinomzellen wurde jeweils 1 ml TRIzol®-Reagenz pro 5x10⁵ Zellen verwendet. Die Zellyse erfolgte jeweils durch eine 5-minütige Inkubation des Kryogewebe-/ Zellmaterials in TRIzol®-Reagenz bei RT. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz mehrfach invertiert, gefolgt von einer erneuten 3-minütigen Inkubation bei

RT. Die anschließende Zentrifugation des Ansatzes für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C führte zur Trennung einer roten, organischen (unten) von einer klaren, wässrigen Phase (oben). Die RNA-haltige klare Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der RNA mit 500 µl Isopropanol versetzt. Der 10-minütigen Inkubation folgte die erneute Zentrifugation des Ansatzes für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C sowie ein Waschschriff mit 1 ml 75 %igen EtOH. Nach vollständigen Verdampfen des EtOHs konnte das RNA-Pellet in DEPC-H₂O resuspendiert und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

2.13.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

DNA- sowie RNA-Lösungen wurden mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA) auf ihre Konzentration sowie Reinheit hin überprüft. Das zugrundeliegende Prinzip der Konzentrationsmessung beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz und nutzt die spezifische maximale Extinktion von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Über die zusätzliche Messung der Lichtabsorption bei $\lambda = 280$ nm, dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäurereste, war es zudem möglich den Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösungen zu bestimmen. Der Quotient aus E₂₆₀ nm und E₂₈₀ nm beträgt im Falle einer reinen DNA-Lösung 1,8 und bei einer reinen RNA-Lösung 2,0. Zwecks Messung von DNA- sowie RNA-Lösungen wurde das Spektralphotometer zunächst mit dem jeweiligen Elutionsmittel kalibriert und anschließend 2 µl der zu messenden Lösung eingesetzt.

2.13.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die enzymatische reverse Transkription von mRNA zu cDNA erfolgte unter Verwendung des *Reverse Transcription Systems* der Firma Promega (Mannheim) und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Synthese der cDNA wurde 1 µg Gesamt-RNA in 8,9 µl DEPC-Wasser vorgelegt und zwecks Denaturierung von Sekundärstrukturen für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 11,1 µl des Reaktionsmixes (siehe Tabelle 2-21) wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert, so dass die im Reaktionsmix enthaltenen Oligonukleotide an die RNA hybridisieren konnten. Im Anschluss erfolgte die Synthese der cDNA mit Hilfe des Enzyms AMV-Reverse-Transkriptase bei 42 °C für 15 min. Das Enzym wurde abschließend durch eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert. Bei vollständiger enzymatischer Umwandlung ergab sich so pro 1 µg eingesetzter mRNA eine theoretische cDNA-Endkonzentration von 10 ng/µl. Die synthetisierte cDNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 2-21: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen [μl]
MgCl ₂ [25 mM]	4
10 x Reverse Transkriptase Puffer	2
dNTP-Mix [je 10 mM]	2
RNase-Inhibitor [40 U/μl]	0,5
Oligo-dT-Nukleotide [0,5 μg/μl]	1
Hexamer-Oligonukleotide [0,5 μg/μl]	1
AMV-Reverse-Transkriptase [25 U/μl]	0,6

2.13.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1986 von K.B. Mullis entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) beruht auf dem Prinzip der enzymatischen Amplifikation eines beliebigen DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-*Primern*, welche gegenläufig an die beiden komplementären Stränge der DNA gebunden sind [172]. Eine hitzestabile DNA-Polymerase, in diesem Fall die *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, katalysiert die Synthese des neuen DNA-Stranges durch die Anlagerung von Nukleotiden (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) an die freie 3'-Hydroxylgruppe der *Primer*. Die Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes sind in Tabelle 2-22 aufgelistet.

Tabelle 2-22: Zusammensetzung einer Standard-PCR

Komponente	Volumen [μl]
<i>GoTaq Flexi</i> Puffer [5×]	5
MgCl ₂ [25 mM]	1,5
dNTPs [jeweils 10 mM]	0,5
<i>Primer Forward</i> [10 μM]	1
<i>Primer Reverse</i> [10 μM]	1
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/μl]	1
DNA- <i>Template</i> [1-10 ng/μl]	1
Ad 25 μl Nuklease-freies ddH ₂ O	14

Ein PCR-Amplifikationszyklus verläuft in drei Schritten: Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen des PCR-Ansatzes auf 95 °C denaturiert. Durch Abkühlen auf 50 - 60 °C hybridisieren die *Primer* an die nun vorliegende Einzelstrang-DNA. Im Anschluss erfolgt die Elongation des zum Matrizenstrang komplementären Nukleotidpolymers bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Typischerweise besteht ein PCR-Reaktionsverlauf aus 30 bis 40 dieser Zyklen. Unter optimalen Bedingungen verläuft die DNA-Amplifikation auf diese Weise exponentiell (2^n). Häufig kommt es jedoch zur Beeinträchtigung der PCR-Effizienz durch Verunreinigungen des Probenmaterials. Das Temperaturprofil einer Standard-PCR mit den oben erläuterten Zyklusschritten ist in Tabelle 2-23 dargestellt.

Tabelle 2-23: Temperaturprofil einer Standard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1 x
Denaturierung	95	30 sec	
Primer-Hybridisierung	50-60	30 sec	30-40 x
Elongation	72	45 sec	
Finale Elongation	72	5 min	1x

2.13.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Tatsache, dass sich geladene Moleküle innerhalb eines elektrischen Feldes zur Elektrode mit entgegengesetzter Ladung bewegen (Elektrophorese). Die Laufgeschwindigkeit der negativ-geladenen DNA-Moleküle durch das als Molekularsieb fungierende Agarose-Gel zur Anode korreliert dabei mit ihrem Molekulargewicht, was eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente ermöglicht.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte abhängig von den zu separierenden Molekülgrößen in einem 0,5 – 3 %igen Agarosegel bei einer angelegten Feldstärke von 5 V/cm. Zuvor wurde das Gel zunächst mit einem Größenstandard sowie jeweils 12 - 16 µL der mit 5x Ladepuffer versetzten DNA-Lösungen beladen. Als Laufpuffer diente Ethidiumbromid-haltiger (0,5 µg/ml) 1xTBE-Puffer. Der ebenfalls im Agarosegel enthaltene Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNA, so dass die DNA-Fragmente nach ihrer Auftrennung im Agarosegel mit Hilfe eines UV-Transilluminators visualisiert werden konnten.

2.13.7 Semiquantitative *Real-Time* PCR

Die erstmalig 1992 von Higuchi *et al.* beschriebene semiquantitative *Real-Time* PCR baut auf dem Prinzip einer konventionellen PCR auf, ermöglicht jedoch über eine Fluoreszenzmessung die Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit (engl. *Real-Time*) [173]. Hierzu werden dem *Real-Time* PCR-Reaktionsansatz entweder FRET-Sonden oder interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie das hier verwendete *SYBR Green I*, zugegeben. Frei in Lösung vorliegend weist dieser Farbstoff nur eine geringe Fluoreszenz auf, die jedoch bei Einlagerung in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix stark ansteigt. Über die Messung der Fluoreszenzzunahme nach jedem Amplifikationszyklus lässt sich auf diese Weise bei fortlaufender Messung Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge eines spezifischen Genproduktes (*cDNA-Template*) in einer Probe ziehen. Im Rahmen dieser Arbeit diente die

semiquantitative *Real-Time* PCR der Messung von Expressionsunterschieden in humanen Gewebeproben sowie Mammakarzinom-Zelllinien. Zu diesem Zweck wurde der *iQ5 SYBR Green Supermix* der Firma Bio-Rad den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die Zusammensetzung eines *Real-Time* PCR-Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2-24 angegeben.

Tabelle 2-24: Zusammensetzung eines *Real-Time* PCR-Reaktionsansatzes

Komponente	Volumen [μl]
<i>iQ SYBR Green Supermix</i> [2x]	10
cDNA-Template [10 ng/μl]	1
Primer Forward [10 μM]	0,5
Primer Reverse [10 μM]	0,5
Ad 20 μl Nuklease-freies ddH ₂ O	8

Die Expressionsanalyse eines Zielgens mittels *Real-Time* PCR erfolgte nach Isolation der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben oder Zelllinien und der anschließenden Umwandlung der darin befindlichen mRNA in cDNA, am *Light Cycler iQ5* (Bio-Rad). Jede Probe wurde dabei in einem Dreifachansatz gemessen. Zwecks Normierung der Zielgen-Expression wurde ebenfalls die Expression des ubiquitär exprimierten Haushalts-Gens *Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) bestimmt. Um mögliche Kontaminationen auszuschließen, diente ddH₂O bei jedem PCR-Lauf als Negativkontrolle. Das Temperaturprofil einer typischen *Real-Time* PCR ist in Tabelle 2-25 aufgelistet.

Tabelle 2-25: Temperaturprofil einer typischen *Real-Time* PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung und Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	5 min	1 x
Denaturierung	95	15 sec	30-40 x
Primer-Hybridisierung	60	15 sec	
Elongation	72	20 sec	
Finale Elongation	72	5 min	1 x
Schmelzkurvenanalyse	40-95	10-20 min	1 x

Quantifizierung der Gen-Expression mittels $\Delta\Delta CT$ -Methode

Während der *Real-Time* PCR folgt die DNA-Amplifikation einem sigmoidalen Kurvenverlauf mit drei Phasen, wie in Abbildung 2-2 dargestellt [174]. Zunächst liegt das durch die Interkalation von *SYBR Green I* bedingte Fluoreszenzsignal der DNA-Amplifikate noch unterhalb des Hintergrundrauschens, so dass sich ein linearer Kurvenverlauf darstellt. Der PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet wird *Cycle-Threshold* (CT)-Wert genannt. Dieser Zeitpunkt markiert den Übergang der linearen in die exponentielle Amplifikationsphase. Im Verlauf der PCR-Reaktion kommt es jedoch infolge limitierender Faktoren wie einem Nachlassen der Enzymaktivität oder einem

Primer- sowie Nukleotidmangel zu einer Abnahme der Amplifikationsrate. Die terminale Plateauphase wird erreicht, in welcher die Rate der DNA-Neusynthese immer weiter abnimmt bis sie letztendlich zum Erliegen kommt.

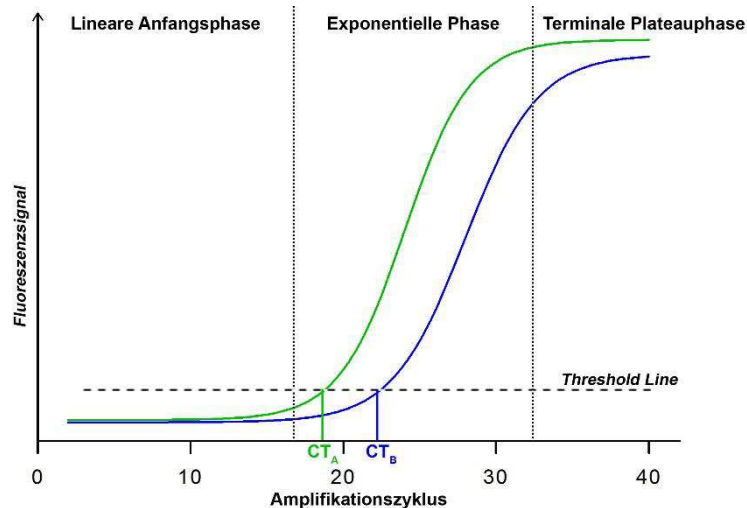


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung eines typischen sigmoidalen Kurvenverlaufs einer Real-Time PCR. Während der linearen Anfangsphase liegt das Fluoreszenzsignal unter dem Hintergrundsignal. Der Zeitpunkt, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant das Hintergrundrauschen überschreitet, wird CT genannt. Im weiteren Verlauf beginnt die exponentielle Phase der DNA-Amplifikation. Unter optimalen Bedingungen kommt es in dieser Phase zu einer exponentiellen Verdopplung der cDNA. Die terminale Plateauphase wird erreicht, wenn aufgrund der Limitierung von dNTPs, *Primern* sowie einer verringerten Aktivität der DNA-Polymerase die DNA-Neusyntheserate zum Erliegen kommt. Die *Threshold Line* markiert den Übergang der linearen in die exponentielle Amplifikationsphase. Mit ihrer Hilfe lässt sich der für jede Probe charakteristische CT-Wert berechnen. Dabei gilt je mehr *Template*-cDNA in der Probe vorhanden war, desto niedriger ist der CT-Wert.

Mit Hilfe des CT-Wertes lassen sich Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der zu amplifizierenden *Template*-cDNA ziehen. Je kleiner dieser Wert ist, umso mehr *Template*-cDNA liegt vor bzw. umso stärker wurde das analysierte Gen in der untersuchten Probe exprimiert. Analysiert wird hier jedoch nicht die absolute Fluoreszenz, sondern die Differenz der Fluoreszenzsignale zu zwei Zeitpunkten innerhalb der exponentiellen Phase. Zwecks Vergleichbarkeit zweier DNA-Proben wird der CT-Wert für ein Zielgen zusätzlich auf den CT-Wert des Referenzgens *GAPDH* normiert:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{GAPDH}}$$

Zum Vergleich zweier Proben A und B wird die Differenz ihrer ΔCT -Werte ermittelt [175].

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT_A - \Delta CT_B$$

Die Berechnung des *Fold Changes* (FC) der differentiellen Zielgen-Expression der Probe A im Vergleich zur Probe B erfolgt gemäß:

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

Schmelzkurvenanalyse

Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* interkaliert in jede doppelsträngige DNA, auch in die unspezifischer PCR-Amplifikate sowie *Primer*-Dimere. Aus diesem Grund war es zwecks Spezifizierung des Fluoreszenzsignals nötig, im Anschluss an die *Real-Time* PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Die Schmelztemperatur wurde über eine kontinuierliche Temperaturerhöhung von 40 °C auf 95 °C bei gleichzeitiger Messung des Fluoreszenzsignals ermittelt. Eine abrupte Abnahme der Fluoreszenz signalisierte die Denaturierung der DNA und die dadurch bedingte Freisetzung des *SYBR Green I*-Farbstoffes. Die für jedes PCR-Produkt spezifische Schmelztemperatur ist abhängig von der Länge der doppelsträngigen DNA-Fragmente sowie der Basenzusammensetzung (GC-Gehalt) des entsprechenden Fragments. Auf diese Weise konnten mögliche unerwünschte PCR-Nebenprodukte detektiert werden. Im Zuge der Etablierung neuer *Primer*-Paare wurde zusätzlich eine gelelektrophoretische Auftrennung zur Begutachtung der Produktgrößen im Gel angeschlossen.

2.13.8 Bisulfit-Konversion genomischer DNA aus humanem Gewebe

5'-Methylcytosin lässt sich bei Verwendung molekularbiologischer Standardmethoden wie einer PCR oder DNA-Sequenzierung nicht von unmethyliertem Cytosin diskriminieren. Um eine spezifische Detektion der DNA-Methylierung zu ermöglichen musste die genomische DNA daher zunächst einer Modifikation unterzogen werden. Das zu diesem Zweck von Frommer *et al.* entwickelte Verfahren der Bisulfit-Konversion [176] nutzt die katalytische Wirkung von Natriumbisulfit (NaHSO_3) um unmethylierte Cytosine hydrolytisch zu Uracil zu desaminieren (Abbildung 2-3). Hingegen bleiben methylierte Cytosine von dieser Behandlung unberührt, so dass sich in der Folge unmethylierte Cytosine, die zu Uracil desaminiert wurden, in der Sequenzabfolge eindeutig von 5'-Methylcytosinen unterscheiden lassen.

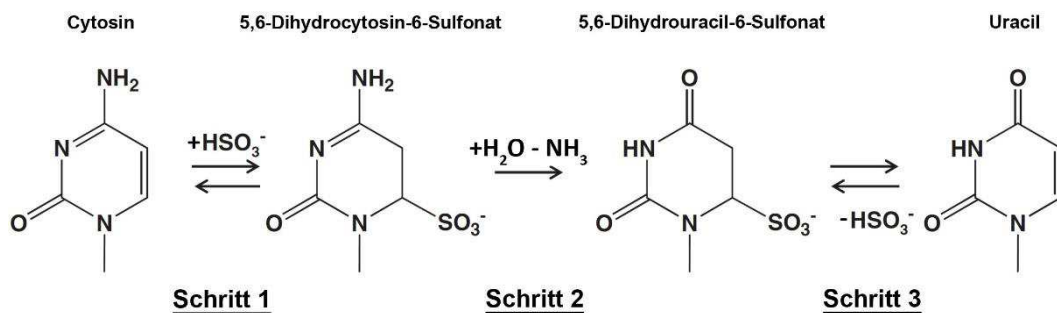


Abbildung 2-3: Prinzip der Bisulfit-Konversion genomischer DNA. Schritt 1: Unmethyliertes Cytosin wird über die Sulfonierung des C6-Atoms zu Cytosinsulfonat umgewandelt. **Schritt 2:** Bei niedrigem pH wird die Aminogruppe am C4-Atom hydrolysiert (Desaminierung). **Schritt 3:** Das

entstandene Uracilsulfonat wird in alkalischem Milieu durch Abspaltung der Sulfonatgruppe zu Uracil umgewandelt (Desulfonierung). Verändert nach [177].

Die Bisulfit-Konversion wurde mit Hilfe des *ZR DNA Methylation Kit* der Firma Zymo Research (Bad Homburg, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. 500 ng genomische DNA wurde jeweils in 45 µl ddH₂O vorgelegt und nach Versetzen mit 5 µl *M-Dilution*-Puffer für 15 min bei 37 °C inkubiert, um eine Denaturierung der DNA zu gewährleisten. Der Zugabe von 100 µl Konversion-Reagenz folgte eine Inkubation der Ansätze für 12 – 16 h bei 50 °C unter Lichtausschluss, während der die Cytosine über die oben beschriebene Reaktion zu Uracilsulfonat desaminiert wurden. Im Anschluss wurden die Ansätze mit je 200 µl *M-Binding*-Puffer versetzt und auf eine Säule aufgetragen. Nach Reinigung der Ansätze durch Zentrifugation sowie einem zusätzlichen Waschschrift erfolgte die Desulfonierung der gebundenen DNA durch Inkubation mit 200 µl des alkalischen *M-Desulfonation*-Puffers für 15 min bei RT. Zwei weiteren Waschschriften folgte die Eluierung der Bisulfit-umgewandelten DNA in 22 µl *M-Elution*-Puffer.

2.13.9 DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung

Mit Hilfe der 1996 am *Royal Institute of Technology* (Stockholm, Schweden) entwickelten Methode der DNA-Pyrosequenzierung lassen sich Genabschnitte präzise und effizient auf ihr Methylierungsmuster hin untersuchen. Neben einer hohen Sensitivität bietet diese Technik gegenüber der methylierungsspezifischen PCR (MSP) den Vorteil, dass sich der Methylierungsgrad einzelner CpG-Dinukleotide in der untersuchten Gensequenz einer Probe quantifizieren lässt. Die Pyrosequenzierung beruht auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese und wurde zuerst von Ronaghi *et al.* beschrieben [178, 179]: An die mittels PCR erzeugten Amplifikate des zu untersuchenden Genabschnitts lagert sich zunächst der Sequenzier-*Primer* an. Bei Verlängerung des neusynthetisierten Stranges durch die DNA-Polymerase erfolgt bei jedem Einbau eines neuen Nukleotids die Freisetzung von Pyrophosphat (PPi), welches wiederum eine enzymkatalysierte Reaktionskaskade aktiviert. Als Folge entsteht ein detektierbares Lichtsignal, dessen Signalstärke direkt proportional ist zur Anzahl der inkorporierten Nukleotide. Nicht-komplementäre Nukleotide werden nicht inkorporiert und kontinuierlich mit Hilfe des Enzyms Apyrase degradiert. Auf diese Weise lässt sich über die kontrollierte Injektion der einzelnen Nukleotide zur Sequenzier-Reaktion die Sequenz des zu untersuchenden Genabschnitts ablesen (siehe Abbildung 2-4).

Zur Analyse der Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide wird eine kombinierte Anwendung aus einer DNA-Bisulfit-Konversion (siehe Abschnitt 2.13.8) und der oben beschriebenen Pyrosequenzierung genutzt [180]. Die Bisulfit-behandelte DNA wird in einer vorgelagerten PCR amplifiziert, bei der das durch die Transversion unmethylierter Cytosine

entstandene Uracil durch Thymin ausgetauscht wird. In der nachfolgenden Sequenzierung wird durch die spezifische Abfolge injizierter Nukleotide der Methylierungsgrad der einzelnen CpG-Dinukleotide bestimmt: Während ein Lichtsignal nach dCTP-Zugabe auf eine ursprünglich methylierte Cytosin-Base hinweist, deutet eine Signal-Detektion bei Injektion von dTTP auf ein ursprünglich unmethyliertes Cytosin hin.

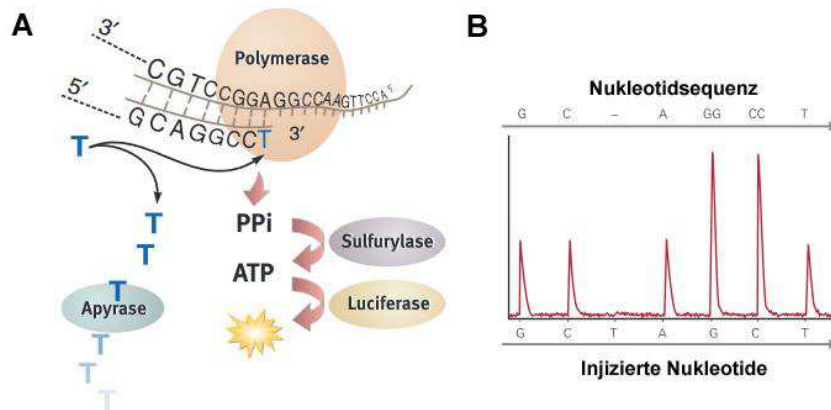


Abbildung 2-4: Prinzip der Pyrosequenzierung. (A) Während der Verlängerung des neusynthetisierten Stranges erfolgt bei jedem Einbau eines Nukleotids die Freisetzung von Pyrophosphat (PPi). Dieses wird über eine Sulfurylase zu ATP umgesetzt, welches wiederum als Substrat der Luciferase fungiert. Die entstehende Lichtemission kann detektiert werden und ist proportional zur Anzahl der inkorporierten Nukleotide. Nicht-incorporierte Nukleotide werden über eine Apyrase degradiert. Über die gezielte Injektion der Nukleotide zur Sequenzier-Reaktion lässt sich der zu untersuchende Genabschnitt sequenzieren. (B) Auf der Ordinate ist die relative Signalstärke aufgetragen, die bei Injektion der einzelnen Nukleotide (untere Abszisse) detektiert wird. Auf der oberen Abszisse ist die daraus ermittelte Nukleotidsequenz aufgetragen. Verändert nach [181].

DNA-Amplifikation für die Pyrosequenzierung

Für die Pyrosequenzierung musste die Bisulfit-behandelte genomische DNA zunächst in einer PCR-Reaktion unter Verwendung des *PyroMark* PCR Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben amplifiziert werden. Die *Prä-Pyro*-PCR diente neben der Vervielfältigung der zu untersuchenden Gensequenz auch dem Austausch des durch die Transversion unmethylierter Cytosine entstandenen Uracils durch Thymin. Die in der PCR eingesetzten *Primer* wurden mit Hilfe der *PSQ Assay Design* Software der Firma Qiagen (Hilden) abgeleitet. Je nach Sequenzier-Richtung lag der *Sense* bzw. *Anti-sense-Primer* am 5'-Ende biotinyliert vor, um im Folgenden die Einzelstrangaufftrennung zu ermöglichen. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie das verwendete Temperatur-Profil der PCR-Reaktion ist in Tabelle 2-26 bzw. Tabelle 2-27 angegeben.

Tabelle 2-26: Zusammensetzung einer *Prä-Pyro-PCR*

Komponente	Volumen [μ l]
Prä-PCR-Mix [5x]	12,5
<i>Primer forward</i> [10 μ M]	0,5
<i>Primer reverse</i> [10 μ M]	0,5
<i>Coral Load</i> Konzentrat	2,5
DNA-Template [10 ng/ μ l]	1
auf 25 μ l ddH ₂ O auffüllen	8

Tabelle 2-27: Temperaturprofil einer *Prä-Pyro-PCR*

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung und Aktivierung der DNA-Polymerase	95	15 min	1 x
Denaturierung	95	30 sec	45 x
<i>Primer</i> -Hybridisierung	56	30 sec	
Elongation	72	30 sec	
Finale Elongation	72	30 sec	1x

Um die Effizienz und Spezifität des amplifizierten Produktes zu kontrollieren, wurden im Anschluss an die *Prä-Pyro-PCR* 2 μ l jeder Probe mit Hilfe eines Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt und begutachtet.

DNA-Einzelstrangpräparation und Pyrosequenzierung

Zwecks Pyrosequenzierung sowie DNA-Einzelstrangpräparation aus den Amplifikaten der *Prä-Pyro-PCR* wurde das *PyroMark Gold Kit* (Qiagen) gemäß Herstellerangaben verwendet. Alle Puffer des Kits mussten vor Verwendung zunächst auf RT erwärmt werden. Je 20 μ l des *Prä-Pyro-PCR*-Ansatzes wurden zusammen mit 20 μ l Pyrophosphat-freiem HPLC-Wasser (Merck), sowie 35 μ l *PyroMark Binding-Puffer* und 5 μ l Streptavidin-Sepharose *High Performance Beads* (GE Healthcare) in die Kavitäten einer *PSQ 96*-Mikrotiterplatte (Qiagen) gegeben und die Lösung anschließend für 5 - 10 min bei 1.400 rpm geschüttelt. Während dieses Prozesses erfolgte die Bindung der Sepharose-Kügelchen an die biotinylierten DNA-Amplifikate, so dass im Folgenden die Präparation der DNA-Einzelstränge an der *PyroMark Q96 MD Vacuum Prep Tool-Station* (Qiagen) ermöglicht wurde. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Filterträger in die Kavitäten der *PSQ 96*-Mikrotiterplatte getaucht und die an die Sepharose-Kügelchen gebundene DNA über Anlegen eines Vakuums an die einzelnen Filterköpfe des Trägers angesaugt. Durch 10-sekündiges Eintauchen der Filterköpfe in die folgenden Lösungen erfolgte die Separierung der DNA-Einzelstränge von anderen Bestandteilen des *Prä-Pyro-PCR*-Ansatzes. Der Filterträger samt angesaugter Sepharose-DNA wurde zunächst in 70 %igen Ethanol gewaschen und im nächsten Schritt die Doppelstrang-DNA mit Hilfe einer 0,2 M NaOH-Lösung denaturiert. Die Entfernung nicht-gebundener Nukleotidstränge sowie störender Reagenzien erfolgte durch Eintauchen in einen Waschpuffer

(Qiagen). Durch Abschalten des Vakuums wurden die an die Sepharose gebundenen DNA-Einzelstränge in die mit *PyroMark Annealing-Puffer* sowie 20 nM Sequenzier-*Primer* befüllten Kavitäten einer *PSQ 96Low*-Sequenzier-Platte überführt. Durch die nachfolgende Inkubation dieser Sequenzier-Ansätze bei 80 °C sowie einer nachfolgenden Abkühlung auf RT wurde die Hybridisierung der Sequenzier-*Primer* an die Einzelstrang-DNA forciert. Anschließend konnte die Sequenzier-Platte in eine spezielle Vorrichtung des *PyroMark Q96 MD* Sequenzierers (Qiagen) eingespannt werden. Vor Beginn der Sequenzierung über die oben beschriebene Enzymkaskade musste zunächst noch eine Kartusche (engl. *Cartridge*) mit den erforderlichen Mengen an Substrat, Enzymen sowie den einzelnen dNTPs beladen werden. Die zugegebene Menge der Reagenzien hing von der jeweiligen Sequenz ab und wurde mit Hilfe der *Pyro Q-CpG™* Software (Qiagen) errechnet, über die ebenso die Erstellung des Sequenzier-Programms sowie die anschließende Auswertung erfolgte.

2.13.10 Transformation in *E. coli*

Für die Generierung stabiler *DKK3*-Überexpressionsmodelle galt es zunächst das bereits klonierte *DKK3*-Vektorkonstrukt [136] bzw. den entsprechenden Leervektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, siehe Abschnitt 2.12) mittels Re-Transformation zu vervielfältigen. Die Transformation der Vektoren erfolgte über Elektroporation in den *E. coli* Stamm JM83. Zu diesem Zweck wurden 20 ng Plasmid-DNA gemeinsam mit 40 - 50 µl kompetenten *E. coli*-Zellen in eine Elektroporationsküvette pipettiert und vorsichtig gemischt. Um die Aufnahme der Plasmide in die kompetenten Bakterienzellen zu erreichen, wurde im Elektroporator (*Gene Pulser II Electroporation System*, Bio-Rad) für wenige Millisekunden ein Spannungsimpuls von max. 2,5 kV angelegt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 400 µl vorgewärmtem SOC-Medium mit anschließender 30-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37 °C zur Regeneration der Bakterienzellen. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch steriles Ausplattieren von 50 - 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Ampicillin-Platten (100 mg/l Ampicillin) mit anschließender Inkubation ü. N. bei 37 °C. Zusätzlich wurden als Kontrollen transformierte Bakterien auf LB-Platten ohne Ampicillin-Zugabe sowie das gleiche Volumen nicht-transformierter Zellen auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und diese Ansätze unter gleichen Bedingungen inkubiert.

2.13.11 Inokulation von Flüssigkulturen transformierter *E. coli*

Für die Plasmid-Präparation war es nötig die transformierten *E. coli*-Zellen über eine Flüssigkultur zu vermehren. Zu diesem Zweck wurden zunächst 2 ml LB-Ampicillin-Medium (100 mg/l Ampicillin) mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze mit den Zellen einer

herangewachsenen *E. coli*-Einzelkolonie inokuliert. Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte ü. N. bei 37 °C und 150 U/min. Im Anschluss wurden 1,5 ml der Vorkultur zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation in die Plasmid-Mini-Präparation eingesetzt. (siehe Abschnitt 2.13.12). Weitere 300 µl der Vorkultur dienten der Inokulation von 300 ml LB-Ampicillin-Medium (100 mg/l Ampicillin). Die Inkubation dieser Hauptkultur erfolgte ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen.

2.13.12 Plasmid-Mini-Präparation mittels Kochlyse-Verfahren

Vor Inokulation der Hauptkultur galt es zunächst die Einzelklone hinsichtlich der Präsenz des gewünschten Plasmids zu untersuchen. Der Nachweis erfolgte über eine PCR mit spezifischen *Primern* für das *DKK3*-Vektorkonstrukt sowie den korrespondierenden Leervektor (siehe Tabelle 2-17) und anschließender Überprüfung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Plasmid-Mini-Präparation mittels Kochlyse-Verfahren durchgeführt, um die zu untersuchende Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterienzellen der Vorkultur (siehe Abschnitt 2.13.11) zu isolieren. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Hilfe eines Lysozym-haltigen Lysepuffers aufgeschlossen. Durch das nachfolgende Erhitzen wurden sowohl die DNA als auch die Proteine denaturiert. Aufgrund ihrer geringen Komplexität sowie ihrer Ringstruktur war die Plasmid-DNA im Gegensatz zur chromosomalen DNA nach Abkühlen zu einer vollständigen Renaturierung fähig und konnte so durch Zentrifugation aus den übrigen Bestandteilen des Lyse-Ansatzes isoliert werden. Nach Inkubation der Vorkultur ü. N. wurden 1,5 ml der 2 ml Vorkultur bei 12.000 x g und RT für 30 sec zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 µL Lysepuffer zunächst für 1 - 2 min bei RT und anschließend für 1 min bei 100 °C inkubiert. Nach 5-minütiger Kühlung der Ansätze auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei RT und 12.000 x g. Im Anschluss konnte der Plasmid-haltige Überstand in die PCR eingesetzt werden.

2.13.13 Plasmid-Maxi-Präparation

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus der Hauptkultur (siehe Abschnitt 2.13.11) wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation angeschlossen. Diese erfolgte mit Hilfe des *NucleoBond® Xtra Maxi Kit* des Herstellers Machery-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben.

2.13.14 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Vor Verwendung der mittels Plasmid-Maxi-Präparation gewonnenen Vektor-Konstrukte zur Generierung stabiler Überexpressions-Zellkulturmodelle musste zunächst die Sequenzabfolge

der Vektoren auf mögliche Mutationen hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde eine DNA-Sequenzierung nach Sanger durchgeführt [182]. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des kontrollierten Abbruchs der enzymatischen Replikation. Zusätzlich zu den 4 dNTPs, die in einer Standard-PCR eingesetzt werden, befinden sich im Ansatz der Sequenzierungs-PCR zusätzlich geringe Mengen der 2'-3'-Dideoxynalogons dieser Nukleotide (ddNTPs). Ein Einbau dieser ddNTPs in den neusynthetisierten DNA-Strang führt zum Abbruch der Kettenverlängerung, da ihnen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Zusätzlich ist jedes Analogon mit einem spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Als Folge entstehen DNA-Amplifikate unterschiedlicher Länge, die alle jeweils ein terminierendes, Fluoreszenz-markiertes ddNTP aufweisen. In der nachfolgenden Sequenzierung kann so über Kapillar-Elektrophorese und Fluoreszenzanregung die Position der einzelnen Basen detektiert werden.

Für die Sequenzierungs-PCR wurde das *Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Kit* (Applied Biosystems, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die Zusammensetzung sowie das verwendete Temperatur-Profil der Sequenzierungs-PCR ist in Tabelle 2-28 bzw. Tabelle 2-29 angegeben.

Tabelle 2-28: Zusammensetzung einer Sequenzierungs-PCR

Komponente	Volumen [µl]
<i>Terminator Ready Reaction Mix</i> (5×)	2
Puffer	2
<i>Primer</i> (10 pmol/µl)	1
500 ng Plasmid-DNA	9
ad 20 µl ddH ₂ O	6

Tabelle 2-29: Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
Aktivierung der DNA-Polymerase	96	4 min	1 x
Denaturierung	96	15 sec	
<i>Primer</i> -Hybridisierung	55	15 sec	35 x
Elongation	60	4 min	

Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR wurde jeder Ansatz separat gefällt. Zu diesem Zweck wurde das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze mit 80 µl HPLC-H₂O sowie 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,6) und 250 µl reinem Ethanol gemischt. Das in der folgenden 20-minütigen Zentrifugation bei 8.000 x g gewonnene DNA-Pellet wurde anschließend zunächst mit Hilfe von 75 %igen EtOH gewaschen und nach vollständigem Verdampfen des EtOHs für die Sequenzierung in 25 µl Formamid aufgenommen. Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des *Sequencer ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer 2001* gemäß Herstellerangaben.

2.13.15 *Microarray*-basierte Genexpressionsanalyse

Zwecks Identifizierung SFRP1-assoziiierter Gene wurden die Daten einer *Microarray*-basierten Genexpressionsanalyse genutzt. Die experimentelle Durchführung sowie die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte in einer zentralen Einheit der Uniklinik RWTH Aachen (*Interdisciplinary Centre for Clinical Research*, IZKF) unter Verwendung des *GeneChip Human Gene 2.0 ST Array* des Herstellers Affymetrix (Santa Clara CA, USA), welcher mehr als 33.500 Protein-codierende sowie mehr als 11.000 nicht-codierende RefSeq-, Ensembl- und lncRNAdb-annotierte Transkripte abdeckt. Mit Hilfe dieses DNA-Arrays erfolgte die Identifikation differenziell regulierter Gene in den BT-20-Leervektor- sowie *SFRP1*-Einzelklonen, die im Folgenden als Marker-Gene der SFRP1-Funktionen dienen sollten. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte in Form einer Klassen-Vergleichsanalyse mit Hilfe der Software *Affymetrix Transcriptome Analysis Console* (TAC) 2.0 (Affymetrix, USA). Gene galten als differenziell exprimiert, wenn der lineare *Fold-Change* (FC) zwischen Leervektor- und *SFRP1*-Klon ≥ 2 war und ein *P*-Wert $< 0,05$ (einfaktorielle Varianzanalyse) vorlag.

2.14 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.14.1 Herstellung von Gewebeschnitten aus humanem Material

Für die immunhistochemische Analyse wurden mithilfe eines Mikrotoms 2 μm -Gewebeschnitte aus humanem Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE) Material angefertigt. Diese wurden abschließend auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht und bis zur Verwendung bei RT gelagert. Zur Beurteilung humaner Frischgewebe wurden zunächst 4 μm -Gewebeschnitte am Kryotom HM560 (Microm Laborgeräte, Walldorf) angefertigt und mit Methylenblau bzw. Hämatoxylin-Eosin angefärbt, so dass der Tumorzell- bzw. Epithel-Anteil abgeschätzt werden konnte (siehe Abschnitte 2.14.2 und 2.14.3). Zwecks anschließender Extraktion von DNA oder RNA aus den Kryogeweben wurden zehn weitere Gewebeschnitte mit einer Dicke von 10 μm angefertigt, die anschließend in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und wie in Abschnitt 2.13.1 und 2.13.2 beschrieben weiterverarbeitet wurden.

2.14.2 Methylenblau-Färbung von humanem Frischgewebe

Die Methylenblau-Färbung von humanem Frischgewebe diente der schnellen Abschätzung des Epithelanteils von humanen Frischgewebe-Schnitten. Zu diesem Zweck wurden einige Tropfen einer 0,1 %igen Methylenblau-Lösung auf die Gewebeschnitte gegeben und überschüssiger Farbstoff nach 30 Sekunden vorsichtig mit Hilfe von VE-Wasser entfernt. Methylenblau färbt Zellkerne stark, das Zytoplasma hingegen nur schwach dunkelblau, so dass eine Orientierung in der Gewebestruktur ermöglicht wurde.

2.14.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) von Gewebeschnitten

Die HE-Färbung kryokonservierter Gewebeschnitte diente der Diskriminierung normalen Brustepithels und pathologisch-veränderter Gewebestrukturen durch einen Pathologen. Nur Mammakarzinomproben mit einem Tumorzellanteil von über 70 % und Brust-Normalgewebeproben mit über 30 % Brustepithel wurden für die vorliegende Studie genutzt. Für die HE-Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst für 2 min mit Hämalaun-Lösung inkubiert, was zur Blaufärbung basophiler Strukturen, wie den Nukleinsäure-haltigen Zellkernen, führte. Dem zweimaligen Waschen in Leitungswasser für jeweils 2 min folgte die Anfärbung basischer Strukturen, wie den Proteinen des Zytoplasmas und Kollagenfasern, mittels saurer Eosin-Karbonat-Lösung für 45 Sekunden. Im Anschluss folgte die Dehydrierung der angefärbten Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 2-30) mit abschließender Eindeckelung der Schnitte mit *Vitro-Clud*® (Langenbrinck, Emmendingen).

Tabelle 2-30: Aufsteigende Alkoholreihe

Lösung	Zeit
VE-Wasser	1 x 1 min
Ethanol 70 %	1 x 1 min
Ethanol 96 %	1 x 1 min
Ethanol 100 %	2 x 1 min
Xylol 100 %	2 x 1 min

2.14.4 Immunhistochemie (IHC) an humanem FFPE-Gewebe

Die immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten dient dazu die Expression sowie Lokalisation von Proteinen innerhalb von Geweben nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Nachweis eines DKK3-Expressionsverlustes in malignen Brusttumor- im Vergleich zu Kontrollgeweben (gesundes Brustepithel). Das Prinzip der angewendeten immunhistochemischen Methode beruht auf dem indirekten Avidin-Biotin-Detektionssystem: Ein gegen das Zielprotein gerichteter Primärantikörper wird von einem

biotinylierten Sekundärantikörper erkannt. An diesen Antigen-Antikörper-Antikörper-Biotin-Komplex bindet anschließend Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppeltes Avidin, welches eine hohe Affinität zu Biotin aufweist. Bei Zugabe des HRP-Substrates 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) entsteht durch Oxidation ein braunes Endprodukt, so dass das Zielprotein im Gewebe sichtbar wird. Der Vorteil dieses Detektionssystems ist eine im Vergleich zu einer direkten Nachweismethode gesteigerte Sensitivität, infolge einer erhöhten Signalstärke [183].

Vorbehandlung der FFPE-Gewebeschnitte für die IHC

Zwecks Entparaffinierung wurden die FFPE-Gewebeschnitte zunächst für 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend dreimal für 15 min mit Xylol behandelt. Der Entparaffinierung folgte eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 2-31).

Tabelle 2-31: Absteigende Alkoholreihe

Lösung	Zeit
Ethanol 100 %	2 x 5 min
Ethanol 96 %	2 x 2 min
Ethanol 70 %	1 x 1 min
VE-Wasser	1 x 1 min

Als nächstes erfolgte eine Epitop-Demaskierung durch Hitzebehandlung, um die Immunreaktivität der Formalin-fixierten Gewebeantigene zu erhöhen [184]. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte für 30 min in einer mit Citrat-Puffer (pH 6,0) befüllten Küvette bei 98 °C im Wasserbad erhitzt.

Immunhistochemische Färbung

Nachdem die Gewebeschnitte auf RT abgekühlt waren, wurden die Objektträger in *Chamber Slides* eingespannt und mit VE-Wasser gewaschen. Zwecks Hemmung endogener Peroxidasen, die eine unspezifische Hintergrundfärbung verursachen, folgte eine 10-minütige Inkubation mit *Ultravision Hydrogen Peroxidase Block* (Thermo Fisher Scientific, USA). Die anschließende Durchführung der immunhistochemischen Färbung erfolgte mit Hilfe des *Vectastain ABC Kits* (Vector Laboratories, USA) nach Herstellerangaben. Nach zweimaligen Waschen mit 1xPBS und einem Proteinblock-Schritt mit Serum (20 min) wurden die Gewebeschnitte für 45 min mit dem Primärantikörper (DKK3 AF118, R&D-Systems, USA) in einer Verdünnung von 1:15 in *Antibody Diluent* (Dako, Dänemark) inkubiert. Unspezifisch gebundene Primärantikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS entfernt und die Gewebeschnitte zunächst mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und nach einem erneuten Waschschrift mit dem Avidin-HRP-haltigen ABC-Reagenz für jeweils 30 min

inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung der Antigen-Antikörper-HRP-Komplexe durch die Zugabe des Chromogens DAB (*DAB Quanto*, Dako, Dänemark). Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurden die Schnitte mit VE-Wasser gewaschen und für 5 min mit Hämalaun gegengefärbt. Nach Bläuen in lauwarmen Leitungswasser folgte die abschließende Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 2-30) sowie die Eindeckelung mit Vitro-Clud® (Langenbrinck, Emmendingen).

2.14.5 Isolation von Gesamt- sowie sezerniertem Protein für die SDS-Gelelektrophorese

Um eine Reexpression von DKK3-Protein in *DKK3*-transfizierten Klonen mit Hilfe der *Western Blot*-Methode zu verifizieren, wurden sowohl Gesamtprotein-Lysate aus den Zellen hergestellt als auch die sezernierten Proteine aus den korrespondierenden Zellkultur-Überständen isoliert. Zu diesem Zweck wurden die stabil-transfizierten Zellen zunächst bis zu einer Konfluenz von 80 % in einer Petrischale unter Selektionsdruck kultiviert. Zur Isolation von sezerniertem Protein aus dem Zellkultur-Überstand wurde das Zellkulturmedium zunächst abgenommen und für 7 min bei 250 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Zur Anreicherung sowie Aufreinigung des sezernierten Proteins erfolgte im nächsten Schritt die Protein-Fällung durch Aussalzen. Hierzu wurde der Zellkultur-Überstand 1:1 mit einer 4 M Ammoniumsulfat-Lösung gemischt und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ammoniumsulfat-Lösung durch Zentrifugation (10 min, 2700 x g) entfernt und das Proteinpellet in 300 µL RIPA-Puffer aufgenommen. Mit Hilfe des gleichen Ansatzes erfolgte die Isolation von Gesamtprotein aus den Zellen. Hierzu wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkultur-Überstandes mit 1x PBS gewaschen, anschließend unter Zugabe von 300 µL RIPA-Puffer mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum besseren Aufschluss der Zellen folgte eine dreimalige Sonifikation für 15 sec (35 % Intensität, je 9 Zyklen, SONOPLUS HD2070, Bandelin electronic, Berlin). Abschließend wurden vorhandene Zelltrümmer abzentrifugiert (30 min, 4 °C, maximale Geschwindigkeit). Alle Schritte wurden, um einem fortschreitenden Proteinabbau entgegenzuwirken, zügig und auf Eis durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Proteinproben bei -80 °C.

2.14.6 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde das *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip dieser Methode

beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen durch Peptide mit einer Mindestlänge von 3 Aminosäuren. Die einwertigen Kupferkationen bilden wiederum mit BCA einen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 562 \text{ nm}$. Die Menge des entstandenen violetten Farbkomplexes korreliert mit der Gesamtproteinmenge der Proben und kann mit Hilfe eines *Microplate-Readers* (Tecan, Schweiz) quantifiziert werden. Die exakten Konzentrationen der Proteinproben wurden mit Hilfe einer Protein-Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) ermittelt.

2.14.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [185] lassen sich Proteine anhand ihres Molekulargewichtes separieren. Das dabei angewendete zwei-Komponenten Gelsystem aus Sammel- (3 - 4 %, pH 6-8) und Trenngel (5 - 25 %, pH 8,8) ermöglicht eine hohe Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung. Im großporigen Sammelgel erfolgt die Konzentrierung der Proteine vor deren Übergang ins kleinporige Trenngel, in dem anschließend die Proteine durch den Siebeffekt nach ihrem Molekulargewicht separiert werden. Zu diesem Zweck müssen die Proteine vor dem Auftragen auf das Sammelgel zunächst mit Hilfe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie Dithiothreitol (DTT), welches die vorhandenen Disulfidbrücken reduziert, denaturiert werden. Die stark-negativ geladenen SDS-Anionen lagern sich zudem an die nun entfalteten Polypeptidketten an (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren) und überdecken so deren Eigenladung. Als Folge besitzen alle Proteine ein gleiches Ladungs-Masseverhältnis und lassen sich dadurch entsprechend ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld über ein Polyacrylamid-Gel auftrennen.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben zunächst mit 1x *NuPage*-Probenpuffer, der sowohl DTT als auch SDS enthielt, versetzt und anschließend für 5 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden jeweils 30 µg Protein in die Taschen des Polyacrylamid-Gels aufgetragen. In dieser Arbeit kamen *NuPage* Mini Gele (4 – 12 % Bis-Tris) der Firma Invitrogen zum Einsatz, die eine klare Proteinauftrennung im Bereich von 15 - 150 kDa ermöglichen. Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in eine mit 500 mL 1xMOPS-Laufpuffer befüllte Gelkammer (*X-Cell SureLock™ Mini-Cell System*, Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Als Größenstandard dienten 10 µl des Markers *Precision Plus Protein™ Standard All Blue* (Bio-Rad, München).

2.14.8 Western Blot

Die *Western Blot*-Methode dient dem Nachweis spezifischer Proteine in einer Probe mit Hilfe Enzym-gekoppelter Antikörper. Zu diesem Zweck werden die Proteine nach Separation über eine SDS-PAGE zunächst auf eine Trägermembran transferiert. Das Prinzip des Proteintransfers beruht dabei auf der Wanderung der negativ-geladenen SDS-Polypeptid-Komplexe entlang eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode, wobei diese durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Trägermembran haften bleiben. Im Anschluss können die auf die Trägermembran aufgebrachten Proteine mittels Bindung spezifischer Antikörper detektiert werden (Immunodetektion).

Proteintransfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines *Tank-Blot*-Systems des Herstellers Bio-Rad (München) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (*Roti®Fluoro PVDF*, Roth, Karlsruhe) übertragen. Zu diesem Zweck wurde die Trägermembran zunächst für 5 min mit Methanol aktiviert und anschließend luftblasenfrei auf dem Proteingel platziert. Beidseitig von *Whatmann*-Filterpapier sowie zwei Kunststoffschwämmen umschlossen, wurde dieses sogenannte „*Sandwich*“ in die mit 500 ml Transferpuffer befüllte Blotkammer eingespannt. Zur Kühlung des *Blotting*-Prozesses wurde ein Kühlelement verwendet. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V für 60 min.

Ponceau S-Färbung

Zwecks Nachweis eines erfolgreichen Proteintransfers wurde die PVDF-Membran im Anschluss an den Proteintransfer für 5 - 10 min mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Durch reversible Bindung des roten Farbstoffes Ponceau S an die geladenen Aminogruppen der Proteine wurden diese auf der Trägermembran sichtbar gemacht. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit dH₂O entfernt.

Immunodetektion

Der Nachweis spezifischer, auf der Trägermembran befindlicher Proteine erfolgte durch eine Antigen-Antikörperreaktion. Hierbei wird ein gegen das Zielprotein gerichteter Primärantikörper wiederum von einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Die Zugabe eines Substrates ermöglicht im Folgenden die Detektion des Proteins auf der Membran.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren wurde die PVDF-Membran zunächst für 60 min bei RT mit einer *Blocking*-Lösung (5 % Milchpulver in 1xTBS mit 0,5 % Tween-20) behandelt. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem in *Blocking*-Lösung verdünnten Primärantikörper (DKK3: 1:1000, β -Aktin: 1:5000) ü. N. bei 4 °C unter Schwenken. Am nächsten Tag wurde unspezifisch gebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 5 min mit Waschpuffer (1xTBS mit 0,5 % Tween-20) auf dem Schüttler entfernt. Im Anschluss wurde der entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper (Dako) nach Herstellerangaben zugegeben und für 60 min unter Schwenken bei RT auf der Membran inkubiert. Erneutes dreimaliges Waschen für 5 min mit Waschpuffer auf dem Schüttler diente der Entfernung unspezifisch gebundener Sekundärantikörper. Abschließend erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden über eine HRP-vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion unter Verwendung des *ECL Western Blotting Substrate* (Pierce, USA) gemäß Herstellerangaben. Hierbei resultierte die HRP-katalysierte Oxidation von Luminol in der Abgabe eines Chemilumineszenz-Signals, welches auf einem Röntgenfilm (Amersham Systems, Freiburg) detektiert werden konnte.

2.15 Zellbiologische Methoden

2.15.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Sämtliche Arbeitsschritte mit humanen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) durchgeführt um bakterielle sowie Kontaminationen durch Pilze zu vermeiden. Die Kultivierung erfolgte basierend auf der Zelldichte in T25 (25 cm²)- oder T75 (75 cm²)-Zellkulturgefäßen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Sättigung, 95 % Luftfeuchtigkeit). Alle Zellkulturmedien enthielten als Minimalzusatz 10 % fetales Kälberserum (FKS) und 2 mM L-Glutamin sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zum Schutz vor bakterieller Kontamination. Die genaue Zusammensetzung aller verwendeten Zellkulturmedien ist in Abschnitt 2.6 aufgelistet. Um optimale Wachstumsbedingungen sicherzustellen, wurde das Zellkulturmedium alle zwei bis drei Tage erneuert, so dass akkumulierende Stoffwechselprodukte entfernt und die Zellen mit neuen Nährstoffen versorgt wurden. Als Kontrolle diente ein im Medium enthaltender pH-Indikator (Phenolrot), dessen Farbumschlag eine Ansäuerung des Mediums durch Stoffwechselprodukte der Zellen signalisierte.

2.15.2 Ernte humaner Zelllinien

Sobald die adhärenenten Zellen eine Konfluenz von 70 – 80 % erreicht hatten, erfolgte die Ernte bzw. das Passagieren der Zellen. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und diese nach Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin bewirkt den proteolytischen Abbau von Adhäsionsproteinen, so dass sich die adhärenenten Zellen von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes lösen. EDTA verstärkt diesen Effekt durch Bindung zweiwertiger Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} , die für die Zell-Matrix-Adhäsion benötigt werden. Dieser Vorgang wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und nach Ablösen der Zellen durch Zugabe von FKS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt. Um die Trypsin-EDTA-Lösung zu entfernen wurden die Zellen zunächst pelletiert (250 x g, 5 min) und dann in frischem Medium resuspendiert. Im Anschluss konnten die Zellen neu ausgesät bzw. kryokonserviert oder für funktionelle Analysen sowie für eine RNA- und DNA-Isolation genutzt werden.

2.15.3 Kryokonservierung humaner Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst geerntet (siehe Abschnitt 2.15.2) und nach einmaligem Waschen mit sterilem PBS in Einfriermedium (20 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen in der Zellmembran und schützt damit die Zellen vor Schädigung durch den Einfriervorgang. Die Zellsuspension wurde in 1 mL-Kryoröhrchen aliquotiert und mittels einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe (*Mr. Frosty*, Thermo Scientific, USA) langsam heruntergekühlt (-1 °C/min). Im Anschluss erfolgte die Langzeit-Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension im Anschluss umgehend in ein mit 10 ml erwärmten Zellkulturmedium (20 % FKS) befülltes Kulturgefäß gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel um toxische DMSO-Reste und abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.15.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des *CASY® Cell Counter and Analyzer* (OLS OMNI Life Science, Bremen) bestimmt. Das Messprinzip des *CASY®* basiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore. Dabei wird die Zellzahl über die Zahl der Widerstandserhöhungen in einem elektrischen Feld quantifiziert. Zudem kann zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden werden. Während vitale Zellen mit

intakter Zellmembran den Stromfluss blockieren und so ein Signal generieren, das vom Volumen der Zelle abhängt, kann der Strom die geschädigte Zellmembran toter Zellen durchdringen, so dass diese lediglich mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst werden. Zum Zweck der Messung wurden 100 μL der Zellsuspension in 9,9 ml einer isotonischen Messlösung (CASYTON, OLS OMNI Life Science, Bremen) verdünnt und die unter Strom stehende Messkapillare des *CASY@ Cell Counter and Analyzer* in diese Messlösung eingeführt.

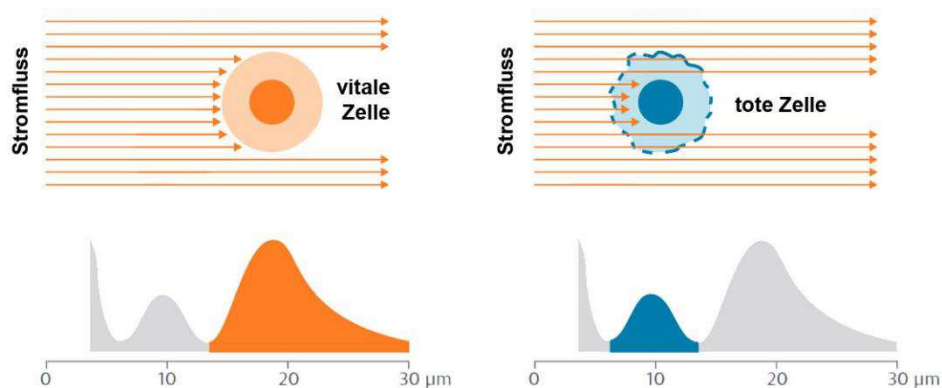


Abbildung 2-5: Messprinzip des CASY@ Cell Counter and Analyzer. Bei Eintritt in ein elektrisches Feld verursachen die Zellen eine Widerstandserhöhung und können auf diese Weise detektiert werden. Das Signal vitaler Zellen hängt vom Volumen der Zelle ab, da eine intakte Zellmembran den Stromfluss blockiert. Tote Zellen hingegen haben eine geschädigte Zellmembran, so dass sie lediglich mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst werden. Verändert nach [186].

2.15.5 Generierung stabil genetisch-veränderter Transfektanten

Eine funktionelle Charakterisierung von DKK3 in den distinkten Subtypen des humanen Mammakarzinoms sollte anhand stabil genetisch-veränderter Zellkulturmodelle durchgeführt werden. Für die luminale Zelllinie MCF-7 lag ein solches Modell bereits vor [170]. Analog zum MCF-7-Zellkulturmodell galt es im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres luminales (MDA-MB-453) sowie zwei basale Überexpressions-Zellkulturmodelle (MDA-MB-436 und MDA-MB-231) zu generieren. Zu diesem Zweck wurde das *DKK3*-Gen unter Kontrolle eines CMV-Promotors stabil ins Genom eingebracht. Hierzu stand ein pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe), in den die *DKK3*-Sequenz kloniert war, sowie als Kontrolle der entsprechende Leervektor ohne *DKK3*-Vollängen-cDNA bereits zur Verfügung (siehe Abschnitt 2.12). Beide Vektoren mussten jedoch zunächst mittels Re-Transformation vervielfältigt werden (siehe Abschnitt 2.13.10).

G418-Konzentrationsbestimmung

Zwecks Selektion stabil-transfizierter Zellen wurde die Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Neomycin/Geneticin genutzt (siehe Abschnitt 2.12). Im Vorfeld zur Transfektion

musste zunächst die letale Konzentration des eingesetzten Selektiv-Antibiotikums (G418) für die jeweiligen Zelllinien experimentell ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden $2 - 3 \times 10^5$ Wildtyp-Zellen der entsprechenden Zelllinien in sterile 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.15.1) kultiviert, um ein Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von G418 in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 100 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ in das Zellkulturmedium. Zusätzlich diente ein Ansatz mit Medium ohne Antibiotikum als Kontrolle. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel mit erneuter Antibiotika-Zugabe durchgeführt. Nach insgesamt 14 Tagen Inkubation erfolgte die Auswertung. Die niedrigste Antibiotika-Menge, die nach Ablauf der Inkubationszeit zum Absterben aller Wildtyp-Zellen führte, galt als optimale G418-Konzentration und wurde im Folgenden zur Selektion der Transfektanten genutzt. Die in dieser Arbeit ermittelten letalen G418-Konzentrationen für die Selektion der stabil-transfizierten Mammakarzinom-Zelllinien sind in Tabelle 2-32 aufgelistet.

Tabelle 2-32: Letale G418-Konzentrationen

Zelllinie	G418-Konzentration
MDA-MB-231	700 $\mu\text{g/ml}$
MDA-MB-436	400 $\mu\text{g/ml}$
MDA-MB-453	600 $\mu\text{g/ml}$

Lipid-basierte Transfektion

Zwecks Transfektion wurden $2 - 3 \times 10^5$ Wildtyp-Zellen der jeweiligen Zelllinien in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 – 80 % unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.15.1) kultiviert. Die anschließende Transfektion erfolgte mit Hilfe des *FuGENE HD Kits* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Hierzu wurde ein Gemisch aus ddH₂O sowie 6 bzw. 8 μl Transfektionsreagenz und 2 μg Vektor-DNA (siehe Tabelle 2-33) hergestellt und dieses für 15 Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubation kommt es zu einer Bindung zwischen den positiv-geladenen Lipiden im Transfektionsreagenz und der zugegebenen negativ-geladenen Vektor-DNA. Die Ansätze wurden im Anschluss tröpfchenweise auf die in 2 ml Medium befindlichen Zellen gegeben und diese für 72 h kultiviert (siehe Tabelle 2-33). Durch eine Fusion der Liposom-DNA-Komplexe mit der eukaryotischen Zellmembran gelangte die Vektor-DNA in die Zellen.

Tabelle 2-33: Transfektions-Schema

Ansatz	Funktion	<i>Fugene HD</i> [µl]	Vektor-DNA [µg]	ddH ₂ O [µl]
A	Reagenzkontrolle	8	-	92
B	DNA-Kontrolle	-	2	100
C	Selektionskontrolle	-	-	100
D	Vollvektor 6:2	6	2	94
E	Vollvektor 8:2	8	2	92
F	Leervektor 6:2	6	2	94
G	Leervektor 8:2	8	2	92

Selektion und Anzucht von Einzelklonen

Nach der Lipid-basierten Transfektion wurden die Ansätze C-G (Tabelle 2-33) durch Trypsinieren geerntet, in jeweils 10 ml G418-haltiges Medium aufgenommen und gemäß dem Schema in Tabelle 2-34 in 10 cm-Petrischalen ausgesät. Dieses Vorgehen diente der Gewinnung stabil-transfizierter Einzel-Klone. Die beiden Ansätze A und B fungierten lediglich als Kontrolle der Transfektion und wurden daher nicht weitergeführt.

Tabelle 2-34 Verdünnungsreihe für die Einzelklon-Isolation

Verdünnung	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	1:300	1:500
Medium [ml]	9,00	9,50	9,80	9,9	9,95	9,97	9,98
Zellsuspension [µl]	1000	500	200	100	50	30	20

Nach vollständigem Absterben der nicht-transfizierten Wildtypzellen der mitgeführten Selektionskontrolle (Ansatz C) und der Bildung makroskopisch sichtbarer Kolonien in den Ansätzen D-G konnte mit der Isolation der Einzel-Klone begonnen werden. Mit Hilfe von Klonierungsringen wurden die Kolonien durch Trypsinieren von der Oberfläche der Petrischalen gelöst und in die Kavitäten einer *96-Well*-Zellkulturplatte überführt. Um bestmögliche Wachstumsbedingungen der selektierten Einzelklone zu gewährleisten, erfolgte die Kultivierung zunächst mit konditioniertem Medium. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % wurden die Zellen jeweils in das nächstgrößere Zellkulturgefäß (*48-/24-/6-Well*-Zellkulturplatte bzw. T25-/T75-Zellkulturflasche) umgesetzt. Zum Nachweis einer stabilen Integration der Konstrukte in das Genom der Zellen erfolgte eine DNA-Extraktion. Um die ektopische Expression von DKK3 zu analysieren wurden jeweils RNA- und Proteinproben isoliert.

2.15.6 Zellpräparation für die Rasterelektronen-Mikroskopie (REM)

Zwecks Darstellung morphologischer Veränderungen von MDA-MB-436 Leervektor- und -*DKK3*-Klonen mit Hilfe von REM-Bildern, wurden die Zellen zunächst für 72 h unter

Standardbedingungen (Abschnitt 2.15.1) auf mit *Matrigel*TM-beschichteten Glas-Platten kultiviert, die eine Ausbildung der Zellmorphologie gewährleisteten. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte mit Hilfe von 3 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer für mindestens 4 h bei RT. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer gespült und über eine aufsteigende EtOH-Reihe (30 - 100 %) dehydriert. Der finale Trocknungsschritt erfolgte durch eine Inkubation mit Hexamethyldisilazan für 10 min. Die getrockneten Zellschichten wurden mittels Kathodenbestäubungs-Verfahren mit Gold beschichtet (Sputter Coater EM SCD500, Leica, Wetzlar, Germany). Die Analyse der Zellproben erfolgte am Rasterelektronen-Mikroskop (ESEM XL 30 FEG, FEI Philips, Eindhoven, Niederlande) im Hochvakuum bei einer Spannung von 10 kV. Sämtliche Trocknungsschritte sowie die Goldbeschichtung und Aufnahme der Rasterelektronen-Mikroskopie-Bilder wurden in der Elektronenmikroskopischen Einrichtung der Uniklinik RWTH Aachen durchgeführt.

2.16 Funktionelle *in vitro*-Experimente

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen *in vitro*-Experimente dienten zum einen dazu eine mögliche Subtyp-spezifische Bedeutung eines DKK3-Expressionsverlustes für die Tumorgenese humaner Mammakarzinome zu untersuchen (Abschnitt 3.1) als auch putative SFRP1-Mimetika anhand ihres Einflusses auf elementare Tumorzelleigenschaften zu charakterisieren (Abschnitt 3.2). Für die *in vitro*-Experimente wurden jeweils stabile Überexpressions-Zellkulturmodelle bzw. entsprechende Leervektor-transfizierte Kontrollen verwendet, die eigens für diese Versuche generiert wurden (siehe Abschnitt 2.15.5). Eine Ausnahme bildeten das BT-20-*SFRP1*- sowie das MCF-7-*DKK3*-Zellkulturmodell, die bereits im Vorfeld etabliert wurden [169, 170]. Zur Erhaltung der genomischen Veränderung der Zellkulturmodelle, wurden die Zellen in allen *in vitro*-Experimenten stets unter Selektionsdruck kultiviert. Die Konzentrationen der zugegebenen Selektiva ist in Abschnitt 2.3 bzw. 2.15.5 angegeben.

2.16.1 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest (engl. *Colony Formation Assay*, CFA) ermöglicht es, neben einer Quantifizierung des Zellwachstums, zusätzlich eine Aussage über das Koloniebildungsvermögen sowie mögliche morphologische Veränderungen der Zellen treffen zu können. Zur Durchführung des Koloniebildungstests wurden aus jeder Versuchsgruppe 10^3 Zellen im Dreifachansatz in die Kavitäten einer 6-Well-Zellkulturschale in 2 ml Medium ausgesät und über einen Zeitraum von 12 - 14 Tagen unter Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks durch Blasticidin bzw. G418 kultiviert. Alle 3 - 4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Im Anschluss

wurden die Zellen vorsichtig mit 1xPBS gewaschen und anschließend für 30 min mit 1 ml einer Methanol- und Formaldehyd-haltigen, 0,5 %igen Kristallviolett-Lösung fixiert und angefärbt. Nach dreimaligem Waschen der fixierten und angefärbten Kolonien mit H₂O wurden diese getrocknet, fotografiert und das Koloniewachstum mit Hilfe der Software *ImageJ* (National Institute of Health, USA) densitometrisch ausgewertet.

Im Falle der Charakterisierung der potentiellen SFRP1-Mimetika hinsichtlich ihres Einfluss auf das Koloniebildungsvermögen (Abschnitt 3.2.5.1) erfolgte zusätzlich am zweiten Tag der Kultivierung die Zugabe der entsprechenden putativen SFRP1-Mimetika sowie des WNT-Signalweg-Inhibitors ICG-001 (Endkonzentration jeweils: 10 µM). Zudem wurde einem Kontrollansatz DMSO in äquivalentem Volumenverhältnis zu den Testsubstanzen hinzugefügt. Jedem Mediumwechsel folgte eine erneute Zugabe der Test- und Kontrollsubstanzen.

2.16.2 Bestimmung des Zellwachstums

Bestimmung des Zellwachstums im DKK3-Überexpressionsmodell

Zur Bestimmung des Zellwachstums in den *DKK3*-Überexpressionsmodellen wurde die Änderung der Zellzahl über einen Zeitraum von 96 h ermittelt. Zu diesem Zweck wurden zunächst pro Versuchsgruppe je 5×10^4 Zellen im Dreifachansatz in *6-Well*-Zellkulturschalen ausgesät, über 96 h unter G418-Selektionsdruck kultiviert und anschließend die Zellzahl mit Hilfe des *CASY® Cell Counter and Analyzer* (siehe Abschnitt 2.15.4) bestimmt.

Bestimmung der dosisabhängigen Wachstumsinhibition durch putative SFRP1-Mimetika

Zur Bestimmung der dosisabhängigen Wachstumsinhibition durch die potentiellen SFRP1-Mimetika (Abschnitt 3.2.2) wurden zunächst pro Versuchsgruppe je 2×10^4 Zellen im Dreifachansatz in *12-Well*-Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h in 1 ml reinem Medium kultiviert, um ein Anwachsen der Zellen ohne Beeinflussung durch die Testsubstanzen zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe der putativen SFRP1-Mimetika in der gewünschten Konzentration. Da die Testsubstanzen in DMSO gelöst vorlagen, fungierte reines DMSO, in einem Volumen äquivalent zum größten eingesetzten Volumen der Testsubstanzen, als Kontrolle und durfte aufgrund seiner zelltoxischen Eigenschaften jeweils eine Endkonzentration von 0,5 % nicht überschreiten [187]. Nach einer 72-stündigen Inkubation mit den potentiellen SFRP1-Mimetika wurde die Zellzahl mit Hilfe des *CASY® Cell Counter and Analyzer* (siehe Abschnitt 2.15.4) bestimmt und jeweils auf die Zellzahl der DMSO-Kontrolle normiert.

2.16.3 Caspase 3/7-Aktivitätsmessung

Um eine mögliche, über DKK3 bzw. die potentiellen SFRP1-Mimetika vermittelte Sensitivierung gegenüber pro-apoptotischen Reizen zu analysieren, wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7, als Indikator der Apoptose, mit Hilfe des *ApoOne® Homogeneous Caspase 3/7 Assays* (Promega) gemäß Herstellerangaben ermittelt. Die Detektion der aktiven Caspasen 3/7 beruht auf der Umwandlung des zugesetzten, nicht fluoreszierenden Rhodamin-Derivats Z-DEVD-R110 in den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 110 (Anregung $\lambda = 499$ nm, Emission $\lambda = 521$ nm) über Abspaltung des DEVD-Peptids durch die Effektor-Caspasen. Das entstehende Fluoreszenzsignal kann an einem *Microplate-Reader* quantifiziert werden. Die auf diesem Wege bestimmte Aktivität der Effektor-Caspasen korreliert wiederum mit der Apoptoserate. Zu diesem Zweck wurden zunächst pro Versuchsgruppe 2×10^4 Zellen im Dreifachansatz in 50 μ L Medium in die Kavitäten einer *96-Well-Zellkulturschale* ausgesät und 24 h unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.15.1) kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine 24-stündige Apoptose-Induktion durch Zugabe von Staurosporin in einer Endkonzentration von 1 μ M [188]. Ansätze ohne Staurosporin dienten als Negativkontrolle. Am nächsten Tag wurden den Zellen jeweils 50 μ L des Caspase 3/7-Substrats (1:100 in Lysepuffer verdünnt) zugesetzt und die Ansätze für 4 h lichtgeschützt bei RT inkubiert. Im Anschluss konnte der Überstand in eine schwarze 96-Well-Zellkulturplatte überführt und das Fluoreszenzsignal am *Microplate-Reader* (Tecan, Schweiz) quantifiziert werden. Ein mögliches Hintergrundrauschen wurde durch Subtraktion der Grundfluoreszenz des Mediums herausgefiltert.

Im Falle der Charakterisierung der potentiellen SFRP1-Mimetika hinsichtlich ihres Einflusses auf die Apoptose-Induktion (Abschnitt 3.2.5.2) folgte einer 24-stündigen Kultivierung unter Standardbedingungen nach Zell-Aussaat zunächst eine Inkubation der Zellen mit den entsprechenden putativen SFRP1-Mimetika sowie des WNT-Signalweg-Inhibitors ICG-001 (Endkonzentration jeweils: 10 μ M) über einen Zeitraum von 24 h bevor mit der Apoptose-induktion über die Zugabe von Staurosporin begonnen werden konnte. Reines DMSO, in einem äquivalenten Volumenverhältnis zu den Testsubstanzen, diente als Kontrolle.

2.16.4 Zell-Matrix-Adhäsionstest

Der Zell-Matrix-Adhäsionstest untersucht die Fähigkeit von Zellen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes an eine Oberfläche zu adhären. In diesem Fall stellte diese Oberfläche eine mit *Matrigel™ Basement Membrane Matrix* (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) beschichtete Kavität einer *6-Well-Zellkulturschale* dar. *Matrigel™* entstammt dem Engelbrecht-Holm-Swarm (EHS)-Maus-Sarkom, einem an extrazellulären Matrixproteinen reichen Tumor, und dient der Simulation der natürlichen Basalmembran. Zur Beschichtung der

6-Well-Zellkulturschalen wurde den Kavitäten je 1 ml FKS-freies Zellkulturmedium gegeben, dem *Matrigel*TM in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugefügt war. Das *Matrigel*TM setzte sich auf der Oberfläche des Zellkulturgefäßes ab und polymerisierte innerhalb von 2 Stunden bei RT aus. Anschließend konnte der flüssige Überstand abgenommen und die Beschichtung vorsichtig mit FKS-freiem Medium gewaschen werden. Im nächsten Schritt wurden pro Versuchsgruppe 3 - 5x10⁵ Zellen (abhängig vom jeweiligen Zellkulturmodell) im Dreifachansatz in 2 ml FKS-freiem Medium in die beschichteten Kavitäten der Zellkulturschale gegeben. Nach einer Inkubationsdauer über 60 min bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Entfernung aller nicht-adhärenenten Zellen durch zweimaliges Waschen mit FKS-freiem Medium. Im Anschluss wurden die adhärenenten Zellen mittels 10-minütiger Inkubation mit 70 %igem EtOH fixiert und mit einer 0,1 %igen Kristallviolett-Lösung angefärbt. Nach 20 min wurde überschüssiger Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit H₂O entfernt und die Zellkulturschalen über Nacht bei 37 °C getrocknet. Am nächsten Tag konnte der in den Zellen gebundene Farbstoff mit Hilfe von 0,02 % Triton-X und Isopropanol gelöst werden. Die Menge des gelösten Farbstoffes war proportional zur Anzahl adhärenenter Zellen und konnte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590$ nm im *Microplate-Reader* (Tecan, Schweiz) fotometrisch quantifiziert werden. Um eine mögliche Hintergrundfärbung herauszufiltern, wurden zellfreie, mit *Matrigel*TM beschichtete Kontrollansätze mitgeführt und deren Messwerte jeweils von denen der Versuchsansätze subtrahiert.

2.16.5 Wundheilungstest

Der Wundheilungstest diente dazu den Einfluss von DKK3 bzw. den putativen SFRP1-Mimetika auf das Migrationsverhalten humaner Mammakarzinom-Zelllinien zu analysieren. Dabei wird die Fähigkeit der Zellen untersucht eine zellfreie Fläche (Wunde) durch Migration zu besiedeln. Diese zellfreie Fläche wurde mit Hilfe von Silikonrahmen (*Ibidi*, Martinsried) erzeugt. Zu diesem Zweck wurden die Silikonrahmen unter sterilen Bedingungen in die Kavitäten einer 6-Well-Zellkulturschale eingesetzt und die Teilkammern der Silikonrahmen jeweils mit einer entsprechenden Zellzahl (BT-20: 2x10⁴, MDA-MB-231: 2,5x10⁴, MDA-MB-436: 3,5x10⁴ Zellen) in 100 µl Medium im Dreifachansatz befüllt, so dass am nächsten Tag ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen entstanden war. Durch Entfernung des Silikonrahmens entstand an der Stelle des Mittelsteiges zwischen den Teilkammern eine zellfreie Fläche (Wunde) mit einer definierten Breite von 500 ± 50 µm. Die Zellen wurden anschließend zweimal vorsichtig mit 1xPBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen sowie Zelltrümmer zu entfernen und die Kavitäten der 6-Well-Zellkulturschalen mit je 2 ml Medium befüllt. Der Wundschluss wurde in definierten Zeitabständen mit Hilfe eines Mikroskops (*Axiovert TV100*, Zeiss) und einer hochauflösenden *ColourVision III* CCD Kamera sowie der

Software *analySIS pro* (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) fotodokumentiert. Dabei wurde für jede Probe immer der gleiche Ausschnitt der Wunde in einer 25-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die zellfreie Fläche (in Pixel) konnte mit Hilfe der Software *ImageJ* quantifiziert werden und wurde jeweils auf die ursprüngliche Wundgröße zum Zeitpunkt $T = 0$ h normiert.

Im Falle der Charakterisierung der potentiellen SFRP1-Mimetika hinsichtlich ihres Einflusses auf das Migrationsverhalten (Abschnitt 3.2.5.3) wurden dem Zellkulturmedium zusätzlich die entsprechenden putativen SFRP1-Mimetika sowie der WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001 (Endkonzentration jeweils: 10 μ M) hinzugefügt. Einem zusätzlichen Kontrollansatz wurde DMSO in einem äquivalenten Volumenverhältnis zu den Testsubstanzen, hinzugefügt.

2.17 Statistische Methoden

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der Programme *SPSS 20.0* (SPSS, Chicago, IL, USA) und *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt und waren stets zweiseitig angelegt. Als statistisch signifikant definiert war eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $P < 0,05$. Ein Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen erfolgte mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests. Für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen untereinander wurde der Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's multiplem Vergleichstest angewendet. Beeinflussten zwei unabhängige Faktoren das Ergebnis, erfolgte die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller Varianzanalyse. Ein möglicher signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Messpunkten wurde in diesem Fall mit Hilfe des Bonferroni Post-Tests bestimmt. Bivariate Korrelationsanalysen zwischen der *DKK3*-Expression und den klinisch-pathologischen Parametern der Patientenkohorten erfolgte mittels Kreuztabellen unter Anwendung des exakten Tests nach Fisher. Die Korrelationsanalyse zwischen der *DKK3*-mRNA-Expression und der DNA-Methylierung des *DKK3*-Gens wurden mit Hilfe der Bravais-Pearson-Methode durchgeführt. Um die prognostische Relevanz eines *DKK3*-Expressionsverlustes in humanen Mammakarzinomen zu bestimmen wurde eine univariate Überlebensanalyse nach der Methode von Kaplan und Meier mit Hilfe des Online-Programmes *Kaplan-Meier Plotter* durchgeführt [189]. Die IC_{50} -Werte (halbmaximale inhibitorische Konzentration) der untersuchten putativen SFRP1-Mimetika sowie der Inhibitoren des WNT-Signalweges wurden näherungsweise mittels linearer Regression bestimmt. Hierzu wurde zunächst die Steigung der ermittelten Dosis-Wirkungskurve im Bereich des erwarteten IC_{50} -Wertes berechnet. Über eine Geradengleichung mit der berechneten Steigung und dem Ordinatenschnittpunkt (Zellzahl) bei 0,5 konnte der gesuchte IC_{50} -Wert näherungsweise ermittelt werden.

3. Ergebnisse

Das humane Mammakarzinom ist weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau und zudem verantwortlich für den größten Anteil krebsbedingter weiblicher Sterbefälle [5]. Ursächlich für die hohe Mortalität ist unter anderem das oftmalige Auftreten von Resistenzen gegenüber einzelnen Pharmazeutika sowie ein Mangel an effektiven, zielgerichteten Therapien zur Behandlung triple-negativer Tumoren, für die neben der klassischen, mit starken Nebenwirkungen behafteten Chemotherapie bislang kaum zugelassene, alternative Therapiemöglichkeiten existieren [34]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer, zielgerichteter und damit weniger toxischer Therapien für das humane Mammakarzinom. Im Fokus stehen hier vor allem Substanzen, die spezifisch tumorrelevante Signalwege und Prozesse inhibieren.

Einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt stellt der WNT-Signalweg dar. Eine Deregulation dieses für die Tumorentstehung zentralen Signalweges ist bereits für viele humane Tumorentitäten belegt, so auch für das Mammakarzinom, und mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert [191-194]. Eine Ursache der aberranten Aktivierung des WNT-Signalweges ist unter anderem ein Expressionsverlust seiner Antagonisten, der häufig die Folge einer Hypermethylierung des Promotors der jeweiligen codierenden Gene ist [88, 195-197]. Zu diesen WNT-Inhibitoren gehören beispielsweise die beiden bekannten Tumorsuppressoren DKK3 und SFRP1.

3.1 Charakterisierung des putativen Tumorsuppressors DKK3 im humanen Mammakarzinom

Ein Verlust der DKK3-Expression ist für zahlreiche humane Krebsentitäten, einschließlich des Mammakarzinoms, bereits beschrieben [130]. So zeigen maligne Brusttumoren im Median eine um 70 % niedrigere *DKK3*-mRNA-Expression als gepaarte Brust-Normalgewebe [190]. Als Ursache für den Expressionsverlust wird eine Hypermethylierung des *DKK3*-Gens verantwortlich gemacht, die zugleich mit einer schlechten Überlebensprognose von Brustkrebspatienten (gesamt und rezidivfrei) assoziiert ist [142, 191]. Zudem belegen mehrere *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien die tumorsuppressive Wirkung von DKK3 im humanen Mammakarzinom, die sich vor allem in einer DKK3-vermittelten Reduktion des Tumorzellwachstums [142, 192], als auch einer möglichen Involvierung von DKK3 in die Aufrechterhaltung einer epithelialen Differenzierung [142, 193] äußert. Die bisherigen Daten berücksichtigten dabei jedoch nicht die Heterogenität der Brustkrebserkrankung. Daher galt es im Rahmen dieser Dissertation erstmalig eine umfassende, Subtyp-spezifische Charakterisierung der DKK3-Funktion im humanen Mammakarzinom durchzuführen.

3.1.1 Verlust der DKK3-Expression im humanen Mammakarzinom

Zur Evaluierung eines möglichen Subtyp-spezifischen DKK3-Expressionsverlustes im humanen Mammakarzinom erfolgte zunächst eine *Real-Time*-basierte Expressionsanalyse unter Verwendung von 30 kryokonservierten Brusttumor- und 11 Brust-Normalgewebeproben. Die klinisch-pathologischen Parameter dieses Kollektivs sind in Tabelle 6-1 des Anhangs zusammengefasst. Im Vergleich zu gesundem Brustgewebe wiesen die untersuchten Mammakarzinome im Median eine Reduktion der *DKK3*-mRNA-Expression um den Faktor 5 auf (Abbildung 3-1A).

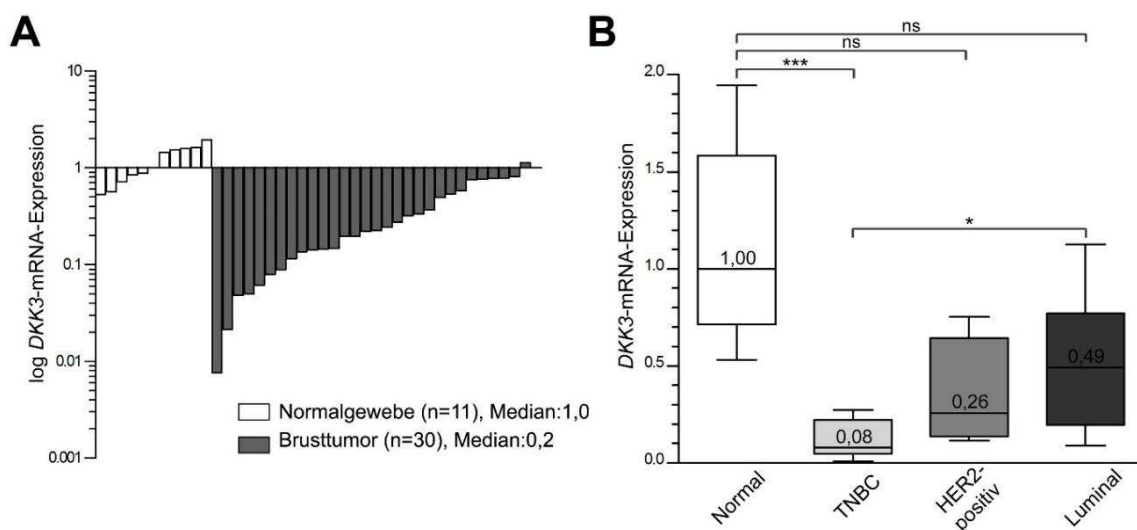


Abbildung 3-1: Verlust der *DKK3*-mRNA-Expression in humanen, kryokonservierten Mammakarzinomen (A) Die kryokonservierten Proben von 30 Mammakarzinomen zeigten in der *Real Time*-PCR-basierten Expressionsanalyse eine deutlich geringere *DKK3*-mRNA-Expression im Vergleich zu Brust-Normalgeweben (n=11). (B) Die Subgruppenanalyse der Proben aus A offenbarte den stärksten Verlust der *DKK3*-mRNA-Expression in Karzinomen des IHC-definierten Subtyps TNBC. Die Normierung aller Proben erfolgte auf die mediane *DKK3*-mRNA-Expression der Normalgewebe. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. ns: nicht signifikant; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

Anhand immunhistochemischer (IHC) und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs (FISH)-Daten für den Östrogen (ER)-, Progesteron (PR)- und HER2/NEU-Rezeptor erfolgte zusätzlich eine Stratifizierung der Patientenkohorte in die drei Subtypen „TNBC“, „HER2-positiv“ und „Luminal“ [37, 163]. Die Subgruppenanalyse der *DKK3*-mRNA-Expression ergab einen, im Vergleich zu den Kontroll-Normalgeweben, hochsignifikanten Expressionsverlust in den aggressiven, triple-negativen Tumoren (TNBC, medianer *Fold Change* (FC): 12,7; $P < 0,001$; Abbildung 3-1B). Hingegen erwies sich die Herabregulation der *DKK3*-mRNA-Expression in HER2-positiven (medianer FC: 3,9) und luminalen Fällen (medianer FC: 2,0) als nicht signifikant.

Gestützt wurden diese Beobachtungen durch eine mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelte, positive Korrelation zwischen einer niedrigen *DKK3*-mRNA-Expression und einem negativen Hormonrezeptor-Status (ER: $P < 0,01$ und PR: $P = 0,066$; Tabelle 3-1). Ferner zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen einer reduzierten *DKK3*-Expression und einem hohem Tumorgrad ($P < 0,05$; Tabelle 3-1). Diese Verknüpfung deutet auf eine mögliche Funktion von *DKK3* in der epithelialen Differenzierung hin [22].

Tabelle 3-1: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des Kryogewebe-Kollektivs mit der *DKK3*-mRNA-Expression.

Parameter	n ^a	<i>DKK3</i> hoch ^b	<i>DKK3</i> niedrig ^b	P-Wert ^c
Gesamt	30	15 (50,0 %)	15 (50,0 %)	-
Alter bei Diagnosestellung				
< 63 Jahre	14	10 (71,4 %)	4 (28,6 %)	0,066
≥ 63 Jahre	16	5 (31,3 %)	11 (68,7 %)	
Tumorgröße ^d				
pT1	14	8 (57,2 %)	6 (42,8 %)	0,715
pT2-3	16	7 (43,7 %)	9 (56,3 %)	
Lymphknoten-Status ^d				
pN0	17	7 (41,2 %)	10 (58,2 %)	0,462
pN1-3	12	7 (58,3 %)	5 (41,7 %)	
Histologischer Tumorgrad ^e				
G1-2	8	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	0,035
G3	22	8 (36,4 %)	14 (63,6 %)	
Östrogenrezeptor-Status				
negativ (IRS ^f 0-2)	16	4 (25,0 %)	12 (75,0 %)	0,009
positiv (IRS ^f 3-12)	14	11 (78,6 %)	3 (21,4 %)	
Progesteronrezeptor-Status				
negativ (IRS ^f 0-2)	15	5 (33,3 %)	10 (66,7 %)	0,066
positiv (IRS ^f 3-12)	15	10 (66,7 %)	5 (33,3 %)	
HER2-Status ^g				
negativ	24	11 (45,8 %)	13 (54,2 %)	0,651
positiv	6	4 (66,7 %)	2 (33,3 %)	

^aWeibliche Patientinnen mit primärem, unilateralem, invasivem Mammakarzinom. ^bDie relativen Expressionswerte wurden an der medianen *DKK3*-mRNA-Expression dichotomisiert. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. ^cExakter Test nach Fisher (zweiseitig). Signifikante *P*-Werte ($P < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben. ^dGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [23]. ^eGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [22]. ^fImmunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [194]. ^gÜberexpression des *ERBB2*-Gens (*HER2/NEU*) wurde gemäß dem IHC-basierten DAKO-Score-System diagnostiziert. Bei zweifelhaften Fällen (DAKO-IHC: 2+) erfolgte zusätzlich eine Untersuchung auf Amplifikation des Gens mittels FISH-Test. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehlern ungleich 100 % sein.

Die Validierung der generierten mRNA-Expressionsdaten sowie deren Korrelationen mit den klinisch-pathologischen Parametern erfolgte anhand der *in silico*-Analyse eines

unabhängigen Datensatzes des TCGA-Portals [166, 167] (siehe Abschnitt 2.1.3). Die klinisch-pathologischen Parameter des TCGA-Expressionsdatensatzes sind in Tabelle 6-4 des Anhangs aufgelistet. Die Auswertung der *Illumina-HiSeq*-Expressionsanalyse von 791 PAM50-klassifizierten Brustkrebs-Fällen und 113 Normalgeweben der Brust ergab einen hochsignifikanten Verlust der *DKK3*-mRNA-Expression in allen klinisch-relevanten Brustkrebs-Subtypen (für alle $P < 0,001$; Abbildung 3-2). In Übereinstimmung mit dem eigenständig generierten mRNA-Expressionsdatensatz zeigte sich der stärkste *DKK3*-Expressionsverlust gegenüber den Normalgewebe-Kontrollen in dem intrinsischen Subtyp Basal-like (medianer FC: 5,1), welcher überwiegend dem IHC-definierten TNBC-Subtyp entspricht [44, 195].

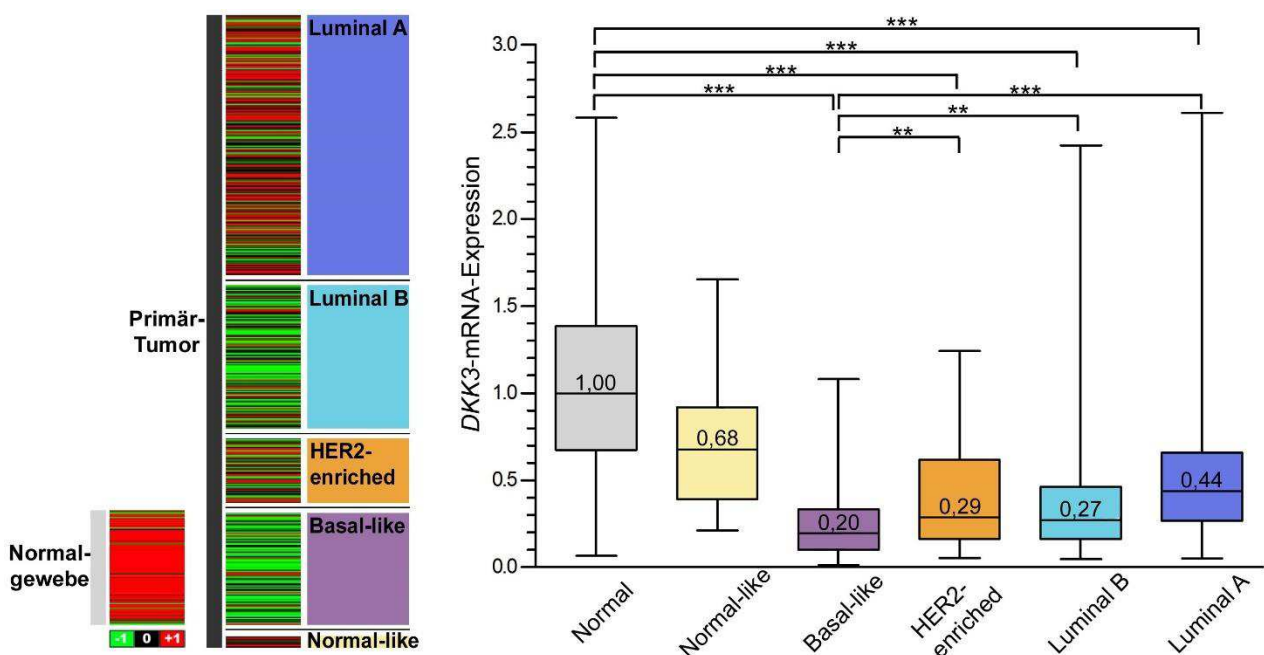


Abbildung 3-2: Verlust der *DKK3*-mRNA-Expression in humanen Mammakarzinomen (*in silico*-Datensatz). Die *in silico* *DKK3*-mRNA-Expressionsanalyse von 791 PAM50-klassifizierten Brusttumor- und 113 Brust-Normalgewebeproben, dargestellt als *Heatmap* (links) und *Boxplots* (rechts), bestätigte die Herabregulation der *DKK3*-mRNA-Expression im humanen Mammakarzinom. Rot: hohe, schwarz: intermediäre, grün: niedrige *DKK3*-mRNA-Expression. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

Die Analyse der klinisch-pathologischen Parameter der TCGA-Kohorte mittels exaktem Test nach Fisher bestätigte die Verknüpfung zwischen einem Verlust der *DKK3*-mRNA-Expression und dem aggressiven triple-negativen Mammakarzinom. So korrelierte eine niedrige *DKK3*-Expression signifikant mit einem negativen Hormonrezeptor- ($P < 0,001$) und HER2-Status ($P < 0,05$) und konnte zudem vermehrt in größeren Brusttumoren beobachtet werden ($P < 0,01$; Tabelle 3-2). Aufgrund fehlender Information über den Differenzierungsgrad der Tumoren war es nicht möglich eine potentielle Korrelation zwischen einem Verlust der *DKK3*-Expression und einer schlechten Differenzierung der Tumoren (Tumorgad größer G2),

wie sie anhand des Kryogewebe-Kollektivs beobachtet wurde, am unabhängigen *in silico*-Kollektiv des TCGA-Datenportals zu verifizieren.

Tabelle 3-2: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des *in silico*-Datensatzes (TCGA) mit der *DKK3*-mRNA-Expression.

Parameter	n ^a	<i>DKK3</i> hoch ^b	<i>DKK3</i> niedrig ^b	<i>P</i> -Wert ^c
Gesamt	791	401 (50,7 %)	390 (49,3 %)	-
Alter bei Diagnosestellung				
≤ 58 Jahre	409	213 (52,1 %)	196 (47,9 %)	0,434
> 58 Jahre	382	188 (49,2 %)	194 (50,8 %)	
Tumorgroße ^d				
pT1	209	123 (58,9 %)	86 (41,2 %)	0,006
pT2-4	582	278 (47,8 %)	304 (52,2 %)	
Lymphknoten-Status ^d				
pN0	375	178 (47,5 %)	197 (52,5 %)	0,073
pN1-3	403	218 (54,1 %)	185 (45,9 %)	
Östrogenrezeptor-Status				
negativ (IRS ^e 0-2)	176	61 (34,7 %)	115 (65,3 %)	< 0,001
positiv (IRS ^e 3-12)	577	321 (55,6 %)	256 (44,4 %)	
Progesteronrezeptor-Status				
negativ (IRS ^e 0-2)	246	96 (39,0 %)	150 (61,0 %)	< 0,001
positiv (IRS ^e 3-12)	504	285 (56,6 %)	219 (43,5 %)	
HER2-Status ^f				
negativ	600	296 (49,3 %)	304 (50,7 %)	0,041
positiv	102	62 (60,8 %)	40 (39,2 %)	

^aWeibliche Patientinnen mit primärem, invasivem Mammakarzinom. ^bDie relativen mRNA-Expressionsdaten wurden am Median dichotomisiert. ^cExakter Test nach Fisher (zweiseitig). Signifikante *P*-Werte (*P* < 0,05) sind durch Fettdruck hervorgehoben. ^dGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [23]. ^eImmunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [194]. ^fÜberexpression des *ERBB2*-Gens (*HER2/NEU*) wurde gemäß dem IHC-basierten DAKO-Score System diagnostiziert. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehlern ungleich 100 % sein.

Als nächstes galt es den auf mRNA-Ebene gezeigten Verlust der *DKK3*-Expression auf Proteinebene zu verifizieren. Zu diesem Zweck erfolgte die immunhistochemische Analyse von mehreren hundert Brusttumor-Fällen in Form eines *Tissue Microarrays* (TMAs) sowie von elf Brust-Normalgeweben anhand einzelner Gewebeschnitte. Der TMA umfasste insgesamt 772 Mammakarzinom-Proben und wurde bereits in anderen Studien publiziert [164, 165]. Für 463 Fälle lagen auswertbare *DKK3*-Proteinexpressions-Daten sowie Informationen über ER-, PR- und HER2-Status vor, so dass diese für die folgende Expressionsstudie genutzt werden konnten (siehe Abschnitt 2.1.2). Die klinisch-pathologischen Parameter der für die Analyse verwendeten Tumoren des TMAs sind in Tabelle 6-2 (Anhang) zusammengefasst.

In Abbildung 3-3A-E sind repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung der DKK3-Proteinexpression gesunder Brust- sowie Brusttumor-Gewebeschnitte gezeigt. In normalem epithelialen Brustgewebe wurde eine moderate, überwiegend zytoplasmatische DKK3-Proteinexpression detektiert (Abbildung 3-3A), während in epithelialen Brustkrebszellen eine vorwiegend schwache, zytoplasmatische Expression des DKK3-Proteins zu erkennen war (Abbildung 3-3C-E).

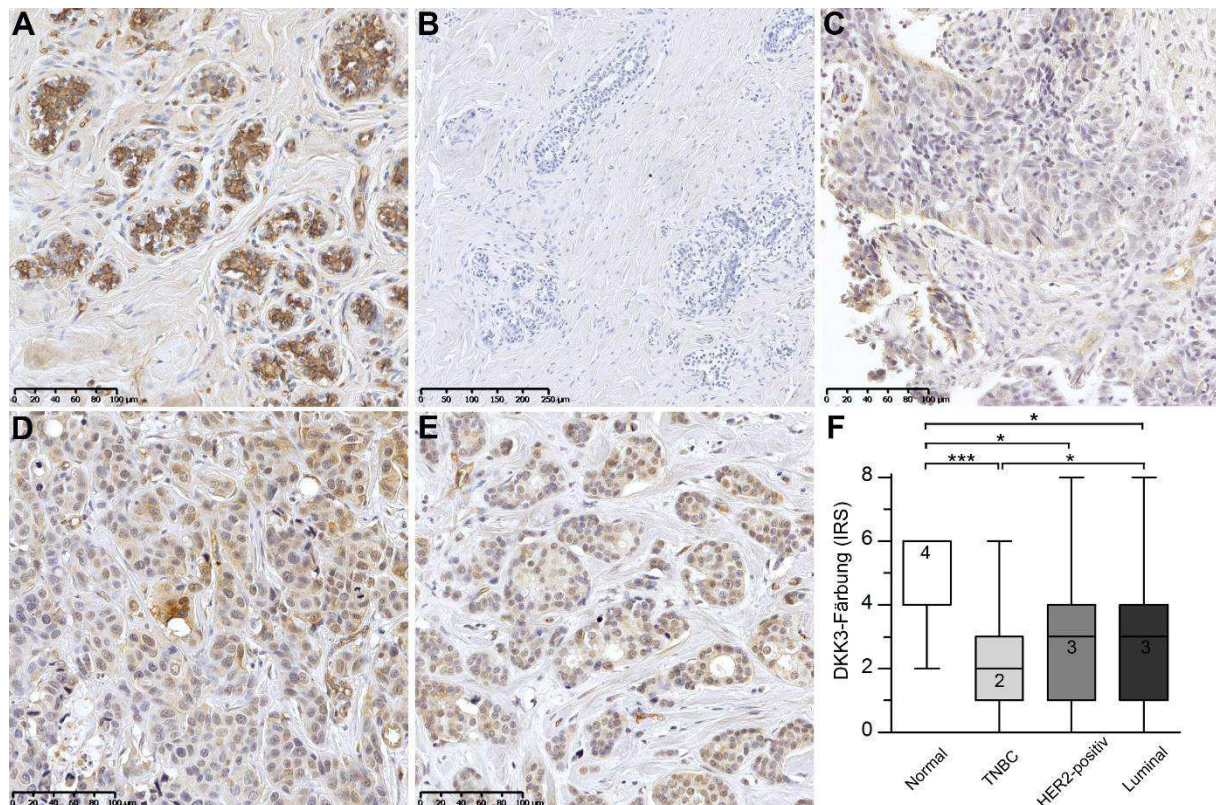


Abbildung 3-3: Der DKK3-Protein-Expressionsverlust im humanen Mammakarzinom. (A-E) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Untersuchung der DKK3-Proteinexpression in gesunden Brust- sowie Mammakarzinom-Gewebeschnitten. (A) Normales epitheliales Brustgewebe zeigte eine moderate, überwiegend zytoplasmatische DKK3-Immunreaktivität, während (B) die Primärantikörper-Kontrolle kein Signal aufwies. In Mammakarzinomen konnte eine überwiegend schwache DKK3-Expression festgestellt werden, mit der niedrigsten Intensität in Fällen des (C) triple-negativen Brustkrebs (TNBC) im Vergleich zu (D) HER2-positiven und (E) luminalen Karzinomen. (F) Die *Boxplot*-Analyse verdeutlicht die signifikante Herabregulation der DKK3-Expression in Tumoren der IHC-definierten Subtypen TNBC (n=54), HER2-positiv (n=47) und Luminal (n=362). IRS: immunoreaktiver Score nach Remmele und Stegner [194]. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

Durch die Quantifizierung der DKK3-Färbung unter Verwendung eines von Remmele und Stegner entwickelten immunreaktiven Scores (IRS) [194] ergab sich eine im Vergleich zu den Normalgewebe-Kontrollen (medianer IRS=4) statistisch signifikante Herabregulation der DKK3-Proteinexpression sowohl in triple-negativen Tumoren (TNBC; n=54; medianer IRS=2; $P < 0,001$) als auch HER2-positiven (n=47; medianer IRS=3; $P < 0,05$) und luminalen

Mammakarzinomen (n=362; medianer IRS=3; $P < 0,05$). Im Einklang mit den mRNA-Daten zeigte sich hier ebenfalls der stärkste Verlust der DKK3-Proteinexpression in den IHC-klassifizierten triple-negativen Brustkrebsfällen (Abbildung 3-3F).

3.1.2 DNA-Hypermethylierung der *DKK3*-Gensequenz

Eine Reduktion der DKK3-Expression im humanen Mammakarzinom wurde bereits in mehreren Studien gezeigt [142, 145, 190] und konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.1.1). Darüber hinaus offenbarte die in dieser Dissertation erstmalig durchgeführte Subtyp-spezifische Expressionsanalyse einen differenziellen DKK3-Expressionsverlust in den distinkten Brusttumor-Subtypen mit der stärksten Reduktion in triple-negativen Karzinomen. Eine mögliche Ursache dieses Expressionsverlustes stellt eine DNA-Hypermethylierung des *DKK3*-Gens dar. In einer vorangegangenen Studie der AG Dahl konnte bereits mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) eine positive Korrelation zwischen einer reduzierten *DKK3*-mRNA-Expression und einer erhöhten DNA-Hypermethylierung des *DKK3*-Gens im humanen Mammakarzinom nachgewiesen werden [190]. Im Folgenden galt es diese Daten mit Hilfe der sensitiveren und zudem quantitativen Methode der Pyrosequenzierung zu überprüfen. Zudem sollte untersucht werden, ob den beobachteten Subtyp-spezifischen DKK3-Expressionsunterschieden ein differenzielles DNA-Methylierungsmuster in den distinkten Brustkrebs-Subtypen zu Grunde liegt.

Der zu diesem Zweck mittels Pyrosequenzierung analysierte Bereich befand sich in der 5'-Region des *DKK3*-Gens in unmittelbarer Nachbarschaft zur Hybridisierungsregion der *DKK3*-MSP-Primer aus der oben genannten Studie der AG Dahl [190]. Die Lage des pyrosequenzierten Genabschnitts sowie die Hybridisierungsregionen der *DKK3*-MSP-Primer sind schematisch in Abbildung 3-4 illustriert. Die analysierte Gensequenz deckt vier CpG-Dinukleotide ab und ist innerhalb einer CpG-Insel nahe des Translationsstartpunktes in Exon 2 lokalisiert. CpG-Inseln sind definiert als DNA-Sequenzen, die einen hohen CpG-Dinukleotid-Gehalt aufweisen und befinden sich häufig in regulatorischen Genabschnitten nahe des Transkriptionsstartpunktes [97, 196, 197]. Diese Bereiche beinhalten neben dem Kernpromotor ebenfalls zusätzliche Bindungsstellen für Gentranskriptions-verstärkende bzw. -schwächende Faktoren, sogenannte *Enhancer* bzw. *Silencer*. Über eine *in silico*-Sequenzanalyse mit Hilfe der Software *Genomatix* konnte eine potentielle *Enhancer*-Sequenz innerhalb des pyrosequenzierten Genabschnitts identifiziert werden.

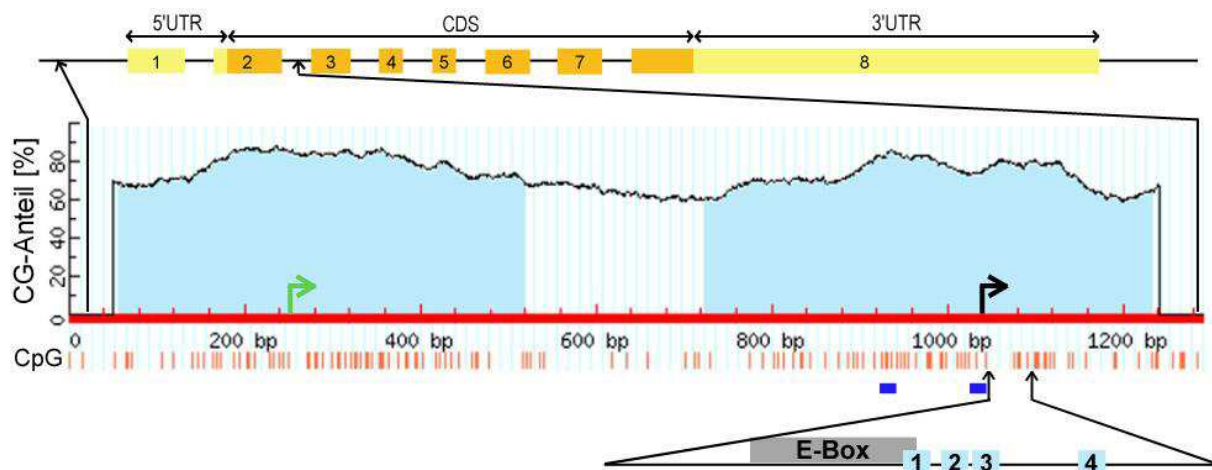


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der untersuchten 5'-Region des *DKK3*-Gens. Die obere Darstellung zeigt den auf Chromosom 11p15.2 lokalisierten *DKK3*-Genbereich, welcher sich über 8 Exons erstreckt. Die codierende Sequenz (orange Boxen, CDS) ist flankiert von der 5'-untranslatierten Region (5'UTR) sowie der 3'UTR (gelbe Boxen). Die mittlere Darstellung (*Methprimer*-Datenbank) zeigt zwei CpG-Inseln (hellblau), die in der 5'-Region des *DKK3*-Gens lokalisiert sind. Diese Sequenz erstreckt sich über den Promotorbereich sowie die ersten beiden Exons. Der grüne Pfeil markiert den Transkriptions-, der schwarze Pfeil den Translationsstartpunkt, welcher sich in Exon 2 befindet. Einzelne CpG-Dinukleotide sind als vertikale rote Striche unterhalb der Abszisse eingezeichnet. Auf der Ordinate ist der prozentuale CG-Anteil der Gensequenz aufgetragen. Die untere Darstellung illustriert die mittels Pyrosequenzierung erfasste *DKK3*-Gensequenz mit den entsprechenden CpG-Dinukleotide 1-4 (blaue Boxen) sowie einer potentiellen Bindungsstelle für Gentranskriptions-verstärkende Faktoren (graue E-Box). Diese *Enhancer*-Sequenz wurde durch eine *in silico*-Sequenzanalyse ermittelt (*Genomatix* Software, Konfidenzniveau: 0,9). Zum Vergleich sind die Hybridisierungsregionen der *DKK3*-MSP-Primer aus einer vorangegangenen Studie der AG Dahl [190] als dunkelblaue Boxen eingezeichnet.

Die Pyrosequenzierungs-basierte Methylierungsanalyse erfolgte unter Einschluss von 33 kryokonservierten Brusttumor- sowie neun Brust-Normalgewebeproben. Die klinisch-pathologischen Parameter dieses DNA-Kollektivs sind in Tabelle 6-3 des Anhangs zusammengefasst. Das Ergebnis der Methylierungsanalyse ist in Form eines Streudiagrammes in Abbildung 3-5 dargestellt. Die Einzelwerte stellen jeweils den mittleren Methylierungsgrad für jede Probe dar und sind aus den Methylierungsfrequenzen aller vier untersuchten CpG-Dinukleotide im analysierten *DKK3*-Genabschnitt errechnet. Im Vergleich zum gesunden Brustgewebe (n=9; Median: 4,5 %) konnte in Mammakarzinomen (n=33; Median: 28,8 %; $P < 0,01$) eine signifikant erhöhte Methylierungsfrequenz herausgestellt und somit die zuvor mittels MSP generierten Beobachtungen bestätigt werden (Abbildung 3-5A). Anhand immunhistochemischer (IHC) und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs (FISH)-Daten für den Östrogen-, Progesteron- und HER2/NEU-Rezeptor erfolgte zusätzlich eine Stratifizierung der Patientenkohorte in die drei Subtypen „TNBC“, „HER2-positiv“ und „Luminal“ [37, 163]. Die Subgruppenanalyse der *DKK3*-DNA-Methylierung ergab eine statistisch signifikant erhöhte Methylierungsfrequenz des untersuchten Genbereichs in Tumoren der beiden Subtypen HER2-positiv (n=4; Median: 48,5 %; $P < 0,05$) und Luminal (n=21; Median: 23,3 %; $P < 0,05$), jedoch nicht in Karzinomen des Subtyps TNBC (n=8; Median: 17,4 %) (Abbildung 3-5B). Interessanterweise wiesen TNBC-Tumoren, in denen zuvor

der größte Verlust der DKK3-Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.1), die geringste Methylierungsfrequenz der drei Brusttumor-Subtypen auf.

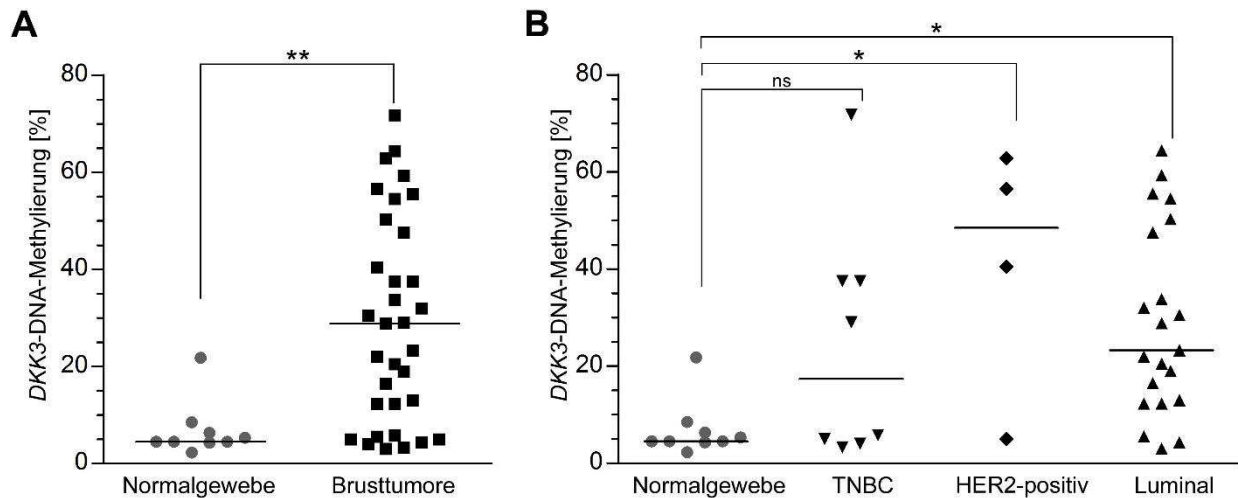


Abbildung 3-5: Erhöhte DKK3-DNA-Methylierung im humanen Mammakarzinom. (A) Die 33 untersuchten Brusttumorproben wiesen in den vier mittels Pyrosequenzierung analysierten CpG-Dinukleotiden eine im Vergleich zu den Brust-Normalgeweben (n=9) signifikant erhöhte Methylierungsfrequenz auf. ** $P < 0,01$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test). (B) In Tumoren der IHC-definierten Brustkrebs-Subtypen HER2-positiv (n=4) und Luminal (n=21) konnte eine im Vergleich zum Brust-Normalgewebe signifikant höhere Methylierungsfrequenz des untersuchten Genbereichs gezeigt werden, nicht aber in Karzinomen des triple-negativen Brustkrebs-Subtyps (TNBC, n=8). ns: nicht signifikant; * $P < 0,05$ (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest). Horizontale Linien der Streudiagramme: Mediane. Einzelwerte: Mittlere Methylierung der vier untersuchten CpG-Dinukleotide.

Zur Validierung der generierten DNA-Methylierungsdaten erfolgte die *in silico*-Analyse eines unabhängigen Datensatzes des TCGA-Portals [166, 167] (siehe Abschnitt 2.1.3). Zur Verfügung standen die *Illumina-Infinium450k*-Methylierungsdaten von 29 einzelnen, in der *DKK3*-Gensequenz lokalisierten CpG-Dinukleotide. 14 dieser CpG-Dinukleotide befanden sich innerhalb der beiden in Abbildung 3-4 dargestellten CpG-Inseln in der 5'-Region des *DKK3*-Gens, darunter auch die CpG-Position „1“ des mittels Pyrosequenzierung untersuchten *DKK3*-Genabschnitts. Der Datensatz umfasste insgesamt 497 PAM50-klassifizierte Brustkrebsfälle sowie 84 gesunde Brust-Normalgewebe. Die klinisch-pathologischen Parameter des TCGA-Methylierungs-Datensatzes sind in Tabelle 6-5 des Anhangs aufgelistet.

Die statistische Auswertung der *in silico*-Methylierungsdaten für das CpG-Dinukleotid „1“ ist in Abbildung 3-6A und B dargestellt. In Übereinstimmung mit den Methylierungsdaten des Kryo-Kollektivs konnte im Vergleich zu gesunden Kontroll-Brustgeweben (Median: 12 %) eine hochsignifikant erhöhte Methylierungsfrequenz dieser CpG-Position in humanen Mammakarzinomen (Median: 44 %; $P < 0,001$) herausgestellt werden (Abbildung 3-6A).

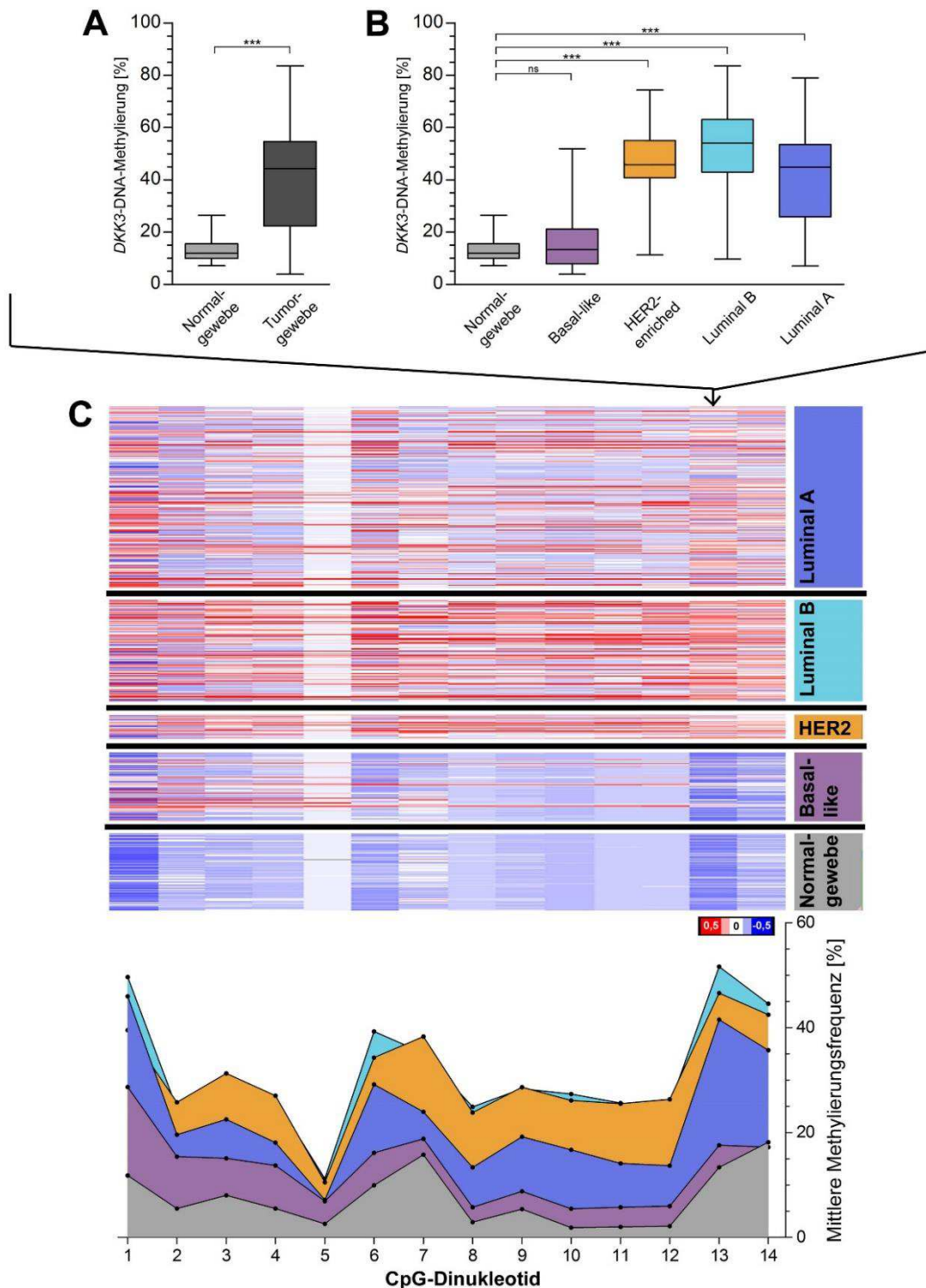


Abbildung 3-6: Methylierungsfrequenz von 14 einzelnen CpG-Dinukleotiden in der 5'-Region des *DKK3*-Gens (*in silico*-Datensatz). Analysiert wurden die Methylierungsdaten von 497 PAM50-klassifizierten Brusttumorfällen sowie 84 Brust-Normalgeweben des TCGA-Datenportals [166]. (**A** und **B**) Dargestellt als *Boxplots* ist die *in silico*-Methylierungsanalyse der CpG-Position „1“ des mittels Pyrosequenzierung untersuchten *DKK3*-Genabschnitts (siehe Abbildung 3-4). (**A**) Die statistische Auswertung der Methylierungsdaten ergab eine signifikant erhöhte mediane Methylierungsfrequenz dieses CpG-Dinukleotids in humanen Mammakarzinom-Proben im Vergleich zu Brust-Normalgeweben. ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test). (**B**) Eine Stratifizierung der Tumoren gemäß PAM50-Klassifikation offenbarte eine im Vergleich zu den Brust-Normalgeweben signifikant gesteigerte Methylierungsrate des CpG-Dinukleotids „1“ in Karzinomen der Subtypen *HER2-enriched* ($n=31$), *Luminal B* ($n=117$) und *Luminal A* ($n=256$) nicht aber in Tumoren des Subtyps *Basal-like* ($n=77$). ns: nicht signifikant; ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest). Horizontale Linien der

Boxplots: Mediane. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. (C) Dargestellt als *Heatmap* (oben) und Kurvendiagramm (unten) ist die *in silico*-Methylierungsanalyse von 14 einzelnen CpG-Dinukleotide. Alle CpG-Positionen sind innerhalb der beiden in Abbildung 3-4 skizzierten CpG-Inseln in der 5'-Region des *DKK3*-Gens lokalisiert. CpG-Dinukleotid 13 dieser Abbildung entspricht der CpG-Position „1“ des mittels Pyrosequenzierung untersuchten *DKK3*-Genabschnitts (siehe Abbildung 3-4). Basale Tumoren wiesen im Bereich der untersuchten CpG-Dinukleotide eine deutlich geringere mittlere Methylierungsfrequenz auf als Karzinome der Subtypen *HER2-enriched* (HER2), Luminal B und Luminal A. *Heatmap*: Rot: hohe; Weiß: intermediäre, Blau: niedrige Methylierungsfrequenz. Diagramm: Einzelwerte stellen die mittlere Methylierungsfrequenz des jeweiligen CpG-Dinukleotids in allen Tumorfällen des entsprechenden Subtyps dar.

Ebenfalls im Einklang mit dem eigenständig generierten Datensatz wiesen Tumoren des intrinsischen Subtyps *Basal-like* (n=77; Median: 13 %), der überwiegend dem IHC-definierten TNBC-Subtyp entspricht [44, 195], im Vergleich zu Brust-Normalgeweben keine signifikant erhöhte Methylierung des CpG-Dinukleotids „1“ auf, während in Karzinomen der Subtypen *HER2-enriched* (n=31; Median: 46 %), Luminal B (n=117; Median: 54 %) und Luminal A (n=256; Median: 45 %) in dieser CpG-Position eine hochsignifikant erhöhte Methylierungsfrequenz nachgewiesen werden konnte (jeweils $P < 0,001$) (Abbildung 3-6B).

Dieses Ergebnis bestätigt die am eigenständig generierten Methylierungs-Datensatz des Kryo-Kollektivs beobachtete Diskrepanz zwischen einem hohem *DKK3*-Expressionsverlust und einer geringen DNA-Methylierung dieser Gensequenz in basalen Mammakarzinomen. Im Folgenden galt es zu untersuchen, ob diese Abweichung im DNA-Methylierungsmuster in Tumoren des Subtyps *Basal-like* sich auch in anderen CpG-Dinukleotide der beiden, die *DKK3*-Promotorregion überspannenden, CpG-Inseln widerspiegelte. Zu diesem Zweck wurden die für 14 einzelne CpG-Dinukleotide innerhalb dieser Sequenz verfügbaren *in silico*-Methylierungsdaten ausgewertet und gemäß PAM50-Klassifikation stratifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-6C in Form einer *Heatmap* sowie eines Kurvendiagramms des untersuchten Genbereichs gezeigt. CpG-Dinukleotid 13 dieser Abbildung entspricht der CpG-Position „1“ des mittels Pyrosequenzierung untersuchten *DKK3*-Genabschnitts (siehe Abbildung 3-4).

Sowohl in der *Heatmap* als auch im Kurvendiagramm wird deutlich, dass basale Tumoren über den gesamten untersuchten Bereich eine deutlich geringere mittlere Methylierungsfrequenz als Karzinome der Subtypen *HER2-enriched*, Luminal B und Luminal A aufwiesen (Abbildung 3-6C). Die an den eigenständig generierten Methylierungsdaten beobachtete Abweichung von *DKK3*-Methylierung und *DKK3*-Expression in basalen Tumoren ist demnach nicht nur auf einen bestimmten Genbereich begrenzt, sondern findet sich im gesamten transkriptionsregulierenden *DKK3*-Genabschnitt wieder. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der *DKK3*-Expressionsverlust in basalen Mammakarzinomen möglicherweise über einen anderen molekularen Mechanismus reguliert wird, als in Tumoren der übrigen Brustkrebs-Subtypen.

Bestätigt werden konnte diese Hypothese zusätzlich durch eine Korrelationsanalyse zwischen der mittleren Methylierung der 14 untersuchten CpG-Dinukleotide und der *DKK3*-

mRNA-Expression (Tabelle 3-3). Während für basale Tumoren kein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und *DKK3*-mRNA-Expression nachweisbar war, korrelierten diese Parameter signifikant bei Analyse aller nicht basalen Tumoren der TCGA-Patientenkohorte ($P < 0,05$).

Tabelle 3-3: Korrelation der mittleren Methylierungsfrequenz des untersuchten *DKK3*-Genabschnitts mit der *DKK3*-mRNA-Expression. Korreliert wurde der Mittelwert der Methylierungsfrequenzen aller 14 untersuchten CpG-Dinukleotide in der 5'-Region des *DKK3*-Gens mit der *DKK3*-mRNA-Expression (siehe Abbildung 3-6).

Fälle	Korrelationskoeffizient nach Pearson ^a	Signifikanz ^b	n ^c
Alle Tumoren	-0,027	0,548	497
Basale Tumoren ^d	-0,027	0,819	77
Nicht basale Tumoren	-0,116	0,018	420

^aKorrelationskoeffizient gemäß Bravais und Pearson [198]. ^bZweiseitiger *t*-Test. Signifikante *P*-Werte ($P < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben. ^cWeibliche Patientinnen mit primärem, invasivem Mammakarzinom. ^dGemäß PAM50-Klassifikation [31].

3.1.3 Die prognostische Relevanz von *DKK3* für das humane Mammakarzinom

Eine Assoziation zwischen der Hypermethylierung des *DKK3*-Gens und einer schlechten Prognose für das Überleben von Brustkrebspatienten (gesamt und rezidivfrei) konnte bereits in zwei unabhängigen Studien nachgewiesen werden, die jedoch beide jeweils nicht die Heterogenität der Brustkrebserkrankung berücksichtigten [142, 191]. Eine mögliche Korrelation zwischen Patientenüberleben und der *DKK3*-Expression in den einzelnen molekularen Subtypen des Mammakarzinoms wurde bis heute nicht analysiert. In Anbetracht der beobachteten Subtyp-spezifischen *DKK3*-Expressionsunterschiede galt es im Folgenden die potentielle prognostische Bedeutung eines *DKK3*-mRNA-Expressionsverlustes in den einzelnen Brustkrebs-Subtypen zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurde die Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen in Abhängigkeit von der *DKK3*-mRNA-Expression unter Verwendung von Daten des *Kaplan-Meier Plotter*-Portals [189] analysiert. Der *Kaplan-Meier Plotter* ist ein Online-Programm, das die Berechnung univariater Kaplan-Meier-Überlebenskurven, basierend auf *Affymetrix-Chip*-Expressionsdaten und den korrespondierenden Überlebensdaten der jeweiligen Brustkrebsfälle, ermöglicht. Zur Analyse des rezidivfreien Überlebens (RFÜ) über 120 Monate in Bezug zur *DKK3*-Expression standen die Daten für 3.554 Brustkrebspatienten zur Verfügung.

Unter Berücksichtigung aller Mammakarzinom-Fälle konnte eine hochsignifikante Assoziation zwischen einer niedrigen *DKK3*-mRNA-Expression und einem verringerten RFÜ nachgewiesen werden ($P < 0,001$; Abbildung 3-7A). Um eine Subtyp-spezifische Analyse der Überlebens-Prognose zu ermöglichen erfolgte eine Stratifizierung der Brustkrebs-Kohorte in

die Subtypen Basal, HER2-positiv, Luminal A und Luminal B anhand von Proteinexpressionsdaten für ER, HER2/Neu und Ki-67 gemäß Konsens der St. Gallen-Konferenz 2013 [199, 200]. Die Subgruppen-Analyse offenbarte eine prognostische Bedeutung der *DKK3*-mRNA-Expression in basalen ($P < 0,001$; Abbildung 3-7B) als auch luminalen Karzinomen ($P < 0,001$; Abbildung 3-7D und E), hingegen nicht in HER2-positiven Tumoren (Abbildung 3-7C). Interessanterweise konnte der stärkste Zusammenhang zwischen der *DKK3*-Expression und dem Patientenüberleben in der Gruppe der basalen Tumoren (Hazardrate HR = 0,61) gezeigt werden, in welcher ebenfalls der größte Verlust der *DKK3*-Expression nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.1.1).

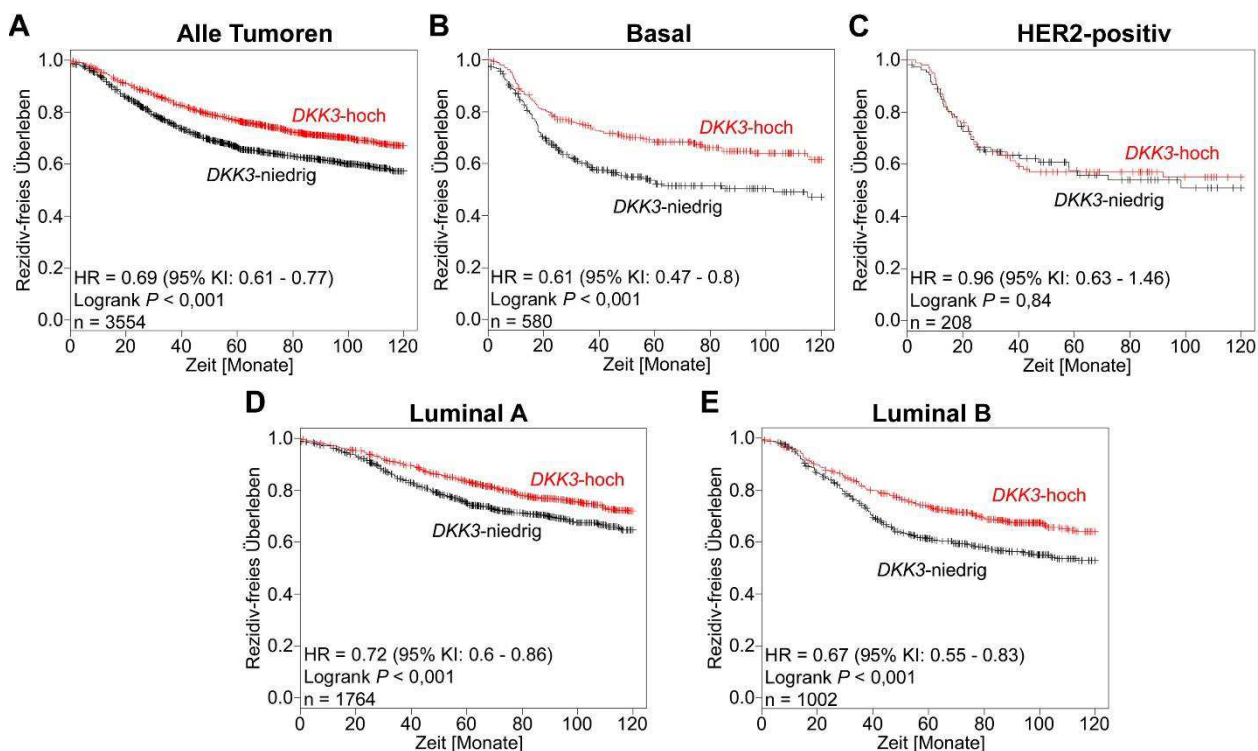


Abbildung 3-7: Der Verlust der *DKK3*-mRNA-Expression ist mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben assoziiert. Dargestellt sind die mit Hilfe des Online-Programms *Kaplan-Meier Plotter* [189] erstellten univariaten Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das rezidivfreie Überleben von Mammakarzinom-Patienten mit hoher *DKK3*-mRNA-Expression (rot) im Vergleich zu Patienten mit niedriger *DKK3*-mRNA-Expression (schwarz). (A) Unter Berücksichtigung aller Tumoren als auch nur den Karzinomen der Subtypen (B) Basal, (C) Luminal A sowie (D) Luminal B konnte eine signifikante Korrelation zwischen geringer *DKK3*-mRNA-Expression und einem verkürzten rezidivfreien Überleben beobachtet werden, hingegen nicht in Tumoren des Subtyps (E) HER2-positiv. Vertikale Linien: zensierte Fälle, HR = Hazardrate, 95 % KI: 95 %-Konfidenzintervall.

3.1.4 Die biologische Relevanz des DKK3-Expressionsverlustes für die Tumorgenese des humanen Mammakarzinoms

3.1.4.1 Generierung stabiler *in vitro*-Mammakarzinom-Modelle

Die prognostischen Daten der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse sowie ein Verlust der DKK3-Expression vornehmlich in basalen Brusttumoren wiesen auf eine mögliche Subtyp-spezifische Bedeutung eines DKK3-Expressionsverlustes in der Tumorgenese humaner Mammakarzinome hin. Eine experimentelle Überprüfung dieser Hypothese sollte anhand funktioneller *in vitro*-Tests unter Verwendung stabiler *DKK3*-Überexpressions-Zellkulturmodelle (*gain-of-function*) erfolgen. Mammakarzinom-Zelllinien lassen sich über die Expression molekularer Marker den einzelnen intrinsischen Brustkrebs-Subgruppen zuordnen und stellen daher geeignete Tumormodellsysteme dar, um die Eigenschaften der molekularen Brustkrebs-Subtypen widerzuspiegeln [201, 202]. Zusätzlich zu dem bereits in der AG Dahl etablierten luminalen *DKK3*-Überexpressionsmodell MCF-7 [170], galt es im Rahmen dieser Dissertation ein weiteres luminales sowie zwei basale Zellkulturmodelle zu erzeugen, um in den folgenden *in vitro*-Tests eine valide Aussage über eine mögliche Subtyp-spezifische Bedeutung eines DKK3-Verlustes treffen zu können. Zu diesem Zweck wurden die mesenchymalen Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-436 und MDA-MB-231, welche beide dem Subtyp Basal B zugeordnet werden, sowie MDA-MB-453, eine luminalen Brustkrebszelllinie, die zudem eine Amplifikation für HER2 aufweist, für die folgende stabile Transfektion ausgewählt [168, 201, 203]. Für die Auswahl war neben dem molekularen Subtyp der Zelllinien zudem eine fehlende endogene DKK3-Expression relevant. Diese konnte für alle drei Zelllinien auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Abbildung 3-8).

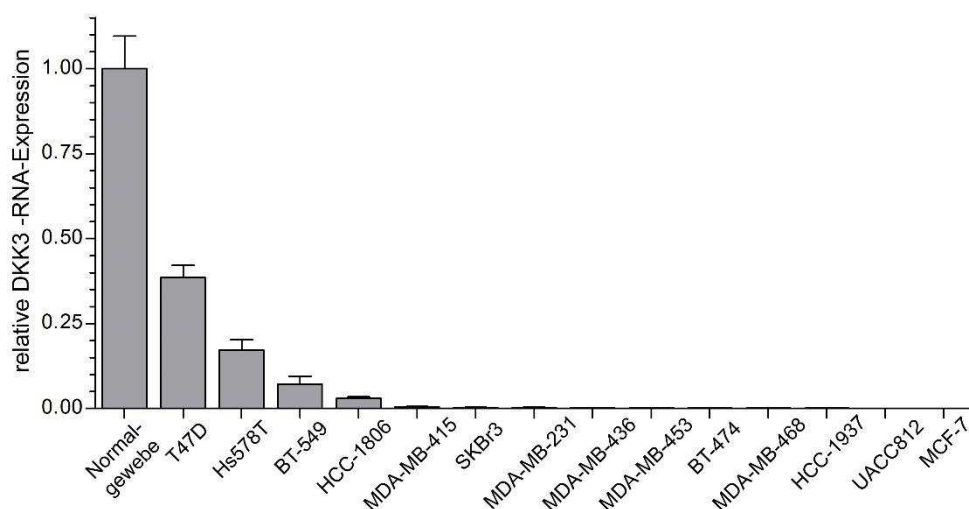


Abbildung 3-8: Verlust der *DKK3*-mRNA-Expression in humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Graphisch dargestellt ist die mittels *Real-Time* PCR ermittelte relative *DKK3*-mRNA-Expression in 14 humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Die Normierung aller Proben erfolgte auf die mediane *DKK3*-

mRNA-Expression von zehn vereinigten, kryokonservierten Normalgeweben der Brust. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: 95 %-Konfidenzintervall der Dreifachbestimmung.

Um eine ektopische Expression von DKK3 in den ausgewählten Zellkulturmodellen MDA-MB-436, MDA-MB-231 und MDA-MB-453 zu erzielen, wurde die Volllängen-*DKK3*-cDNA unter der Kontrolle eines CMV-Promotors über das pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektorkonstrukt stabil in das Genom dieser Zelllinien integriert (*DKK3*-Klone). Als Negativkontrollen dienten Einzelklone, die mit dem entsprechenden Leervektor (ohne Volllängen-*DKK3*-cDNA) transfiziert waren (Leervektor-Klone) (siehe Abschnitt 2.15.5). Die Generierung der stabilen MDA-MB-231 und MDA-MB-453-*DKK3*-Überexpressionsmodelle erfolgte unter Mitwirkung der beiden Studentinnen Aylin Topuz und Sarah Stahl im Rahmen ihrer Master- bzw. Bachelor-Thesis.

Nachdem die jeweiligen Klone erfolgreich in Reinkultur gebracht werden konnten, galt es die transgene *DKK3*-Reexpression der Einzelklone sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene zu bestätigen. Zusätzlich sollte auch die *DKK3*-Expression im bereits etablierten MCF-7-*DKK3*-Zellkulturmodell erneut überprüft werden. In Abbildung 3-9 sind die Ergebnisse der *Real-Time* PCR- sowie der *Western Blot*-Analysen für jeweils drei Leervektor- und drei *DKK3*-Klone der vier *DKK3*-Überexpressionsmodelle dargestellt.

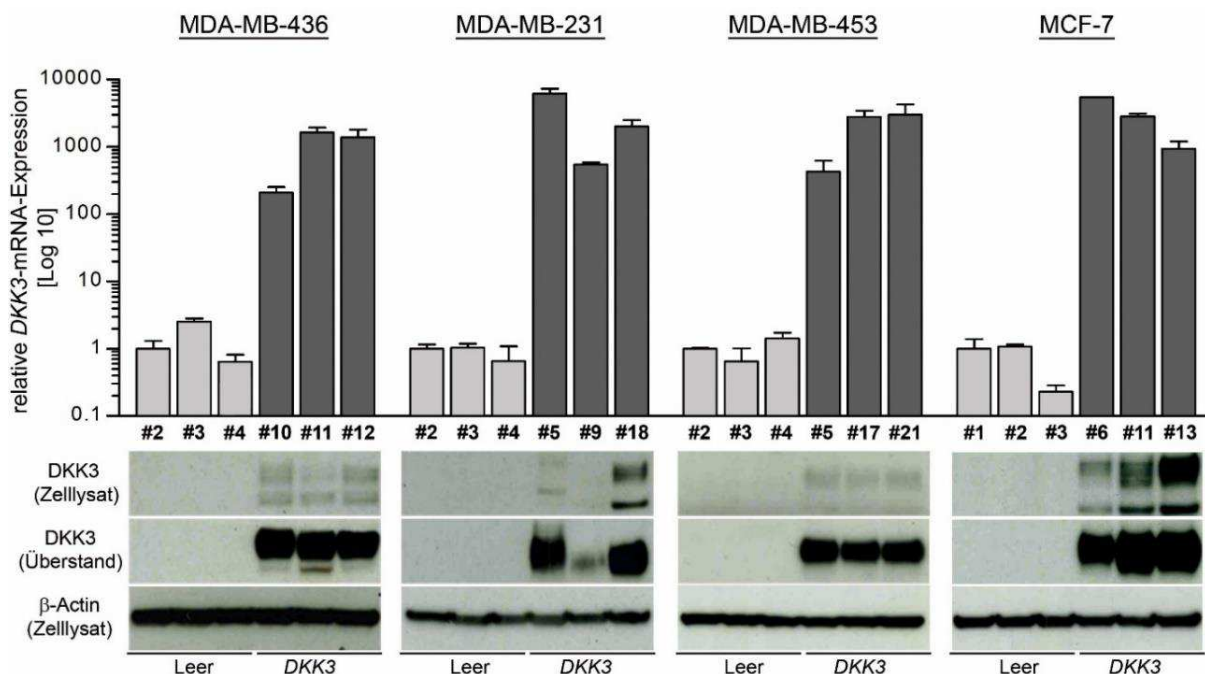


Abbildung 3-9: Verifizierung der *DKK3*-Reexpression in stabil transfizierten Einzelklonen der beiden basalen Zelllinien MDA-MB-436 und MDA-MB-231 sowie der beiden luminalen Zelllinien MDA-MB-453 und MCF-7 mittels *Real-Time* PCR- und *Western-Blot*-Expressionsanalysen. Oben: Dargestellt ist die relative *DKK3*-mRNA-Expression in je drei Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klonen (dunkelgrau) der vier Überexpressionsmodelle MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-453 und MCF-7. Die *DKK3*-mRNA-Expression aller Klone wurde jeweils auf die mediane Expression der Leervektor-Klone normiert. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression.

Vertikale Linien: 95 %-Konfidenzintervall der Dreifachbestimmung. *Unten:* Sowohl die DKK3-Proteinexpression als auch -sekretion wurde mittels *Western Blot*-Analysen an Gesamtzell-Lysaten sowie den korrespondierenden Zellkultur-Überständen der jeweiligen Leervektor- bzw. *DKK3*-Klone untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Alle untersuchten *DKK3*-Klone wiesen eine deutlich erhöhte *DKK3*-mRNA-Expression im Vergleich zu den korrespondierenden Leervektor-Klonen auf (Abbildung 3-9). In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten konnte in den generierten *DKK3*-Klonen auch auf Proteinebene eine Reexpression von *DKK3* herausgestellt werden, während in den Zell-Lysaten der Leervektor-Klone kein *DKK3*-Protein detektierbar war. Infolge der Tatsache, dass *DKK3* ein sekretiertes Protein ist [61], erfolgte zusätzlich eine Untersuchung des *DKK3*-Proteingehalts in den korrespondierenden Zellkultur-Überständen (siehe Abschnitt 2.14.5). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die ektopische *DKK3*-Expression in einer starken Sekretion von *DKK3*-Protein in den Zellkultur-Überstand resultierte (Abbildung 3-9).

Im Folgenden wurden die vier generierten stabilen *DKK3*-Tumormodelle genutzt, um einen möglichen Subtyp-spezifischen Einfluss von *DKK3* auf fundamentale Eigenschaften von Tumorzellen zu untersuchen, zu denen unter anderem ein gesteigertes Zellwachstum, ein Verlust der Zell-Matrix-Adhäsion sowie eine erhöhte Zellmigration zählen [53, 55].

3.1.4.2 Der Einfluss der *DKK3*-Reexpression auf das Koloniewachstum humaner Mammakarzinomzellen

Zunächst galt es den Einfluss von *DKK3* auf das Koloniewachstum der vier Brusttumor-Modelle MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-453 und MCF-7 zu untersuchen. Der zu diesem Zweck angewendete Koloniebildungstest (engl. *Colony Formation Assay*, CFA) erlaubt es, neben einer Untersuchung des Zellwachstums zusätzlich eine Aussage über mögliche morphologische Unterschiede der Zellen sowie das generelle Koloniebildungsvermögen treffen zu können. Für den Koloniebildungstest wurden pro Einzelklon der vier Mammarkarzinom-Zelllinien je 10^3 Zellen im Dreifachansatz in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät, diese nach 14 Tagen Kultivierung mit einer Kristallviolett-Lösung angefärbt und im Anschluss die mit Kolonien besiedelte Fläche densitometrisch ausgewertet. Für jedes Modell erfolgte der Test in drei unabhängig durchgeführten Versuchen mit jeweils drei Leervektor- bzw. *DKK3*-Einzelklonen.

Das Ergebnis des Koloniebildungstests für die stabil transfizierten luminalen Zelllinien MDA-MB-453 und MCF-7 ist in Abbildung 3-10 dargestellt. Makroskopisch war für beide luminalen Zellkulturmodelle ein leicht reduziertes Koloniewachstum infolge forcierter *DKK3*-Reexpression erkennbar, wie die repräsentativen Aufnahmen in Abbildung 3-10A und B zeigen. Nach densitometrischer Auswertung erwies sich dieser Unterschied jedoch weder im

MDA-MB-453 (Abbildung 3-10C) noch im MCF-7-Modell (Abbildung 3-10D) als statistisch signifikant.

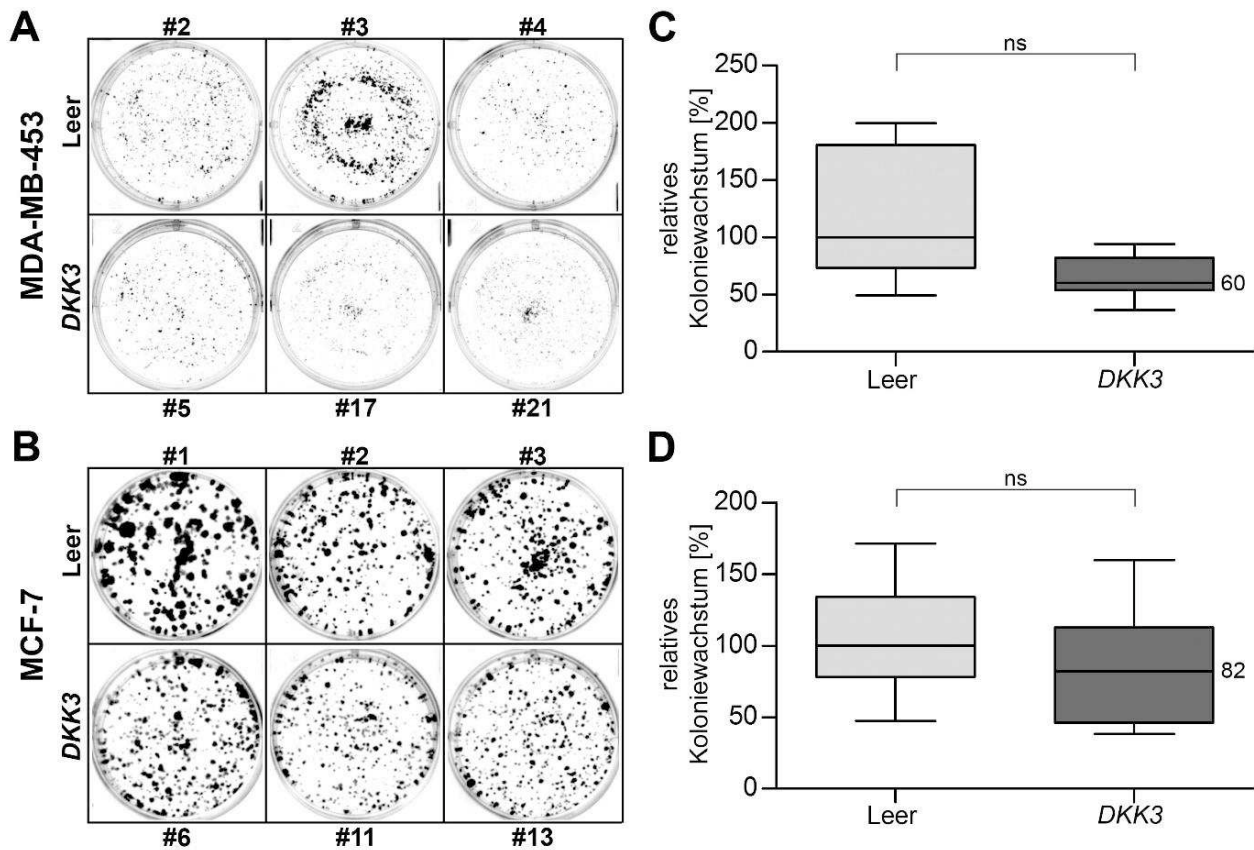


Abbildung 3-10: Der Einfluss von DKK3 auf das Koloniebildungsvermögen luminaler Mammakarzinom-Zelllinien. Zur Bestimmung des Koloniebildungsvermögens wurden je 10^3 Zellen der Leervektor- bzw. *DKK3*-Einzelklone im Dreifachansatz in die Kavitäten einer 6-Well-Zellkulturschale ausgesät. Nach 14-tägiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert, angefärbt und das Koloniewachstum densitometrisch ausgewertet. (**A** und **B**) Repräsentative Aufnahmen der angefärbten Kolonien von jeweils drei Leervektor- und *DKK3*-Einzelklonen der beiden luminalen Zelllinien MDA-MB-453 (**A**) und MCF-7 (**B**). Die densitometrische Auswertung des Koloniewachstums ergab weder im MDA-MB-453 (**C**) noch im MCF-7-Modell (**D**) einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Koloniebildungsvermögen der Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klone (dunkelgrau). Für beide Zelllinien wurden je drei unabhängige Versuche mit jeweils drei Leervektor- und *DKK3*-Einzelklonen durchgeführt und das relative Koloniewachstum auf den Median des Koloniewachstums der Leervektor-Klone normiert. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane der Neunfachbestimmung. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. ns: nicht signifikant (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Abbildung 3-11 zeigt das Ergebnis des Koloniebildungstests für die beiden stabil transfizierten basalen Zelllinien MDA-MB-436 und MDA-MB-231. Mittels densitometrischer Auswertung konnte im MDA-MB-436-Modell kein differenzielles Koloniewachstum zwischen Leervektor- und *DKK3*-Klonen herausgestellt werden (Abbildung 3-11C). Im Falle des MDA-MB-231-*DKK3*-Modells hingegen ergab die statistische Analyse ein signifikant reduziertes Koloniewachstum der *DKK3*-Klone im Vergleich zu den korrespondierenden Leervektor-Klonen ($P < 0,05$, Abbildung 3-11D).

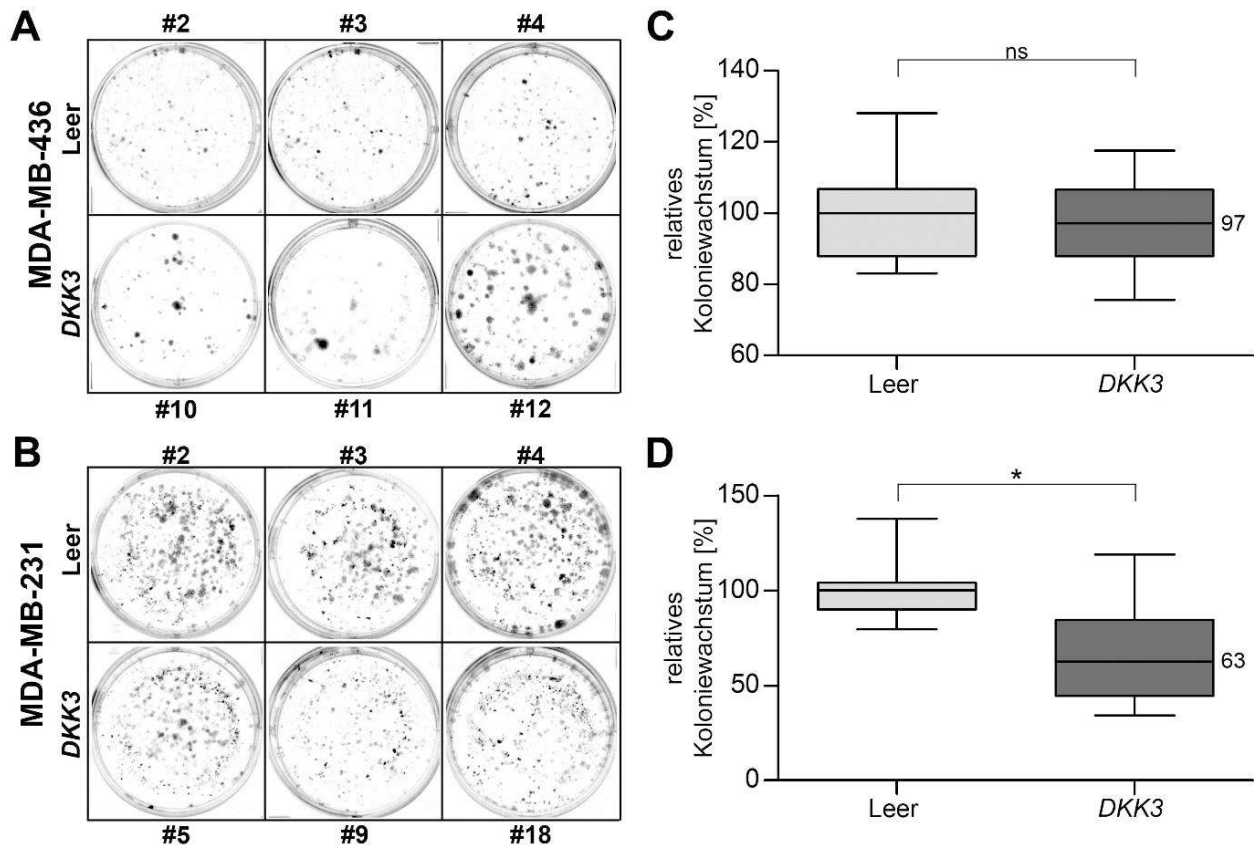


Abbildung 3-11: Der Einfluss von DKK3 auf das Koloniebildungsvermögen basaler Mammakarzinom-Zelllinien. Zur Bestimmung des Koloniebildungsvermögens wurden je 10^3 Zellen der Leervektor- bzw. *DKK3*-Einzelklone im Dreifachansatz in die Kavitäten einer 6-Well-Zellkulturschale ausgesät. Nach 14-tägiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert, angefärbt und das Koloniewachstum densitometrisch ausgewertet. (**A** und **B**) Repräsentative Aufnahmen der angefärbten Kolonien von jeweils drei Leervektor- und *DKK3*-Einzelklonen der beiden basalen Zelllinien MDA-MB-436 (**A**) und MDA-MB-231 (**B**). Die densitometrische Auswertung des Koloniewachstums ergab im MDA-MB-436-Modell (**C**) ein nicht differenzielles Koloniewachstum zwischen Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klonen (dunkelgrau), während im MDA-MB-231-Modell (**D**) ein signifikanter Unterschied im Koloniebildungsvermögen festgestellt werden konnte. Für beide Zelllinien wurden je drei unabhängige Versuche mit jeweils drei Leervektor- und *DKK3*-Einzelklonen durchgeführt und das relative Koloniewachstum auf den Median des Koloniewachstums der Leervektor-Klone normiert. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane der Neunfachbestimmung. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. ns: nicht signifikant; *: $P < 0,05$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Bei makroskopischer Betrachtung der MDA-MB-436-Einzelkolonien waren deutliche Unterschiede zwischen den *DKK3*-Klone und den Leervektor-transfizierten Kontrollen zu erkennen. Während die Leervektor-Klone zahlreiche kleine Kolonien ausbildeten, wiesen die *DKK3*-Klone weniger, dafür aber größere Kolonien auf (Abbildung 3-11A). Die detaillierte Analyse der Einzelkolonien mittels Phasenkontrast- und Elektronenmikroskopie offenbarte eine infolge der ektopischen *DKK3*-Reexpression veränderte Zellmorphologie der MDA-MB-436-Zellen (Abbildung 3-12). *DKK3*-Klone wuchsen vermehrt in Zell-*Clustern*, waren deutlich vergrößert und insgesamt durch ein eher epitheliales Erscheinungsbild charakterisiert. Hingegen wiesen die malignen Leervektor-transfizierten MDA-MB-436-Zellen eine mesenchymale bzw. Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf, die durch eine unregelmäßige

Zellform sowie die Ausbildung zahlreicher ausgestreckter Zell-Ausläufer gekennzeichnet war. Im Gegensatz zu den MDA-MB-436-Zellen führte die Reexpression von DKK3 sowohl im zweiten basalen Zellkulturmodell MDA-MB-231 als auch den beiden luminalen Modellen MDA-MB-453 und MCF-7 zu keinen sichtbaren morphologischen Veränderungen.

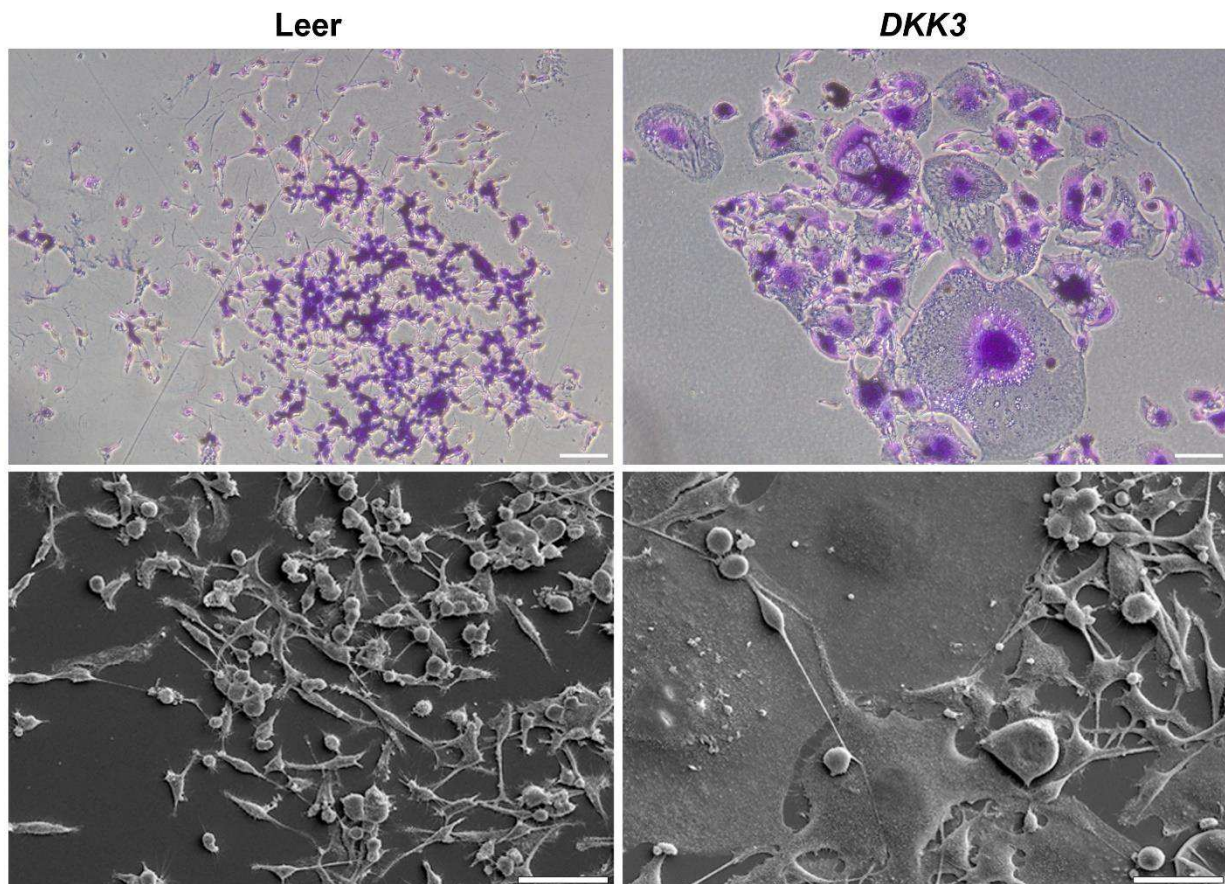


Abbildung 3-12: Die Zellmorphologie der mesenchymalen Brustkrebszelllinie MDA-MB-436 in Abhängigkeit einer forcierten DKK3-Reexpression. Repräsentative Aufnahmen von MDA-MB-436-Leervektor- (links) und -*DKK3*-Klonen (rechts) mittels Phasenkontrastmikroskopie angefärbter Kolonien (oben) und Elektronenmikroskopie (unten). Weißer Balken: 100 μ m.

Bedingt durch die Größenzunahme der MDA-MB-436-Zellen infolge der forcierten DKK3-Reexpression konnte mit Hilfe der densitometrischen Auswertung der Koloniefäche keine adäquate Aussage hinsichtlich eines möglichen Einflusses von DKK3 auf das Zellwachstum des MDA-MB-436-Modells gemacht werden. Im Folgenden sollte daher das Zellwachstum mit Hilfe eines Zell-Counters über die Messung der Zellzahlveränderung erneut untersucht werden.

3.1.4.3 Der Einfluss der DKK3-Reexpression auf das Zellwachstum humaner Mammakarzinomzellen

Ein gesteigertes Zellwachstum, resultierend aus einer verstärkten proliferativen Aktivität und einer Resistenz gegenüber Apoptose induzierenden Signalen, stellt eine grundlegende Eigenschaft von Tumorzellen dar und fördert vor allem die Tumorentstehung [53, 55]. Das Ergebnis des Koloniebildungstests lieferte erste Hinweise auf eine mögliche DKK3-vermittelte Wachstumsinhibition in humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Da der Koloniebildungstest jedoch keine adäquate Methode darstellte, um das Zellwachstum morphologisch veränderter Klone zu untersuchen, galt es im nächsten Schritt den Einfluss von DKK3 auf das Zellwachstum der vier Brusttumor-Modelle MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-453 und MCF-7 über die Messung der Zellzahl-Veränderung während eines definierten Zeitraums zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst pro Einzelklon der vier Mammakarzinom-Zelllinien je 5×10^4 Zellen im Dreifachansatz in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät, über 96 h kultiviert und anschließend die Zellzahl mit Hilfe des *CASY® Cell Counter and Analyzer* bestimmt (siehe Abschnitt 2.16.2). Für jedes Modell wurde die Zellzahlzunahme in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Leervektor- bzw. *DKK3*-Einzelklonen bestimmt.

Die daraus hervorgegangenen relativen Zellzahlen nach 96-stündiger Kultivierung sind in Abbildung 3-13 in Form von *Boxplots* dargestellt. Eine Reexpression von DKK3 führte in beiden basalen Zellkulturmodellen zu einer signifikant reduzierten Zellzahl (MDA-MB-436: $P < 0,01$ und MDA-MB-231: $P < 0,05$; Abbildung 3-13A und B). Dieses Ergebnis bestätigte die bereits im Koloniebildungstest erkennbare DKK3-vermittelte Wachstumsinhibition der basalen MDA-MB-231-Zellen und stellte zusätzlich einen Einfluss von DKK3 auf das Zellwachstum der zweiten basalen Zelllinie MDA-MB-436 heraus. Im Gegensatz dazu resultierte eine Reexpression von DKK3 in beiden luminalen Zelllinien (MDA-MB-453 und MCF-7; Abbildung 3-13C und D) in keiner statistisch signifikanten Reduktion des Zellwachstums. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Koloniebildungstests, in dem ebenfalls kein signifikant verringertes Koloniewachstum in luminalen, *DKK3*-transfizierten Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden Leervektor-transfizierten Kontrollen nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.4.2).

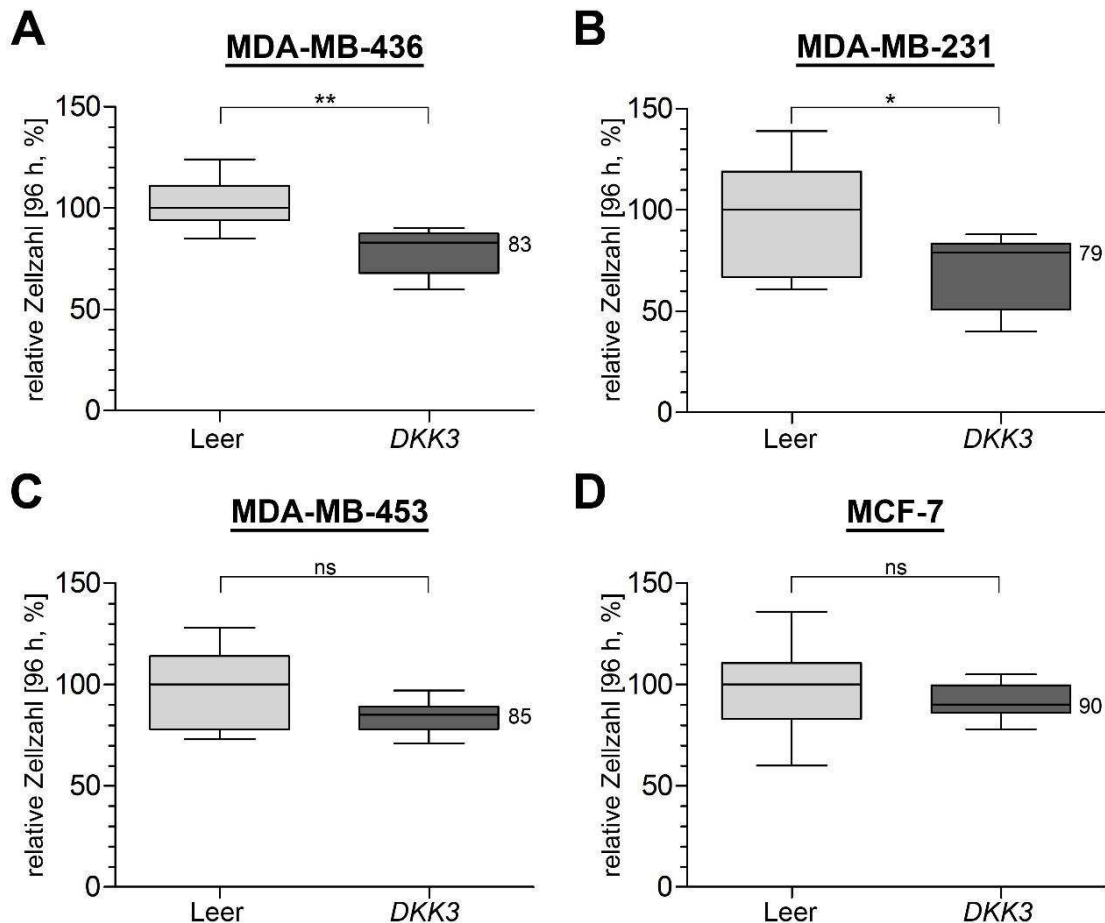


Abbildung 3-13: Der Einfluss von DKK3 auf das Zellwachstum von Mammakarzinom-Zelllinien. Als *Boxplot* dargestellt sind die relativen Zellzahlen der Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klone (dunkelgrau) des (A) MDA-MB-436-, (B) MDA-MB-231-, (C) MDA-MB-453- und (D) MCF-7-Modells nach 96-stündiger Kultivierung. Eine Reexpression von *DKK3* resultierte in beiden basalen Zelllinien (MDA-MB-436 und MDA-MB-231) in einem reduzierten Zellwachstum, zeigte aber keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum der beiden luminalen Modelle (MDA-MB-453 und MCF-7). Für jede Zelllinie wurden je drei unabhängige Versuche mit jeweils drei Leervektor- und *DKK3*-Einzelklonen durchgeführt und die relative Zellzahl auf die mediane Zellzahl der Leervektor-Klone normiert. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane der Neunfachbestimmung. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. ns: nicht signifikant; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

3.1.4.4 Der Einfluss der *DKK3*-Reexpression auf die Apoptose-Induktion in humanen Mammakarzinomzellen

Während *DKK3* keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum luminaler Zellkulturmodelle zeigte, führte eine ektopische *DKK3*-Expression in beiden basalen Modellen zu einem verminderten Zellwachstum. Im Folgenden galt es zu klären, ob die *DKK3*-vermittelte Wachstumsinhibition aus einer gehemmten Zellproliferation oder einer gesteigerten Apoptose-rate beziehungsweise einer Modulation beider Prozesse resultierte. Um einen möglichen Effekt von *DKK3* auf die Sensitivität gegenüber pro-apoptotischen Reizen in den vier Brusttumor-Modellen MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-453 und MCF-7 zu evaluieren, wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 nach einer 24-stündigen Apoptoseinduktion

(1 μM Staurosporin) über den Rhodamin-basierten *ApoOne® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega) ermittelt (siehe Abschnitt 2.16.3). Die Detektion der aktiven Caspasen 3/7 beruht auf der Umwandlung eines zugesetzten Substrats in ein Fluoreszenzsignal. Die über eine Fluoreszenzmessung bestimmte Aktivität der Effektor-Caspasen korreliert wiederum mit der Apoptoserate.

Das Ergebnis aus jeweils drei unabhängigen Versuchen mit je Zellkulturmodell drei Leervektor- bzw. *DKK3*-Einzelklonen ist in Abbildung 3-14 dargestellt.

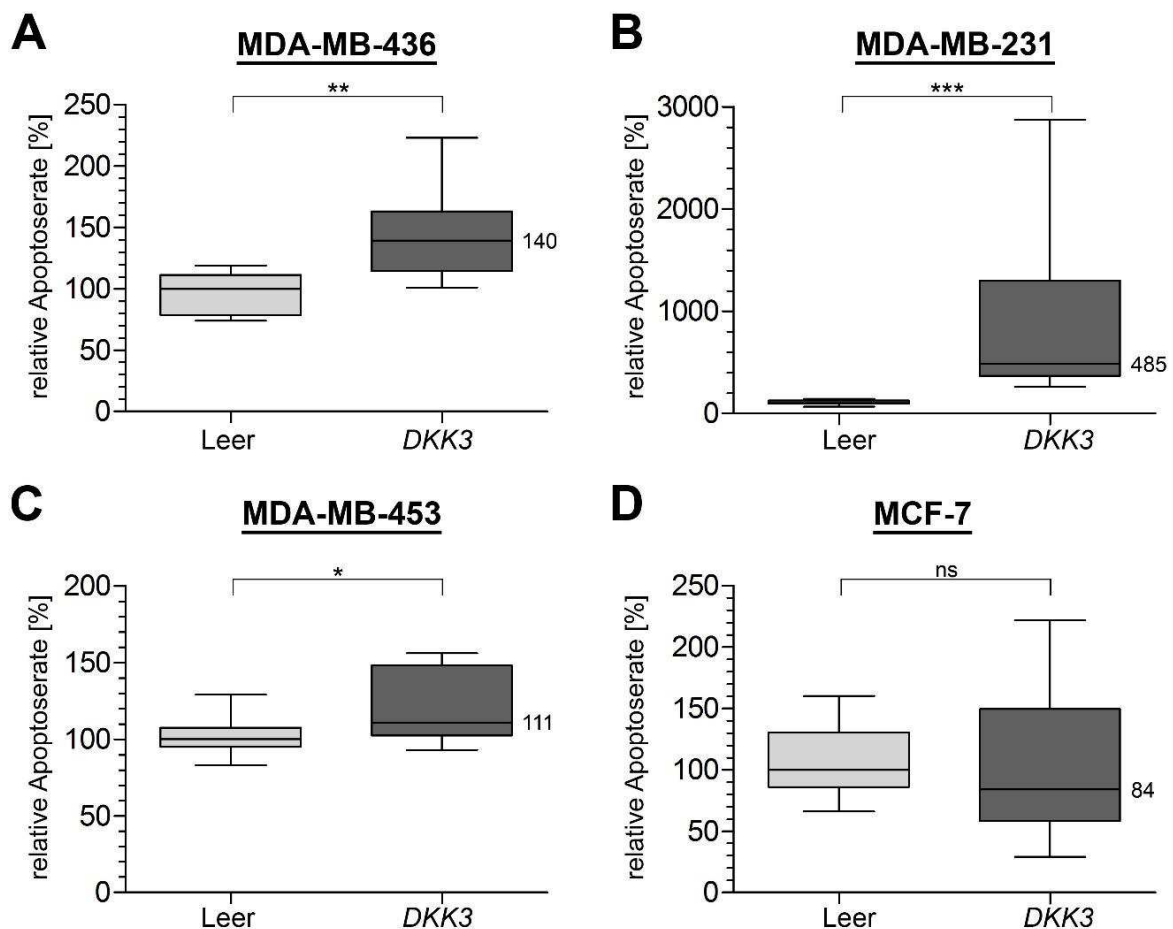


Abbildung 3-14: Der Einfluss von DKK3 auf die Apoptoserate von Mammakarzinom-Zelllinien.

Als *Boxplot* dargestellt sind die relativen Apoptoseraten der Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klone (dunkelgrau) des (A) MDA-MB-436-, (B) MDA-MB-231-, (C) MDA-MB-453- und (D) MCF-7-Modells. Als Maß für die Apoptose wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7 nach 24-stündiger Apoptose-induktion (1 μM Staurosporin) über einen Rhodamin-basierten Caspase-Assay gemessen. Sowohl in den beiden basalen Zellkulturmodellen MDA-MB-436 und MDA-MB-231 als auch im luminalen Modell MDA-MB-453 konnte eine signifikant erhöhte Apoptoserate in den *DKK3*-Klonen im Vergleich zu den jeweiligen Leervektor-Klonen gemessen werden. MCF-7-Zellen hingegen zeigten infolge forcierter *DKK3*-Reexpression keine veränderte Aktivität der Caspasen 3/7. Für jede Zelllinie wurden je drei unabhängige Versuche mit jeweils drei Leervektor- und *DKK3*-Einzelklonen durchgeführt und die Werte auf die mediane Caspase 3/7-Aktivität der Leervektor-Klone normiert. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane der Neunfachbestimmung. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. ns: nicht signifikant; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

In beiden basalen Zellkulturmodellen konnte eine hochsignifikant gesteigerte Aktivität der Caspasen 3/7 infolge forcierter DKK3-Reexpression beobachtet werden (MDA-MB-436: $P < 0,01$; MDA-MB-231: $P < 0,001$; Abbildung 3-14A und B). Es ist daher anzunehmen, dass die beobachtete DKK3-vermittelte Wachstumsreduktion in diesen beiden Zelllinien vornehmlich aus einer verstärkten Apoptose resultierte. Während in den *DKK3*-Klonen der luminalen Zelllinie MDA-MB-453 ebenfalls eine im Vergleich zu den korrespondierenden Leervektor-Klonen signifikant erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden konnte ($P < 0,05$; Abbildung 3-14C), führte die ektopische Reexpression von DKK3 im MCF-7-Modell (Abbildung 3-14D) zu keiner gesteigerten Apoptose-Induktion.

3.1.4.5 Der Einfluss der DKK3-Reexpression auf die Zell-Matrix-Adhäsion humaner Mammakarzinomzellen

Da zellmorphologische Veränderungen, wie sie im MDA-MB-436-Modell beobachtet wurden, häufig mit einer Modifikation der adhäsiven Zelleigenschaften einhergehen [204], galt es im nächsten Schritt den Einfluss von DKK3 auf die Zell-Matrix-Adhäsion der vier Brusttumor-Modelle MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-453 und MCF-7 zu analysieren. Hierbei sollte die Fähigkeit der Zellen untersucht werden, innerhalb eines bestimmten Zeitraumes an *Matrigel™ Basement Membrane Matrix*, welches die natürliche Basalmembran simuliert, zu adhären. Nicht adhärente Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt, die adhären Zellen im Anschluss fixiert und mit Kristallviolett-Lösung angefärbt. Die Menge des in den Zellen gebundenen Farbstoffes ist proportional zur Anzahl adhären Zellen und konnte nach Lösen der Kristallviolett-Färbung aus den Zellen kolorimetrisch quantifiziert werden (siehe Abschnitt 2.16.4). Für jedes Tumormodell erfolgten drei unabhängig durchgeführte Versuche mit jeweils drei Leervektor- bzw. *DKK3*-Einzelklonen.

Wie erwartet, konnte in den morphologisch veränderten *DKK3*-Klonen der basalen Zelllinie MDA-MB-436 eine signifikant gesteigerte Zell-Matrix-Adhäsion im Vergleich zu den korrespondierenden Leervektor-Klonen beobachtet werden ($P < 0,01$; Abbildung 3-15A). Im Gegensatz dazu resultierte eine forcierte Reexpression von DKK3 weder im zweiten basalen Zellkulturmodell MDA-MB-231, noch in den beiden luminalen Modellen MDA-MB-453 und MCF-7 in einer verstärkten Zell-Matrix-Adhäsion (Abbildung 3-15B-D).

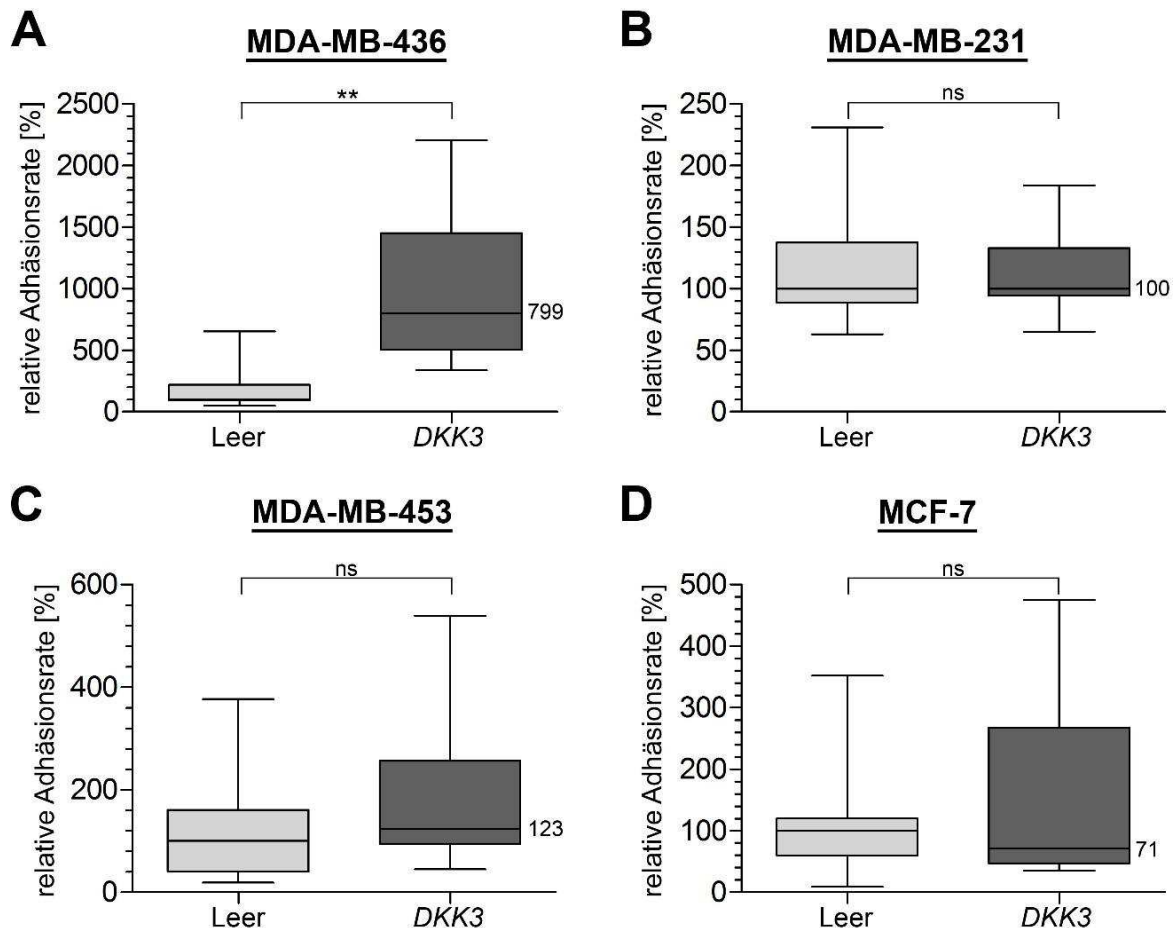


Abbildung 3-15: Der Einfluss von DKK3 auf die Zell-Matrix-Adhäsion von Mammakarzinom-Zelllinien. Als *Boxplot* dargestellt ist die kolorimetrische Auswertung des *Matrigel*TM-basierten Zell-Matrix-Adhäsionstests von Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klonen (dunkelgrau) des (A) MDA-MB-436, (B) MDA-MB-231, (C) MDA-MB-453- und (D) MCF-7-Modells. In der statistischen Auswertung erwies sich der Unterschied in der Adhäsionsrate zwischen MDA-MB-436-*DKK3*- und den zugehörigen Leervektor-Klonen als hochsignifikant, während in den drei anderen Tumormodellen infolge einer forcierten *DKK3*-Reexpression keine veränderten Adhäsionseigenschaften festgestellt werden konnten. Für jede Zelllinie wurden je drei unabhängige Versuche mit jeweils drei Leervektor- und *DKK3*-Einzelklonen durchgeführt und die relative Adhäsionsrate auf den Median der Leervektor-Klone normiert. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane der Neunfachbestimmung. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. ns: nicht signifikant; **: $P < 0,01$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

3.1.4.6 Der Einfluss der *DKK3*-Reexpression auf die Migration basaler Mammakarzinomzellen

Ein funktioneller Einfluss von *DKK3* vornehmlich auf das Zellwachstum der beiden basalen Mammakarzinom-Zelllinien ließ auf eine potentielle Subtyp-spezifische Bedeutung eines *DKK3*-Verlustes in der frühen Tumorgenese insbesondere basaler Mammakarzinome schließen. Zusätzlich konnten in basalen *DKK3*-transfizierten MDA-MB-436-Zellen morphologische Veränderungen verbunden mit einer verstärkten Zell-Matrix-Adhäsion beobachtet werden. Da Modifikationen im Adhäsionsverhalten bzw. der Zellmorphologie oft mit einem veränderten Migrations- und Invasionspotential und damit der Metastasierung epithelialer Zellen verbunden sind [204, 205], sollten die Mammakarzinom-Modelle im

folgenden Schritt zusätzlich hinsichtlich eines möglichen Effektes von DKK3 auf das Migrationsverhalten analysiert werden.

Bereits im Vorfeld dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass DKK3 keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten des luminalen MCF-7-Zellkulturmodells hatte [170]. Es ist belegt, dass die eher epithelialen luminalen Zelllinien ein schwaches Migrations- und Invasionspotential besitzen, während diese Eigenschaften in mesenchymalen Mammakarzinom-Zelllinien des Subtyps Basal B stark ausgeprägt ist [168, 206]. Im Folgenden sollte daher die Zellmigration ausschließlich in den beiden basalen Zellkulturmodelle MDA-MB-436 und MDA-MB-231 in Form eines 2D-Wundheilungstests (engl. *wound healing* oder *scratch assay*) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Wunde in einen konfluenten Zellrasen der Leervektor- sowie *DKK3*-Klone der beiden basalen Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-436 und MDA-MB-231 eingebracht und die entstandene zellfreie Fläche im Folgenden in definierten Zeitabständen bis zum vollständigen Wundschluss fotodokumentiert (siehe Abschnitt 2.16.5). Für beide Modelle erfolgte der Wundheilungstest in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Leervektor- bzw. *DKK3*-Einzelklonen.

Das Ergebnis des Wundheilungstests für das basale MDA-MB-231-Zellkulturmodell ist in Abbildung 3-16 dargestellt. Bereits makroskopisch konnte ein im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen langsamerer Wundschluss der *DKK3*-Klone beobachtet werden, wie in der exemplarischen Darstellung in Abbildung 3-16A zu erkennen ist. Abbildung 3-16B zeigt die graphische Auswertung des Wundheilungstests für die Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klone (dunkelgrau) über einen Zeitraum von 27 h. Die zellfreien Flächen wurden jeweils auf die ursprüngliche Wundgröße zum Zeitpunkt $T = 0$ h normiert. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der zellfreien Fläche der Leervektor- und *DKK3*-Klone ab einen Zeitpunkt von $T = 15$ h ($P < 0,01$).

Hingegen konnte im MDA-MB-436-Zellkulturmodell kein *DKK3*-vermittelter Effekt auf die Zellmigration festgestellt werden (Abbildung 3-17B). Auffällig war hier jedoch ein sehr heterogenes Verhalten der *DKK3*-Klone (Abbildung 3-17C). Während *DKK3*-Klon #10 nach 72 h noch eine mittlere zellfreie Fläche von nahezu 40 % aufwies und damit deutlich langsamer migrierte als die korrespondierenden Leervektor-Klone, war die zellfreie Fläche des *DKK3*-Klons #11 bereits im Mittel auf 8 % reduziert. Dieses heterogene Verhalten wird auch in der exemplarischen Darstellung in Abbildung 3-17A deutlich.

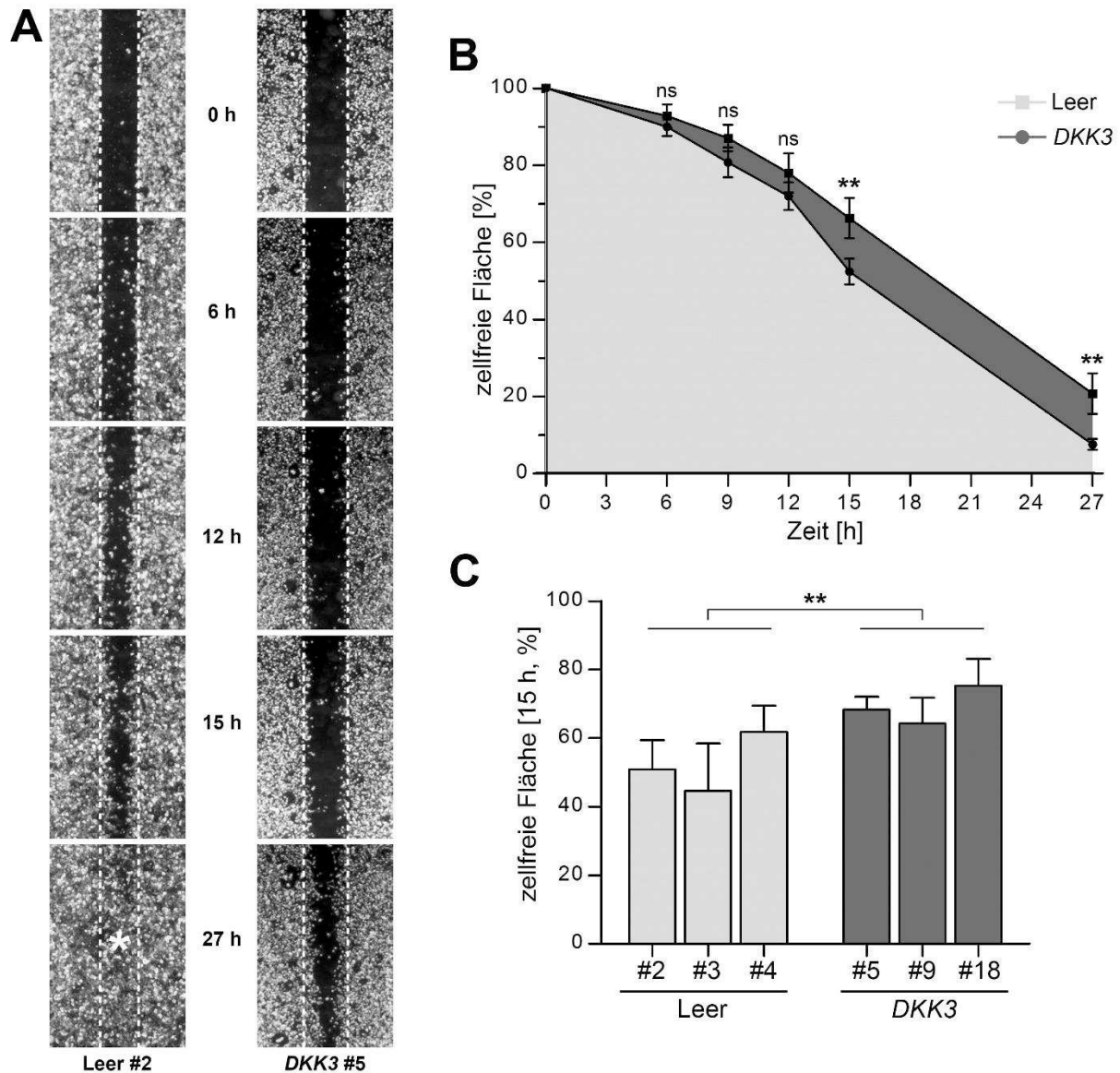


Abbildung 3-16: Der Einfluss von DKK3 auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231. Um die Zellmigration des MDA-MB-231-Zellkulturmodells zu untersuchen wurde ein Wundheilungstest durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Wunde in den konfluenten Zellrasen eingebracht und der Wundschluss über einen Zeitraum von 27 h dokumentiert. **(A)** Exemplarische Darstellung des Wundheilungstests für Leervektor-Klon #2 (links) und *DKK3*-Klon #3 (rechts). Die vertikal gestrichelte Linie stellt die Begrenzung der zellfreien Fläche zum Zeitpunkt $T = 0$ h dar. Das Sternchen markiert einen vollständigen Wundschluss. **(B)** Graphische Darstellung des Wundschlusses der Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klone (dunkelgrau) über einen Zeitraum von 27 h. Alle Werte wurden jeweils auf die ursprüngliche Wundgröße zum Zeitpunkt $T = 0$ h normiert. Vertikale Linien: $\pm$ Standardfehler der Mehrfachbestimmung. ns: nicht signifikant; **: $P < 0,01$ (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Test). **(C)** Einzeldarstellung der zellfreien Flächen der Leervektor- und *DKK3*-Einzelklone nach 15 h.

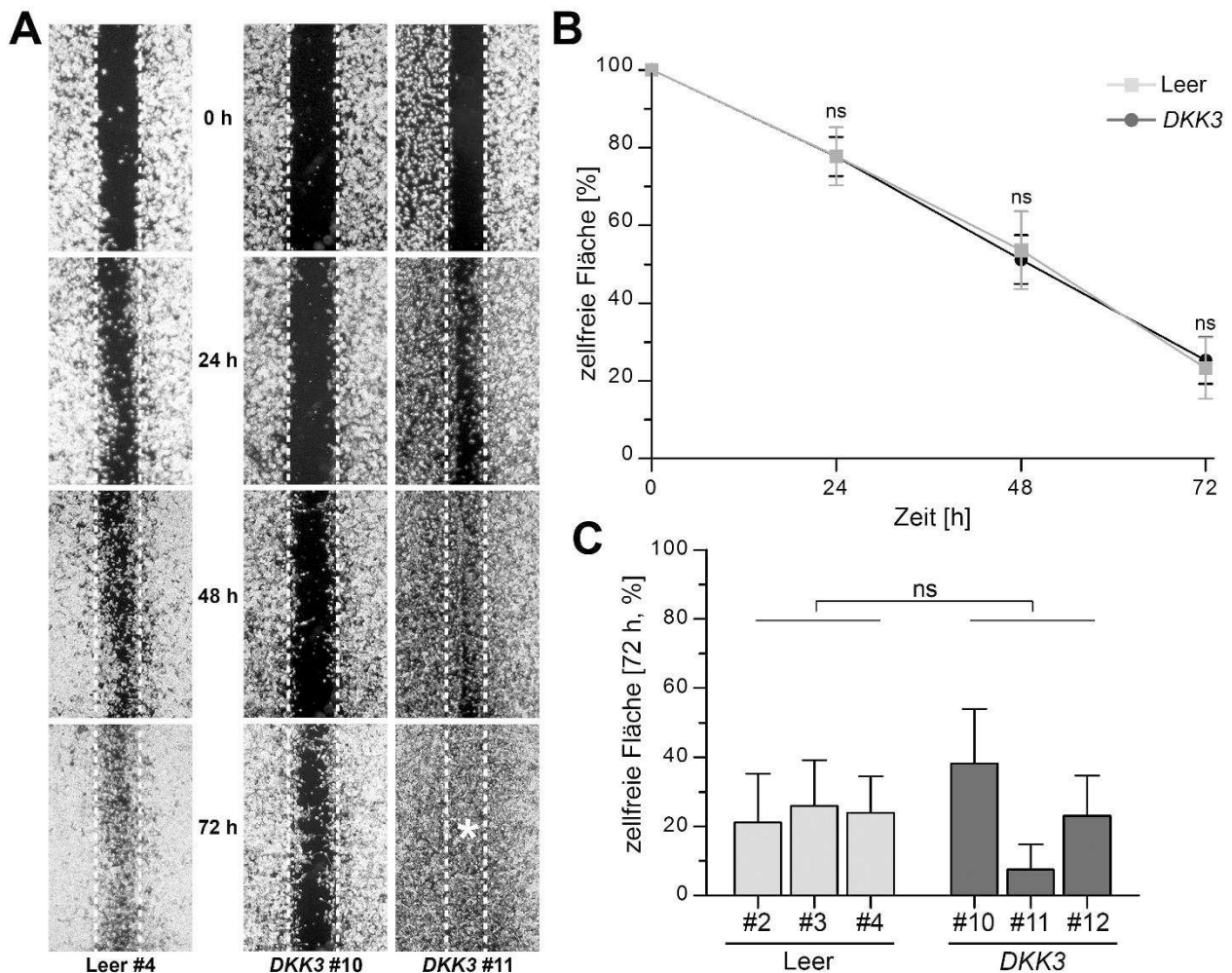


Abbildung 3-17: Der Einfluss von DKK3 auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-436. Um die Zellmigration des MDA-MB-436-Zellkulturmodells zu untersuchen wurde ein Wundheilungstest durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Wunde in den konfluenten Zellrasen eingebracht und der Wundschluss über einen Zeitraum von 72 h dokumentiert. **(A)** Exemplarische Darstellung des Wundheilungstests für Leervektor-Klon #4 (links) sowie *DKK3*-Klon #10 und #11 (rechts). Die vertikal gestrichelte Linie stellt die Begrenzung der zellfreien Fläche zum Zeitpunkt $T = 0$ h dar. Das Sternchen markiert einen vollständigen Wundschluss. **(B)** Graphische Darstellung des Wundschlusses der Leervektor- (hellgrau) und *DKK3*-Klone (dunkelgrau) über einen Zeitraum von 72 h. Alle Werte wurden jeweils auf die ursprüngliche Wundgröße zum Zeitpunkt $T = 0$ h normiert. Vertikale Linien: $\pm$ Standardfehler der Mehrfachbestimmung. ns: nicht signifikant (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Test). **(C)** Einzeldarstellung der zellfreien Flächen der Leervektor- und *DKK3*-Einzelklone nach 72 Stunden.

3.1.4.7 Der Einfluss von DKK3 auf die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker in basalen Mammakarzinomzellen

Morphologische Veränderungen und eine erhöhte Zell-Matrix-Adhäsion basaler MDA-MB-436-Mammakarzinom-Zellen infolge ektopischer *DKK3*-Reexpression sowie eine verminderte Zellmigration *DKK3*-transfizierter MDA-MB-231-Zellen, gaben erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung eines *DKK3*-Verlustes für den komplexen Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Die EMT ist definiert durch den Verlust epithelialer

Merkmale sowie eine Zunahme mesenchymaler Eigenschaften der Zellen und assoziiert mit tumorprogressiven Prozessen [207-209]. Im humanen Mammakarzinom ist die EMT vor allem mit dem aggressiven basalen Subtypen verknüpft [206, 210, 211]. Um einen möglichen Einfluss einer DKK3-Reexpression auf die Reversion der EMT zu evaluieren, galt es im Folgenden die Expression molekularer Marker des EMT-Prozesses zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde die relative mRNA-Expression der bekannten mesenchymalen Marker *Vimentin* und *Snail 1* sowie der epithelial-assoziierten Gene *E-Cadherin*, *Claudin 1*, *Occludin* und *Zonula Occludens 1* (ZO1) [54, 208, 209, 212] in *DKK3*-Klonen der beiden mesenchymalen Zellkulturmodelle des Subtyps Basal B mit der in den jeweils korrespondierenden Leervektor-transfizierten Kontrollen verglichen. Das Ergebnis der *Real-Time* PCR-basierten Expressionsanalyse ist in Abbildung 3-18 dargestellt.

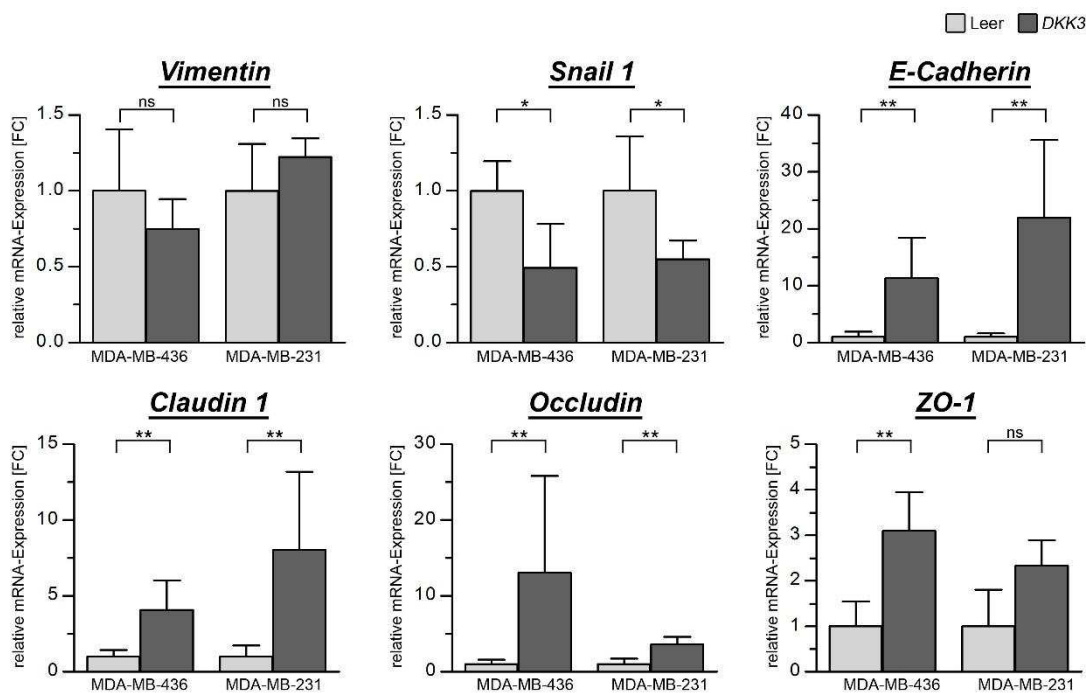


Abbildung 3-18: Die ektopische Reexpression von DKK3 resultierte in basalen MDA-MB-436- und MDA-MB-231-Zellen in einem Expressionsverlust mesenchymaler- bzw. einer Aufregulation epithelialer Marker. Dargestellt ist die mit Hilfe einer *Real-Time* PCR-Analyse ermittelte relative mRNA-Expression der mesenchymalen Marker *Vimentin* und *Snail 1* sowie der epithelial-assoziierten Gene *E-Cadherin*, *Claudin 1*, *Occludin* und *ZO-1* in Leervektor- (n=5, hellgrau) und *DKK3*-Klonen (n=5, dunkelgrau) des MDA-MB-436- und MDA-MB-231-Zellkulturmodells. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. FC: *Fold Change*. Vertikale Linien: +Standardfehler der Fünffachbestimmung. ns: nicht signifikant; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Während nach forcierter DKK3-Reexpression kein signifikanter Expressionsunterschied für Vimentin, einer wichtigen zytoskelettalen Komponente in mesenchymalen Zellen, beobachtet werden konnte (MDA-MB-436: $P = 0,42$; MDA-MB-231: $P = 0,31$), erwies sich die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Snail 1 in *DKK3*-Klonen beider Zelllinien im Vergleich zu

den korrespondierenden Leervektor-Klonen als signifikant herunterreguliert (jeweils $P < 0,05$). Snail 1 fungiert als eines der Schlüsselproteine der EMT-Induktion, indem es die Transkription zahlreicher epithelialer Marker reprimiert [54, 213-216]. Hierzu gehören unter anderem E-Cadherin, eine Hauptkomponente der *Adherens Junctions* epithelialer Zellen, sowie die *Tight Junction*-Proteine Claudin 1 und Occludin [54, 215, 217-219]. Eine signifikant erhöhte Expression dieser epithelialen Marker infolge ektopischer DKK3-Reexpression konnte, übereinstimmend mit einem Verlust von Snail 1, in beiden Zellkulturmodellen herausgestellt werden (jeweils $P < 0,01$). Zusätzlich wurde in DKK3-tranfizierten Klonen eine gesteigerte Expression von ZO-1 (MDA-MB-436: $P < 0,05$; MDA-MB-231: $P = 0,06$) beobachtet. ZO-1 verbindet über seine PDZ-Domäne die Transmembranproteine der *Tight Junctions*, wie Claudine und Occludin, mit den Aktinfilamenten des Zytoskelettes [218-220].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Reexpression von DKK3 mit einem Verlust des EMT-induzierenden Transkriptionsfaktors Snail 1 sowie einer Aufregulation epithelialer Marker, vor allem solcher, die für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich sind, assoziiert ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der Verlust von DKK3 während der Tumorgenese des humanen Mammakarzinoms möglicherweise den aggressiven mesenchymalen Phänotyp basaler Brusttumoren fördert.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung potentieller SFRP1-Mimetika für die Therapie des humanen Mammakarzinoms

Aufgrund seiner zentralen Rolle in der Kanzerogenese zahlreicher humaner Tumorentitäten, einschließlich des Mammakarzinoms, stellt der WNT-Signalweg einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien maligner Brusttumoren dar [221-223]. Von besonderem Interesse sind hierbei vor allem WNT-Antagonisten, die über ihre inhibierende Wirkung auf den WNT-Signalweg als Tumorsuppressoren fungieren. In vielen Brusttumor-Fällen wird ein Expressionsverlust dieser Inhibitoren beobachtet, der in einer aberranten Aktivierung des WNT-Signalweges resultiert [88]. So wird z. B. der WNT-Antagonist SFRP1 in 70 % aller Mammakarzinome als herunterreguliert beschrieben und dieser Verlust mit einer schlechten Patientenprognose assoziiert [160, 224, 225]. Die tumorsuppressive Wirkung von SFRP1 konnte bereits in zahlreichen *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien bestätigt werden [12, 51-53]. Die Wiederherstellung der SFRP1-Funktion könnte daher eine effektive Therapie SFRP1-defizienter Mammakarzinome darstellen.

Um diesen Ansatz zu verfolgen, sollten in Kooperation mit dem *Lead Discovery Center* (LDC) in Dortmund neue Wirkstoff-Moleküle gefunden werden, die den WNT-Signalweg in

gleicher Weise wie SFRP1 inhibieren können. Für die Identifizierung dieser sogenannten SFRP1-Mimetika wurde das in der Arbeitsgruppe Dahl bereits etablierte *SFRP1*-Zellkulturmodell der humanen basalen Mammakarzinom-Zelllinie BT-20 genutzt [169, 226]. Der Primärscreen sowie alle folgenden Validierungsschritte der daraus hervorgegangenen potentiellen SFRP1-Mimetika erfolgten an zwei Einzelklonen, die mit einem *SFRP1*-Expressionsvektor bzw. dem entsprechenden Leervektor stabil transfiziert waren. Das LDC identifizierte im Primärscreen unter Verwendung einer Substanzbibliothek mit 190.000 verschiedenen Substanzen 430 Hits, die anschließend mittels einer WNT-Reporter-gen-Studie validiert wurden. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte schließlich die Auswahl der zwölf vielversprechendsten potentiellen SFRP1-Mimetika. Diese zwölf Substanzen wiesen im ATP-basierten Zellviabilitäts-Test *Cell Titer Glow* (CTG) je einen IC_{50} -Wert (halbmaximale inhibitorische Konzentration) von unter 10 μ M im Leervektor-Modell auf, während ihr IC_{50} -Wert im *SFRP1*-Überexpressionsmodell jeweils > 15 μ M betrug. Auch im WNT-Reporter-gen-Assay erreichten diese Substanzen einen geringen IC_{50} -Wert in wildtypischen BT-20-Zellen (< 15 μ M).

Im Folgenden galt es die vom LDC identifizierten zwölf potentiellen SFRP1-Mimetika am Institut für Pathologie des UKA im Rahmen weiterführender Experimente zu validieren bzw. funktionell zu charakterisieren.

3.2.1 Etablierung eines Zellkultur-Analyseverfahrens zur Validierung der potentiellen SFRP1-Mimetika

Zwecks Validierung der zwölf vom LDC identifizierten potentiellen SFRP1-Mimetika, galt es zunächst einen Zellkulturtest zu etablieren, der es im gleichen Ansatz ermöglichen sollte den konzentrationsabhängigen Einfluss der zu testenden Substanzen sowohl auf das Zellwachstum als auch das Genexpressionsprofil der BT-20-Zellen zu untersuchen. Weitere Ansprüche an den Test waren eine hohe Robustheit gegenüber geringen Schwankungen, die sich aus einer limitierten Pipettier-Genauigkeit ergeben, sowie ein möglichst kleiner Maßstab, um den Verbrauch der Testsubstanzen gering zu halten.

Das Schema des in dieser Studie etablierten Analyseverfahrens ist in Abbildung 3-19 dargestellt. Zunächst wurden die Zellen für 24 h unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.15.1) in den Kavitäten einer 12-Well-Zellkulturschale in 1 ml reinem Medium kultiviert, um ein Anwachsen der Zellen ohne Beeinflussung durch die Testsubstanzen zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe der zu testenden Substanzen in der gewünschten Konzentration. Da die Testsubstanzen in DMSO gelöst vorlagen, fungierte reines DMSO (Volumen äquivalent zum größten eingesetzten Volumen der Testsubstanzen) als Kontrolle und durfte aufgrund der zelltoxischen Eigenschaften von DMSO jeweils eine End-

konzentration von 0,5 % nicht überschreiten [187]. Die gewählte Inkubationsdauer sowie die Anfangszellzahl waren abhängig vom entsprechenden Test und sind im Folgenden jeweils angegeben.

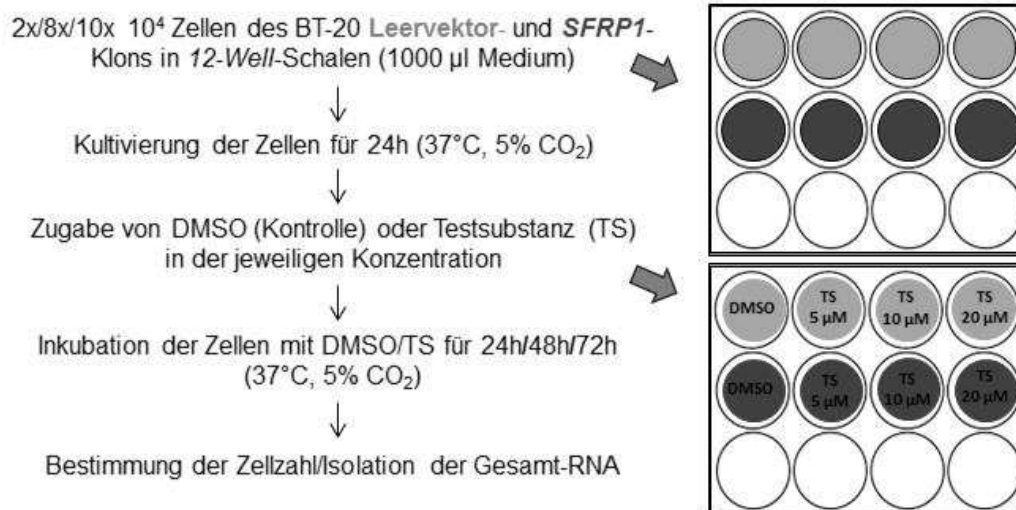


Abbildung 3-19: Schema des Zellkultur-Analyseverfahrens zur Bestimmung des konzentrationsabhängigen Einflusses der Testsubstanzen auf das Zellwachstum sowie das Genexpressionsprofil des BT-20-Zellkulturmodells.

Die Verifizierung des Zellkultur-Analyseverfahrens erfolgte mit Hilfe des *SFRP1*-Inhibitors WAY-316606 [171], sowie drei bereits bekannten Inhibitoren des WNT-Signalweges, welche die WNT-Signaltransduktion jeweils über einen divergenten Mechanismus hemmen: WIKI4 fungiert als Tankyrase-Inhibitor und fördert auf diesem Wege die Degradation von β -Catenin [113]. Im Gegensatz dazu wirken sowohl ICG-001 als auch iCRT 14 *downstream* der β -Catenin-Stabilisierung und hemmen spezifisch die β -Catenin-abhängige Transkription der WNT-Zielgene. Während ICG-001 die Interaktion von β -Catenin und dem Ko-Faktor CBP (*CREB-binding protein*) [114] blockiert, inhibiert iCRT 14 spezifisch die β -Catenin-TCF-Interaktion [115]. Unter Verwendung dieser Inhibitoren sollte überprüft werden, ob eine über die Inaktivierung des WNT-Signalweges vermittelte Wachstumsinhibition mit Hilfe des etablierten Tests abgebildet werden kann. Der konzentrationsabhängige Einfluss der Inhibitoren auf das Zellwachstum des BT-20-Leervektor- und -*SFRP1*-Klons ist in Abbildung 3-20 dargestellt.

Die Behandlungen mit allen drei verwendeten WNT-Signalweg-Inhibitoren resultierte bei zunehmender Konzentration der Testsubstanzen jeweils in einer reduzierten Zellzahl des Leervektor- sowie des *SFRP1*-Klons im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 3-20A-C). Dieses Ergebnis belegt eine Eignung des etablierten Tests, um eine Wachstumsinhibition über eine dosisabhängige Inaktivierung des WNT-Signalweges abzubilden. Der Einfluss auf das Wachstum des Leervektor- sowie des *SFRP1*-Klons war jedoch nicht differenziell, wie die

ermittelten IC_{50} -Werte (Tabelle 3-4) nochmals verdeutlichen. Dies war zu erwarten, da die Inhibitoren den WNT-Signalweg jeweils über einen anderen, zur SFRP1-Wirkung divergenten Mechanismus zusätzlich inaktivieren.

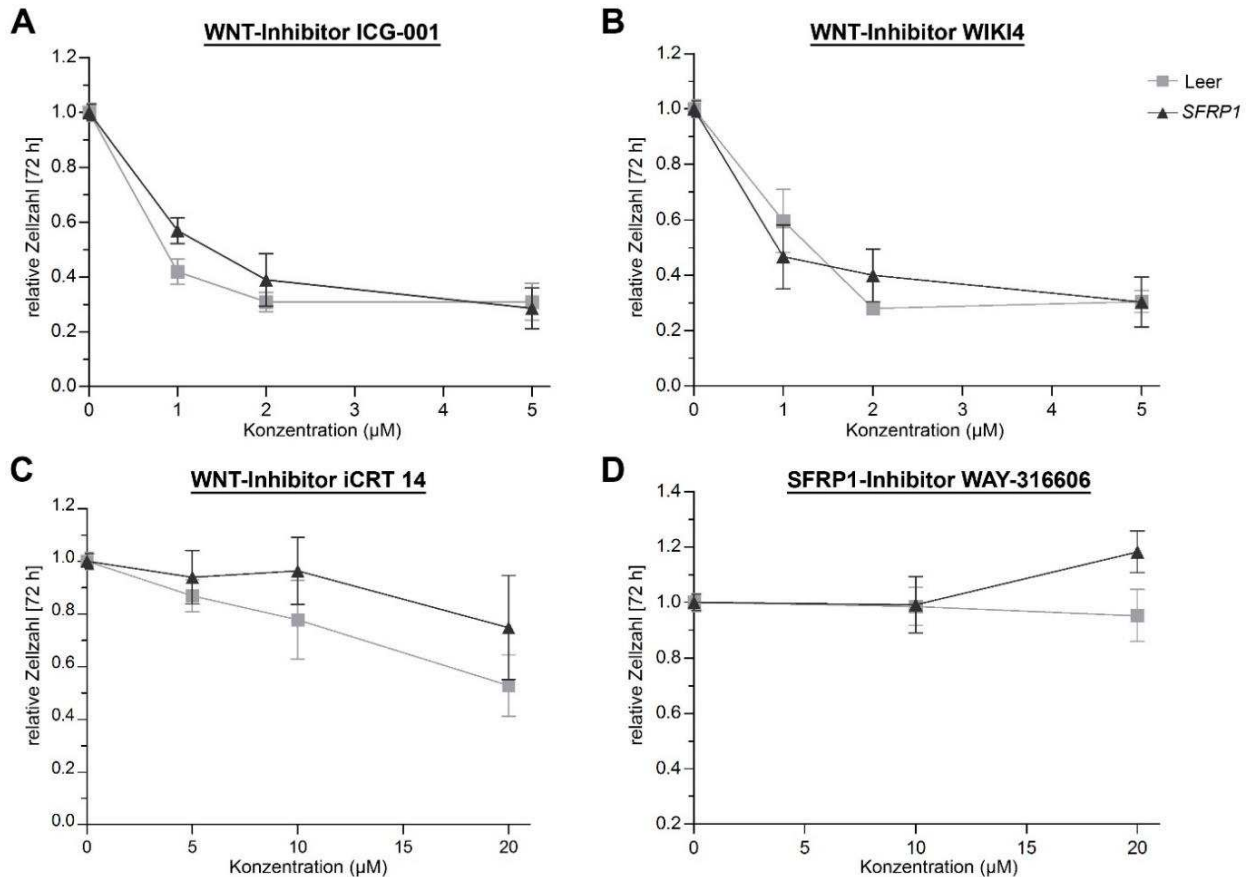


Abbildung 3-20: Der Einfluss bekannter WNT-Signalweg- und SFRP1-Inhibitoren auf das Zellwachstum des BT-20-Zellkulturmodells. Zur Bestimmung der dosisabhängigen Wachstumsinhibition wurden pro Inhibitor und Konzentration je 2×10^4 Zellen des Leervektor- (hellgraues Viereck) und *SFRP1*-Klons (schwarzes Dreieck) ausgesät. Nach zunächst 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte eine 72-stündige Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren und im Anschluss die Auswertung mittels Zellzahlbestimmung. Die Inkubation mit den WNT-Signalweg-Inhibitoren (A) ICG-001, (B) WIKI4 und (C) iCRT 14 führte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sowohl in den Leervektor- als auch in den *SFRP1*-transfizierten BT-20-Zellen zu einer Inhibition des Zellwachstums. (D) Eine Konzentration des SFRP1-Inhibitors WAY-316606 von 20 μ M resultierte in einer erhöhten Zellzahl des *SFRP1*-Klons, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Zellwachstum des *SFRP1*-defizienten Leervektor-Klons. Die relative Zellzahl stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Messwerte (Ausnahme: WIKI4 jeweils zwei Messwerte) dar und ist jeweils auf den Mittelwert der *SFRP1*- bzw. Leervektor-Kontrolle (DMSO) normiert. Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung der Mehrfachbestimmung.

Ebenso galt es zu überprüfen, ob auch eine über SFRP1 vermittelte Reduktion des Zellwachstums mit Hilfe des etablierten Tests dargestellt werden kann. Zu diesem Zweck wurde der SFRP1-Inhibitor WAY-316606 genutzt. Eine 20- μ molare Konzentration dieses Inhibitors resultierte in einem verstärkten Zellwachstum des *SFRP1*-Klons, zeigte jedoch keinen Effekt auf den Leervektor-Klon (Abbildung 3-20D). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da der

Leervektor-Klon kein SFRP1 exprimiert, und bestätigte die Spezifität des Tests, der im Folgenden zur weiteren Validierung der potentiellen SFRP1-Mimetika genutzt werden konnte.

Tabelle 3-4: Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) der drei getesteten WNT-Signalweg-Inhibitoren in der Zellwachstums-Analyse des BT-20-Zellkulturmodells.

Testsubstanz	IC ₅₀ Leer ^a (μM)	IC ₅₀ SFRP1 ^a (μM)	FC IC ₅₀ -Werte ^b
ICG-001	< 1,0	1,4	> 1,4
WIKI4	1,3	< 1,0	< 0,8
iCRT 14	> 20,0	> 20,0	k. A.

^aDie Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte näherungsweise mittels linearer Regression (siehe Abschnitt 2.17). IC₅₀-Werte außerhalb des Messbereiches konnten auf diese Weise nicht berechnet werden und sind in der Folge in Bereichen > bzw. < angegeben. ^bFold Change: IC₅₀ SFRP1 / IC₅₀ Leer.

3.2.2 Validierung der potentiellen SFRP1-Mimetika anhand ihrer dosis-abhängigen Wachstumsinhibition im BT-20-Zellkulturmodell

Eine erhöhte Aktivität des kanonischen WNT-Signalweges in Tumorzellen resultiert über die Deregulation von Proliferation und Apoptose in einem gesteigerten Zellwachstum [107, 227, 228]. Der im LDC durchgeführte *Screening*-Ansatz offenbarte bereits einen Einfluss der zwölf putativen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum des BT-20-Zellkulturmodells. So konnte im ATP-basierten Zellviabilitäts-Test für jedes der zwölf putativen SFRP1-Mimetika ein deutlich geringerer IC₅₀-Wert im BT-20-Leervektor-Modell als im BT-20-SFRP1-Modell nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche SFRP1-analoge Wirkung der Test-substanzen hin. Im Folgenden galt es diese Beobachtung mit Hilfe des etablierten Zellkultur-Analyseverfahrens (siehe Abschnitt 3.2.1) zu validieren und anhand der Ergebnisse vier Testsubstanzen für eine nachfolgende funktionelle Charakterisierung auszuwählen.

In einem ersten Durchgang sollten zunächst die Effekte aller zwölf Testsubstanzen auf das Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons untersucht werden, um basierend auf den Ergebnissen eine Vorauswahl von acht Substanzen zu treffen, die einer umfassenderen Analyse unterzogen werden sollten. Zu diesem Zweck wurden die Leervektor-transfizierten BT-20-Zellen über einen Zeitraum von 72 h mit den putativen SFRP1-Mimetika in einer Konzentration von 10 μM inkubiert und anschließend die relative Zellzahl im Verhältnis zur Kontrolle (DMSO) bestimmt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des LDCs resultierte die Behandlung mit den zwölf potentiellen SFRP1-Mimetika in allen Fällen in einem reduzierten Wachstum des Leervektor-Klons (Abbildung 3-21).

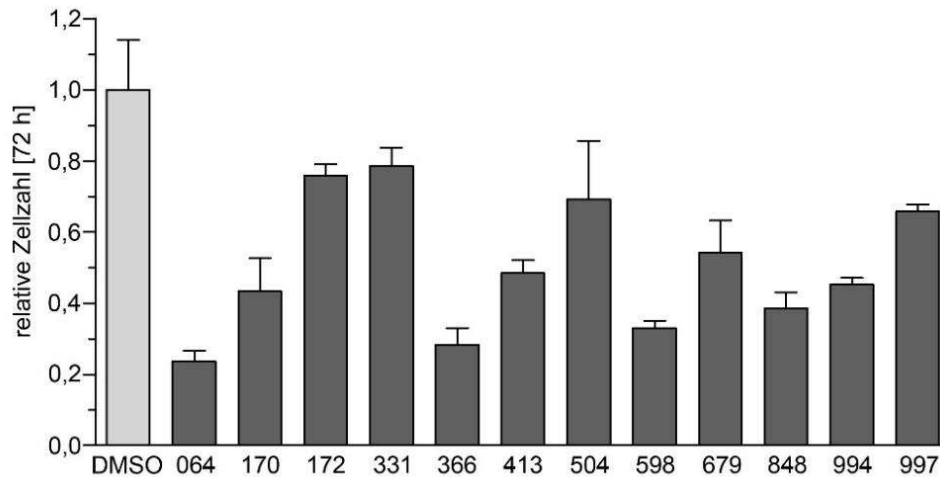


Abbildung 3-21: Der Einfluss der zwölf potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons bei einer Konzentration von 10 μM . Zur Bestimmung der dosisabhängigen Wachstumsinhibition wurden pro Testsubstanz je 2×10^4 Zellen des Leervektor-Klons ausgesät. Nach zunächst 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte eine 72-stündige Inkubation der Zellen mit den potentiellen SFRP1-Mimetika (Konzentration: 10 μM) und im Anschluss die Auswertung mittels Zellzahlbestimmung. Für alle getesteten Substanzen (dunkelgraue Balken) konnte eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (hellgrauer Balken) reduzierte Zellzahl festgestellt werden. Die relative Zellzahl stellt den Mittelwert von vier unabhängigen Messwerten dar und ist auf die DMSO-Kontrolle normiert. Vertikale Linien: + Standardabweichung der Vierfachbestimmung.

Die acht Testsubstanzen mit den Kurznamen 064, 170, 366, 413, 598, 679, 848 und 994 wiesen in einer Konzentration von 10 μM den stärksten Einfluss auf das Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons auf (jeweils eine relative Zellzahl < 55 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle) und sollten im Folgenden in einer umfassenderen Analyse hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Eigenschaften auf das BT-20-Zellkulturmodell untersucht werden. Zum einen galt es neben dem Einfluss auf das Zellwachstum des Leervektor-Klons, zusätzlich die Effekte der putativen SFRP1-Mimetika im *SFRP1*-Überexpressionsmodell zu untersuchen, um zwischen einer SFRP1-analogen sowie einer anderweitig vermittelten Wachstumsinhibition unterscheiden zu können. Durch die Reexpression von SFRP1 war ein nur geringfügiger bis ausbleibender Einfluss der Mimetika auf das Wachstum des *SFRP1*-Klons zu erwarten. Zum anderen sollte die wachstumsinhibierende Wirkung der Testsubstanzen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (5 μM , 10 μM und 20 μM) gemessen werden, um den jeweiligen IC_{50} -Wert näherungsweise bestimmen zu können. Da die Substanz 064 das Zellwachstum des Leervektor-Klons bereits in einer Konzentration von 10 μM um rund 80 % reduzierte (Abbildung 3-21), war für diese Testsubstanz ein deutlich geringerer IC_{50} -Wert zu erwarten, so dass zwei zusätzliche Messpunkte (1 μM und 3 μM) hinzugefügt wurden.

Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3-22 in Form von Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Aufgetragen sind die relativen Zellzahlen des BT-20-Leervektor- und -*SFRP1*-Klons nach 72-stündiger Behandlung mit der jeweiligen Testsubstanz in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. Die Inkubation der Zellen mit jedem der acht

untersuchten, potentiellen SFRP1-Mimetika resultierte jeweils in einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition sowohl im Leervektor- als auch im *SFRP1*-Modell. In Übereinstimmung mit den Daten des im LDC durchgeführten ATP-basierten Zellviabilitäts-Test, konnte, mit Ausnahme von Substanz 413, jedoch für alle potentiellen SFRP1-Mimetika eine im Vergleich zum *SFRP1*-Modell stärkere Wirkung auf den Leervektor-Klon beobachtet werden. Dies ist ebenfalls in den mittels linearer Regression ermittelten IC_{50} -Werten in Tabelle 3-5 ersichtlich. Diese wiesen zwischen BT-20-Leervektor- und –*SFRP1*-Modell alle einen *Fold Change* $> 1,6$ auf, der damit jeweils höher lag als der jeweilige *Fold Change* der drei untersuchten, bereits bekannten WNT-Signalweg-Inhibitoren (siehe Tabelle 3-4).

Tabelle 3-5: Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) der acht getesteten putativen SFRP1-Mimetika in der Zellwachstums-Analyse des BT-20-Zellkulturmodells.

Testsubstanz	IC_{50} Leer ^a (μ M)	IC_{50} <i>SFRP1</i> ^a (μ M)	FC IC_{50} -Werte ^b
064	1,5	3,1	2,1
170	9,1	$> 20,0$	$> 2,2$
366	8,2	$> 20,0$	$> 2,4$
413	10,8	9,5	0,9
598	$< 5,0$	$> 20,0$	$> 4,0$
679	12,8	$> 20,0$	$> 1,6$
848	7,2	$> 20,0$	$> 2,8$
994	8,3	16,8	2,0

^aDie Bestimmung der IC_{50} -Werte erfolgte näherungsweise mittels linearer Regression (siehe Abschnitt 2.17). IC_{50} -Werte außerhalb des Messbereiches konnten auf diese Weise nicht berechnet werden und sind in der Folge in Bereichen $>$ bzw. $<$ angegeben. ^b*Fold Change*: IC_{50} *SFRP1* / IC_{50} Leer.

Die beiden putativen SFRP1-Mimetika 064 und 598 zeigten mit einem IC_{50} -Wert von unter 5 μ M im Leervektor-Modell die stärksten wachstumshemmenden Effekte (Tabelle 3-5). Für Testsubstanz 598 wäre eine genauere Bestimmung des IC_{50} -Wertes im Leervektor-Modell über zusätzliche Messpunkte, analog zur Substanz 064, ebenfalls wünschenswert gewesen. Diese konnte im Rahmen dieser Dissertation zwecks Erfüllung des Zeitzieles des Projektantrages jedoch nicht mehr durchgeführt werden. Aus genanntem zeitlichen Grund konnte dieses vielversprechende SFRP1-Mimetikum, trotz guter Ergebnisse in diesem Validierungsschritt, auch für die weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt werden.

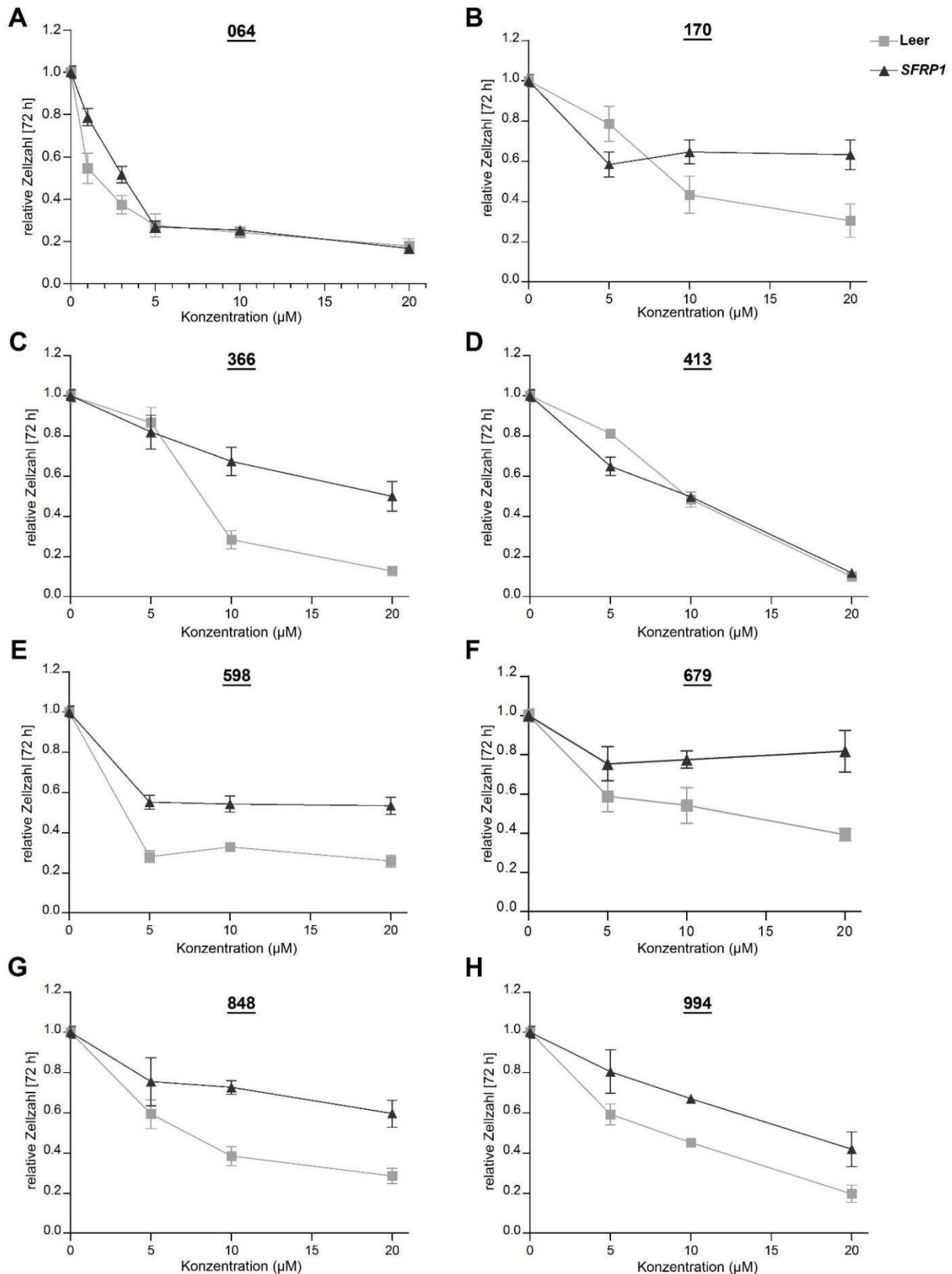


Abbildung 3-22: Der Einfluss von acht ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum des BT-20-Zellkulturmodells. Zur Bestimmung der dosisabhängigen Wachstumsinhibition wurden pro Testsubstanz je 2×10^4 Zellen des Leervektor- (hellgraues Viereck) und *SFRP1*-Klons (schwarzes Dreieck) ausgesät. Nach zunächst 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte eine 72-stündige Inkubation der Zellen mit den potentiellen Mimetika (Konzentrationen: 5 µM, 10 µM und 20 µM; für 064 zusätzlich 1 µM und 3 µM) um im Anschluss daran die Zellzahl zu ermitteln. Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven der putativen SFRP1-Mimetika (A) 064, (B) 170, (C) 366, (D) 413, (E) 598 (F) 679, (G) 848 und (H) 994. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigten alle

Substanzen sowohl auf den Leervektor- als auch den *SFRP1*-Klon eine wachstumsinhibierende Wirkung. Die relative Zellzahl stellt den Mittelwert von vier (Leervektor-Klon) bzw. drei (*SFRP1*-Klon) unabhängigen Messwerten dar und ist auf die jeweilige DMSO-Kontrolle normiert. Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung der Mehrfachbestimmung.

Die im Rahmen dieser Dissertation unter Einfluss der putativen *SFRP1*-Mimetika durchgeführte Zellwachstums-Analyse des BT-20-Zellkulturmodells bestätigte die Ergebnisse des im LDC durchgeführten Zellviabilitäts-Tests und deutete auf eine spezifisch *SFRP1*-analoge Wachstumsinhibition der Testsubstanzen hin. Für die weitere Validierung der putativen *SFRP1*-Mimetika bezüglich dieser Hypothese wurden, basierend auf den vorliegenden Daten, die vier Testsubstanzen 064, 366, 848 und 994 ausgewählt. Diese Testsubstanzen wiesen, abgesehen von Substanz 598, die niedrigsten IC_{50} -Werte (jeweils $< 9 \mu M$) hinsichtlich der Wachstumsinhibition des Leervektor-Klons auf.

3.2.3 Der Einfluss der potentiellen *SFRP1*-Mimetika auf das Zellwachstum weiterer humaner Mammakarzinom-Zelllinien

Im Hinblick auf eine mögliche, spezifisch *SFRP1*-analoge Wirkung der Testsubstanzen, galt es im Folgenden die Wirkung der vier ausgewählten Substanzen 064, 366, 848 und 994 auf das Zellwachstum weiterer Brusttumor-Modelle in Relation zu deren *SFRP1*-mRNA-Expression zu untersuchen. Darüber hinaus sollte mit Hilfe dieser Untersuchung überprüft werden, ob es sich bei der beobachteten Wachstumsinhibition durch die Testsubstanzen um einen auf das BT-20-Zellkulturmodell begrenzten Effekt handelte. Hierzu wurde die Zelllinie HCC-1143, die eine im Vergleich zum BT-20-Leervektor-Klon hohe *SFRP1*-Expression aufwies, sowie die Zelllinie HCC-1806, welche eine geringen *SFRP1*-Expression zeigte, ausgewählt (Abbildung 3-23).

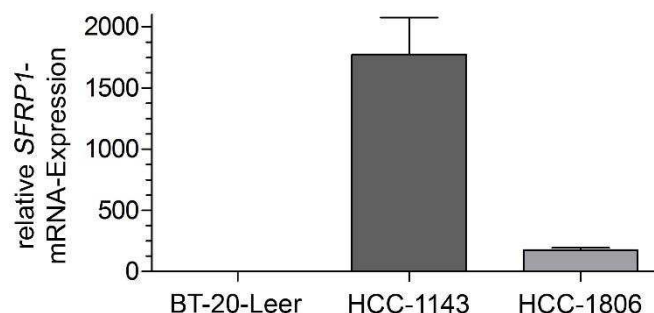


Abbildung 3-23: Relative *SFRP1*-mRNA-Expression der beiden humanen Mammakarzinom-Zelllinien HCC-1143 und HCC-1806 im Vergleich zu der des BT-20-Leervektor-Klons. Graphisch dargestellt ist die mittels *Real-Time* PCR ermittelte relative *SFRP1*-mRNA-Expression in den humanen Mammakarzinom-Zelllinien HCC-1143 und HCC-1806 sowie dem BT-20-Leervektor-Klon (BT-20-Leer). Die Normierung aller Proben erfolgte auf die *SFRP1*-mRNA-Expression des BT-20-Leervektor-Klons. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: 95 % Konfidenzintervall der Dreifachbestimmung.

Die Messung der über die potentiellen SFRP1-Mimetika vermittelten Wachstumsinhibition erfolgte analog zu der für das BT-20-Zellkulturmodell beschriebenen (siehe Abschnitt 3.2.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 3-24 in Form von Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Aufgetragen sind die relativen Zellzahlen nach 72-stündiger Behandlung mit der jeweiligen Testsubstanz in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration.

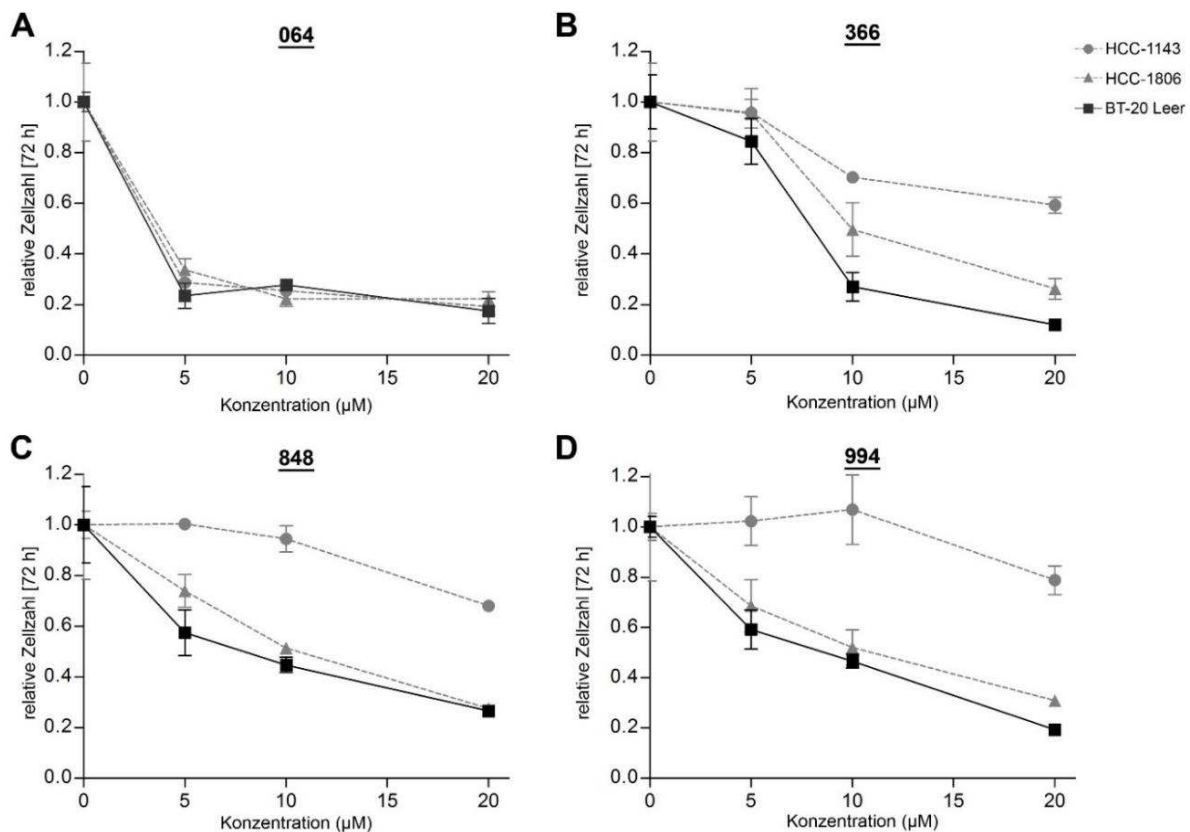


Abbildung 3-24: Der Einfluss von vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum von humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Zur Bestimmung der dosisabhängigen Wachstumsinhibition wurden pro Testsubstanz je 2×10^4 Zellen der Zelllinien HCC-1143 (Kreis) und HCC-1806 (Dreieck) sowie des BT-20-Leervektor-Klons (schwarzes Viereck) ausgesät. Nach zunächst 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte eine 72-stündige Inkubation der Zellen mit den potentiellen Mimetika (Konzentrationen: 5 μM , 10 μM und 20 μM) und im Anschluss die Auswertung mittels Zellzahlbestimmung. Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven der putativen SFRP1-Mimetika (A) 064, (B) 366 (C) 848 und (D) 994. Die Behandlung mit den vier Testsubstanzen resultierte bei jeder Zelllinie in einem verminderten Zellwachstum im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die relative Zellzahl stellt den Mittelwert zweier unabhängiger Messwerte dar und ist jeweils auf die DMSO-Kontrolle normiert. Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung der Doppelbestimmung.

In Übereinstimmung mit einer durch das putative SFRP1-Mimetikum 064 vermittelten Wachstumsinhibition im BT-20-Leervektor-Modell resultierte auch die Inkubation der beiden weiteren Brusttumor-Zelllinien mit dieser Substanz in einem stark verringerten Zellwachstum (Abbildung 3-24A). Dieses Ergebnis ist ebenfalls anhand der IC_{50} -Werte für diese Substanz ersichtlich, die in allen untersuchten Zellkulturmodellen unter 5 μM lagen (Tabelle 3-6). Im hier untersuchten Messbereich (5 - 20 μM) konnte jedoch, ebenso wie im BT-20-Brusttumor-

Modell, kein Zusammenhang zwischen *SFRP1*-Expression und einer durch die Testsubstanz 064 vermittelten Wachstumsinhibition herausgestellt werden.

Eine Behandlung mit den Substanzen 366, 848 und 994 resultierte in beiden Zellkulturmodellen in einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition (Abbildung 3-24B-D). Zwischen den untersuchten Zelllinien waren jedoch deutliche Unterschiede im Ansprechen auf die wachstumshemmende Wirkung der Testsubstanzen festzustellen. So reagierte die Zelllinie HCC-1806 (geringe *SFRP1*-Expression) auf die Inkubation mit den drei Testsubstanzen jeweils mit einer deutlichen Wachstumsinhibition. Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen nur leicht über denen im BT-20-Leervektor-Modell. Hingegen wiesen die HCC-1143-Zellen (hohe *SFRP1*-Expression) eine größere Resistenz gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung dieser drei potentiellen SFRP1-Mimetika auf. Dieses Ergebnis bestätigt das in der Zellwachstums-Analyse des BT-20-Zellkulturmodells beobachtete differenzielle Ansprechen *SFRP1*-negativer und *SFRP1*-positiver Klone auf eine Behandlung mit den potentiellen SFRP1-Mimetika 366, 848 und 994.

Tabelle 3-6: Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika in der Zellwachstums-Analyse humaner Mammakarzinom-Zelllinien.

Substanz	IC_{50} BT-20-Leer (μM) ^a	IC_{50} HCC-1143 WT (μM) ^a	IC_{50} HCC-1806 WT (μM) ^a
064	1,5	< 5,0	< 5,0
366	8,2	> 20,0	10,0
848	7,2	> 20,0	10,6
994	8,3	> 20,0	11,0

^aDie Bestimmung der IC_{50} -Werte erfolgte näherungsweise mittels linearer Regression (siehe Abschnitt 2.17). IC_{50} -Werte außerhalb des Messbereiches konnten auf diese Weise nicht berechnet werden und sind in der Folge in Bereichen > bzw. < angegeben. WT: Wildtyp.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die beobachtete wachstumshemmende Wirkung der putativen SFRP1-Mimetika nicht allein auf das BT-20-Zellkulturmodell beschränkt, sondern auch auf weitere Brustkrebs-Modelle übertragbar ist. Die untersuchten Zelllinien wiesen eine unterschiedlich starke Sensitivität gegenüber den einzelnen Testsubstanzen auf, wobei eine stärkere Wachstumsinhibition jeweils mit einer niedrigen *SFRP1*-Expression korrelierte. Lediglich für das putative SFRP1-Mimetikum 064 konnte dieser Zusammenhang in dem hier untersuchten Messbereich nicht bestätigt werden. Im Folgenden galt es den Einfluss der vier potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Genexpressionsprofil des BT-20-Zellkulturmodells zu untersuchen, um mit Hilfe der Expression SFRP1-assoziiierter Marker-Gene eine mögliche SFRP1-analoge Wirkung der Testsubstanzen zu verifizieren.

3.2.4 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Genexpressionsprofil des BT-20-Zellkulturmodells

Die Behandlung mit allen vier potentiellen SFRP1-Mimetika resultierte jeweils in einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition, sowohl im BT-20-Zellkulturmodell als auch in zwei weiteren Mammakarzinom-Zelllinien (siehe Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3). Zusätzlich deutete ein differenzielles Ansprechen *SFRP1*-negativer und *SFRP1*-positiver Brustkrebszellen auf eine analog zu SFRP1-vermittelte Wachstumsinhibition hin. Die Überprüfung dieser Hypothese sollte mit Hilfe einer Genexpressionsstudie erfolgen. Zu diesem Zweck galt es zunächst spezifische Marker-Gene der SFRP1-Wirkung abzuleiten, um anschließend den Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf die Expression dieser Gensignatur im BT-20-Zellkultur-Modell zu analysieren. Bei SFRP1-analoger Wirkung dieser Testsubstanzen wurde eine ähnliche Expressionsänderung der Marker-Gene wie infolge einer forcierten SFRP1-Reexpression erwartet.

3.2.4.1 Identifizierung zu SFRP1 ko- bzw. anti-regulierter Gene

Zwecks Identifizierung SFRP1-assoziierter Gene wurden die Daten einer *Microarray*-basierten Genexpressionsanalyse genutzt. Die Analyse erfolgte in der *Chip Facility* des IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung) am UKA unter Verwendung des *GeneChip Human Gene 2.0 ST Arrays* des Herstellers Affymetrix, welcher mehr als 33.500 Protein-codierende sowie mehr als 11.000 nicht-codierende Transkripte abdeckt. Mit Hilfe dieses DNA-Arrays wurden jeweils drei unabhängige BT-20-Leervektor- sowie *SFRP1*-Einzelklone auf ihr spezifisches Expressionsprofil hin untersucht. Gene galten als differenziell exprimiert, wenn der lineare *Fold-Change* (FC) zwischen Leervektor- und *SFRP1*-Klon entweder > 2 oder < -2 war und ein *P*-Wert $< 0,05$ (einfaktorielle Varianzanalyse) vorlag (siehe Abschnitt 2.13.15). Unter Anwendung dieser Filtereigenschaften konnten 56 Gene als differenziell exprimiert identifiziert werden, davon 15 Gene als anti- und 41 Gene als ko-reguliert zu *SFRP1* (siehe Tabelle 6-10 und Tabelle 6-11 des Anhangs).

Im Folgenden galt es ausgewählte SFRP1-assozierte Gene mit Hilfe einer *Real-Time* PCR-basierten Expressionsanalyse auf ihre Eignung als Marker-Gene der SFRP1-Wirkung hin zu untersuchen (siehe Tabelle 3-7). Diese sechs zu *SFRP1* ko- und drei zu *SFRP1* anti-regulierten Gene erfüllten alle die oben genannten Filterkriterien, mit Ausnahme des Gens *IGFBP5*, welches jedoch auf Grund seines Bezuges zum WNT-Signalweg [229, 230] ebenfalls analysiert werden sollte.

Tabelle 3-7: Ausgewählte, SFRP1-assoziierte Gene im BT-20-Zellkulturmodell.

Gensymbol	FC <i>SFRP1</i> vs. Leer (linear)	<i>P</i> -Wert ^a
<i>SLC6A14</i>	20,72	< 0,05
<i>PLS3</i>	17,79	< 0,05
<i>COL12A1</i>	9,22	< 0,01
<i>IGFBP5</i>	3,65	0,07
<i>FRAS1</i>	3,60	< 0,01
<i>IL1R1</i>	2,63	< 0,05
<i>PCDH10</i>	-15,39	< 0,05
<i>KCNK2</i>	- 4,51	< 0,001
<i>BMPER</i>	- 2,26	< 0,05

^aDie *P*-Werte wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse ermittelt.

Abbildung 3-25 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Expressionsanalyse für die beiden *SFRP1*-ko-regulierten Gene *PLS3* und *IGFBP5* sowie der beiden zu *SFRP1* anti-regulierten Gene *PCDH10* und *KCNK2*. Im Streudiagramm sind die Expressionswerte von je vier BT-20-Leervektor- bzw. vier *SFRP1*-Einzelklonen abgebildet.

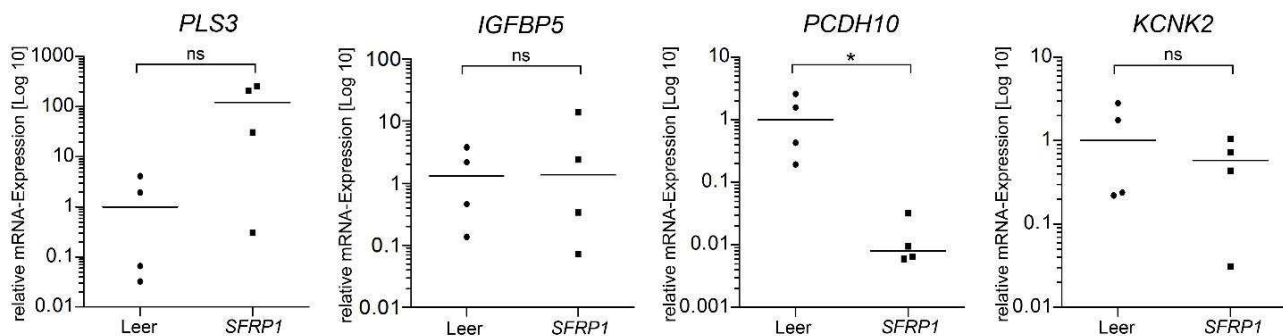


Abbildung 3-25: Exemplarische Darstellung der *Real-Time* PCR-basierten Expressionsanalyse ausgewählter Zielgene der *SFRP1*-Wirkung im BT-20-Zellkulturmodell. In Form von Streudiagrammen dargestellte mRNA-Expression der zu *SFRP1* ko-regulierten Gene *PLS3* und *IGFBP5* sowie der beiden zu *SFRP1* anti-regulierten Gene *PCDH10* und *KCNK2*. Die Genexpressionsanalyse erfolgte an jeweils vier Leervektor- bzw. *SFRP1*-Klonen. Als interner Standard der relativen Expression diente das Haushaltsgen *GAPDH*. Die Normierung erfolgte auf die mediane Expression der Leervektor-Klone. Horizontale Linien: Mediane. Punkte: relative Expressionswerte der Leervektor-Klone. Vierecke: relative Expressionswerte der *SFRP1*-Klone. ns: nicht signifikant; *: $P < 0,05$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Die statistische Auswertung der *Real-Time* PCR-basierten Expressionsanalyse der neun analysierten Zielgene ergab lediglich für *PCDH10* einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der medianen mRNA-Expression der vier untersuchten BT-20-Leervektor- und *SFRP1*-Einzelklone (*Fold Change* der *PCDH10*-Expression: -125). Diese Abweichung zu den Ergebnissen der *Microarray*-basierten Genexpressionsanalyse lässt sich zum einen durch die

unterschiedliche Methode, als auch eine divergente Einzelklonauswahl für die *Real-Time* PCR-Analyse erklären.

Zusammengefasst konnte *PCDH10* sowohl in der *Microarray*-basierten als auch in der nachfolgenden *Real-Time* PCR-Expressionsanalyse als SFRP1-assoziiertes Gen identifiziert werden. Um eine Eignung von *PCDH10* als Marker-Gen der SFRP1-Wirkung für die nachfolgende Genexpressionsstudie mit den putativen SFRP1-Mimetika zu verifizieren, wurde im Folgenden zusätzlich der Einfluss des SFRP1-Inhibitors WAY-316606 auf die *PCDH10*-mRNA-Expression im BT-20-Zellkulturmodell untersucht.

Zwecks *PCDH10*-Expressionsanalyse wurde die zur Validierung der putativen SFRP1-Mimetika etablierte Zellkultur-Analysemethode (siehe Abschnitt 2.2.1) genutzt. Die Messung der relativen *PCDH10*-mRNA-Expression erfolgte im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation des BT-20-Leervektor- bzw. –*SFRP1*-Klons mit dem SFRP1-Inhibitor WAY-316606 mit Hilfe der semiquantitativen *Real-Time* PCR-Methode. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 3-26 dargestellt. Die gezeigten relativen *PCDH10*-mRNA-Expressionswerte sind jeweils auf die DMSO-Kontrolle des Leervektor- bzw. *SFRP1*-Klons normiert.

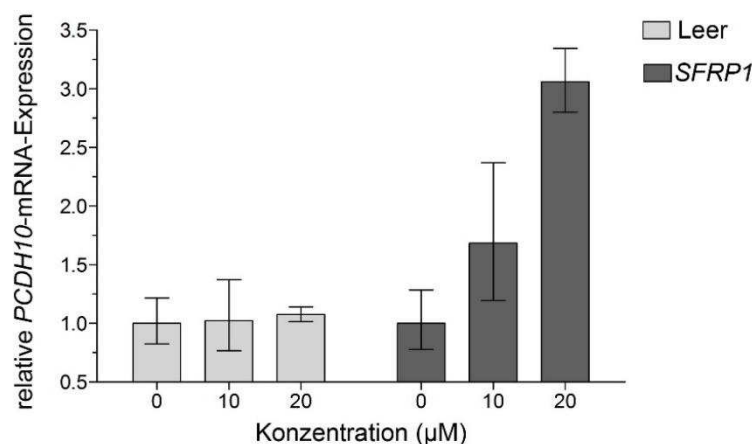


Abbildung 3-26: Der Einfluss des SFRP1-Inhibitors WAY-316606 auf die mRNA-Expression von *PCDH10* im BT-20-Zellkulturmodell. Zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Genexpression von *PCDH10* wurden pro Konzentration je 1×10^5 Zellen des BT-20-Leervektor- (hellgrau) und des BT-20-*SFRP1*-Klons (dunkelgrau) ausgesät. Nach zunächst 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit dem SFRP1-Inhibitor WAY-316606. Die relative *PCDH10*-mRNA-Expression wurde mittels *Real-Time* PCR bestimmt. Die Inkubation mit WAY-316606 erhöhte die *PCDH10*-Expression des *SFRP1*-Klons, aber nicht die des Leervektor-Klons. Als interner Standard der relativen Expression diente das Haushaltsgen *GAPDH*. Balken: mittlere relative *PCDH10*-mRNA-Expression normiert auf die jeweilige DMSO-Kontrolle des Leervektor- bzw. des *SFRP1*-Klons. Vertikale Linien: 95 %-Konfidenzintervall der Dreifachbestimmung.

Nach der Behandlung mit dem SFRP1-Inhibitor WAY-316606 wies der BT-20-Leervektor-Klon eine unveränderte *PCDH10*-Expression auf (*Fold-Change* bei maximaler Konzentration (maxFC): 1,1), während die Expression im *SFRP1*-Klon bei einer Konzentration von 20 µM um den Faktor 3,1 erhöht war (siehe Abbildung 3-26). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit

den Resultaten der *Microarray*- und *Real-Time* PCR-basierten Expressionsanalyse und bestätigt eine SFRP1-vermittelte Regulation der *PCDH10*-Expression.

3.2.4.2 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf die mRNA-Expression von *PCDH10*

Zwecks Validierung der putativen SFRP1-Mimetika galt es im Folgenden ihren Einfluss auf die mRNA-Expression von *PCDH10*, das zuvor als Marker-Gen der SFRP1-Wirkung identifiziert werden konnte, im BT-20-Zellkulturmodell zu analysieren. Die *PCDH10*-mRNA-Expression des BT-20-*SFRP1*-Klons lag nahe der Nachweisgrenze dieser Methode, so dass ein eventuell verstärkter Expressionsverlust infolge einer Behandlung mit den potentiellen SFRP1-Mimetika im BT-20-*SFRP1*-Modell nicht untersucht werden konnte. Daher wurde der Einfluss der vier Testsubstanzen auf die *PCDH10*-Expression im Folgenden lediglich im BT-20-Leervektor-Klon analysiert.

Hierzu wurden 10 bzw. 8×10^4 Zellen des BT-20-Leervektor-Klons wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben ausgesät und für 24 h bzw. 48 h mit den vier putativen SFRP1-Mimetika in drei unterschiedlichen Konzentrationen (5 μ M, 10 μ M und 20 μ M) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der relativen *PCDH10*-mRNA-Expression mittels *Real-Time* PCR. Neben einem konzentrationsabhängigen Einfluss konnte so ebenfalls ein eventuell durch die Inkubationsdauer verursachter Effekt der Testsubstanzen auf die mRNA-Expression des *PCDH10*-Gens untersucht werden.

Abbildung 3-27 zeigt das Ergebnis der konzentrationsabhängigen Expressionsanalyse der *PCDH10*-mRNA im BT-20-Leervektor-Klon nach Inkubation mit den potentiellen SFRP1-Mimetika 064, 366, 848 und 994. Alle Expressionswerte wurden auf die jeweilige DMSO-Kontrolle normiert.

Für alle vier potentiellen SFRP1-Mimetika ließ sich in der *Real-Time* PCR-basierten Expressionsanalyse eine dosisabhängige Reduktion der *PCDH10*-Expression im BT-20-Leervektor-Klon, sowohl nach 24 h als auch 48 h, feststellen (Abbildung 3-27). Testsubstanz 064 zeigte nach 24 h den stärksten Einfluss auf die Transkription von *PCDH10* (Abbildung 3-27A, maxFC24: -4,8). Diese Wirkung ließ jedoch nach einer insgesamt 48-stündigen Inkubation wieder nach (maxFC48: -2,2). Hingegen resultierte eine 24-stündige Behandlung der Leervektor-transfizierten BT-20-Zellen mit den Substanzen 366 (Abbildung 3-27B, maxFC24: -1,5), 848 (Abbildung 3-27C, maxFC24: -1,6) und 994 (Abbildung 3-27D, maxFC24: -1,9) jeweils in einem geringeren Effekt auf die *PCDH10*-Expression als eine Applikation der Testsubstanz 064. Nach einer Inkubation über 48 h offenbarte sich jedoch auch für diese drei Substanzen ein deutlicher Verlust der *PCDH10*-Expression (Abbildung 3-27B-D; 366: maxFC48: -14; 848: maxFC48: -2,8; 994: maxFC48: -6,6).

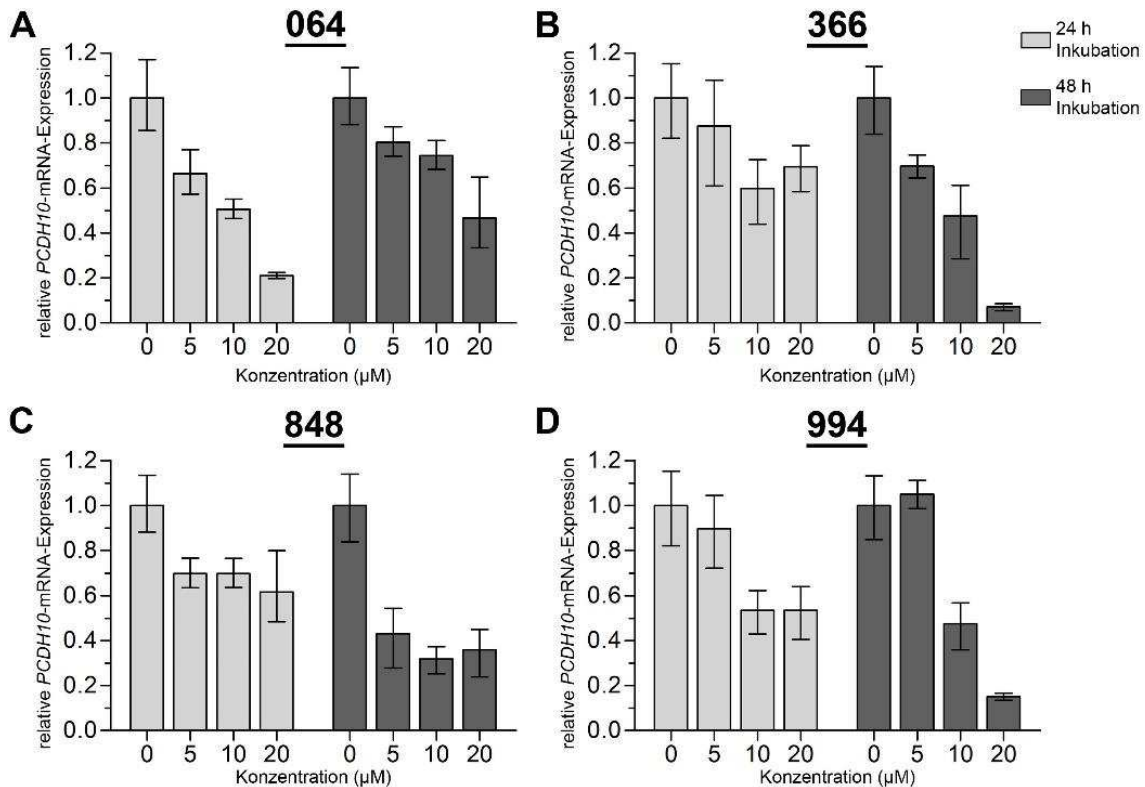


Abbildung 3-27: Der Einfluss der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf die mRNA-Expression von *PCDH10* im BT-20-Leervektor-Klon. Zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Genexpression von *PCDH10* wurden pro Testsubstanz und Konzentration in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer je 10 bzw. 8×10^4 Zellen des BT-20-Leervektor-Klons ausgesät. Nach zunächst 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte eine 24- bzw. 48-stündige Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen. Die relative *PCDH10*-mRNA-Expression wurde mittels *Real-Time* PCR bestimmt. Eine Inkubation mit den Substanzen (**A**) 064, (**B**) 366, (**C**) 848 und (**D**) 994 über 24 h (hellgraue Balken) sowie auch 48 h (dunkelgraue Balken) resultierte in einer reduzierten *PCDH10*-mRNA-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Als interner Standard der relativen Expression diente das Haushaltsgen *GAPDH*. Balken: mittlere relative *PCDH10*-mRNA-Expression normiert auf die DMSO-Kontrolle. Vertikale Linien: 95 %-Konfidenzintervall.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle vier potentiellen SFRP1-Mimetika die Expression des Marker-Gens *PCDH10* reduzierten, wenn auch zwischen den einzelnen Testsubstanzen Unterschiede bezüglich der Stärke des *PCDH10*-Expressionsverlustes sowie der erforderlichen Inkubationsdauer, um diesen Effekt zu erzielen, beobachtet werden konnten. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der zuvor durchgeführten Zellwachstums-Analyse, die für alle vier potentiellen SFRP1-Mimetika eine differenzielle Wachstumsinhibition in *SFRP1*-negativen und *SFRP1*-positiven Mammakarzinomzellen nachgewiesen hatte, deutete dieses Ergebnis auf eine zu SFRP1 analoge Wirkung der putativen SFRP1-Mimetika hin.

3.2.5 Funktionelle Charakterisierung der potentiellen SFRP1-Mimetika

Eine differenzielle Wachstumsinhibition *SFRP1*-negativer und -positiver Mammakarzinomzellen sowie ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die mRNA-Expression des Marker-Gens *PCDH10* suggerierten eine potentiell SFRP1-analoge Wirkung der vier untersuchten Wirkstoffmoleküle.

Im Hinblick auf eine Nutzung der putativen SFRP1-Mimetika als Therapeutika sollten die vier Testsubstanzen im Folgenden zusätzlich hinsichtlich ihrer möglichen Beeinflussung weiterer elementarer Tumorzelleigenschaften charakterisiert werden. Ein Einfluss von SFRP1 auf zentrale Charakteristika von Tumorzellen ist bereits für zahlreiche Tumorentitäten belegt und äußert sich unter anderem in einer gehemmten Proliferation und Migration sowie einer gesteigerten Apoptoserate [231-236]. So wurde auch das im Rahmen dieser Arbeit genutzte BT-20-*SFRP1*-Überexpressionsmodell bereits hinsichtlich dieser Eigenschaften analysiert [169].

Die funktionellen Untersuchungen wurden daher unter Verwendung des gleichen BT-20-Leervektorklons, der bereits für die zuvor beschriebene Validierung der Testsubstanzen (siehe Abschnitt 3.2.2 und 3.2.4) genutzt wurde, durchgeführt. Die Bewertung der funktionellen Effekte erfolgte über einen Vergleich mit dem BT-20-*SFRP1*-Überexpressionsmodell sowie der Nutzung des zuvor bereits verwendeten Inhibitors der WNT-Signaltransduktion ICG-001 als Referenz-Substanz. Zwecks besserer Vergleichbarkeit wurde jedes putative SFRP1-Mimetikum sowie ICG-001 jeweils in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt, da in dieser Konzentration alle Testsubstanzen sowohl auf das Zellwachstum als auch die Expression des Marker-Gens *PCDH10* einen deutlichen Effekt gezeigt hatten. Die Durchführung der funktionellen Charakterisierung der potentiellen SFRP1-Mimetika im BT-20-Modell erfolgte unter Mitwirkung der Masterstudentin Andrea Nülens im Rahmen ihrer Master-Thesis.

3.2.5.1 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Koloniebildungsvermögen

Zunächst galt es den Einfluss der putativen SFRP1-Mimetika auf das Koloniebildungsvermögen der BT-20-Zellen zu untersuchen. Für diesen Prozess sind neben dem Zellwachstum ebenfalls migratorische Zelleigenschaften sowie die Fähigkeit durch Einzelzellen Kolonien zu bilden von Relevanz. Die Effekte einer Inkubation des BT-20-Leervektor-Klons mit den potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Koloniebildungsvermögen wurden mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst pro Test- und Kontrollsubstanz je 10³ Zellen des BT-20-Leervektor-Klons im Doppelansatz in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät und über einen Zeitraum von insgesamt elf Tagen mit den jeweiligen Substanzen inkubiert (siehe Abschnitt 2.16.1).

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen pro Testsubstanz sind in Abbildung 3-28 zusammengestellt. Wie bereits makroskopisch erkennbar war, führte sowohl die Inkubation mit dem Referenz-Inhibitor ICG-001 als auch die Behandlung mit jedem der vier putativen SFRP1-Mimetika 064, 366, 848 und 994 zu einem deutlich reduzierten Koloniewachstum des BT-20-Leervektor-Klons im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 3-28A). Die Quantifizierung der qualitativen Beobachtung mittels densitometrischer Auswertung der fixierten und mit Kristallviolett gefärbten Kolonien ist in Abbildung 3-28B dargestellt. In Übereinstimmung mit der makroskopischen Beobachtung ergab die statistische Analyse eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle jeweils signifikant reduzierte Koloniezahl (jeweils $P < 0,01$) durch eine Behandlung mit den vier Testsubstanzen 064 (Δ Mediane: 83 %), 366 (Δ Mediane: 61 %), 848 (Δ Mediane 41 %) und 994 (Δ Mediane: 80 %). Die beiden potentiellen SFRP1-Mimetika 064 und 994 zeigten den stärksten Einfluss auf das Koloniewachstum, welcher vergleichbar war mit dem des bereits bekannten Referenz-Inhibitors ICG-001 (Δ Mediane: 84 %).

Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da für alle putativen SFRP1-Mimetika bereits ebenfalls ein starker Einfluss auf das Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.2.2). Im Vergleich zum BT-20-SFRP1-Überexpressionsmodell (Δ Mediane: 23 %, [169]) konnte für alle putativen SFRP1-Mimetika sogar ein deutlich stärkerer Effekt auf das Koloniewachstum nachgewiesen werden.

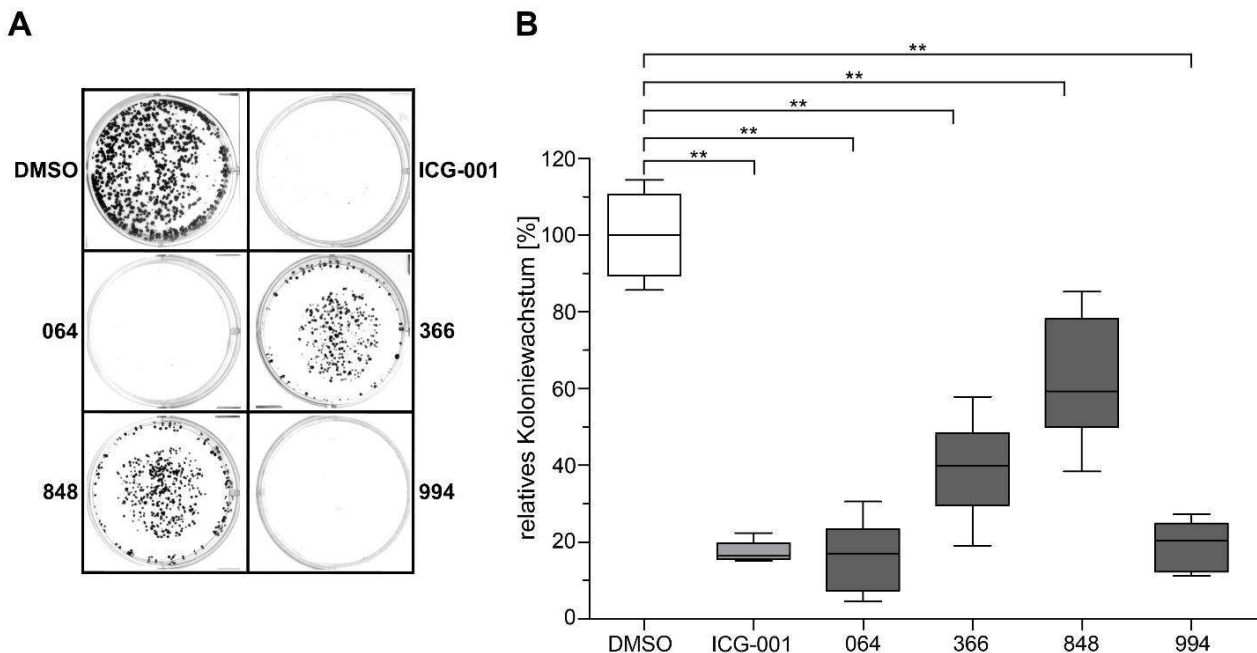


Abbildung 3-28: Der Einfluss der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Koloniebildungsvermögen des BT-20-Leervektor-Klons. Zur Bestimmung des Koloniebildungsvermögens wurden pro Test- und Kontrollsubstanz je 10^3 Zellen des Leervektor-Klons ausgesät. Nach zunächst 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte eine Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Substanzen in einer Konzentration von 10 μ M über elf Tage. (A) Repräsentative

Aufnahme fixierter und angefärbter Kolonien in den Kavitäten einer 6-Well-Zellkulturschale. Gezeigt ist die Koloniebildung des BT-20-Leervektorklons nach elftägiger Kultivierung mit dem WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001, den Testsubstanzen 064, 366, 848 und 994 sowie die DMSO-Kontrolle. Sowohl eine Behandlung mit ICG-001 als auch mit allen vier putativen SFRP1-Mimetika resultierte in einem geringeren Koloniewachstum im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. (B) Die *Boxplot*-Darstellung der densitometrischen Auswertung veranschaulicht das signifikant reduzierte Koloniebildungsvermögen bei Behandlung der Zellen mit jeder der vier Testsubstanzen sowie der Referenzsubstanz ICG-001. Für jede Substanz wurden jeweils drei unabhängige Versuche im Doppelansatz durchgeführt und das relative Koloniewachstum auf den Median der DMSO-Kontrolle normiert. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane der Sechsfachbestimmung. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. **: $P < 0,01$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

3.2.5.2 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf die Apoptose-Induktion

Eine Behandlung mit den potentiellen SFRP1-Mimetika 064, 366, 848 und 994 in einer Konzentration von 10 μM resultierte jeweils in einem stark verminderten Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons (Abbildung 3-22). Ferner konnte ebenfalls ein Effekt auf das Koloniewachstum durch diese vier Testsubstanzen nachgewiesen werden (Abbildung 3-28). Im Folgenden galt es zu klären, ob eine über die putativen SFRP1-Mimetika vermittelte Wachstumsinhibition auf eine gehemmte Zellproliferation, eine gesteigerte Apoptoserate oder eine Modulation beider Prozesse zurückzuführen ist.

Zwecks Überprüfung eines möglichen Effektes der Testsubstanzen auf die Sensitivität gegenüber pro-apoptotischen Reizen, erfolgte zunächst eine 24-stündige Inkubation des BT-20-Leervektorklons mit den vier Testsubstanzen sowie dem WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001 (Konzentration jeweils: 10 μM), bevor die Apoptose mit Hilfe von Staurosporin induziert wurde [188]. Als Maß für die Apoptose wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 mittels des *ApoOne® Homogeneous Caspase-3/7 Assays* (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Detektion der aktiven Caspasen 3/7 beruht auf der Umwandlung eines zugesetzten Substrats in ein Fluoreszenzsignal. Die über eine Fluoreszenzmessung bestimmte Aktivität der Effektor-Caspasen korreliert wiederum mit der Apoptoserate (siehe Abschnitt 2.16.3).

Das Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen pro Testsubstanz ist in Abbildung 3-29 dargestellt. Die statistische Auswertung ergab eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant gesteigerte Apoptose-Induktion bei einer Behandlung des BT-20-Leervektor-Klons mit dem Referenz-Inhibitor ICG-001 (Δ Mediane: 99 %, $P < 0,001$). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit einer durch diesen Inhibitor vermittelten Zunahme der Caspase 3/7-Aktivität in Kolonkarzinomzellen [114, 237]. Während die Inkubation mit den putativen SFRP1-Mimetika 366 (Δ Mediane: 78 %) und 994 (Δ Mediane: 11 %) ebenfalls in einer signifikant gesteigerten Apoptoserate resultierte (366: $P < 0,001$; 994: $P < 0,05$), zeigte die Testsubstanz 848 (Δ Mediane: 4 %) hingegen keinen Einfluss auf die Apoptose-Induktion des BT-20-Leervektor-Klons. Für das potentielle SFRP1-Mimetikum 064 war im Vorfeld der stärkste Einfluss auf das Zell- sowie das Koloniewachstum gezeigt worden (Abschnitt 3.2.2 und

3.2.5.1). Entgegen der Erwartung resultierte eine Behandlung des BT-20-Leervektor-Klons mit Testsubstanz 064 jedoch in einer im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant verringerten Apoptoserate (Δ Mediane: -46 %, $P < 0,001$).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine durch die potentiellen SFRP1-Mimetika hervorgerufene Wachstumsinhibition vermutlich über unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird. So resultierte eine Inkubation mit Substanz 366 in einer erhöhten Sensitivität des BT-20-Leervektor-Klons gegenüber pro-apoptotischen Reizen. Die Steigerung der Apoptoserate war vergleichbar mit der im BT-20-*SFRP1*-Überexpressionsmodell (Δ Mediane: 93 %) [169] und deutete darauf hin, dass die beobachtete Wachstumsreduktion durch diese Substanz vornehmlich aus einer verstärkten Apoptose resultierte. Hingegen wirkte Testsubstanz 064 in einer Konzentration von 10 μ M offenbar anti-apoptotisch, so dass eine Reduktion des Zellwachstums demnach vermutlich die Folge einer stark gehemmten Proliferation war.

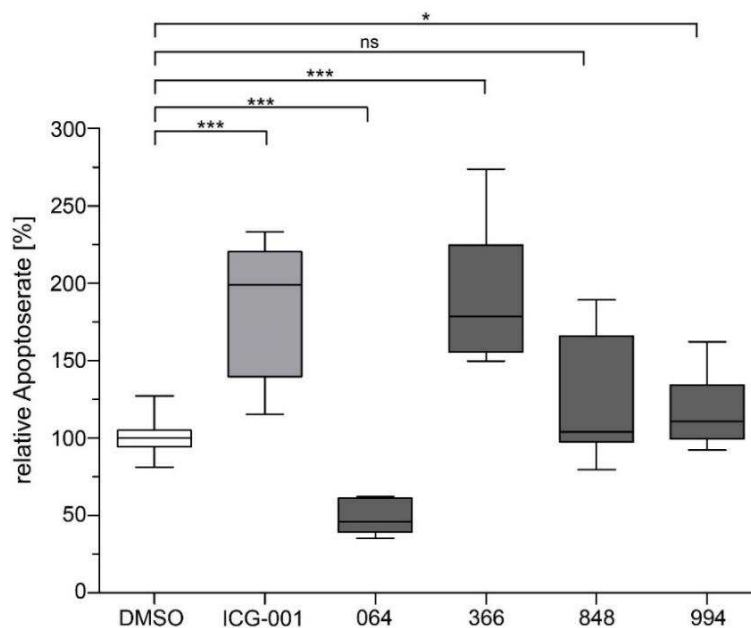


Abbildung 3-29: Der Einfluss der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf die Apoptoserate des BT-20-Leervektor-Klons. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden pro Test-/Kontrollsubstanz je 10^4 Zellen des Leervektor-Klons im Dreifachansatz ausgesät und zunächst für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Substanzen in einer Konzentration von 10 μ M über weitere 24 h und eine anschließende 24-stündige Behandlung der Zellen mit Staurosporin. Die nachfolgende Detektion der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 wurde mit Hilfe eines auf Fluoreszenz basierten Caspase-Assays (499nm/521nm) durchgeführt. Die statistische Auswertung ergab eine signifikant gesteigerte Apoptoserate nach Behandlung mit dem WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001 sowie den Testsubstanzen 366 und 994 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Eine Inkubation mit Substanz 064 führte hingegen zu einer reduzierten Apoptoserate. Für jede Substanz wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt und die relative Apoptoserate auf die mediane Caspase 3/7-Aktivität der DMSO-Kontrolle normiert. Horizontale Linien der *Boxplots*: Mediane der Neunfachbestimmung. Vertikale Linien: Minima und Maxima. Boxen: 25 %- bis 75 %-Quartile. ns: nicht signifikant, *: $P < 0,05$, ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

3.2.5.3 Der Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Migrationsverhalten

Eine weitere zentrale Eigenschaft von Tumorzellen stellt die Zellmigration dar, die in malignen Krebszellen gesteigert ist und wesentlich zum Invasions- und Metastasierungspotential der Zellen beiträgt [205]. Mehrere *in vitro*-Studien belegen, dass SFRP1 die Migration von Krebszellen inhibieren kann [234-236]. Ein Einfluss von SFRP1 auf das Migrationsverhalten des BT-20-SFRP1-Überexpressionsmodells konnte jedoch nicht gezeigt werden [169]. Um einen möglichen Mehrwert der putativen SFRP1-Mimetika gegenüber einer Reexpression von SFRP1 im BT-20-Zellkulturmodell zu evaluieren, sollte im Folgenden ein möglicher Effekt der Testsubstanzen auf die Zellmigration anhand eines 2D-Wundheilungstests (engl. *Scratch Assay*) untersucht werden. Dieser Test untersucht die Fähigkeit der Zellen eine zellfreie Fläche (*Scratch*) innerhalb eines definierten Zeitraumes zu besiedeln. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Wunde in einen konfluenten Zellrasen des BT-20-Leervektor-Klons eingebracht und das Kulturmedium anschließend mit den Testsubstanzen bzw. dem Referenzinhibitor ICG-001 in einer Konzentration von jeweils 10 μ M versetzt. Die Dokumentation des Wundschlusses über einen Zeitraum von 72 h erfolgte über lichtmikroskopische Aufnahmen der Wunde alle 24 h (siehe Abschnitt 2.16.5). Für jede Substanz wurden jeweils drei unabhängige Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt.

Abbildung 3-30A zeigt eine repräsentative Darstellung des Wundheilungstests für den BT-20-Leervektor-Klon unter dem jeweiligen Einfluss der DMSO-Kontrolle bzw. der potentiellen SFRP1-Mimetika 064, 366, 848 und 994 sowie der Referenzsubstanz ICG-001. Bereits makroskopisch ist ein im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich größeres zellfreies Areal nach Inkubation der Zellen mit den beiden Testsubstanzen 064 und 994, sowie dem WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001 zu erkennen.

Die graphische Auswertung des Wundschlusses erfolgte mit Hilfe der Software *Image J* (siehe Abschnitt 2.16.5). Die Werte der zellfreien Fläche wurden jeweils auf die entsprechende zellfreie Ausgangsfläche zum Startpunkt der Messung (T=0 h) normiert. Abbildung 3-30B illustriert den Verlauf des Wundschlusses über 72 h unter Einwirkung des WNT-Signalweg-Inhibitors ICG-001 sowie der vier putativen SFRP1-Mimetika und der DMSO-Kontrolle. Die bereits makroskopisch sichtbaren qualitativen Effekte ließen sich auch quantitativ bestätigen. Dabei offenbarte Testsubstanz 064 den stärksten Einfluss auf den Wundschluss der Leervektor-transfizierten BT-20-Zellen.

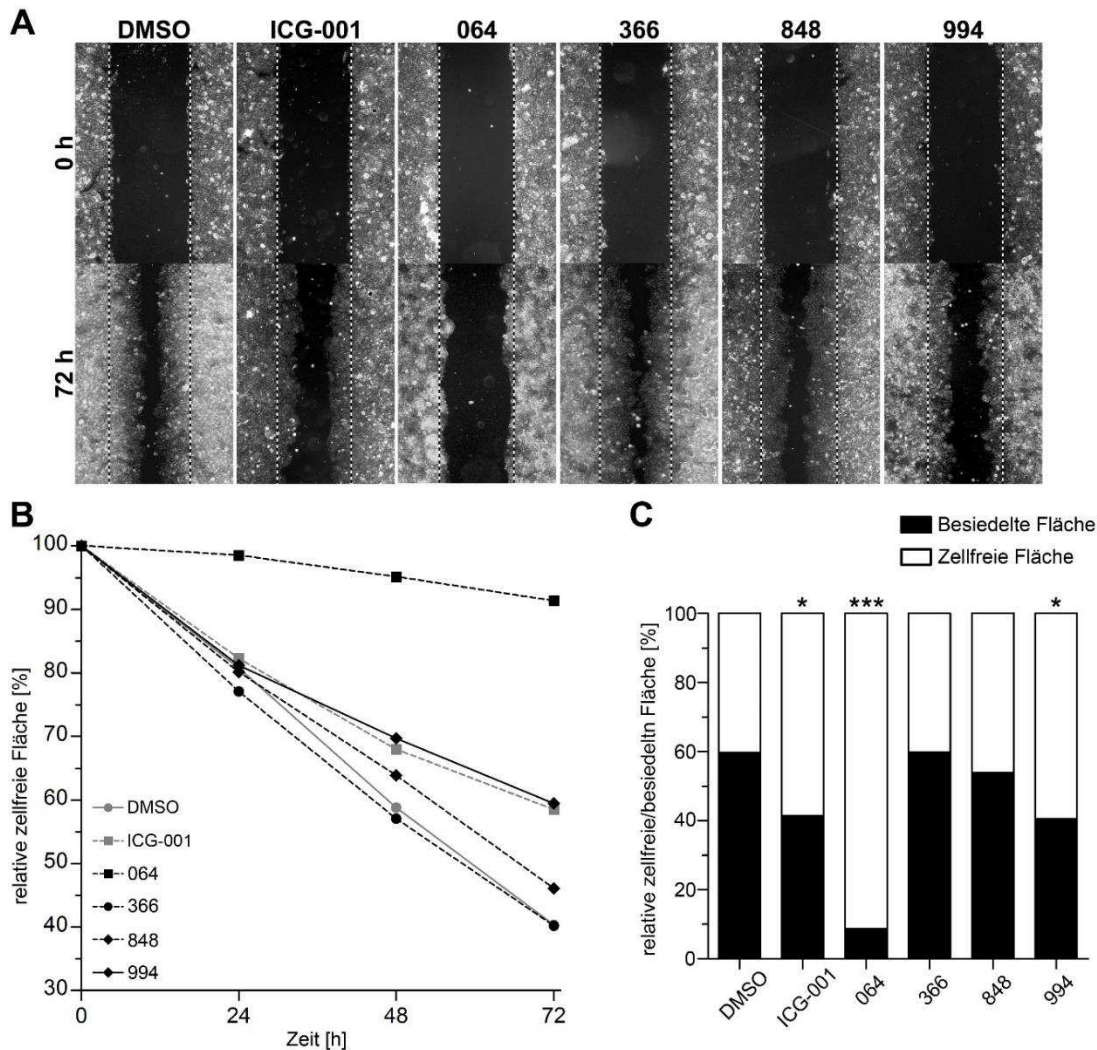


Abbildung 3-30: Der Einfluss von vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf den Wundschluss des BT-20-Leervektor-Klons. Für den Wundheilungstest wurde zunächst eine Wunde in den konfluenten Zellrasen des BT-20-Leervektor-Klons eingebracht und das Kulturmedium anschließend mit den Testsubstanzen bzw. ICG-001 in einer Konzentration von jeweils 10 μ M versetzt. Die Fotodokumentation des Wundschlusses über einen Zeitraum von 72 h erfolgte alle 24 h. **(A)** Exemplarische Darstellung der Wundfläche zum Start- (0 h) und Endzeitpunkt (72 h) des Wundheilungstests für die Behandlungen mit der Referenzsubstanz ICG-001, den Testsubstanzen 064, 366, 848 und 994, sowie der DMSO-Kontrolle. Vertikal gestrichelte Linie: Begrenzung der zellfreien Fläche zum Zeitpunkt T = 0 h. **(B)** Dargestellt ist der graphische Vergleich des Wundschlusses bei jeweiliger Behandlung der Zellen mit DMSO und ICG-001 sowie den vier Testsubstanzen 064, 366, 848 und 994. Alle Werte wurden jeweils auf die zellfreie Ausgangsfläche zum Zeitpunkt T = 0 h normiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die $\pm$ Standardfehler der einzelnen Messpunkte nicht angegeben. **(C)** Darstellung der zellfreien (weiß) im Vergleich zur besiedelten Fläche (schwarz) nach 72-stündiger Behandlung mit den Kontroll- sowie Testsubstanzen. Die dargestellten P-Werte beziehen sich auf den jeweiligen Vergleich der zellfreien Fläche nach Behandlung mit den Testsubstanzen bzw. ICG-001 und der DMSO-Kontrolle. *: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

In Abbildung 3-30C ist der direkte Vergleich der zellfreien Fläche nach jeweiliger Behandlung mit den Kontroll- bzw. Testsubstanzen zum Endzeitpunkt der Messung (T=72 h) dargestellt. Die Differenz in der zellfreien Fläche zwischen der DMSO-Kontrolle und dem Ansatz mit dem WNT-Signalweginhibitor ICG-001 betrug zum Zeitpunkt 72 h ($\Delta zF72$) 19 % und erwies sich in der statistischen Auswertung als signifikant ($P < 0,05$). Dies ist in Überein-

stimmung mit einem reduzierten Wundschluss von Zellen des Pankreaskarzinoms sowie des humanen Bronchien-Epithels bei Inkubation mit ICG-001 und bestätigt eine Abhängigkeit der im Wundheilungstest beobachteten Effekte von einer Inhibition der WNT-Signaltransduktion [238, 239]. Eine 72-stündige Inkubation des BT-20-Leervektor-Klons mit dem putativen SFRP1-Mimetikum 064 sowie 994 resultierte ebenfalls in einer statistisch signifikant größeren zellfreien Fläche im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (für 064: $\Delta zF72$: 51 %, $P < 0,001$ und für 994: $\Delta zF72$: 19 %, $P < 0,05$). Hingegen zeigten die beiden potentiellen SFRP1-Mimetika 366 ($\Delta zF72$: 0 %) und 848 ($\Delta zF72$: 7 %) keine nachweisbare Wirkung auf den Wundschluss des BT-20-Leervektor-Klons.

Auf Grund des Aufbaus des Wundheilungstests kann neben migratorischen Effekten ebenfalls ein vermindertes Zellwachstum Einfluss auf den Wundschluss haben, und zwar umso stärker je länger der Zeitraum ist, den die Zellen für einen vollständigen Wundschluss benötigen. Da auch nach 72-stündiger Versuchsdurchführung ein maximaler Wundschluss von lediglich 60 % beobachtet wurde, sollten zusätzlich die Daten der Zellwachstums-Analyse aus Abschnitt 3.2.2 herangezogen werden, um mögliche Auswirkungen einer über die potentiellen SFRP1-Mimetika vermittelten Wachstumsinhibition auf den Wundschluss beurteilen zu können. Der direkte Vergleich der Wachstumsinhibition mit dem Wundschluss der BT-20-Zellen bei Inkubation mit den vier Testsubstanzen ist in Abbildung 3-31 dargestellt.

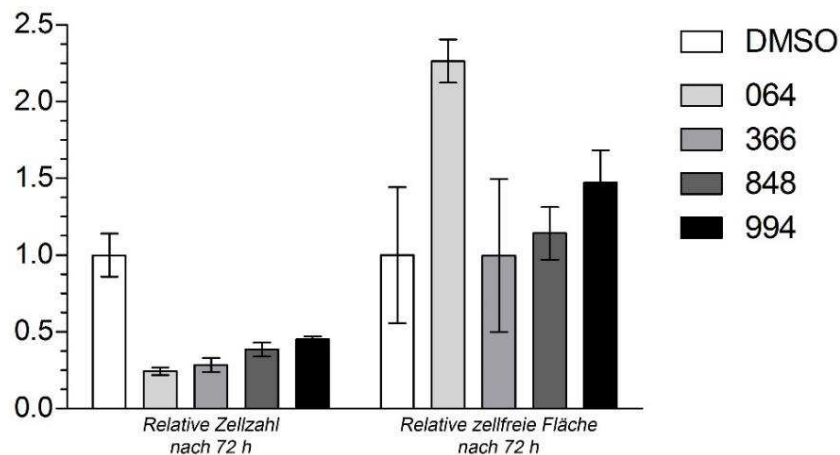


Abbildung 3-31: Der direkte Vergleich des Einflusses der vier potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum sowie den Wundschluss des BT-20-Leervektor-Klons. Dargestellt ist die relative Zellzahl des BT-20-Leervektor-Klons (links) sowie die relative zellfreie Fläche einer in den konfluenten Zellrasen des BT-20-Leervektor-Klons eingebrachten Wunde (rechts) nach 72-stündiger Inkubation mit den vier putativen SFRP1-Mimetika 064, 366, 848 und 994 in einer Konzentration von jeweils 10 μ M. Alle Werte wurden auf den jeweiligen Wert der DMSO-Kontrolle normiert. Vertikale Linien: $\pm$ Standardfehler.

In einer Konzentration von 10 μ M reduzierte Testsubstanz 366 das Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im Median (ΔZW) um 71 % (Abbildung 3-31). Dieser Effekt war vergleichbar mit dem des putativen SFRP1-Mimetikums

064 (ΔZW : 76 %) auf das Zellwachstum und deutlich stärker als der der Testsubstanz 994 (ΔZW : 54 %). Hingegen konnte für die Testsubstanz 366 kein Einfluss auf den Wundschluss nachgewiesen werden, im Gegensatz zu einem signifikant langsameren Wundschluss bei Inkubation mit den potentiellen SFRP1-Mimetika 064 und 994. Dieser Vergleich lässt darauf schließen, dass das Ergebnis des Wundheilungstests vermutlich nicht auf die wachstumsinhibierenden Effekte der Testsubstanzen, sondern vielmehr auf dem Einfluss dieser Substanzen auf die migratorischen Eigenschaften der BT-20-Zellen beruht.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt herausgestellt werden, dass die beiden Testsubstanzen 064 und 994 den Wundschluss des BT-20-Leervektors signifikant verlangsamten und dieser Effekt vermutlich über eine verringerte Zellmigration vermittelt wird. Dies stellt im BT-20-Zellkulturmodell einen Mehrwert dieser beiden putativen SFRP1-Mimetika im Vergleich zu einer forcierten SFRP1-Reexpression dar. Eine Validierung dieses Ergebnisses wäre in weiterführenden Experimenten mit Hilfe eines *Boyden-Chamber*-Migrationstests möglich. Dieser untersucht die chemotaktische Migration der Zellen durch eine Membran und ist somit weitgehend unabhängig von Zellwachstums-Einflüssen.

3.2.6 Zusammenfassung der beobachteten, durch die vier potentiellen SFRP1-Mimetika vermittelten Effekte

In Tabelle 3-8 sind die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Effekte der putativen SFRP1-Mimetika im BT-20-Zellkulturmodell zusammengefasst. Als Vergleich ist zusätzlich die jeweilige Wirkung einer SFRP1-Reexpression angegeben.

Tabelle 3-8: Tabellarische Zusammenfassung der im BT-20-Zellkulturmodell infolge einer Inkubation mit den putativen SFRP1-Mimetika bzw. einer forcierten SFRP1-Reexpression beobachteten Effekte.

Beobachtete Effekte	SFRP1-Reexpression	Putatives SFRP1-Mimetikum			
		064	366	848	994
Differenzielle Zellwachstumsinhibition	k. A.	✓	✓	✓	✓
Reduktion der <i>PCDH10</i> -Expression	✓	✓	✓	✓	✓
Hemmung der Koloniebildung	✓	✓	✓	✓	✓
Erhöhte Apoptoserate	✓	x	✓	-	✓
Verminderte Zellmigration	-	✓	-	-	✓

k. A. : keine Angabe; ✓ : Effekt; - : kein Effekt; x : signifikant reduzierte Apoptose-Induktion

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung des putativen Tumorsuppressors DKK3 im humanen Mammakarzinom

In zahlreichen Tumorentitäten, einschließlich des Mammakarzinoms, kann eine aberrante Aktivität des WNT-Signalweges festgestellt werden, welche mit einem verstärkten Tumorentstehungswachstum sowie einer erhöhten Metastasierungsrate einhergeht [101-103]. Als Antagonisten der WNT-Signaltransduktion gelten die Vertreter der Dickkopf-Familie als putative Tumorsuppressoren, deren Expressionsverlust die Entstehung von Tumoren sowie deren Progression fördert [111]. DKK3 nimmt im Hinblick auf seine divergente Struktur sowie der daraus resultierenden biologischen Funktion eine Sonderstellung innerhalb der Dickkopf-Familie ein [111, 130]. Dies zeigt sich auch im Rahmen der Tumorgenese: Während die übrigen Mitglieder der Dickkopf-Familie in Tumoren nicht wie erwartet konstant herabreguliert, sondern ebenso gewebs- und kontextspezifisch erhöht sein können, konnte ein DKK3-Expressionsverlust in nahezu jeder humanen Tumorentität nachgewiesen werden [130]. Dieser zeigt sich beispielsweise in soliden Neoplasien des zentralen Nervensystems, der Lunge und der Prostata, sowie ebenfalls in hämatopoetischen Tumorerkrankungen [137, 240-242]. Übereinstimmend belegen mehrere Studien eine Reduktion der DKK3-Expression im humanen Mammakarzinom [142, 145, 190]. Diese Studien berücksichtigten jedoch jeweils nicht die Heterogenität der Brusttumoren. So fasst der Begriff „Mammakarzinom“ eine Gruppe heterogener Brustkrebserkrankungen zusammen, die sich sowohl hinsichtlich ihrer molekularen Charakteristika als auch in Bezug auf ihre klinische Prognose und ihr Therapieansprechen unterscheiden [18, 26-28]. Basierend auf Genexpressions-Profilen werden fünf intrinsische Subtypen unterschieden: Luminal A, Luminal B, *HER2-enriched*, *Basal-like* und *Normal-like* [31]. Luminal A-Tumoren sind mit einer guten Prognose verknüpft. Hingegen zeigen Karzinome der Subtypen Luminal B, *HER2-enriched* und *Basal-like* jeweils vergleichsweise ungünstige Krankheitsverläufe [27, 28, 31]. Während sich zudem die systemische Therapie basaler Tumoren bisher ausschließlich auf die Möglichkeit der Applikation unspezifisch wirkender Zytostatika beschränkt, existieren für luminale sowie für *HER2-enriched* Brusttumoren bereits weniger toxische Alternativen zur Chemotherapie, z. B. in Form von endokriner Behandlung oder der Gabe von Anti-HER2-Antikörpern [38, 39]. Dies unterstreicht die hohe klinische Relevanz eines Verständnisses der molekularen Ursachen der jeweiligen Subtyp-spezifischen Tumorentstehung und –progression im Hinblick auf die Entwicklung personalisierter Therapieansätze. Um diesem Bedarf gerecht zu werden, bestand ein Ziel dieser Arbeit in der erstmaligen Analyse eines potentiellen Subtyp-spezifischen DKK3-

Expressionsverlustes im humanen Mammakarzinom sowie dessen biologischer Relevanz für die Karzinogenese der einzelnen Subtypen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorheriger Studien ergab ebenfalls die im Rahmen dieser Dissertation anhand eines eigenständig generierten mRNA-Kollektivs durchgeführte Expressionsanalyse einen signifikanten Verlust von *DKK3* in Brusttumoren im Vergleich zu Brust-Normalgeweben. Durch Verwendung eines umfangreichen *Tissue Microarrays* (TMA) [144, 145] konnte dieser Verlust zudem in einem zweiten, unabhängigen Kollektiv gleichermaßen auf Proteinebene bestätigt werden. Die zusätzliche Stratifizierung der beiden unabhängigen Patientenkohorten in die IHC-definierten Subtypen Luminal, HER2-positiv und Triple-negativ (TNBC) offenbarte zudem eine sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene differenzielle Reduktion der *DKK3*-Expression in den distinkten Brusttumor-Subtypen, mit dem jeweils stärksten Verlust in triple-negativen Karzinomen. Dieses Ergebnis wurde gestützt durch die Analyse eines umfangreichen *in silico*-mRNA-Expressions-Datensatzes des TCGA-Datenportals [166, 167], welcher die geringste *DKK3*-Expression in Karzinomen der PAM-50-definierten Subgruppe *Basal-like* aufwies. Dieser Subtyp überschneidet sich zu einem hohen prozentualen Anteil mit den IHC-definierten TNBC-Karzinomen [44]. Bestätigt wurde diese Verknüpfung durch eine positive Korrelation zwischen einer verminderten *DKK3*-mRNA und einem negativen Hormonrezeptorstatus sowohl im eigenständig generierten als auch im TCGA-Datensatz. Ferner wurde eine niedrige *DKK3*-Expression vermehrt in größeren Brusttumoren (größer pT1) sowie in dedifferenzierten Karzinomen (Tumorgad G3) gefunden, in Übereinstimmung mit einem hohen Prozentsatz von *Basal-like* Brusttumoren, die diese Charakteristika aufweisen [18]. Ein Zusammenhang zwischen reduzierter *DKK3*-Expression und einer geringen Differenzierung von Tumoren konnte ebenso in Neoplasien des Gastrointestinaltraktes und der Lunge beobachtet werden, was auf eine potentielle Funktion von *DKK3* in der epithelialen Differenzierung hindeutet [243-245].

Nachfolgend sollten mögliche molekulare Mechanismen untersucht werden, die zur Ausprägung des beobachteten Subtyp-spezifischen *DKK3*-Expressionsverlustes im Mammakarzinom beitragen könnten. In humanen Tumoren wurden bis heute zahlreiche epigenetische sowie genetische Faktoren als potentielle Ursache eines *DKK3*-Expressionsverlustes analysiert. Als erster Mechanismus einer *DKK3*-Deregulation in Karzinomen wurde eine aberrante DNA-Methylierung beschrieben. So wiesen Kobayashi und Kollegen 2002 im Lungenkarzinom eine mit einem Verlust der *DKK3*-Expression assoziierte Hypermethylierung des *DKK3*-Promotors nach [246]. Mittlerweile stellt die Hypermethylierung des *DKK3*-Gens die am häufigsten beschriebene molekulare Ursache einer Herabregulation der *DKK3*-Expression in humanen Tumoren dar und wurde unter anderem im Kolon-, Prostata- und Magenkarzinom nachgewiesen. [130, 241, 247]. Gleichermäßen konnte ebenfalls in humanen Brusttumoren

eine Assoziation zwischen einem Verlust von *DKK3* und einer *DKK3*-Hypermethylierung gezeigt werden [142, 145, 190]. Die meisten der bisher veröffentlichten *DKK3*-Methylierungsstudien im Mammakarzinom nutzten jedoch die rein qualitative und zudem weniger sensitive Methode der methylierungsspezifischen PCR (MSP) und berücksichtigten zudem jeweils nicht die Heterogenität der Brustkrebserkrankung [142, 190, 248]. Lediglich für die Subgruppe der HER2-positiven Tumoren konnte in einer kürzlich publizierten Studie eine aberrante Methylierung des *DKK3*-Promotors nachgewiesen werden [249]. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher anhand eines eigenständig generierten DNA-Kollektivs eine Methylierungsstudie im humanen Mammakarzinom erstmalig sowohl mit Hilfe der quantitativen Methode der Pyrosequenzierung als auch mit einer zusätzlichen Subgruppenanalyse durchgeführt werden. Den Erwartungen entsprechend konnte in dieser Methylierungsanalyse, unter Berücksichtigung aller Subtypen, eine in Brusttumoren im Vergleich zu Brust-Normalgeweben signifikant erhöhte Methylierungsfrequenz im analysierten *DKK3*-Genbereich beobachtet und somit die mittels MSP generierten Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden [142, 190]. Nachfolgend galt es zu überprüfen, ob der beobachteten differenziellen *DKK3*-Expression in den Brustkrebs-Subtypen eine differenzielle *DKK3*-Methylierung zugrunde liegt. Überraschenderweise wiesen die triple-negativen Karzinome, in denen zuvor der größte Verlust der *DKK3*-Expression nachgewiesen werden konnte, die geringste Methylierungsfrequenz auf. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis ergab ebenfalls die Analyse eines umfangreichen Methylierungs-Datensatzes des TCGA-Datenportals [166, 167], dass basale Fälle eine deutlich geringere Methylierungsfrequenz im Vergleich zu den Tumoren der übrigen Subtypen des Mammakarzinoms aufweisen. Dies bestätigte sich sowohl für den mittels Pyrosequenzierung untersuchten Genabschnitt als auch den gesamten transkriptionsregulierenden Genbereich der beiden, den *DKK3*-Promotor-überspannenden CpG-Inseln. Dieses Ergebnis legt nahe, dass ein *DKK3*-Expressionsverlust in den einzelnen Brustkrebs-Subtypen wahrscheinlich über unterschiedliche regulatorische Mechanismen vermittelt wird. Unterstützt wurde diese Hypothese durch eine Korrelationsanalyse zwischen den *DKK3*-Methylierungs- und *DKK3*-mRNA-Expressionsdaten des TCGA-Datensatzes. Während in basalen Tumoren kein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und *DKK3*-mRNA-Expression nachweisbar war, korrelierten diese Parameter signifikant bei gemeinsamer Analyse aller nicht-basalen Fälle.

In der Tat konnte bereits für zahlreiche weitere, für die Brusttumorgenese relevante Gene, beispielsweise *APC* und *RUNX3*, ein Subtyp-spezifisches Methylierungsmuster in Mammakarzinomen nachgewiesen werden, mit der jeweils höchsten Promotor-Methylierungsfrequenz in Tumoren des Subtyps Luminal B und der jeweils niedrigsten in basalen Karzinomen [250-252]. Ferner legen die Ergebnisse einiger Studien nahe, dass die Gentranskription in den einzelnen Brustkrebs-Subgruppen jeweils über eine DNA-Methylierung differenzieller

Genbereiche reguliert wird. So treten aberrant methylierte CpG-Dinukleotide in luminalen Tumoren meist innerhalb der CpG-Inseln der Gen-Promotoren bzw. deren proximalen Gensequenzen auf, wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Hingegen sind aberrant methylierte CpG-Dinukleotide in basalen Karzinomen gehäuft in CpG-*Island shores*, die *up-* oder *downstream* der Promotorregion liegen, aufzufinden [253, 254]. Um die Relevanz einer Methylierung dieser Genbereiche für die *DKK3*-Transkription zu evaluieren, insbesondere in basalen Mammakarzinomen, wäre jedoch zunächst die Identifizierung transkriptionsrelevanter CpG-*Island shores* innerhalb des *DKK3*-Gens sowie deren Methylierungsanalyse nötig. Zudem sind für andere Tumorentitäten bereits weitere, für die *DKK3*-Expression bedeutsame Regulationsmechanismen bekannt, die möglicherweise ebenso ursächlich für einen *DKK3*-Verlust in basalen Brusttumoren sein könnten. Beispielsweise konnte im Nierenzellkarzinom gezeigt werden, dass die *DKK3*-Expression vermutlich nicht über DNA-Methylierung, sondern vielmehr über Histon-Modifikationen reguliert wird [255]. Des Weiteren wurde eine über RNA-Interferenz vermittelte, posttranskriptionelle Regulation der *DKK3*-mRNA-Stabilität bereits für mehrere Tumorgewebe beschrieben. So stellt *DKK3* sowohl in Neuroblastomen als auch in Prostatakarzinomen das Zielgen einiger, zum Teil über das Onkogen *N-MYC* regulierter, microRNAs dar [256-258]. Hingegen scheinen genetische Faktoren als mögliche Ursache eines *DKK3*-Funktionsverlustes im Mammakarzinom nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Während sowohl für Gallenblasen- als auch Prostatakrebs kürzlich klinisch-relevante *DKK3*-Punktmutationen nachgewiesen werden konnten [259, 260], sind Mutationen des *DKK3*-Gens im Mammakarzinom sehr selten (etwa 0,2 % aller Brustkrebs-Fälle) [166]. In einigen Neoplasien, einschließlich des Mammakarzinoms, kann eine gehäufte heterozygote Deletion der genomischen Region 11p15, in der unter anderem das *DKK3*-Gen lokalisiert ist, beobachtet werden [261-263]. Jedoch wurde bisher nicht untersucht, ob diese chromosomale Aberration auch in einer verminderten *DKK3*-Transkription resultiert.

Der Nachweis einer prognostischen Relevanz einer Hypermethylierung des *DKK3*-Gens erfolgte erstmalig 2004 durch Roman-Gomez und Kollegen bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie [264] und konnte mittlerweile auch für zahlreiche weitere Tumorentitäten bestätigt werden, wie beispielsweise das hepatozelluläre sowie das Magen- und Zervixkarzinom [247, 265, 266]. Ebenso belegen mehrere Mammakarzinom-Studien eine signifikante Assoziation zwischen einer *DKK3*-Hypermethylierung und einer schlechten Prognose, sowohl für das Gesamt- als auch das rezidivfreie Überleben von Brustkrebspatienten [137, 179]. Jedoch erfolgte auch in diesen Studien jeweils keine differenzielle Betrachtung der einzelnen molekularen Brustkrebs-Subtypen. Daher ist fraglich, ob dieser Zusammenhang ebenfalls für die basalen Karzinome gültig ist, die eine vergleichsweise geringe Methylierungsfrequenz aufweisen und zudem lediglich 10 - 15 % aller Brustkrebs-erkrankungen darstellen [267, 268]. Im Gegensatz zu einer in der Mehrzahl der Krebsentitäten

nachgewiesenen klinischen Relevanz der *DKK3*-Methylierung, konnte eine prognostische Bedeutung eines *DKK3*-Expressionsverlustes bislang nur für vereinzelte Tumorerkrankungen belegt werden. Während in Neuroblastomen, Zervix- und Magenkarzinomen eine niedrige *DKK3*-Expression mit einem kürzeren Patientenüberleben assoziiert ist [240, 245, 269, 270], stellt der Verlust von *DKK3* in Lungen, Pankreas- und Kolonkarzinomen offenbar keinen prognostisch-relevanten Faktor dar [244, 271, 272]. Da im Mammakarzinom bisher keine publizierten Daten zu einer putativen Bedeutung der *DKK3*-Expression für das Überleben von Brustkrebspatienten existieren, sollte die mögliche klinische Relevanz eines *DKK3*-Verlustes erstmalig im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine univariate Überlebensanalyse unter Verwendung eines großen *in silico*-Datensatzes des Online-Programmes *Kaplan-Meier Plotter* [189]. In Übereinstimmung mit der publizierten prognostischen Relevanz einer Hypermethylierung des *DKK3*-Gens [137, 179], konnte die *DKK3*-mRNA-Expression ebenfalls als potentieller prognostischer Faktor für das rezidivfreie Überleben von Brustkrebspatienten identifiziert werden. Im Hinblick auf ein differenzielles *DKK3*-Expressionsmuster in den distinkten Brusttumor-Subtypen wurde zusätzlich eine Subgruppenanalyse durchgeführt. Diese offenbarte einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen *DKK3*-Expression und einem günstigeren rezidivfreien Überleben der Patienten in allen Mammakarzinom-Subgruppen, mit Ausnahme von *HER2-enriched*-Brustkrebsfällen. Interessanterweise zeigte sich die stärkste Assoziation zwischen Prognose und *DKK3*-Expression innerhalb der Gruppe der basalen Tumoren, für die gleichfalls der stärkste *DKK3*-Expressionsverlust beobachtet wurde.

Ein Verlust von *DKK3* in nahezu allen humanen Tumorgeweben sowie die prognostische Relevanz einer *DKK3*-Hypermethylierung und/oder Reduktion der *DKK3*-Expression in zahlreichen Krebsentitäten suggerieren eine tumorsuppressive Wirkung von *DKK3*. In der Tat belegt eine Vielzahl an *in vitro*- und *in vivo*-Studien anti-tumorale Effekte für *DKK3*, die sich vor allem durch eine Inhibition des Tumorzellwachstums sowie einer Hemmung Progressions-assoziiierter Tumoreigenschaften, wie eine Reduktion des Migrations- und Invasionspotentials, manifestieren [130]. Die tumorsuppressive Wirkung von *DKK3* konnte neben zahlreichen weiteren Tumorentitäten ebenso im humanen Mammakarzinom nachgewiesen werden [130, 142, 192]. Allerdings untersuchte keine dieser Studien die möglicherweise divergente funktionelle Bedeutung eines *DKK3*-Expressionsverlustes für die Subtyp-spezifische Karzinogenese des Mammakarzinoms.

Eine im Rahmen der vorliegenden Dissertation nachgewiesene Reduktion der *DKK3*-Expression vornehmlich in basalen Mammakarzinomen wies indessen auf eine potentielle Subtyp-spezifische Bedeutung des *DKK3*-Verlustes in der Brusttumorgenese hin. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die prognostischen Daten der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse, welche die stärkste klinische Relevanz eines *DKK3*-Expressionsverlustes in Basal-

like Tumoren offenbarte. Auf Grund dessen galt es im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine umfassende Analyse der funktionellen Bedeutung eines DKK3-Verlustes für die Tumorgenese der distinkten Brusttumor-Subtypen durchzuführen. Da sich Mammakarzinom-Zelllinien über die Expression molekularer Marker jeweils den einzelnen intrinsischen Brustkrebs-Subgruppen zuordnen lassen, stellen sie geeignete *in vitro*-Tumormodellsysteme dar, um Subtyp-spezifische Tumorzelleigenschaften *in vitro* abzubilden [201, 202]. Zur Gewährleistung einer validen Aussage über eine mögliche Subtyp-spezifische Bedeutung eines DKK3-Verlustes, erfolgten die funktionellen *in vitro*-Tests anhand von jeweils zwei stabilen *DKK3*-Überexpressions-Zellkulturmodellen (*gain-of-function*) der beiden Subgruppen luminal und basal. Da bislang nur ein luminales Brusttumor-*DKK3*-Modell (MCF-7) existierte, wurden unter Verwendung der luminalen Zelllinie MDA-MB-453 sowie der beiden basalen Zelllinien MDA-MB-436 und MDA-MB-231 zunächst drei weitere stabile *DKK3*-Überexpressions-Zellkulturmodelle generiert. Nach Verifizierung einer jeweils erfolgreichen Reexpression des DKK3-Proteins mittels *Western Blot*-Analysen, sollte zunächst ein potentieller Subtyp-spezifischer Einfluss von DKK3 auf das Tumorzellwachstum untersucht werden.

Die frühe Tumorgenese ist insbesondere durch ein ungehemmtes Zellwachstum charakterisiert [205]. Dieses ist das Resultat einer deregulierten Zellzykluskontrolle und/oder dem Erwerb einer Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Signalen [53, 55]. In der vorliegenden Studie wies bereits eine positive Korrelation zwischen einer hohen DKK3-Expression und dem Auftreten kleinerer Brusttumoren (pT1) auf eine putative, funktionelle Involvierung von DKK3 in die Regulation des Zellwachstums hin. In der Tat ist eine DKK3-vermittelte Inhibition des Tumorzellwachstums bereits für eine Vielzahl an Tumorentitäten, einschließlich des Mammakarzinoms, belegt. So konnte unter anderem in Zellkulturmodellen für das Pankreas-, Lungen-, Zervix- sowie Mammakarzinom nach stabiler oder transienter Reexpression von DKK3 ein vermindertes Zellwachstum festgestellt werden [142, 192, 273-275]. In der Mehrzahl der genannten Studien wurde eine erhöhte Apoptoserate als Ursache der DKK3-vermittelten Wachstumshemmung identifiziert. Gleichermäßen konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein infolge ektopischer DKK3-Reexpression vermindertes Zellwachstum zusammen mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber pro-apoptotischen Reizen beobachtet werden. Interessanterweise zeigten sich die deutlichsten Effekte in den beiden basalen Zelllinien, während beide luminalen *DKK3*-Zellkulturmodelle jeweils kein signifikant verringertes Zellwachstum aufwiesen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der ebenfalls herausgestellten stärksten Reduktion der DKK3-Expression in basalen Karzinomen und suggeriert eine mögliche Bedeutung des DKK3-Verlustes für die Regulation des Tumorzellwachstums insbesondere von Mammakarzinomen des basalen Subtyps.

Ein vermindertes Zellwachstum in basalen *DKK3*-transfizierten Mammakarzinom-Zellen infolge einer erhöhten Apoptoserate, wie in dieser Arbeit gezeigt, ist im Einklang mit den

Ergebnissen einer Publikation von Xiang *et al.*. In dieser Studie konnte sowohl in MDA-MB-231 als auch in einer weiteren basalen Brusttumor-Zelllinie (BT-549) ein DKK3-induzierter Zellzyklus-Arrest sowie eine Abhängigkeit der Apoptoserate von der DKK3-Expression nachgewiesen werden [142]. Hingegen beobachteten Kawasaki und Kollegen in einer Studie ebenfalls in luminalen MCF-7-Zellen eine DKK3-vermittelte Steigerung der Apoptoserate [192]. Mechanistisch konnte in beiden genannten Studien eine erhöhte Aktivität von JNK (C-Jun-N-terminale Kinase) infolge einer DKK3-Reexpression detektiert werden, die möglicherweise ursächlich für die gesteigerte Sensitivität gegenüber pro-apoptotischen Reizen ist. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde eine über DKK3-vermittelte Aktivierung von JNK als Mechanismus der Apoptose-Induktion ebenfalls in anderen Tumorentitäten beschrieben, beispielsweise im Lungen- und Prostatakarzinom [141, 275]. In folgenden Arbeiten wäre es daher interessant zu untersuchen, ob den im Rahmen der vorliegenden Studie beobachteten Effekten gleichermaßen eine erhöhte Aktivität von JNK zu Grunde liegt.

Eine detaillierte, mikroskopische Untersuchung der Einzelkolonien aller vier Zellkulturmodelle offenbarte eine modifizierte Zellmorphologie der basalen, *DKK3*-transfizierten MDA-MB-436-Zellen, welche zudem einherging mit einer erhöhten Zell-Matrix-Adhäsion. Hingegen wiesen das zweite basale MDA-MB-231- sowie beide luminalen Brusttumor-Modelle infolge forcierter *DKK3*-Reexpression weder Veränderungen der Zellmorphologie noch der adhäsiven Eigenschaften auf. *DKK3*-vermittelte zellmorphologische Modifikationen wurden bereits mehrfach beschrieben, so beispielsweise in Osteosarkom-, in malignen Melanom- sowie ebenfalls in Mammakarzinom-Zelllinien [136, 142, 276]. Wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, zeigten *DKK3*-transfizierte Kolonien in diesen Studien ein epithelialeres Erscheinungsbild mit rundförmigen, in *Clustern* wachsenden Zellen im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Kontrollen, die durch einen mesenchymalen Phänotypen charakterisiert waren. Die zellmorphologischen Veränderungen gingen in den genannten Studien zudem jeweils mit einer Inhibition weiterer Progressions-assoziiierter Tumoreigenschaften einher, zu denen eine gesteigerte Zellmigration und Invasionsfähigkeit gehören. In Anbetracht einer modifizierten Zellmorphologie der basalen MDA-MB-436-*DKK3*-Klone, galt es daher im Rahmen der vorliegenden Dissertation auch die motilen Eigenschaften der Brusttumor-Modelle in Abhängigkeit von der *DKK3*-Expression zu untersuchen. Für das in dieser Arbeit genutzte luminale MCF-7-Zellkulturmodell konnte bereits in einer früheren Studie der AG Dahl gezeigt werden, dass *DKK3* keinen Einfluss auf die migratorischen Fähigkeiten dieser Zelllinie hat [170]. Vor dem Hintergrund eines eher epithelialen Phänotyps luminaler Zelllinien und einem in der Regel nur schwach ausgeprägten Migrations- und Invasionspotential [168, 206], war das Ausbleiben einer *DKK3*-vermittelten Migrationshemmung in MCF-7-Zellen jedoch gemäß den Erwartungen. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit die Effekte einer ektopischen *DKK3*-Reexpression auf das Migrationsverhalten lediglich

in den beiden basalen Brusttumor-Modellen analysiert werden, welche durch ein erhöhtes Migrations- und Invasionspotential charakterisiert sind [168, 206]. Entgegen den Erwartungen blieb jedoch ein Einfluss von DKK3 auf das Migrationsverhalten der zellmorphologisch veränderten, basalen MDA-MB-436-Zellen aus. Die *DKK3*-transfizierten MDA-MB-436-Einzelklone zeigten jeweils sehr heterogene migratorische Eigenschaften, die sich im Mittel allerdings nicht von denen der korrespondierenden Leervektor-Klone unterschieden. Hingegen konnte in den ebenfalls basalen MDA-MB-231-Zellen eine infolge forcierter *DKK3*-Reexpression signifikant verminderte Zellmigration herausgestellt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie von Xiang und Kollegen, die sowohl in MDA-MB-231-Zellen als auch einem weiteren basalen Mammakarzinom-Zellkulturmodell (BT-549) eine *DKK3*-vermittelte Migrationshemmung nachweisen konnten [142]. Xiang *et al.* beobachteten zudem eine infolge forcierter *DKK3*-Reexpression veränderte Expression epithelialer sowie mesenchymaler Marker und vermuteten daher, dass die beobachteten Effekte aus einer *DKK3*-bedingten Reversion der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) resultierten.

Die EMT stellt einen komplexen biologischen Vorgang dar, der in gesunden Zellen im Rahmen der Embryogenese sowie bei gewebsregenerativen und entzündlichen Prozessen auftritt [54, 208]. Epitheliale Zellen sind durch Polarität gekennzeichnet und interagieren über Transmembranproteine sowohl untereinander als auch mit der Basalmembran. Während der EMT verlieren diese Zellen ihre apikal-basale Polarität und durchlaufen eine Reorganisation des Zytoskelettes sowie der exprimierten Transmembranproteine. Dieser Vorgang resultiert in einer Transdifferenzierung der Zellen, die mit einer veränderten Zellmorphologie sowie der Modifikation zahlreicher biologischer Funktionen einhergeht. So gewinnen diese Zellen an migratorischem und invasivem Potential und zeigen zudem eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen. Nach vollständiger EMT hat sich aus der epithelialen eine mesenchymale Zelle gebildet, welche dazu befähigt ist, durch Auflösung der Zellkontakte den ursprünglich epithelialen Zellverband zu verlassen und die Basalmembran zu durchdringen [54, 208, 277]. Die Reversion dieses transienten Vorgangs wird als Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) bezeichnet [54].

Wie viele andere entwicklungsrelevante Zellprogramme wird ebenfalls die EMT während der Tumorgenese reaktiviert [208]. Den anfangs zunächst benignen Tumoren verleiht die EMT im Rahmen der Tumorprogression die Fähigkeit zur Infiltration des umgebenden Gewebes sowie dadurch bedingt zur Ausbildung von Fernmetastasen [207]. Tumorzellen durchlaufen in der Regel jedoch keine vollständige Transdifferenzierung, sondern präsentieren vielmehr verschiedene intermediäre EMT-Stadien. Daher wird im Kontext der Tumorprogression auch häufig von EMT-*like*-Phänotypen gesprochen [277, 278]. Im humanen Mammakarzinom ist die EMT vor allem mit Krebsstammzellen sowie dem aggressiven, basalen Subtyp assoziiert [210, 211, 279]. Im Einklang mit dieser Assoziation repräsentieren gleichfalls die mesenchymalen

Brustkrebszelllinien der Subgruppe Basal B, der auch die beiden basalen Zellkulturmodelle der vorliegenden Arbeit zugeordnet werden, einen Post-EMT-Phänotyp [168, 206, 280]. Dieser ist einerseits charakterisiert durch eine geringe Expression epithelialer Marker, welche häufig in die Ausbildung der *Tight- und Adherens-Junctions* involviert sind, sowie andererseits durch eine erhöhte Transkription mesenchymal-assoziiierter Gene, zu denen vor allem spezifische Transkriptionsfaktoren sowie Matrix-Metalloproteasen zählen [54, 207].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte in beiden basalen Zellkulturmodellen infolge forcierteter DKK3-Reexpression eine Inhibition Progressions-assoziiierter Tumoreigenschaften beobachtet werden. Dies lieferte einen ersten Hinweis auf eine mögliche DKK3-vermittelte Reversion EMT-assoziiierter Prozesse. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Ergebnisse einer *Real Time*-basierten Expressionsanalyse verschiedener etablierter epithelialer und mesenchymaler Marker. Zwar offenbarte sich die Expression des anerkannten mesenchymalen Markers Vimentin, einer wichtigen zytoskelettalen Komponente mesenchymaler Zellen, nach DKK3-Reexpression als unverändert, jedoch konnte sowohl in MDA-MB-436- als auch MDA-MB-231-Zellen ein DKK3-bedingter Expressionsverlust des Transkriptionsfaktors Snail 1 nachgewiesen werden. Snail 1 gehört zusammen mit Snail 2, Twist und ZEB1/2 zu den wichtigsten EMT-Regulatoren [54]. Snail 1 induziert zum einen die Expression mesenchymal-assoziiierter Gene, zu denen N-Cadherin, Fibronectin sowie die bereits genannten Transkriptionsfaktoren Twist und ZEB1/2 gehören, und supprimiert zum anderen die Transkription zahlreicher epithelialer Gene [54, 213-216]. In *DKK3*-Klonen konnte in Übereinstimmung mit einem Verlust von Snail 1 eine erhöhte Expression der drei epithelialen Marker *E-Cadherin*, *Claudin 1* und *Occludin*, welche jeweils eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten epithelialer Zellverbände spielen, herausgestellt werden. Während E-Cadherin die Hauptkomponente der epithelialen *Adherens-Junctions* darstellt, sind Claudin 1 und Occludin in die Ausbildung von *Tight-Junctions* involviert und über die Mitglieder der Zonula Occludens (ZO)-Familie mit dem Aktinzytoskelett verbunden [218-220]. Im Einklang konnte in *DKK3*-Klonen beider basaler Brusttumor-Modelle eine im Vergleich zu den korrespondierenden Leervektor-Klonen erhöhte mRNA-Expression eines Mitgliedes dieser Familie (*ZO-1*) detektiert werden.

Eine infolge ektopischer DKK3-Reexpression veränderte Transkription klassischer EMT-Marker in Mammakarzinomen, wie sie in der vorliegenden Arbeit sowie der oben genannten Studie von Xiang und Kollegen [142] beobachtet wurde, ist in Übereinstimmung mit den Daten weiterer Publikationen. So konnte ebenfalls in *DKK3*-transfizierten Zellkulturmodellen des Osteosarkoms, des malignen Melanoms sowie des Pankreaskarzinoms jeweils im Vergleich zu den zugehörigen Kontroll-Zellen sowohl eine erhöhte Expression von E-Cadherin als auch ein Verlust mesenchymaler Marker, vor allem Snail 1 und Vimentin, gemessen werden [276, 281, 282].

Die Daten der funktionellen Untersuchungen sowie der Expressionsanalyse etablierter EMT-Marker suggerieren eine partielle Reversion EMT-assoziiierter Prozesse in *DKK3*-Klonen. So präsentieren beide basalen Zelllinien nach Transfektion von *DKK3* sowohl dazugewonnene Merkmale eines epithelialen als auch noch vorhandene Eigenschaften eines mesenchymalen Phänotyps. Ein solches intermediäres EMT-Stadium wurde von Savagner als „metastabiler Phänotyp“ definiert [277, 283] und passt in das Konzept der mehrstufigen Tumorgenese. Laut diesem sind für die Ausprägung aller Charakteristika eines Karzinoms Modifikationen in einer Vielzahl tumorrelevanter Gene nötig [16, 205]. Eine Reduktion der *DKK3*-Expression würde demnach, neben dem Verlust weiterer Faktoren, zur Dedifferenzierung von Tumorzellen beitragen und die Ausprägung eines aggressiven Phänotyps fördern.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, ist die Durchführung weiterer funktioneller Studien sinnvoll. Neben der Analyse möglicher *DKK3*-vermittelter Effekte auf das Invasionspotential von Mammakarzinomzellen ist auch die Untersuchung der Auswirkung eines induzierten *DKK3*-Verlustes anhand von *loss-of-function*-Zellkultur-Modellen von Interesse. Anbieten würde sich für diese Versuche die luminal Zelllinie T47D, welche neben einer hohen *DKK3*-Expression zusätzlich eine geringe Transkription mesenchymaler Marker aufweist [168, 206]. Zudem sind die molekularen Mechanismen, die einer *DKK3*-vermittelten MET zu Grunde liegen, noch nicht vollständig entschlüsselt. Erste Hinweise liefert hier eine Studie von Li und Kollegen [193]. Offenbar stimuliert der Transkriptionsfaktor SOX2 die EMT über eine Aktivierung der WNT/ β -Catenin-Signaltransduktion, unter anderem durch die Transkriptionsregulation von *DKK3* und *DVL*. Dies ist im Einklang mit einer Akkumulation von β -Catenin im Nukleus mesenchymaler Zellen, sowie der Tatsache, dass die Aktivität essentieller EMT-Regulatoren der Snail- und ZEB-Familie unter anderem über den WNT/ β -Catenin-Signalweg gefördert wird [54, 207, 216, 284].

Schlussfolgerung

Schlussfolgernd demonstrieren die Daten der vorliegenden Studie erstmals eine mögliche Subtyp-spezifische Bedeutung eines *DKK3*-Verlustes im humanen Mammakarzinom. Ein Verlust der *DKK3*-Expression konnte vornehmlich in basalen Tumoren beobachtet werden und scheint in dieser Subgruppe, im Gegensatz zu Tumoren der übrigen Brustkrebs-Subtypen, nicht über eine Hypermethylierung der Promotorsequenz vermittelt zu sein. In Übereinstimmung mit den Expressionsdaten konnten *DKK3*-vermittelte, tumorsuppressive Effekte vornehmlich in basalen Mammakarzinomzellen beobachtet werden. Diese äußerten sich in einer Reduktion des Zellwachstums sowie der Inhibition Progressions-assoziiierter Tumorzelleigenschaften und deuteten auf eine mögliche Relevanz des *DKK3*-Verlustes insbesondere für die Tumorgenese des basalen Subtyps hin. Darüber hinaus suggerierten die funktionellen

Daten eine mögliche partielle MET in DKK3-transfizierten Brustkrebszellen. Gestützt wurde diese Hypothese durch eine gesteigerte Expression epithelialer Marker, wie E-Cadherin und Claudin 1, sowie einem Verlust des mesenchymalen Transkriptionsfaktors Snail 1 infolge forcierter DKK3-Reexpression. Weiterführende Studien werden benötigt, um die diesen Effekten zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu entschlüsseln und könnten gemeinsam mit den vorliegenden Daten dieser Studie dazu beitragen zielgerichtete Therapien für den schwer therapierbaren basalen Brustkrebs-Subtyp zu entwickeln.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung potentieller SFRP1-Mimetika für die Therapie des humanen Mammakarzinoms

Das humane Mammakarzinom stellt sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar [5, 6]. Zwar konnte dank kontinuierlich verbesserter Früherkennungs- und Therapiemöglichkeiten die Mortalitätsrate in den letzten Jahrzehnten gesenkt werden, jedoch versterben jährlich nach wie vor über 17.000 Frauen alleine in Deutschland an den Folgen einer Brustkrebserkrankung [6]. Während die Behandlung benigner Neoplasien für gewöhnlich erfolgreich verläuft, nehmen die Heilungschancen nach maligner Progression der Tumoren hingegen rapide ab [40]. Um einer Metastasierung vorzubeugen werden bei gegebener Indikation ergänzend zu einer lokalen Behandlung systemische Therapien angewendet [38, 39]. Häufig treten aber bereits zu Anfang oder im Laufe dieser Therapien Wirkstoff-Resistenzen auf. Daher ist die Entwicklung neuer Pharmazeutika ein fundamentaler Schwerpunkt der Brustkrebsforschung [46, 285].

Um Resistenzen gegen einzelne Chemotherapeutika zu umgehen, werden kontinuierlich neuartige Zytostatika entwickelt. Diese Therapieform ist jedoch infolge der unspezifischen Wirkung stets mit starken Nebenwirkungen verbunden. Aus diesem Grund richten sich die Bemühungen der Forschung zunehmend auf die Entwicklung weniger toxischer Alternativen. Diesbezüglich konnten in den letzten Jahrzehnten vor allem für die Behandlung luminaler und HER2-positiver Karzinome große Fortschritte erzielt werden [286]. So erfolgt heutzutage die Therapie Hormonrezeptor-positiver Tumoren mit Hilfe des Anti-Östrogens Tamoxifen sowie, je nach Menopausen-Status, verschiedenen Aromatase-Hemmern bzw. GnRh-Analoga. Für die Behandlung HER2-positiver Neoplasien stehen wiederum die Anti-HER2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab sowie der Tyrokinasehemmer Lapatinib zur Verfügung [38, 39]. Indessen existieren für die Therapie triple-negativer Karzinome zum jetzigen Zeitpunkt keine effektiven Alternativen zu einer Chemotherapie [34, 39, 46]. Folglich ist der Bedarf an neuen Substanzen zur Behandlung des humanen Mammakarzinoms, insbesondere für TNBC- sowie therapieresistente Neoplasien, groß.

Der Fokus der aktuellen onkologischen Arzneimittelforschung liegt vornehmlich auf der Entwicklung zielgerichteter Therapien. Diese adressieren spezifisch molekulare Charakteristika von Tumorzellen, die in gesunden Körperzellen nicht oder zumindest vermindert auftreten. So weisen beispielsweise bestimmte Signalwege in Neoplasien eine aberrante Aktivität auf. Im humanen Mammakarzinom sowie einigen weiteren Tumorentitäten zählt hierzu auch die WNT-Signaltransduktion, deren Deregulation mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert ist [287-290]. Ursächlich für diese Deregulation ist unter anderem ein Verlust seiner Antagonisten, beispielsweise DKK1, WIF-1 sowie mehrerer Vertreter der SFRP-Familie [108]. Daraus ergeben sich eine Vielzahl möglicher therapeutischer Ansätze für die Behandlung humaner Karzinome, so dass die Identifizierung geeigneter Substanzen für eine zielgerichtete Inhibition des WNT-Signalweges Grundlage zahlreicher Studien ist. So wurde die Wirkung von *c-MYC-antisense*-Oligonukleotiden, welche die Expression des WNT-Zielgens *c-MYC* hemmen [66-68], sowie die des Yttrium 90-markierten Antikörpers OTSA101, der gegen den Rezeptor *Frizzled10* gerichtet ist [291, 292], bereits im Rahmen klinischer Studien untersucht. Gleichermäßen konnten einige niedermolekulare Substanzen, die als Inhibitoren oder Aktivatoren des WNT-Signalweges fungieren, identifiziert werden. Exemplarisch ist der Inhibitor LGK-794 zu nennen, der die für die Prozessierung der WNT-Moleküle wichtige Acetyltransferase Porcupine inaktiviert und somit das WNT-Signal hemmt [293, 294].

Als WNT-Antagonist stellt SFRP1 einen putativen Tumorsuppressor dar. In der Tat kann ein Expressionsverlust von SFRP1 in zahlreichen Tumorentitäten, einschließlich dem Mammakarzinom, in einer hohen Prozentzahl der Tumoren beobachtet werden und geht zudem oftmals mit einer ungünstigen Patientenprognose einher [108, 160, 225, 295, 296]. Neben seiner Rolle als Inhibitor der WNT-Signalkaskade weist SFRP1 weitere anti-tumorale Eigenschaften auf. So interagiert SFRP1 ebenfalls mit RANKL, einem Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie, sowie der Metalloprotease ADAM10 und inhibiert auf diese Weise die Aktivität weiterer tumorrelevanter Signalwege, wie beispielsweise der Notch- oder MAPK-Signaltransduktion [110]. Eine erhöhte Expression von RANKL und ADAM10 ist jeweils mit einem verkürzten Gesamtüberleben von Brustkrebspatienten verknüpft [297-300]. Zusätzlich gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass SFRP1 möglicherweise als *Chemosensitizer* wirken könnte, insbesondere in Karzinomen des Subtyps TNBC [301, 302]. Die Wiederherstellung der SFRP1-Funktion würde daher vermutlich eine effektive Therapie SFRP1-defizienter Mammakarzinome darstellen und gegenüber dem Einsatz anderer Inhibitoren des WNT-Signalweges zusätzliche Vorteile bieten.

Für die therapeutische Reaktivierung der SFRP1-Funktion existieren verschiedene Optionen. So würde beispielsweise eine somatische Gentherapie die direkte Reexpression von SFRP1 ermöglichen. Die Entwicklung gentherapeutischer Behandlungsmethoden ist

jedoch noch in einem frühen Stadium und der Einsatz dieser Therapeutika bislang mit zahlreichen Risiken, beispielweise starken Immunreaktionen, verbunden [303, 304]. Da der Expressionsverlust von SFRP1 meist über eine Hypermethylierung des *SFRP1*-Gens vermittelt wird, wäre ebenso die Verwendung von Inhibitoren der DNA-Methyl-Transferasen (DNMTs) denkbar. Ein Vorteil dieser Behandlung wäre die zusätzliche Reaktivierung weiterer über Gen-Hypermethylierung inaktiver Tumorsuppressorgene. Für die Therapie akuter myeloischer Leukämie werden bereits die als DNMT-Inhibitoren fungierenden Zytostatika Decitabin und 5-Azacytidin angewendet [305, 306]. Ein Benefit für die Behandlung solider Tumoren wurde für diese DNMT-Inhibitoren hingegen bislang nicht nachgewiesen [108, 307]. Aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung können diese Therapeutika zudem starke Nebenwirkungen hervorrufen und durch die Aktivierung stillgelegter Onkogene kontraindiziert sein. Der Einsatz rekombinanten SFRP1-Proteins hat sich im Rahmen von *in vitro*-Versuchen als sehr wirksam erwiesen [301, 308]. Der Nutzen dieser Biopharmazeutika für die klinische Anwendung ist jedoch aufgrund ihrer geringen Serum-Halbwertszeit, ihrer schlechten oralen Bioverfügbarkeit sowie hoher Produktionskosten stark limitiert [309-311]. Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung spezifischer, niedermolekularer Substanzen (engl. *small molecules*), welche den WNT-Signalweg in gleicher Weise wie SFRP1 inhibieren, sogenannte SFRP1-Mimetika.

Um diesen Ansatz zu verfolgen, bestand ein Teilziel der vorliegenden Dissertation in der Identifizierung sowie funktionellen Charakterisierung putativer SFRP1-Mimetika. Für das in Kooperation mit dem *Lead Discovery Center* (LDC) in Dortmund durchgeführte Projekt sollte ein neuartiger, funktionell-basierter Ansatz zur Anwendung kommen. Im Gegensatz zu den meist Struktur-basierten *Screenings* bisheriger WNT-Inhibitor-Studien, die der gezielten Identifikation spezifischer Inhibitoren definierter Zielmoleküle auf Basis von Strukturanalysen dienten, [108], bot das hier angewendete Verfahren eines zellulären Primärscreens die Möglichkeit der gleichzeitigen Identifizierung sowie funktionellen Charakterisierung der gesuchten Wirkstoffmoleküle.

Eine aberrante Aktivität des kanonischen WNT-Signalweges in Tumorzellen resultiert über die verstärkte Expression der WNT-Zielgene, welche wie *c-MYC* oder *Cyclin D1* vorrangig die Zellproliferation fördern, in einem erhöhten Zellwachstum [101, 107]. In Übereinstimmung mit seiner Rolle als WNT-Antagonist wirkt SFRP1 wachstumshemmend, wie in mehreren *in vitro*- und *in vivo*-Modellen [231, 232, 234], einschließlich der im Rahmen dieses Projektes genutzten humanen BT-20-Mammakarzinom-Zelllinie [169], gezeigt werden konnte. Aufgrund der nachgewiesenen wachstumsinhibierenden Wirkung von SFRP1 wurde als Selektionsmarker des zellulären Primärscreens der potentiellen SFRP1-Mimetika ein differenzieller Einfluss der Testsubstanzen auf das Zellwachstum *SFRP1*-positiver sowie *SFRP1*-negativer BT-20-Zellen gewählt. Dies sollte die Identifizierung analog zu SFRP1 wirkender Substanzen

ermöglichen und diese von Molekülen mit anderweitig vermittelten Mechanismen der Wachstumsinhibition abgrenzen. So war im Falle einer SFRP1-analog wirkenden Substanz eine deutliche Wachstumsinhibition des *SFRP1*-defizienten Leervektor-Klons zu erwarten. Hingegen sollte die Applikation eines SFRP1-Mimetikums zum bereits im Überschuss vorliegenden SFRP1-Protein des SFRP1-reexprimierenden Klons in einem nur geringen zusätzlichen inhibitorischen Effekt resultieren und somit ein differenzielles Ansprechen sichtbar werden.

Basierend auf einer differenziellen Wachstumsinhibition im BT-20-*SFRP1*-Brusttumor-Modell, konnten mit Hilfe des im LDC durchgeführten zellulären Primärscreens und unter Verwendung einer ca. 190.000 Moleküle umfassenden Substanzbibliothek, 430 Hits identifiziert werden, deren Verifizierung nachfolgend über einen WNT-Reporter-Gen-Assay erfolgte. Auf Grundlage der Testergebnisse wurden zwölf vielversprechende, potentielle SFRP1-Mimetika ausgewählt, deren weitere Validierung sowie funktionelle Charakterisierung anschließend am Institut für Pathologie des UKA im Rahmen weiterführender Experimente durchgeführt wurden.

Zunächst sollte die im BT-20-Zellkulturmodell beobachtete differenzielle Wachstumsinhibition der zwölf potentiellen SFRP1-Mimetika anhand eines weiteren, unabhängigen Zellwachstums-Analyseverfahrens sowie der Verwendung zweier zusätzlicher Mammakarzinom-Zelllinien validiert werden. In Übereinstimmung mit den Daten des LDCs offenbarte auch die im Zuge dieser Dissertation durchgeführte Zellwachstums-Analyse ein jeweils deutlich gehemmtes Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons nach Inkubation mit den zwölf Testsubstanzen. Die acht putativen SFRP1-Mimetika mit der stärksten Wachstumsinhibition im Leervektor-Modell wurden zusätzlich auf eine differenzielle Wachstumshemmung des BT-20-Leervektor- und -*SFRP1*-Klons hin untersucht, die für sieben der Testsubstanzen bestätigt werden konnte. Gleichmaßen zeigte die *SFRP1*-defiziente Mammakarzinom-Zelllinie HCC-1806 infolge einer Behandlung mit den potentiellen SFRP1-Mimetika eine deutliche Reduktion des Zellwachstums während *SFRP1*-exprimierende HCC-1143-Zellen eine größere Resistenz gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung der Testsubstanzen aufwiesen. Dieses differenzielle Ansprechen *SFRP1*-negativer und *SFRP1*-positiver Brustkrebszellen auf eine Inkubation mit den putativen SFRP1-Mimetika deutet auf eine analog zu SFRP1 vermittelte Wachstumsinhibition der Testsubstanzen hin.

Die Ergebnisse unterstützend, konnte unter Gabe der als Referenz dienenden, bereits publizierten WNT-Signalweg-Inhibitoren ICG-001 [114], WIKI4 [113] und iCRT 14 [115] wie erwartet nur eine geringfügige, differenzielle Wachstumshemmung zwischen BT-20-Leervektor- und -*SFRP1*-Modell beobachtet werden. Im Gegensatz zu SFRP1-analog wirkenden Molekülen inhibieren diese Substanzen das WNT-Signal über einen divergenten

Mechanismus, so dass sowohl im Leervektor- als auch im *SFRP1*-Klon wachstumshemmende Effekte erzielt werden konnten.

Basierend auf den Ergebnissen der Zellwachstums-Analyse wurden die vier putativen SFRP1-Mimetika 064, 366, 848 und 994 für die nachfolgende Charakterisierung ausgewählt. Die Dosis-Wirkungsstudien dieser Testsubstanzen ergaben im BT-20-Leervektor-Modell einen jeweils deutlich geringeren IC_{50} -Wert (1,5 – 8,5 μ M) im Vergleich mit dem bereits publizierten und käuflich erworbenen Referenz-Inhibitor iCRT 14 ($IC_{50} > 20 \mu$ M). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit einer vorangegangenen Brustkrebs-Studie, in der sich iCRT 14 ebenfalls als wenig effektiv im Hinblick auf eine Zellproliferations-Hemmung der humanen Mammakarzinom-Zelllinie BT-549 erwies und unter Verwendung des *xCELLigence*-Systems einen IC_{50} -Wert von deutlich über 50 μ M erzielte [227]. Im Gegensatz dazu resultierte eine Behandlung mit dem WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001 in Zelllinien des Pankreas- sowie Kolonkarzinoms in einer starken Wachstumsinhibition (IC_{50} -Werte im MTT-Zellviabilitäts-Test zwischen 1 und 6 μ M) [114, 312]. In Übereinstimmung mit diesen Studien offenbarte ICG-001 im Rahmen der vorliegenden Dissertation einen ebenfalls starken inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum der BT-20-Brusttumorzellen mit einem jeweils niedrigeren IC_{50} -Wert ($< 1 \mu$ M) als die vier ausgewählten putativen SFRP1-Mimetika. Bei Berücksichtigung einer potentiellen Wirkungssteigerung durch eine nachfolgende medizinalchemische Optimierung [313], stellen die vier ausgewählten Testsubstanzen jedoch ebenfalls putativ potente Wachstumsinhibitoren *SFRP1*-defizienter Tumorzellen dar.

Mit dem Ziel der Validierung einer in der Zellwachstums-Analyse suggerierten SFRP1-analogen Wirkung der vier ausgewählten Testsubstanzen, sollte ihr jeweiliger Einfluss auf die Expression von Marker-Genen der SFRP1-Wirkung untersucht werden. Zwecks Identifizierung eines Marker-Panels erfolgte eine *Microarray*-Analyse der Genexpressions-Profile von jeweils drei Leervektor- sowie drei *SFRP1*-Klonen der Brustkrebszelllinie BT-20. Von den insgesamt 56 in Leervektor- und *SFRP1*-Klonen differenziell exprimierten Genen wurden neun mit Hilfe einer *Real Time*-PCR-basierten Expressionsanalyse auf ihre Eignung für die nachfolgende Validierung der putativen SFRP1-Mimetika hin untersucht. Jedoch stellte sich hierbei lediglich der Expressionsverlust des *Protocadherins 10* (*PCDH10*) als potentieller Biomarker einer SFRP1-Wirkung heraus.

PCDH10 fungiert als Cadherin-verwandter, neuronaler Transmembranrezeptor. Zahlreiche Studien belegen eine aberrante Hypermethylierung des *PCDH10*-Promotors in einer Vielzahl humaner Tumoren, einschließlich dem Mammakarzinom [314, 315]. In Blasen- sowie Magenkarzinomen ist diese Hypermethylierung des *PCDH10*-Gens zudem mit einer ungünstigen Patientenprognose assoziiert [316, 317]. Diese Daten implizieren eine putativ tumorsuppressive Wirkung des Proteins. Darüber hinaus konnte in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN45 infolge forcierter *PCDH10*-Reexpression sowohl ein verringertes Zellwachstum als

auch eine reduzierte Zellinvasion nachgewiesen werden [316]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in unbehandelten Kolonkarzinomen jedoch eine positive Korrelation zwischen einer Promotor-Hypermethylierung und einem verlängerten rezidivfreien sowie Gesamtüberleben [318]. Zudem wiesen Echizen und Kollegen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine möglicherweise onkogene Funktion für PCDH10 im Glioblastom nach [319].

Ungeachtet einer noch nicht abschließend geklärten Bedeutung von PCDH10 in der humanen Tumorgenese, konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine negative Korrelation zwischen der *PCDH10*- und *SFRP1*-mRNA-Expression in BT-20-Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden. So wurde in allen untersuchten Leervektor-Klonen eine hohe *PCDH10*-Expression detektiert, während diese in den korrespondierenden *SFRP1*-Klonen jeweils signifikant reduziert vorlag. Im Einklang mit diesem Ergebnis resultierte ebenfalls die Inkubation des BT-20-Leervektor-Klons mit den vier putativen SFRP1-Mimetika sowohl nach 24 als auch 48 Stunden in einer konzentrationsabhängigen Reduktion der *PCDH10*-mRNA-Expression. Dieses Ergebnis unterstützt die auf Basis einer differenziellen Wachstumsinhibition SFRP1-negativer und SFRP1-positiver Mammakarzinomzellen aufgestellte Hypothese einer SFRP1-analogen Wirkung der Testsubstanzen. Um eine valide Aussage bezüglich dieser Hypothese treffen zu können, sollte es jedoch das Ziel weiterführender Studien sein, zusätzliche Marker-Gene zu identifizieren und den Einfluss der potentiellen SFRP1-Mimetika auf eine umfassende SFRP1-spezifische Genexpressions-Signatur zu untersuchen.

Im Hinblick auf eine Nutzung der potentiellen SFRP1-Mimetika als Therapeutika des humanen Mammakarzinoms wurden die vier Testsubstanzen ebenfalls bezüglich ihres Einflusses auf weitere elementare Tumorzelleigenschaften, wie ein erhöhtes Koloniewachstum, eine gesteigerte Zellmigration sowie eine verminderte Apoptoserate, untersucht.

Für den Prozess des Koloniewachstums sind neben dem Zellwachstum ebenfalls migratorische Zelleigenschaften sowie das Potential durch Einzelzellen Kolonien auszubilden von Bedeutung. Daher stellt die Fähigkeit einer Zelle zur Koloniebildung einen Indikator für ihre Aggressivität dar [320]. In zahlreichen Tumorentitäten reduziert SFRP1 nachweislich das Potential zur Koloniebildung, so unter anderem im Nieren-, Lungen- und Mammakarzinom [231, 232, 321]. Gleichmaßen konnte in einer Studie von Huth *et al.* eine verminderte Koloniezahl infolge forcierter SFRP1-Reexpression im BT-20-Brustkrebs-Modell beobachtet werden [169]. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis resultierte die Inkubation mit allen vier im Rahmen dieser Dissertation untersuchten potentiellen SFRP1-Mimetika ebenfalls jeweils in einer signifikanten Reduktion des Koloniewachstums. Dabei zeigten die Testsubstanzen 064 und 994 jeweils einen vergleichbaren Einfluss auf die Koloniezahl wie der Referenzinhibitor ICG-001. Ein stark hemmender Einfluss dieses WNT-Signalweg-Inhibitors auf das Koloniewachstum leukämischer Zelllinien wurde bereits in mehreren Studien belegt [322, 323].

Eine erhöhte Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Reizen stellt ein fundamentales Charakteristikum von Tumorzellen dar [53, 55]. Gefördert wird diese in zahlreichen Tumor-entitäten durch eine erhöhte Expression anti-apoptotisch wirkender WNT-Zielgene wie *Survivin* [112, 324]. Übereinstimmend mit einer über den WNT-Signalweg vermittelten Apoptoseresistenz zeigten *in vitro*-Studien im Pankreas- und Mammakarzinom sowie dem multiplen Myelom eine Steigerung der Apoptoserate nach Inkubation mit dem WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001 [312, 325, 326]. Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung ebenfalls für das BT-20-Zellkulturmodell bestätigt werden. Darüber hinaus ist eine SFRP1-vermittelte Sensitivierung gegenüber pro-apoptotischen Reizen *in vitro* in Modellen des hepatozellulären, Nieren- und Mammakarzinoms, einschließlich der Brustkrebszelllinie BT-20, bereits belegt [169, 231, 327]. Im Rahmen dieser Dissertation offenbarten lediglich die beiden potentiellen SFRP1-Mimetika 366 und 994 einen Apoptose-fördernden Effekt auf den BT-20-Leervektor-Klon. Testsubstanz 848 zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Apoptoserate des BT-20-Leervektor-Klons während Wirkstoffmolekül 064 sogar anti-apoptotisch wirkte. Allerdings konnte sowohl für das putative SFRP1-Mimetikum 064 als auch Testsubstanz 848 ein starker Einfluss auf das Zellwachstum, der Nettobilanz aus Zellproliferation und Apoptose, nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen deuten an, dass diese beiden Substanzen im BT-20-Zellkulturmodell vornehmlich proliferationshemmend wirken.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines 2D-Wundheilungstests der Einfluss der vier putativen SFRP1-Mimetika auf die motilen Eigenschaften des BT-20-Leervektor-Klons untersucht. Eine gesteigerte Zellmigration ist fundamental für das Invasions- und Metastasierungspotential maligner Krebszellen [205]. Über die Expression von Zielgenen wie MET und CD44 fördert der WNT-Signalweg sowohl die Invasion als auch die Zellmotilität [112, 324]. In Übereinstimmung mit einer migrationsfördernden Funktion des WNT-Signalweges konnte in Zellen des Pankreaskarzinoms sowie des humanen Bronchien-Epithels ein verlangsamter Wundschluss infolge einer Behandlung mit dem WNT-Signalweg-Inhibitor ICG-001 beobachtet werden [238, 239]. Gleichermäßen zeigte ICG-001 auch im Zuge dieser Dissertation einen negativen Einfluss auf die motilen Eigenschaften der BT-20-Zellen. Neben einer Beeinflussung der Zellmigration über die Regulation des WNT-Signalweges beeinflusst SFRP1 die motilen Eigenschaften von Zellen womöglich ebenfalls über die Inhibition von Metalloproteasen wie ADAM10. Eine SFRP1-vermittelte Reduktion der motilen Eigenschaften humaner MDA-MB-231-Brustkrebszellen wurde in mehreren *in vitro*-Mammakarzinom-Studien nachgewiesen [234-236]. Jedoch konnte im BT-20-Zellkulturmodell kein verändertes Migrationsverhalten infolge ektopischer SFRP1-Reexpression beobachtet werden [169]. Ebenso resultierte die Inkubation des BT-20-Leervektor-Klons mit den beiden putativen SFRP1-Mimetika 366 und 848 im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls in einer

unveränderten Zellmigration. Die Applikation der beiden Testsubstanzen 064 und 994 führte hingegen jeweils zu einem migrationshemmenden Effekt.

Zusammengefasst deuten die funktionellen Daten darauf hin, dass die vier untersuchten, potentiellen SFRP1-Mimetika neben gemeinsamen SFRP1-Charakteristika auch jeweils zusätzliche spezifische Eigenschaften aufweisen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die putativen SFRP1-Mimetika möglicherweise nicht dazu in der Lage sind, das komplexe Wirkungsprofil eines Proteins in seiner Gesamtheit abzubilden. So besitzt SFRP1 zwei unterschiedliche funktionelle Domänen und interagiert über diese mit zahlreichen Bindungspartnern, unter anderem mehreren WNT-Molekülen, *Frizzled*-Rezeptoren, RANKL sowie ADAM10 [110]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte Testsubstanz 366 die größte Übereinstimmung mit dem Wirkungsprofil von SFRP1 im BT-20-Bruttumor-Modell, die sich in einem Verlust der PCDH10-Expression, einem verringerten Zell- und Koloniewachstum, einer erhöhten Apoptoserate sowie in einer unveränderten Zellmigration äußerte. Unter Berücksichtigung des zusätzlichen Benefits einer Inhibition Progressions-assoziiierter Tumorzelleigenschaften, wie einer erhöhten Zellmigration, stellen die beiden putativen SFRP1-Mimetika 064 und 994 jedoch ebenfalls vielversprechende Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie humaner Mammakarzinome dar.

Das vordringliche Ziel weiterführender Studien sollte die Entschlüsselung des jeweiligen Wirkmechanismus der einzelnen Testsubstanzen sein. Hierzu sollte zunächst die im Zuge dieser Arbeit angestrebte Etablierung einer validen, SFRP1-spezifischen Genexpressions-Signatur weiterverfolgt werden. Der Einsatz eines Marker-Panels, bestehend aus dem hier identifizierten SFRP1-assoziierten Gen *PCDH10* sowie weiteren geeigneten Marker-Genen, würde die weiterführende Charakterisierung der SFRP1-Mimetika im Rahmen einer Expressionsanalyse ermöglichen.

Des Weiteren ist der Gebrauch von Methoden der chemischen Proteomik zielführend, um eine eindeutige Identifizierung der jeweiligen Zielstrukturen der Testsubstanzen zu ermöglichen. Bei diesem Verfahren werden die Bindungspartner der putativen SFRP1-Mimetika zunächst über eine Affinitäts-Chromatographie isoliert und können anschließend mittels verschiedener Detektionsmethoden, wie einer Kombination aus 2D-Gelelektrophorese, Massenspektrometrie und bioinformatischer Analyse, identifiziert werden [328, 329].

Schlussfolgerung

Das im Zuge einer Kooperation mit dem LDC in Dortmund durchgeführte Projekt diene der Identifizierung sowie der funktionellen Charakterisierung potentieller SFRP1-Mimetika, die für die Entwicklung zielgerichteter Therapien SFRP1-defizienter Brusttumoren genutzt werden könnten. Auf Basis einer differenziellen Wachstumsinhibition *SFRP1*-negativer und *SFRP1*-positiver Mammakarzinomzellen sowie einem Expressionsverlust des Marker-Gens *PCDH10*,

konnte die vier Wirkstoffmoleküle 064, 366, 848 und 994 im Rahmen der vorliegenden Arbeit als mögliche SFRP1-Mimetika identifiziert werden. Die funktionelle Charakterisierung offenbarte zudem tumorsuppressive Effekte infolge einer Inkubation mit den Testsubstanzen, die sich in einem verminderten Koloniewachstum, einer erhöhten Apoptoserate sowie einer reduzierten Zellmigration äußerten. Die jeweiligen Wirkungsprofile der putativen SFRP1-Mimetika variierten jedoch, so dass weiterführende Studien benötigt werden, um die jeweiligen Wirkmechanismus und Zielstrukturen der einzelnen Testsubstanzen zu entschlüsseln.

5. Literaturverzeichnis

1. Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH, Peiper U: *Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. 4. Auflage. Berlin: Springer Verlag: 1984.
2. Lüllmann-Rauch R: *Taschenlehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag: 2006.
3. Mannello F, Tonti GA, Canestrari F: *Nutrients and nipple aspirate fluid composition: the breast microenvironment regulates protein expression and cancer aetiology*. Genes Nutr 2008, **3**(2): p. 77-85.
4. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG: *An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions*. J Natl Cancer Inst 1975, **55**(2): p. 231-73.
5. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin 2015, **65**(2): p. 87-108.
6. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C: *Krebs in Deutschland 2011/2012 -*. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2015)
7. Cao Y, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci EL: *Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies*. BMJ 2015, **351**: p. h4238.
8. Neuhouwer ML, Aragaki AK, Prentice RL, Manson JE, Chlebowski R, Carty CL, Ochs-Balcom HM, Thomson CA, Caan BJ, Tinker LF, Urrutia RP, Knudtson J, Anderson GL: *Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials*. JAMA Oncol 2015, **1**(5): p. 611-21.
9. Catsburg C, Miller AB, Rohan TE: *Active cigarette smoking and risk of breast cancer*. Int J Cancer 2015, **136**(9): p. 2204-9.
10. Collins JA, Blake JM, Crosignani PG: *Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment*. Hum Reprod Update 2005, **11**(6): p. 545-60.
11. Magnusson C, Baron JA, Correia N, Bergstrom R, Adami HO, Persson I: *Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy*. Int J Cancer 1999, **81**(3): p. 339-44.
12. Hulka BS, Moorman PG: *Breast cancer: hormones and other risk factors*. Maturitas 2001, **38**(1): p. 103-13; discussion 113-6.
13. Zhu H, Lei X, Feng J, Wang Y: *Oral contraceptive use and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies*. Eur J Contracept Reprod Health Care 2012, **17**(6): p. 402-14.
14. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G: *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature 1995, **378**(6559): p. 789-92.

15. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al.: *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science 1994, **266**(5182): p. 66-71.
16. Wagener C, Müller O: *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag: 2010.
17. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS: *Histological types of breast cancer: how special are they?* Mol Oncol 2010, **4**(3): p. 192-208.
18. Sotiriou C, Pusztai L: *Gene-expression signatures in breast cancer*. N Engl J Med 2009, **360**(8): p. 790-800.
19. Margraf J: *Basics - Spezielle Pathologie*. 1. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag: 2009.
20. Russo J, Yang X, Hu YF, Bove BA, Huang Y, Silva ID, Tahin Q, Wu Y, Higgy N, Zekri A, Russo IH: *Biological and molecular basis of human breast cancer*. Front Biosci 1998, **3**: p. D944-60.
21. Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B: *The basic pathology of human breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2000, **5**(2): p. 139-63.
22. Elston CW, Ellis IO: *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology 1991, **19**(5): p. 403-10.
23. Sobin LH, Fleming ID: *TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997)*. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. Cancer 1997, **80**(9): p. 1803-4.
24. Carter CL, Allen C, Henson DE: *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer 1989, **63**(1): p. 181-7.
25. Cianfrocca M, Goldstein LJ: *Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer*. Oncologist 2004, **9**(6): p. 606-16.
26. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature 2000, **406**(6797): p. 747-52.
27. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL: *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001, **98**(19): p. 10869-74.
28. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D: *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, **100**(14): p. 8418-23.
29. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO: *Ki67 index, HER2 status, and*

- prognosis of patients with luminal B breast cancer.* J Natl Cancer Inst 2009, **101**(10): p. 736-50.
30. Cheang MC, Voduc KD, Tu D, Jiang S, Leung S, Chia SK, Shepherd LE, Levine MN, Pritchard KI, Davies S, Stijleman IJ, Davis C, Ebbert MT, Parker JS, Ellis MJ, Bernard PS, Perou CM, Nielsen TO: *Responsiveness of intrinsic subtypes to adjuvant anthracycline substitution in the NCIC.CTG MA.5 randomized trial.* Clin Cancer Res 2012, **18**(8): p. 2402-12.
 31. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS: *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.* J Clin Oncol 2009, **27**(8): p. 1160-7.
 32. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM: *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors.* Genome Biol 2007, **8**(5): p. R76.
 33. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.* Breast Cancer Res 2010, **12**(5): p. R68.
 34. Perou CM: *Molecular stratification of triple-negative breast cancers.* Oncologist 2011, **16**: p. 61-70.
 35. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS: *Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis.* Lancet Oncol 2010, **11**(4): p. 339-49.
 36. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, Panel m: *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.* Ann Oncol 2011, **22**(8): p. 1736-47.
 37. Guiu S, Michiels S, Andre F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessey BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner N, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, Reis-Filho JS: *Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement.* Ann Oncol 2012, **23**(12): p. 2997-3006.
 38. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe e.V.: *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms - Leitlinienprogramm Onkologie.* Berlin: Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (2012)
 39. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie: *Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs - Empfehlungen der AGO Kommission Mamma.* München: W. Zuckschwerdt Verlag (2016)
 40. Holleczeck B, Arndt V, Stegmaier C, Brenner H: *Trends in breast cancer survival in Germany from 1976 to 2008 - a period analysis by age and stage.* Cancer Epidemiol 2011, **35**(5): p. 399-406.

41. Collaborative GEBCT, Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R: *Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials*. Lancet 2011, **378**(9804): p. 1707-16.
42. Collaborative GEBCT, McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, Gray R, Mannu G, Peto R, Whelan T, Wang Y, Wang Z, Darby S: *Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials*. Lancet 2014, **383**(9935): p. 2127-35.
43. Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H, Colleoni M, Denkert C, Eiermann W, Jackesz R, Makris A, Miller W, Pierga JY, Semiglazov V, Schneeweiss A, Souchon R, Stearns V, Untch M, Loibl S: *Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006*. Ann Oncol 2007, **18**(12): p. 1927-34.
44. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, Senn HJ: *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*. Ann Oncol 2013, **24**(9): p. 2206-23.
45. Hudis CA: *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med 2007, **357**(1): p. 39-51.
46. Mohamed A, Krajewski K, Cakar B, Ma CX: *Targeted therapy for breast cancer*. Am J Pathol 2013, **183**(4): p. 1096-112.
47. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS: *Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer*. J Clin Oncol 2005, **23**(4): p. 792-9.
48. Hapani S, Chu D, Wu S: *Risk of gastrointestinal perforation in patients with cancer treated with bevacizumab: a meta-analysis*. Lancet Oncol 2009, **10**(6): p. 559-68.
49. Ranpura V, Hapani S, Wu S: *Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*. Jama 2011, **305**(5): p. 487-94.
50. FDA (U.S. Food and Drug Administration): *FDA Commissioner Removes Breast Cancer Indication from Avastin Label*. (2011) Abgerufen am: 25.08.2016. Abrufbar auf: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/UCM279485>.
51. Maric G, Rose AA, Annis MG, Siegel PM: *Glycoprotein non-metastatic b (GPNMB): A metastatic mediator and emerging therapeutic target in cancer*. Onco Targets Ther 2013, **6**: p. 839-52.
52. Yardley DA, Weaver R, Melisko ME, Saleh MN, Arena FP, Forero A, Cigler T, Stopeck A, Citrin D, Oliff I, Bechhold R, Loutfi R, Garcia AA, Cruickshank S, Crowley E, Green J, Hawthorne T, Yellin MJ, Davis TA, Vahdat LT: *EMERGE: A Randomized Phase II Study of the Antibody-Drug Conjugate Glembatumumab Vedotin in Advanced Glycoprotein NMB-Expressing Breast Cancer*. J Clin Oncol 2015, **33**(14): p. 1609-19.
53. Hanahan D, Weinberg RA: *The hallmarks of cancer*. Cell 2000, **100**(1): p. 57-70.

54. Lamouille S, Xu J, Derynck R: *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol 2014, **15**(3): p. 178-96.
55. Hanahan D, Weinberg RA: *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell 2011, **144**(5): p. 646-74.
56. Nowell PC: *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science 1976, **194**(4260): p. 23-8.
57. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature 2004, **432**(7015): p. 396-401.
58. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, **100**(7): p. 3983-8.
59. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B: *The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers*. Science 2007, **318**(5853): p. 1108-13.
60. Osborne C, Wilson P, Tripathy D: *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. Oncologist 2004, **9**(4): p. 361-77.
61. Land H, Parada LF, Weinberg RA: *Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis*. Science 1983, **222**(4625): p. 771-8.
62. Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA: *p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity*. Mol Cell Biol 1986, **6**(5): p. 1729-40.
63. Pelengaris S, Khan M, Evan G: *c-MYC: more than just a matter of life and death*. Nat Rev Cancer 2002, **2**(10): p. 764-76.
64. Hynes NE, Stoelzle T: *Key signalling nodes in mammary gland development and cancer: Myc*. Breast Cancer Res 2009, **11**(5): p. 210.
65. Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD: *Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis*. World J Gastroenterol 2004, **10**(23): p. 3441-54.
66. Watson PH, Pon RT, Shiu RP: *Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer*. Cancer Res 1991, **51**(15): p. 3996-4000.
67. Tangudu NK, Verma VK, Clemons TD, Beevi SS, Hay T, Mahidhara G, Raja M, Nair RA, Alexander LE, Patel AB, Jose J, Smith NM, Zdyrko B, Bourdoncle A, Luzinov I, Iyer KS, Clarke AR, Dinesh Kumar L: *RNA Interference Using c-Myc-Conjugated Nanoparticles Suppresses Breast and Colorectal Cancer Models*. Mol Cancer Ther 2015, **14**(5): p. 1259-69.

68. Biroccio A, Leonetti C, Zupi G: *The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments*. Oncogene 2003, **22**(42): p. 6579-88.
69. Karakas B, Bachman KE, Park BH: *Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers*. Br J Cancer 2006, **94**(4): p. 455-9.
70. Hortobagyi GN: *Everolimus plus exemestane for the treatment of advanced breast cancer: a review of subanalyses from BOLERO-2*. Neoplasia 2015, **17**(3): p. 279-88.
71. Knudson AG, Jr.: *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A 1971, **68**(4): p. 820-3.
72. Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, Weinberg RA: *Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein*. Proc Natl Acad Sci U S A 1987, **84**(24): p. 9059-63.
73. Brady CA, Attardi LD: *p53 at a glance*. J Cell Sci 2010, **123**(Pt 15): p. 2527-32.
74. Hainaut P, Hollstein M: *p53 and human cancer: the first ten thousand mutations*. Adv Cancer Res 2000, **77**: p. 81-137.
75. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bieche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Borresen-Dale AL: *The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer*. Clin Cancer Res 2006, **12**(4): p. 1157-67.
76. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA: *Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype*. Cancer Res 2003, **63**(20): p. 6643-50.
77. Lane DP, Cheek CF, Lain S: *p53-based cancer therapy*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010, **2**(9): p. a001222.
78. Hong B, van den Heuvel AP, Prabhu VV, Zhang S, El-Deiry WS: *Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities*. Curr Drug Targets 2014, **15**(1): p. 80-9.
79. Guo J, Xin H: *Chinese gene therapy. Splicing out the West?* Science 2006, **314**(5803): p. 1232-5.
80. Peng Z: *Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers*. Hum Gene Ther 2005, **16**(9): p. 1016-27.
81. Friedenson B: *BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian*. MedGenMed 2005, **7**(2): p. 60.
82. Paul A, Paul S: *The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers*. Front Biosci (Landmark Ed) 2014, **19**: p. 605-18.
83. Livraghi L, Garber JE: *PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects*. BMC Med 2015, **13**: p. 188.

84. Parkes EE, Kennedy RD: *Clinical Application of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in High-Grade Serous Ovarian Cancer*. *Oncologist* 2016, **21**(5): p. 586-93.
85. Esteller M: *Epigenetics in cancer*. *N Engl J Med* 2008, **358**(11): p. 1148-59.
86. Lo PK, Sukumar S: *Epigenomics and breast cancer*. *Pharmacogenomics* 2008, **9**(12): p. 1879-902.
87. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B: *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. *Hum Genet* 1989, **83**(2): p. 155-8.
88. Klarmann GJ, Decker A, Farrar WL: *Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer*. *Epigenetics* 2008, **3**(2): p. 59-63.
89. Holliday R: *The inheritance of epigenetic defects*. *Science* 1987, **238**(4824): p. 163-70.
90. Knippers R: *Molekulare Genetik*. 8. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag: 2001.
91. Portela A, Esteller M: *Epigenetic modifications and human disease*. *Nat Biotechnol* 2010, **28**(10): p. 1057-68.
92. Jones PA, Baylin SB: *The epigenomics of cancer*. *Cell* 2007, **128**(4): p. 683-92.
93. Veeck J, Esteller M: *Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010, **15**(1): p. 5-17.
94. Weichenhan D, Plass C: *The evolving epigenome*. *Hum Mol Genet* 2013, **22**(R1): p. R1-6.
95. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA: *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. *Nature* 2004, **429**(6990): p. 457-63.
96. Brenner C, Fuks F: *DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **301**: p. 45-66.
97. Takai D, Jones PA: *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(6): p. 3740-5.
98. Heyn H, Vidal E, Ferreira HJ, Vizoso M, Sayols S, Gomez A, Moran S, Boque-Sastre R, Guil S, Martinez-Cardus A, Lin CY, Royo R, Sanchez-Mut JV, Martinez R, Gut M, Torrents D, Orozco M, Gut I, Young RA, Esteller M: *Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer*. *Genome Biol* 2016, **17**: p. 11.
99. Bird A: *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. *Genes Dev* 2002, **16**(1): p. 6-21.
100. Aran D, Sabato S, Hellman A: *DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes*. *Genome Biol* 2013, **14**(3): p. R21.
101. Logan CY, Nusse R: *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**: p. 781-810.
102. Klaus A, Birchmeier W: *Wnt signalling and its impact on development and cancer*. *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(5): p. 387-98.

103. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A: *WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies*. Nat Rev Genet 2004, **5**(9): p. 691-701.
104. Chien AJ, Conrad WH, Moon RT: *A Wnt survival guide: from flies to human disease*. J Invest Dermatol 2009, **129**(7): p. 1614-27.
105. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R: *Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors*. Sci Signal 2008, **1**(35): p. re9.
106. Baron R, Kneissel M: *WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments*. Nat Med 2013, **19**(2): p. 179-92.
107. Clevers H: *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell 2006, **127**(3): p. 469-80.
108. Goss KH, Kahn M: *Targeting the Wnt Pathway in Cancer*, ed. K. Goss. New York: Springer Verlag: 2011.
109. Kawano Y, Kypta R: *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway*. J Cell Sci 2003, **116**(Pt 13): p. 2627-34.
110. Cruciat CM, Niehrs C: *Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013, **5**(3): p. a015081.
111. Niehrs C: *Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators*. Oncogene 2006, **25**(57): p. 7469-81.
112. Lustig B, Behrens J: *The Wnt signaling pathway and its role in tumor development*. J Cancer Res Clin Oncol 2003, **129**(4): p. 199-221.
113. James RG, Davidson KC, Bosch KA, Biechele TL, Robin NC, Taylor RJ, Major MB, Camp ND, Fowler K, Martins TJ, Moon RT: *WIKI4, a novel inhibitor of tankyrase and Wnt/ss-catenin signaling*. PLoS One 2012, **7**(12): p. e50457.
114. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, Moon RT, Teo JL, Kim HY, Moon SH, Ha JR, Kahn M: *A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, **101**(34): p. 12682-7.
115. Gonsalves FC, Klein K, Carson BB, Katz S, Ekas LA, Evans S, Nagourney R, Cardozo T, Brown AM, DasGupta R: *An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A 2011, **108**(15): p. 5954-63.
116. Fanto M, McNeill H: *Planar polarity from flies to vertebrates*. J Cell Sci 2004, **117**(Pt 4): p. 527-33.
117. Seifert JR, Mlodzik M: *Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility*. Nat Rev Genet 2007, **8**(2): p. 126-38.
118. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y: *The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway*. Genes Cells 2003, **8**(7): p. 645-54.

119. Semenov MV, Habas R, Macdonald BT, He X: *SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways*. Cell 2007, **131**(7): p. 1378.
120. Komiya Y, Habas R: *Wnt signal transduction pathways*. Organogenesis 2008, **4**(2): p. 68-75.
121. Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N: *Wnt signaling pathways meet Rho GTPases*. Genes Dev 2009, **23**(3): p. 265-77.
122. Xu Z, Greene LA: *Activation of the apoptotic JNK pathway through the Rac1-binding scaffold protein POSH*. Methods Enzymol 2006, **406**: p. 479-89.
123. Dhanasekaran DN, Reddy EP: *JNK signaling in apoptosis*. Oncogene 2008, **27**(48): p. 6245-51.
124. Wang Y: *Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy*. Mol Cancer Ther 2009, **8**(8): p. 2103-9.
125. Nishita M, Enomoto M, Yamagata K, Minami Y: *Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells*. Trends Cell Biol 2010, **20**(6): p. 346-54.
126. Katoh M: *WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review)*. Oncol Rep 2005, **14**(6): p. 1583-8.
127. Endo M, Nishita M, Fujii M, Minami Y: *Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells*. Int Rev Cell Mol Biol 2015, **314**: p. 117-48.
128. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT: *A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling*. Dev Cell 2003, **5**(3): p. 367-77.
129. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C: *Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction*. Nature 1998, **391**(6665): p. 357-62.
130. Veeck J, Dahl E: *Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3*. Biochim Biophys Acta 2012, **1825**(1): p. 18-28.
131. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C: *LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins*. Nature 2001, **411**(6835): p. 321-5.
132. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA: *Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family*. Gene 1999, **238**(2): p. 301-13.
133. Mao B, Niehrs C: *Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling*. Gene 2003, **302**(1-2): p. 179-183.
134. Fujii Y, Hoshino T, Kumon H: *Molecular simulation analysis of the structure complex of C2 domains of DKK family members and beta-propeller domains of LRP5/6: explaining why DKK3 does not bind to LRP5/6*. Acta Med Okayama 2014, **68**(2): p. 63-78.
135. Das DS, Wadhwa N, Kunj N, Sarda K, Pradhan BS, Majumdar SS: *Dickkopf homolog 3 (DKK3) plays a crucial role upstream of WNT/beta-CATENIN signaling for Sertoli cell mediated regulation of spermatogenesis*. PLoS One 2013, **8**(5): p. e63603.

136. Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza B, Meyers PA, Gorlick R: *Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway*. Cancer Res 2004, **64**(8): p. 2734-9.
137. Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, Zhang L: *Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer*. Carcinogenesis 2008, **29**(1): p. 84-92.
138. Wang Z, Ma LJ, Kang Y, Li X, Zhang XJ: *Dickkopf-3 (Dkk3) induces apoptosis in cisplatin-resistant lung adenocarcinoma cells via the Wnt/beta-catenin pathway*. Oncol Rep 2015, **33**(3): p. 1097-106.
139. Kawano Y, Kitaoka M, Hamada Y, Walker MM, Waxman J, Kypta RM: *Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3*. Oncogene 2006, **25**(49): p. 6528-37.
140. Brott BK, Sokol SY: *Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins*. Mol Cell Biol 2002, **22**(17): p. 6100-10.
141. Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, Miyazaki M, Namba M, Kumon H, Huh NH: *Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase*. Cancer Res 2005, **65**(21): p. 9617-22.
142. Xiang T, Li L, Yin X, Zhong L, Peng W, Qiu Z, Ren G, Tao Q: *Epigenetic silencing of the WNT antagonist Dickkopf 3 disrupts normal Wnt/beta-catenin signalling and apoptosis regulation in breast cancer cells*. J Cell Mol Med 2013, **17**(10): p. 1236-46.
143. Wang XY, Yin Y, Yuan H, Sakamaki T, Okano H, Glazer RI: *Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways*. Mol Cell Biol 2008, **28**(11): p. 3589-99.
144. Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y, Namba M: *A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines*. Biochem Biophys Res Commun 2000, **268**(1): p. 20-4.
145. Hayashi T, Asano H, Toyooka S, Tsukuda K, Soh J, Shien T, Taira N, Maki Y, Tanaka N, Doihara H, Nasu Y, Huh NH, Miyoshi S: *DNA methylation status of REIC/Dkk-3 gene in human malignancies*. J Cancer Res Clin Oncol 2012, **138**(5): p. 799-809.
146. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J: *Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease*. J Cell Sci 2008, **121**(Pt 6): p. 737-46.
147. Rehn M, Pihlajaniemi T, Hofmann K, Bucher P: *The frizzled motif: in how many different protein families does it occur?* Trends Biochem Sci 1998, **23**(11): p. 415-7.
148. Jones SE, Jomary C: *Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns*. Bioessays 2002, **24**(9): p. 811-20.
149. Banyai L, Patthy L: *The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases*. Protein Sci 1999, **8**(8): p. 1636-42.
150. Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S: *The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers*. Pathology 2004, **36**(2): p. 120-8.

151. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR: *SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A 1997, **94**(25): p. 13636-41.
152. Mii Y, Taira M: *Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range*. Development 2009, **136**(24): p. 4083-8.
153. Esteve P, Bovolenta P: *The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events*. Tohoku J Exp Med 2010, **221**(1): p. 11-7.
154. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, Cumberledge S, Rubin JS: *Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling*. J Biol Chem 2000, **275**(6): p. 4374-82.
155. Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, Betz B, Grube S, Kreutzfeld R, Himmelfarb M, An HX, Gelling S, Klamann I, Hinzmänn B, Kristiansen G, Grutzmann R, Künér R, Petschke B, Rhiem K, Wiechen K, Sers C, Wiestler O, Schneider A, Höfler H, Nahrig J, Dietel M, Schäfer R, Rosenthal A, Schmutzler R, Durst M, Meindl A, Niederacher D: *Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer*. J Pathol 2005, **205**(1): p. 21-8.
156. Dahl E, Wiesmann F, Woenckhaus M, Stoehr R, Wild PJ, Veeck J, Knuchel R, Klopocki E, Sauter G, Simon R, Wieland WF, Walter B, Denzinger S, Hartmann A, Hammerschmied CG: *Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma*. Oncogene 2007, **26**(38): p. 5680-91.
157. Armes JE, Hammet F, de Silva M, Ciciulla J, Ramus SJ, Soo WK, Mahoney A, Yarovaya N, Henderson MA, Gish K, Hutchins AM, Price GR, Venter DJ: *Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers*. Oncogene 2004, **23**(33): p. 5697-702.
158. Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H, Knuechel R, Krieg RC, Klopocki E, Dahl E, Wild P, Blaszyk H, Sauter G, Simon R, Schmitt R, Zaak D, Hofstaedter F, Rosenthal A, Baylin SB, Pilarsky C, Hartmann A: *Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer*. Lab Invest 2004, **84**(4): p. 465-78.
159. Leach RJ, Banga SS, Ben-Othmane K, Chughtai S, Clarke R, Daiger SP, Kolehmainen J, Kumar S, Kuo M, Macoska J, Mada N, Naylor SL, Nunes M, O'Connell P, Pebusque MJ, Pekkel V, Porter CJ, Simons CT, Sohocki MM, Trapman J, Wells D, Westbrook C, Wood S: *Report of the Third International Workshop on Human Chromosome 8 Mapping. San Antonio, Texas, October 25-27, 1996*. Cytogenet Cell Genet 1996, **75**(2-3): p. 71-84.
160. Klopocki E, Kristiansen G, Wild PJ, Klamann I, Castanos-Velez E, Singer G, Stohr R, Simon R, Sauter G, Leibiger H, Essers L, Weber B, Hermann K, Rosenthal A, Hartmann A, Dahl E: *Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors*. Int J Oncol 2004, **25**(3): p. 641-9.
161. Kang P, Wan M, Huang P, Li C, Wang Z, Zhong X, Hu Z, Tai S, Cui Y: *The Wnt antagonist sFRP1 as a favorable prognosticator in human biliary tract carcinoma*. PLoS One 2014, **9**(3): p. e90308.

162. Ricketts CJ, Hill VK, Linehan WM: *Tumor-specific hypermethylation of epigenetic biomarkers, including SFRP1, predicts for poorer survival in patients from the TCGA Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (KIRC) project*. PLoS One 2014, **9**(1): p. e85621.
163. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, Kim SI, Park BW: *Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry*. Breast 2012, **21**(1): p. 50-7.
164. Erber R, Gluz O, Br  nner N, Kreipe HH, Pelz E, Kates R, Bartels A, Huober J, Mohrmann S, Moustafa Z, Liedtke C, M  bus V, Augustin D, Thomssen C, J  nicke F, Kiechle M, Kuhn W, Nitz U, Harbeck N, Hartmann A: *Predictive role of HER2/neu, topoisomerase-II-alpha, and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) for response to adjuvant taxane-based chemotherapy in patients with intermediate-risk breast cancer: results from the WSG-AGO EC-Doc trial*. Breast Cancer Research and Treatment 2015, **150**(2): p. 279-288.
165. Nitz U, Gluz O, Huober J, Kreipe HH, Kates RE, Hartmann A, Erber R, Scholz M, Lisboa B, Mohrmann S, Mobus V, Augustin D, Hoffmann G, Weiss E, Bohmer S, Kreienberg R, Du Bois A, Sattler D, Thomssen C, Kiechle M, Janicke F, Wallwiener D, Harbeck N, Kuhn W: *Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression*. Ann Oncol 2014, **25**(8): p. 1551-7.
166. The Cancer Genome Atlas Network: *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature 2012, **490**(7418): p. 61-70.
167. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N: *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov 2012, **2**(5): p. 401-4.
168. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW: *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. Cancer Cell 2006, **10**(6): p. 515-27.
169. Huth L, Dissertation: *Funktionelle in vitro und in vivo Charakterisierung des putativen Tumorsuppressorgens SFRP1 im humanen Mammakarzinom* (2014)
170. Geisler C, Masterthesis: *Untersuchungen zur Bedeutung der putativen Tumorsuppressorgene DKK3 und ITIH5 bei der Chemosensitivit  t humaner Mammakarzinome* (2009)
171. Moore WJ, Kern JC, Bhat R, Commons TJ, Fukayama S, Goljer I, Krishnamurthy G, Magolda RL, Nogle L, Pitts K, Stauffer B, Trybulski EJ, Welmaker GS, Wilson M, Bodine PV: *Modulation of Wnt signaling through inhibition of secreted frizzled-related protein 1 (sFRP-1) with N-substituted piperidinyl diphenylsulfonyl sulfonamides*. J Med Chem 2009, **52**(1): p. 105-16.
172. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986, **51**: p. 263-73.
173. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y) 1992, **10**(4): p. 413-7.

174. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW: *Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up*. Nucleic Acids Res 2003, **31**(20): p. e122.
175. Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM: *Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking*. Nat Med 1998, **4**(11): p. 1329-33.
176. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL: *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A 1992, **89**(5): p. 1827-31.
177. Hayatsu H: *Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2008, **84**(8): p. 321-30.
178. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P: *Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release*. Anal Biochem 1996, **242**(1): p. 84-9.
179. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P: *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science 1998, **281**(5375): p. 363, 365.
180. Tost J, Dunker J, Gut IG: *Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing*. Biotechniques 2003, **35**(1): p. 152-6.
181. England R, Pettersson M: *Pyro Q-CpG™: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®*. Nature Methods 2005, **2**(10): p.
182. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 1977, **74**(12): p. 5463-7.
183. Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ: *Manual immunohistochemistry staining of mouse tissues using the avidin-biotin complex (ABC) technique*. Cold Spring Harb Protoc 2014, **2014**(6): p. 659-62.
184. Boenisch T: *Heat-induced antigen retrieval restores electrostatic forces: prolonging the antibody incubation as an alternative*. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002, **10**(4): p. 363-7.
185. Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 1970, **227**(5259): p. 680-5.
186. Flyer: *The CASY Model TT*. OLS OMNI Life Science (2016)
187. Pettengill OS, Cate CC, Flint CF, Sorenson GD: *Isolation of Malignant Cells: Alteration of Phenotype in vitro*, in *Cell Separation: Methods and Selected Applications*, T.G. Pretlow and T.P. Pretlow, Editors. 1984, Academic Press Inc.: Orlando.
188. Sanchez-Margalet V, Lucas M, Solano F, Goberna R: *Sensitivity of insulin-secreting RIN m5F cells to undergoing apoptosis by the protein kinase C inhibitor staurosporine*. Exp Cell Res 1993, **209**(1): p. 160-3.
189. Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z: *An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer*

- prognosis using microarray data of 1,809 patients.* Breast Cancer Res Treat 2010, **123**(3): p. 725-31.
190. Veeck J, Bektas N, Hartmann A, Kristiansen G, Heindrichs U, Knuchel R, Dahl E: *Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours.* Breast Cancer Res 2008, **10**(5): p. R82.
191. Veeck J, Wild PJ, Fuchs T, Schuffler PJ, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E: *Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer.* BMC Cancer 2009, **9**: p. 217.
192. Kawasaki K, Watanabe M, Sakaguchi M, Ogasawara Y, Ochiai K, Nasu Y, Doihara H, Kashiwakura Y, Huh NH, Kumon H, Date H: *REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7/ADR cells and induces apoptosis in breast cancer.* Cancer Gene Ther 2009, **16**(1): p. 65-72.
193. Li X, Xu Y, Chen Y, Chen S, Jia X, Sun T, Liu Y, Li X, Xiang R, Li N: *SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/beta-catenin signal network.* Cancer Lett 2013, **336**(2): p. 379-89.
194. Remmele W, Stegner HE: *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue.* Pathologe 1987, **8**(3): p. 138-40.
195. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO: *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype.* Clin Cancer Res 2008, **14**(5): p. 1368-76.
196. Baylin SB, Ohm JE: *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* Nat Rev Cancer 2006, **6**(2): p. 107-16.
197. Herman JG, Baylin SB: *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.* N Engl J Med 2003, **349**(21): p. 2042-54.
198. Eid M, Gollwitzer M, Schmitt M: *Statistik und Forschungsmethoden.* 4. Auflage. Weinheim: Beltz Verlag: 2015.
199. Mihály Z, Györfy B: *Improving Pathological Assessment of Breast Cancer by Employing Array-Based Transcriptome Analysis.* Microarrays 2013, **2**(3): p. 228.
200. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Mobus V, von Minckwitz G, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T, Diel I, Dimpfl T, Eiermann W, Fehm T, Friese K, Janicke F, Janni W, Jonat W, Kiechle M, Kohler U, Luck HJ, Maass N, Possinger K, Rody A, Scharl A, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, Welt A: *13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013).* Breast Care (Basel) 2013, **8**(3): p. 221-9.
201. Holliday DL, Speirs V: *Choosing the right cell line for breast cancer research.* Breast Cancer Res 2011, **13**(4): p. 215.
202. Lacroix M, Leclercq G: *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.* Breast Cancer Res Treat 2004, **83**(3): p. 249-89.

203. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, Minna JD, Pollack JR: *Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery*. PLoS One 2009, **4**(7): p. e6146.
204. Cavallaro U, Christofori G: *Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough*. Biochim Biophys Acta 2001, **1552**(1): p. 39-45.
205. Weinberg RA: *The Biology of Cancer*. 1. Auflage. New York: Garland Science: 2007.
206. Blick T, Widodo E, Hugo H, Waltham M, Lenburg ME, Neve RM, Thompson EW: *Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines*. Clin Exp Metastasis 2008, **25**(6): p. 629-42.
207. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW: *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol 2006, **172**(7): p. 973-81.
208. Kalluri R, Weinberg RA: *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest 2009, **119**(6): p. 1420-8.
209. Maier HJ, Wirth T, Beug H: *Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. Cancers (Basel) 2010, **2**(4): p. 2058-83.
210. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J: *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype*. Cancer Res 2008, **68**(4): p. 989-97.
211. Jeong H, Ryu YJ, An J, Lee Y, Kim A: *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype*. Histopathology 2012, **60**(6b): p. E87-95.
212. Zeisberg M, Neilson EG: *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. J Clin Invest 2009, **119**(6): p. 1429-37.
213. Peinado H, Olmeda D, Cano A: *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer 2007, **7**(6): p. 415-28.
214. Nieto MA: *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol 2002, **3**(3): p. 155-66.
215. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA: *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol 2000, **2**(2): p. 76-83.
216. Kaufhold S, Bonavida B: *Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention*. J Exp Clin Cancer Res 2014, **33**: p. 62.
217. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol 2000, **2**(2): p. 84-9.
218. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*. 5. Auflage. New York: Garland Science: 2007.

219. Hartsock A, Nelson WJ: *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta 2008, **1778**(3): p. 660-9.
220. Van Itallie CM, Anderson JM: *Architecture of tight junctions and principles of molecular composition*. Semin Cell Dev Biol 2014, **36**: p. 157-65.
221. Barker N, Clevers H: *Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics*. Nat Rev Drug Discov 2006, **5**(12): p. 997-1014.
222. Le PN, McDermott JD, Jimeno A: *Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28*. Pharmacol Ther 2015, **146**: p. 1-11.
223. Anastas JN, Moon RT: *WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer*. Nat Rev Cancer 2013, **13**(1): p. 11-26.
224. Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B, Galm O, Camara O, Durst M, Kristiansen G, Huszka C, Knuchel R, Dahl E: *Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis*. Oncogene 2006, **25**(24): p. 3479-88.
225. Ugolini F, Charafe-Jauffret E, Bardou VJ, Geneix J, Adelaide J, Labat-Moleur F, Penault-Llorca F, Longy M, Jacquemier J, Birnbaum D, Pebusque MJ: *WNT pathway and mammary carcinogenesis: loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type*. Oncogene 2001, **20**(41): p. 5810-7.
226. Huth L, Rose M, Kloubert V, Winkens W, Schlensog M, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E: *BDNF is associated with SFRP1 expression in luminal and basal-like breast cancer cell lines and primary breast cancer tissues: a novel role in tumor suppression?* PLoS One 2014, **9**(7): p. e102558.
227. Bilir B, Kucuk O, Moreno CS: *Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells*. J Transl Med 2013, **11**: p. 280.
228. Polakis P: *Wnt signaling and cancer*. Genes Dev 2000, **14**(15): p. 1837-51.
229. Liu BY, Soloviev I, Huang X, Chang P, Ernst JA, Polakis P, Sakanaka C: *Mammary tumor regression elicited by Wnt signaling inhibitor requires IGFBP5*. Cancer Res 2012, **72**(6): p. 1568-78.
230. Russell SB, Russell JD, Trupin KM, Gayden AE, Opalenik SR, Nanney LB, Broquist AH, Raju L, Williams SM: *Epigenetically altered wound healing in keloid fibroblasts*. J Invest Dermatol 2010, **130**(10): p. 2489-96.
231. Suzuki H, Toyota M, Carraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB, Tokino T: *Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer*. Br J Cancer 2008, **98**(6): p. 1147-56.
232. Gumz ML, Zou H, Kreinest PA, Childs AC, Belmonte LS, LeGrand SN, Wu KJ, Luxon BA, Sinha M, Parker AS, Sun LZ, Ahlquist DA, Wood CG, Copland JA: *Secreted frizzled-related protein 1 loss contributes to tumor phenotype of clear cell renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res 2007, **13**(16): p. 4740-9.

233. Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, Jan S, Hardy RG, Byrd P, Chughtai S, Wallis Y, Matthews GM, Morton DG: *The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis*. Cancer Res 2004, **64**(3): p. 883-8.
234. Matsuda Y, Schlange T, Oakeley EJ, Boulay A, Hynes NE: *WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth*. Breast Cancer Res 2009, **11**(3): p. R32.
235. Martin-Manso G, Calzada MJ, Chuman Y, Sipes JM, Xavier CP, Wolf V, Kuznetsova SA, Rubin JS, Roberts DD: *sFRP-1 binds via its netrin-related motif to the N-module of thrombospondin-1 and blocks thrombospondin-1 stimulation of MDA-MB-231 breast carcinoma cell adhesion and migration*. Arch Biochem Biophys 2011, **509**(2): p. 147-56.
236. Gauger KJ, Hugh JM, Troester MA, Schneider SS: *Down-regulation of sfrp1 in a mammary epithelial cell line promotes the development of a cd44high/cd24low population which is invasive and resistant to anoikis*. Cancer Cell Int 2009, **9**: p. 11.
237. Lazarova DL, Chiaro C, Wong T, Drago E, Rainey A, O'Malley S, Bordonaro M: *CBP Activity Mediates Effects of the Histone Deacetylase Inhibitor Butyrate on WNT Activity and Apoptosis in Colon Cancer Cells*. J Cancer 2013, **4**(6): p. 481-90.
238. Moheimani F, Roth HM, Cross J, Reid AT, Shaheen F, Warner SM, Hirota JA, Kicic A, Hallstrand TS, Kahn M, Stick SM, Hansbro PM, Hackett TL, Knight DA: *Disruption of beta-catenin/CBP signaling inhibits human airway epithelial-mesenchymal transition and repair*. Int J Biochem Cell Biol 2015, **68**: p. 59-69.
239. Maftouh M, Belo AI, Avan A, Funel N, Peters GJ, Giovannetti E, Van Die I: *Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/beta-catenin signalling in pancreatic adenocarcinoma*. Oncotarget 2014, **5**(14): p. 5335-49.
240. Koppen A, Ait-Aissa R, Koster J, Ora I, Bras J, van Sluis PG, Caron H, Versteeg R, Valentijn LJ: *Dickkopf-3 expression is a marker for neuroblastic tumor maturation and is down-regulated by MYCN*. Int J Cancer 2008, **122**(7): p. 1455-64.
241. Zenzmaier C, Untergasser G, Hermann M, Dirnhofer S, Sampson N, Berger P: *Dysregulation of Dkk-3 expression in benign and malignant prostatic tissue*. Prostate 2008, **68**(5): p. 540-7.
242. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A: *Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Cancer 2004, **91**(4): p. 707-13.
243. Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, Miyazaki M, Shimizu N, Namba M: *Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer*. Int J Oncol 2001, **19**(1): p. 117-21.
244. Wang W, Zhu W, Xu XY, Nie XC, Yang X, Xing YN, Yu M, Liu YP, Takano Y, Zheng HC: *The clinicopathological significance of REIC expression in colorectal carcinomas*. Histol Histopathol 2012, **27**(6): p. 735-43.
245. Xu XY, Xia P, Yu M, Nie XC, Yang X, Xing YN, Liu YP, Takano Y, Zheng HC: *The roles of REIC gene and its encoding product in gastric carcinoma*. Cell Cycle 2012, **11**(7): p. 1414-31.

246. Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, Hanafusa H, Miyazaki M, Namba M, Shimizu N, Shimizu K: *Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells*. Gene 2002, **282**(1-2): p. 151-8.
247. Yu J, Tao Q, Cheng YY, Lee KY, Ng SS, Cheung KF, Tian L, Rha SY, Neumann U, Rocken C, Ebert MP, Chan FK, Sung JJ: *Promoter methylation of the Wnt/beta-catenin signaling antagonist Dkk-3 is associated with poor survival in gastric cancer*. Cancer 2009, **115**(1): p. 49-60.
248. Kloten V, Becker B, Winner K, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T, Veeck J, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E: *Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening*. Breast Cancer Res 2013, **15**(1): p. R4.
249. Yamaguchi T, Mukai H, Yamashita S, Fujii S, Ushijima T: *Comprehensive DNA Methylation and Extensive Mutation Analyses of HER2-Positive Breast Cancer*. Oncology 2015, **88**(6): p. 377-84.
250. Stefansson OA, Moran S, Gomez A, Sayols S, Arribas-Jorba C, Sandoval J, Hilmarsdottir H, Olafsdottir E, Tryggvadottir L, Jonasson JG, Eyfjord J, Esteller M: *A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes*. Mol Oncol 2015, **9**(3): p. 555-68.
251. Park SY, Kwon HJ, Choi Y, Lee HE, Kim SW, Kim JH, Kim IA, Jung N, Cho NY, Kang GH: *Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes*. Mod Pathol 2012, **25**(2): p. 185-96.
252. Li Z, Guo X, Wu Y, Li S, Yan J, Peng L, Xiao Z, Wang S, Deng Z, Dai L, Yi W, Xia K, Tang L, Wang J: *Methylation profiling of 48 candidate genes in tumor and matched normal tissues from breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat 2015, **149**(3): p. 767-79.
253. Li Y, Li S, Chen J, Shao T, Jiang C, Wang Y, Chen H, Xu J, Li X: *Comparative epigenetic analyses reveal distinct patterns of oncogenic pathways activation in breast cancer subtypes*. Hum Mol Genet 2014, **23**(20): p. 5378-93.
254. Rhee JK, Kim K, Chae H, Evans J, Yan P, Zhang BT, Gray J, Spellman P, Huang TH, Nephew KP, Kim S: *Integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression profiles in molecular subtypes of breast cancer*. Nucleic Acids Res 2013, **41**(18): p. 8464-74.
255. Ueno K, Hirata H, Majid S, Chen Y, Zaman MS, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R: *Wnt antagonist DICKKOPF-3 (Dkk-3) induces apoptosis in human renal cell carcinoma*. Mol Carcinog 2011, **50**(6): p. 449-57.
256. Haug BH, Henriksen JR, Buechner J, Geerts D, Tomte E, Kogner P, Martinsson T, Flaegstad T, Sveinbjornsson B, Einvik C: *MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma*. Carcinogenesis 2011, **32**(7): p. 1005-12.
257. Ueno K, Hirata H, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R: *microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer*. Br J Cancer 2013, **108**(8): p. 1659-67.

258. De Brouwer S, Mestdag P, Lambertz I, Pattyn F, De Paepe A, Westermann F, Schroeder C, Schulte JH, Schramm A, De Preter K, Vandesompele J, Speleman F: *Dickkopf-3 is regulated by the MYCN-induced miR-17-92 cluster in neuroblastoma*. Int J Cancer 2012, **130**(11): p. 2591-8.
259. Kim MS, Lee HN, Kim HJ, Myung SC: *Single nucleotide polymorphisms in DKK3 gene are associated with prostate cancer risk and progression*. Int Braz J Urol 2015, **41**(5): p. 869-97.
260. Yadav A, Gupta A, Yadav S, Rastogi N, Agrawal S, Kumar A, Kumar V, Misra S, Mittal B: *Association of Wnt signaling pathway genetic variants in gallbladder cancer susceptibility and survival*. Tumour Biol 2016, **37**(6): p. 8083-95.
261. Tsuji T, Nozaki I, Miyazaki M, Sakaguchi M, Pu H, Hamazaki Y, Iijima O, Namba M: *Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas*. Biochem Biophys Res Commun 2001, **289**(1): p. 257-63.
262. Pfeifer K: *Mechanisms of genomic imprinting*. Am J Hum Genet 2000, **67**(4): p. 777-87.
263. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, Zhang H, McLellan M, Yau C, Kandoth C, Bowlby R, Shen H, Hayat S, Fieldhouse R, Lester SC, Tse GM, Factor RE, Collins LC, Allison KH, Chen YY, Jensen K, Johnson NB, Oesterreich S, Mills GB, Cherniack AD, Robertson G, Benz C, Sander C, Laird PW, Hoadley KA, King TA, Perou CM: *Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer*. Cell 2015, **163**(2): p. 506-19.
264. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, Molina FJ, Calasanz MJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A: *Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia*. Blood 2004, **104**(8): p. 2492-8.
265. Ding Z, Qian YB, Zhu LX, Xiong QR: *Promoter methylation and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol 2009, **15**(21): p. 2595-601.
266. Kang WS, Cho SB, Park JS, Lee MY, Myung SC, Kim WY, Lee SH, Kim DH, Lee EJ: *Clinico-epigenetic combination including quantitative methylation value of DKK3 augments survival prediction of the patient with cervical cancer*. J Cancer Res Clin Oncol 2013, **139**(1): p. 97-106.
267. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LA, Cronin KA: *US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status*. J Natl Cancer Inst 2014, **106**(5): p.
268. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V: *Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry*. Cancer 2007, **109**(9): p. 1721-8.
269. Ryu SW, Kim JH, Kim MK, Lee YJ, Park JS, Park HM, Kim DH, Lee SH, Lee EJ: *Reduced expression of DKK3 is associated with adverse clinical outcomes of uterine cervical squamous cell carcinoma*. Int J Gynecol Cancer 2013, **23**(1): p. 134-40.

270. Park JM, Kim MK, Chi KC, Kim JH, Lee SH, Lee EJ: *Aberrant loss of dickkopf-3 in gastric cancer: can it predict lymph node metastasis preoperatively?* World J Surg 2015, **39**(4): p. 1018-25.
271. Woenckhaus M, Merk J, Stoehr R, Schaeper F, Gaumann A, Wiebe K, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W: *Prognostic value of FHIT, CTNNB1, and MUC1 expression in non-small cell lung cancer.* Hum Pathol 2008, **39**(1): p. 126-36.
272. Fong D, Hermann M, Untergasser G, Pirkebner D, Draxl A, Heitz M, Moser P, Margreiter R, Hengster P, Amberger A: *Dkk-3 expression in the tumor endothelium: a novel prognostic marker of pancreatic adenocarcinomas.* Cancer Sci 2009, **100**(8): p. 1414-20.
273. Uchida D, Shiraha H, Kato H, Nagahara T, Iwamuro M, Kataoka J, Horiguchi S, Watanabe M, Takaki A, Nouse K, Nasu Y, Yagi T, Kumon H, Yamamoto K: *Potential of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy for use in the treatment of pancreatic cancer.* J Gastroenterol Hepatol 2014, **29**(5): p. 973-83.
274. Lee EJ, Jo M, Rho SB, Park K, Yoo YN, Park J, Chae M, Zhang W, Lee JH: *Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin.* Int J Cancer 2009, **124**(2): p. 287-97.
275. Shien K, Tanaka N, Watanabe M, Soh J, Sakaguchi M, Matsuo K, Yamamoto H, Furukawa M, Asano H, Tsukuda K, Nasu Y, Huh NH, Miyoshi S, Kumon H, Toyooka S: *Anti-cancer effects of REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector for the treatment of non-small cell lung cancer.* PLoS One 2014, **9**(2): p. e87900.
276. Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK: *Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma.* Oncogene 2006, **25**(36): p. 5027-36.
277. Savagner P: *Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity.* Curr Top Dev Biol 2015, **112**: p. 273-300.
278. Klymkowsky MW, Savagner P: *Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe.* Am J Pathol 2009, **174**(5): p. 1588-93.
279. Choi Y, Lee HJ, Jang MH, Gwak JM, Lee KS, Kim EJ, Kim HJ, Lee HE, Park SY: *Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer.* Hum Pathol 2013, **44**(11): p. 2581-9.
280. Hollier BG, Evans K, Mani SA: *The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies.* J Mammary Gland Biol Neoplasia 2009, **14**(1): p. 29-43.
281. Lin CH, Guo Y, Ghaffar S, McQueen P, Pourmorady J, Christ A, Rooney K, Ji T, Eskander R, Zi X, Hoang BH: *Dkk-3, a secreted wnt antagonist, suppresses tumorigenic potential and pulmonary metastasis in osteosarcoma.* Sarcoma 2013, **2013**: p. 147541.
282. Guo Q, Qin W: *DKK3 blocked translocation of beta-catenin/EMT induced by hypoxia and improved gemcitabine therapeutic effect in pancreatic cancer Bxpc-3 cell.* J Cell Mol Med 2015, **19**(12): p. 2832-41.
283. Savagner P: *The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon.* Ann Oncol 2010, **21**: p. vii89-92.

284. Yook JI, Li XY, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, Cha SY, Ryu JK, Choi YJ, Kim J, Fearon ER, Weiss SJ: *A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells*. Nat Cell Biol 2006, **8**(12): p. 1398-406.
285. Martin HL, Smith L, Tomlinson DC: *Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives*. Breast Cancer (Dove Med Press) 2014, **6**: p. 1-13.
286. Giordano SH, Buzdar AU, Smith TL, Kau SW, Yang Y, Hortobagyi GN: *Is breast cancer survival improving?* Cancer 2004, **100**(1): p. 44-52.
287. Lopez-Knowles E, Zardawi SJ, McNeil CM, Millar EK, Crea P, Musgrove EA, Sutherland RL, O'Toole SA: *Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010, **19**(1): p. 301-9.
288. Zhang Y, Liu B, Zhao Q, Hou T, Huang X: *Nuclear localizaiton of beta-catenin is associated with poor survival and chemo-/radioresistance in human cervical squamous cell cancer*. Int J Clin Exp Pathol 2014, **7**(7): p. 3908-17.
289. Stewart DJ: *Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst 2014, **106**(1): p. djt356.
290. Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, Rosty C, Abal M, El Marjou F, Smits R, Louvard D, Fodde R, Robine S: *APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression*. Gastroenterology 2006, **131**(4): p. 1096-109.
291. Fukukawa C, Hanaoka H, Nagayama S, Tsunoda T, Toguchida J, Endo K, Nakamura Y, Katagiri T: *Radioimmunotherapy of human synovial sarcoma using a monoclonal antibody against FZD10*. Cancer Sci 2008, **99**(2): p. 432-40.
292. Nagayama S, Fukukawa C, Katagiri T, Okamoto T, Aoyama T, Oyaizu N, Imamura M, Toguchida J, Nakamura Y: *Therapeutic potential of antibodies against FZD 10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas*. Oncogene 2005, **24**(41): p. 6201-12.
293. Rudy SF, Brenner JC, Harris JL, Liu J, Che J, Scott MV, Owen JH, Komarck CM, Graham MP, Bellile EL, Bradford CR, Prince ME, Carey TE: *In vivo Wnt pathway inhibition of human squamous cell carcinoma growth and metastasis in the chick chorioallantoic model*. J Otolaryngol Head Neck Surg 2016, **45**: p. 26.
294. Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, Kasibhatla S, Schuller AG, Li AG, Cheng D, Li J, Tompkins C, Pferdekamper A, Steffy A, Cheng J, Kowal C, Phung V, Guo G, Wang Y, Graham MP, Flynn S, Brenner JC, Li C, Villarroel MC, Schultz PG, Wu X, McNamara P, Sellers WR, Petruzzelli L, Boral AL, Seidel HM, McLaughlin ME, Che J, Carey TE, Vanasse G, Harris JL: *Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974*. Proc Natl Acad Sci U S A 2013, **110**(50): p. 20224-9.
295. Ren XY, Zhou GQ, Jiang W, Sun Y, Xu YF, Li YQ, Tang XR, Wen X, He QM, Yang XJ, Liu N, Ma J: *Low SFRP1 Expression Correlates with Poor Prognosis and Promotes Cell Invasion by Activating the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway in NPC*. Cancer Prev Res (Phila) 2015, **8**(10): p. 968-77.
296. Huang S, Zhong X, Gao J, Song R, Wu H, Zi S, Yang S, Du P, Cui L, Yang C, Li Z: *Coexpression of SFRP1 and WIF1 as a prognostic predictor of favorable outcomes in patients with colorectal carcinoma*. Biomed Res Int 2014, **2014**: p. 256723.

297. Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, McGowan PM: *The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?* Clin Proteomics 2011, **8**(1): p. 9.
298. Feldinger K, Generali D, Kramer-Marek G, Gijzen M, Ng TB, Wong JH, Strina C, Cappelletti M, Andreis D, Li JL, Bridges E, Turley H, Leek R, Roxanis I, Capala J, Murphy G, Harris AL, Kong A: *ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer.* Oncotarget 2014, **5**(16): p. 6633-46.
299. Li R, Zhang K, Penedo TL, Kragel CP, Grizzle WE, Hameed O, Siegal GP, Wei S: *The RANK Pathway in Advanced Breast Cancer: Does Src Play a Role?* Appl Immunohistochem Mol Morphol 2016, **24**(1): p. 42-50.
300. Gonzalez-Suarez E, Sanz-Moreno A: *RANK as a therapeutic target in cancer.* Febs j 2016, **283**(11): p. 2018-33.
301. Cooper SJ, von Roemeling CA, Kang KH, Marlow LA, Grebe SK, Menefee ME, Tun HW, Colon-Otero G, Perez EA, Copland JA: *Reexpression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers.* Mol Cancer Ther 2012, **11**(10): p. 2105-15.
302. Bernemann C, Hulsewig C, Ruckert C, Schafer S, Blumel L, Hempel G, Gotte M, Greve B, Barth PJ, Kiesel L, Liedtke C: *Influence of secreted frizzled receptor protein 1 (SFRP1) on neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer does not rely on WNT signaling.* Mol Cancer 2014, **13**: p. 174.
303. Boris Fehse SD: *Gentherapie in Deutschland. Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme. Themenband der interdisziplinären Arbeitsgruppe „Gentechnologiebericht. 2. aktualisierte Auflage.* Dornburg: Forum W – Wissenschaftlicher Verlag: 2011.
304. Razi Soofiyan S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L: *Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs.* Adv Pharm Bull 2013, **3**(2): p. 249-55.
305. Steensma DP: *Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment.* Mayo Clin Proc 2015, **90**(7): p. 969-83.
306. Diesch J, Zwick A, Garz AK, Palau A, Buschbeck M, Gotze KS: *A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers.* Clin Epigenetics 2016, **8**: p. 71.
307. Sharma S, Kelly TK, Jones PA: *Epigenetics in cancer.* Carcinogenesis 2010, **31**(1): p. 27-36.
308. Ghoshal A, Ghosh SS: *Expression, purification, and therapeutic implications of recombinant sFRP1.* Appl Biochem Biotechnol 2015, **175**(4): p. 2087-103.
309. Buckel P: *Recombinant Protein Drugs.* Berlin: Springer Science & Business Media: 2001.
310. Golan DE: *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 2008.

311. Hutt M, Farber-Schwarz A, Unverdorben F, Richter F, Kontermann RE: *Plasma half-life extension of small recombinant antibodies by fusion to immunoglobulin-binding domains*. J Biol Chem 2012, **287**(7): p. 4462-9.
312. Arensman MD, Telesca D, Lay AR, Kershaw KM, Wu N, Donahue TR, Dawson DW: *The CREB-binding protein inhibitor ICG-001 suppresses pancreatic cancer growth*. Mol Cancer Ther 2014, **13**(10): p. 2303-14.
313. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL: *Principles of early drug discovery*. Br J Pharmacol 2011, **162**(6): p. 1239-49.
314. Ying J, Li H, Seng TJ, Langford C, Srivastava G, Tsao SW, Putti T, Murray P, Chan AT, Tao Q: *Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation*. Oncogene 2006, **25**(7): p. 1070-80.
315. Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T: *Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers*. Int J Cancer 2005, **116**(3): p. 407-14.
316. Yu J, Cheng YY, Tao Q, Cheung KF, Lam CN, Geng H, Tian LW, Wong YP, Tong JH, Ying JM, Jin H, To KF, Chan FK, Sung JJ: *Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer*. Gastroenterology 2009, **136**(2): p. 640-51.e1.
317. Ma JG, He ZK, Ma JH, Li WP, Sun G: *Downregulation of protocadherin-10 expression correlates with malignant behaviour and poor prognosis in human bladder cancer*. J Int Med Res 2013, **41**(1): p. 38-47.
318. Heitzer E, Artl M, Filipits M, Resel M, Graf R, Weissenbacher B, Lax S, Gnant M, Wrba F, Greil R, Dietze O, Hofbauer F, Bohm G, Hofler G, Samonigg H, Schaberl-Moser R, Balic M, Dandachi N: *Differential survival trends of stage II colorectal cancer patients relate to promoter methylation status of PCDH10, SPARC, and UCHL1*. Mod Pathol 2014, **27**(6): p. 906-15.
319. Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T: *PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells*. Biochem Biophys Res Commun 2014, **444**(1): p. 13-8.
320. Aapro MS, Eliason JF, Krauer F, Alberto P: *Colony formation in vitro as a prognostic indicator for primary breast cancer*. J Clin Oncol 1987, **5**(6): p. 890-6.
321. Fukui T, Kondo M, Ito G, Maeda O, Sato N, Yoshioka H, Yokoi K, Ueda Y, Shimokata K, Sekido Y: *Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer*. Oncogene 2005, **24**(41): p. 6323-7.
322. Gang EJ, Hsieh YT, Pham J, Zhao Y, Nguyen C, Huantes S, Park E, Naing K, Klemm L, Swaminathan S, Conway EM, Pelus LM, Crispino J, Mullighan CG, McMillan M, Muschen M, Kahn M, Kim YM: *Small-molecule inhibition of CBP/catenin interactions eliminates drug-resistant clones in acute lymphoblastic leukemia*. Oncogene 2014, **33**(17): p. 2169-78.

323. Zhao Y, Masiello D, McMillian M, Nguyen C, Wu Y, Melendez E, Smbatyan G, Kida A, He Y, Teo JL, Kahn M: *CBP/catenin antagonist safely eliminates drug-resistant leukemia-initiating cells*. *Oncogene* 2016, **35**(28): p. 3705-17.
324. Behrens J, Lustig B: *The Wnt connection to tumorigenesis*. *Int J Dev Biol* 2004, **48**(5-6): p. 477-87.
325. Won HS, Lee KM, Oh JE, Nam EM, Lee KE: *Inhibition of beta-Catenin to Overcome Endocrine Resistance in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cell Line*. *PLoS One* 2016, **11**(5): p. e0155983.
326. Grigson ER, Ozerova M, Pisklakova A, Liu H, Sullivan DM, Nefedova Y: *Canonical Wnt pathway inhibitor ICG-001 induces cytotoxicity of multiple myeloma cells in Wnt-independent manner*. *PLoS One* 2015, **10**(1): p. e0117693.
327. Kaur P, Mani S, Cros MP, Scoazec JY, Chemin I, Hainaut P, Herceg Z: *Epigenetic silencing of sFRP1 activates the canonical Wnt pathway and contributes to increased cell growth and proliferation in hepatocellular carcinoma*. *Tumour Biol* 2012, **33**(2): p. 325-36.
328. Rix U, Superti-Furga G: *Target profiling of small molecules by chemical proteomics*. *Nat Chem Biol* 2009, **5**(9): p. 616-24.
329. Drewes G: *Chemical proteomics in drug discovery*. *Methods Mol Biol* 2012, **803**: p. 15-21.
330. Wittekind C, Meyer H: *TNM. Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag: 2010.

6. Anhang

6.1 Eigenschaften der verwendeten Patientenkohorten

Tabelle 6-1: Klinisch-pathologische Parameter des Mammakarzinom-Kryogewebe-Kollektivs für die *DKK3*-mRNA-Expressionsstudie.

Parameter	Kategorisierung	n ^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 63 Jahre (Spanne: 33 - 81 Jahre)		
	< 63 Jahre	14	46,7
	≥ 63 Jahre	16	53,3
Tumorgroße ^b	pT1	14	46,7
	pT2	15	50,0
	pT3	1	3,3
	pT4	0	0,0
Lymphknoten-Status ^b	pN0	17	56,7
	pN1-3	12	40,0
	unbekannt	1	3,3
Histologischer Tumorgad ^c	G1	0	0,0
	G2	8	26,7
	G3	22	73,3
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^d 0-2)	16	53,3
	positiv (IRS ^d 3-12)	14	46,7
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^d 0-2)	15	50,0
	positiv (IRS ^d 3-12)	15	50,0
HER2-Status ^e	negativ	24	80,0
	positiv	6	20,0

^aWeibliche Patientinnen mit primär, unilateral, invasivem Mammakarzinom. ^bGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [23]. ^cGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [22]. ^dImmunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [194]. ^eÜberexpression des *ERBB2* Gens (*HER-2/NEU*) wurde gemäß dem IHC-basierten DAKO-Score System diagnostiziert. Zweifelhafte Fälle (DAKO-IHC: 2+) wurden zusätzlich mittels FISH-Test auf Amplifikation des Gens untersucht. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehler ungleich 100 % sein.

Tabelle 6-2: Klinisch-pathologische Parameter des *Tissue Microarrays* für die DKK3-Protein-Expressionsstudie.

Parameter	Kategorisierung	n ^a verfügbar	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 51 Jahre (Spanne: 21 - 66 Jahre)		
	< 51 Jahre	192	41,5
	≥ 51 Jahre	269	58,1
	unbekannt	2	0,4
Tumorgroße ^b	pT1	214	46,4
	pT2	219	47,5
	pT3	20	4,3
	pT4	5	1,1
	unbekannt	5	1,1
Lymphknoten-Status ^b	pN0	1	0,2
	pN1-3	457	99,1
	unbekannt	5	1,1
Histologischer Tumorgrad ^c	G1	24	5,2
	G2	274	59,4
	G3	154	33,4
	unbekannt	11	2,4
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^d 0-2)	133	28,9
	positiv (IRS ^d 3-12)	330	71,6
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^d 0-2)	161	34,9
	positiv (IRS ^d 3-12)	302	65,5
HER2-Status ^e	negativ	323	69,8
	positiv	140	30,2

^aWeibliche Patientinnen mit primär, unilateral, invasivem Mammakarzinom. ^bGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [23]. ^cGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [22]. ^dImmunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [194]. ^eÜberexpression des *ERBB2* Gens (*HER-2/NEU*) wurde gemäß dem IHC-basierten DAKO-Score System diagnostiziert. Zweifelhafte Fälle (DAKO-IHC: 2+) wurden zusätzlich mittels FISH-Test auf Amplifikation des Gens untersucht. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehler ungleich 100 % sein.

Tabelle 6-3: Klinisch-pathologische Parameter des Mammakarzinoms-DNA-Kollektivs für die *DDK3*-Gen-Methylierungsstudie.

Parameter	Kategorisierung	n ^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 59 Jahre (Spanne: 38 - 81 Jahre)		
	< 59 Jahre	16	48,5
	≥ 59 Jahre	17	51,5
Tumorgroße ^b	pT1	15	45,5
	pT2	12	36,4
	pT3	4	12,1
	pT4	0	0,0
	unbekannt	2	6,1
Lymphknoten-Status ^b	pN0	17	54,6
	pN1-3	14	42,4
	unbekannt	2	6,1
Histologischer Tumorgrad ^c	G1	1	3,0
	G2	9	27,3
	G3	22	66,7
	unbekannt	1	3,0
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^d 0-2)	11	33,3
	positiv (IRS ^d 3-12)	22	66,6
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^d 0-2)	12	36,4
	positiv (IRS ^d 3-12)	21	63,6
HER2-Status ^e	negativ	26	78,8
	positiv	7	21,2

^aWeibliche Patientinnen mit primär, unilateral, invasivem Mammakarzinom. ^bGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [23]. ^cGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [22]. ^dImmunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [194]. ^eÜberexpression des *ERBB2* Gens (*HER-2/NEU*) wurde gemäß dem IHC-basierten DAKO-Score System diagnostiziert. Zweifelhafte Fälle (DAKO-IHC: 2+) wurden zusätzlich mittels FISH-Test auf Amplifikation des Gens untersucht. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehler ungleich 100 % sein.

Tabelle 6-4: Klinisch-pathologische Parameter des *in silico*-Mammakarzinom-Kollektivs für die *DKK3*-mRNA-Expressionsstudie (*The Cancer Genome Atlas*-Plattform).

Parameter	Kategorisierung	n ^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 58 Jahre (Spanne: 26 - 90 Jahre)		
	≤ 58 Jahre	409	51,7
	> 58 Jahre	382	48,3
Tumorgroße ^b	pT1	209	26,4
	pT2	468	59,2
	pT3	83	10,5
	pT4	28	3,5
	unbekannt	3	0,4
Lymphknoten-Status ^b	pN0	375	47,4
	pN1-3	403	51,0
	unbekannt	13	1,6
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^c 0-2)	176	22,3
	positiv (IRS ^c 3-12)	577	73,0
	unbekannt	38	4,8
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^c 0-2)	246	31,1
	positiv (IRS ^c 3-12)	504	63,7
	unbekannt	41	5,2
HER2-Status ^d	negativ	600	75,9
	positiv	102	12,8
	unbekannt	89	11,3

^aWeibliche Patientinnen mit primär, invasivem Mammakarzinom. ^bGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [23]. ^cImmunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [194]. ^dÜberexpression des *ERBB2* Gens (*HER-2/NEU*) wurde gemäß dem IHC-basierten DAKO-Score System diagnostiziert. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehler ungleich 100 % sein.

Tabelle 6-5: Klinisch-pathologische Parameter des *in silico*-Mammakarzinom-Kollektivs für die DKK3-Gen-Methylierungsstudie (*The Cancer Genome Atlas*-Plattform).

Parameter	Kategorisierung	n ^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 58 Jahre (Spanne: 26 - 90 Jahre)		
	≤ 58 Jahre	263	52,9
	> 58 Jahre	234	47,1
Tumorgroße ^b	pT1	135	27,2
	pT2	290	58,4
	pT3	55	11,1
	pT4	15	3,0
	unbekannt	2	0,4
Lymphknoten-Status ^b	pN0	216	43,5
	pN1-3	274	55,1
	unbekannt	7	1,4
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^c 0-2)	99	19,9
	positiv (IRS ^c 3-12)	331	66,6
	unbekannt	67	13,5
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^c 0-2)	134	27,0
	positiv (IRS ^c 3-12)	295	59,4
	unbekannt	68	13,7
HER2-Status ^d	negativ	373	75,1
	positiv	50	10,1
	unbekannt	74	14,9

^aWeibliche Patientinnen mit primär, invasivem Mammakarzinom. ^bGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [23]. ^cImmunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [194]. ^dÜberexpression des *ERBB2* Gens (*HER-2/NEU*) wurde gemäß dem IHC-basierten DAKO-Score System diagnostiziert. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehler ungleich 100 % sein.

6.2 Klassifizierung maligner Tumoren der Brust

6.2.1 Staging des humanen Mammakarzinoms

Die Einteilung in die einzelnen Tumorstadien erfolgte gemäß UICC anhand der Ausdehnung des Primärtumors (**pT**), der Infiltration regionären und juxta-regionären Lymphknoten (**pN**) sowie dem Vorliegen einer Fernmetastasierung (**pM**) (siehe Tabelle 6-6 und Tabelle 6-7).

Tabelle 6-6: pTNM-Klassifikation des humanen Mammakarzinoms [23, 330].

pT-Klassifikation (Primärtumor)	
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
pT1	Tumor bis 2 cm in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion bis 0,1 cm in größter Ausdehnung
pT1a	Tumor > 0,1 bis 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b	Tumor > 0,5 bis 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	Tumor > 1 bis 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
pT3	Tumor > 5 cm im größten Durchmesser
pT4	Tumor jeder Größe mit Befall der Thoraxwand oder der Haut
pT4a	mit Befall der Thoraxwand
pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Haut oder Satellitenknoten der Haut der gleichen Brust
pT4c	Vorliegen der Kriterien T4a und T4b
pT4d	Inflammatorisches Karzinom
pN-Klassifikation (regionäre Lymphknoten)	
pNx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1mi	Mikrometastasen (> 0,2 mm und/oder mehr als 200 Tumorzellen; nicht größer 0,2 cm)
pN1	Metastasen in 1 bis 3 ipsilateralen Lymphknoten und/oder mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna
pN1a	1 bis 3 axilläre Lymphknotenmetastasen, mindestens eine > 2 mm
pN1b	Mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar
pN1c	pN1a und pN1b
pN2	Metastasen in 4 bis 9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Metastasen
pN2a	Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten, darunter mindestens eine > 2 mm
pN2b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3a	Metastasen in ≥10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (wenigstens eine > 2 mm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 2 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Untersuchung des/der Sentinel-Lymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pM-Klassifikation (Fernmetastasierung)	
pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 6-7: UICC-Stadieneinteilung des humanen Mammakarzinoms [23, 330].

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1mic, T1	N0	M0
IB	T0, T1mic, T1	N1mi	M0
IIA	T0, T1mic, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0, T1mic, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
IIIC	Alle T	N3	M0
IV	Alle T	Alle N	M1

6.2.2 Grading des humanen Mammakarzinoms

Invasive Tumoren werden hinsichtlich einer Einschätzung ihrer Aggressivität (Malignität) nach ihrem histologischen Grad klassifiziert. Dieser ergibt sich aus der Differenzierung der Zellen (Tubulusbildung und Zellkernpolymorphie) und ihrer proliferativen Aktivität (Mitoserate). Das nach Elston und Ellis definierte Bewertungssystem des Tumorgrades teilt Karzinome anhand eines **Summenscores** in die prognostisch relevanten Klassen Grad 1 bis 3 ein. Grad 1 entspricht einem gut differenzierten Tumor mit geringem Malignitätsgrad, während Grad 3 mit einer schlechten Differenzierung sowie der höchsten Malignität assoziiert ist (siehe Tabelle 6-8 und Tabelle 6-9) [22].

Tabelle 6-8: Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms

Merkmal	Kriterium	Wert
Tubulusbildung	75 %	1
	10 - 75 %	2
	< 10 %	3
Kernpolymorphie	gering	1
	mittelgradig	2
	stark	3
Mitose-Rate	0-5/10 HPF ^a	1
	6-11/10 HPF ^a	2
	≥ 12/10 HPF ^a	3
Summenscore		3-9

^aHPF: *High Power Field* (400-fache Vergrößerung)

Tabelle 6-9: Bewertungssystem des histologischen Summenscores

Summenscore	Malignitätsgrad	Grad	Definition
3, 4, 5	gering	G1	gut differenziert
6, 7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8, 9	hoch	G3	schlecht differenziert

6.3 Auflistung der über SFRP1-regulierten Transkripte

Die in der *Microarray*-basierten Genexpressionsanalyse identifizierten differenziell auf- bzw. herabregulierten Transkripte im BT-20-Tumormodell sind in Tabelle 6-10 bzw. Tabelle 6-11 angegeben.

Tabelle 6-10: Über SFRP1 differenziell aufregulierte Transkripte im BT-20-Tumormodell

Probenset-ID ^a	Gensymbol ^b	FC <i>SFRP1</i> vs. Leer (linear)	P-Wert ^c
17106398	<i>SLC6A14</i>	20,72	0,048558
17106357	<i>PLS3</i>	17,79	0,025012
17125702		13,44	0,036017
17020846	<i>COL12A1</i>	9,22	0,008026
16942692		8,85	0,029974
17076609	<i>SFRP1</i>	5,41	0,000040
16971414		4,89	0,038053
17124830		3,97	0,008679
16968122	<i>FRAS1</i>	3,60	0,003796
16995241	<i>UGT3A2</i>	3,46	0,014760
17087413	<i>GALNT12</i>	2,87	0,004963
17120690		2,81	0,006205
16861126	<i>UPK1A</i>	2,69	0,039687
16934241		2,66	0,015294
16883647	<i>IL1R1</i>	2,63	0,022660
16696295	<i>KIFAP3</i>	2,61	0,016046
16771462		2,60	0,041559
16653821		2,58	0,049276
17077191	<i>LOC100507516</i>	2,52	0,043635
17124944		2,50	0,001590
16656299		2,42	0,018135
17124832		2,41	0,002152
16702285	<i>ITIH2</i>	2,39	0,002390
16654403		2,36	0,022935
17061662	<i>LAMB1</i>	2,29	0,005244
16962316	<i>LIPH</i>	2,20	0,006115
16711562	<i>SFMBT2</i>	2,16	0,008726
16907812	<i>ACADL</i>	2,16	0,014498
17121204		2,16	0,033518
16704454	<i>LOC100507539</i>	2,12	0,005554
16768923	<i>SLC9A7P1</i>	2,11	0,018997
16748835	<i>PIK3C2G</i>	2,11	0,036105
16743262	<i>SLC36A4</i>	2,10	0,017322
16944588	<i>SLC15A2</i>	2,08	0,048188
17011812		2,07	0,047352
17109464	<i>SCML2</i>	2,06	0,000592
17063977	<i>LOC154761</i>	2,05	0,049883
16921171	<i>HAR1B</i>	2,04	0,016511
16966514	<i>ATP10D</i>	2,03	0,037822
16966685	<i>SPATA18</i>	2,02	0,016308
16651023		2,02	0,039923

^aGeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, USA). ^bFür nicht codierende Transkripte konnte kein Gensymbol angegeben werden. ^cDie P-Werte wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse ermittelt.

Tabelle 6-11: Über SFRP1 differenziell herabregulierte Transkripte im BT-20-Tumormodell

Proben-ID^a	Gensymbol^b	FC <i>SFRP1</i> vs. Leer (linear)	P-Wert^c
16970762	<i>PCDH10</i>	-15,39	0,014492
16864907	<i>ERVV-2</i>	-7,45	0,013142
16654995		-5,12	0,001402
16979800		-4,65	0,044607
16677451	<i>KCNK2</i>	-4,51	0,000078
16653873		-3,34	0,013304
16653163		-2,74	0,007837
16652325		-2,34	0,005098
16753270	<i>SLC16A7</i>	-2,33	0,049719
16688615	<i>SLC44A5</i>	-2,32	0,023944
17045078	<i>BMPER</i>	-2,26	0,035233
16656239		-2,20	0,027470
16876162		-2,15	0,026096
16817630	<i>QPRT</i>	-2,12	0,040406
16655999		-2,04	0,019454

^aGeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, USA). ^bFür nicht codierende Transkripte konnte kein Gensymbol angegeben werden. ^cDie P-Werte wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse ermittelt.

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der weiblichen Brustanatomie.	1
Abbildung 1-2: Verteilung der zehn häufigsten Krebsneuerkrankungen der Frau im Jahre 2012 in Deutschland.	2
Abbildung 1-3: Altersstandardisierte, Brustkrebs-spezifische Inzidenz- und Mortalitätsrate in Deutschland in den Jahren 1999 – 2012.	3
Abbildung 1-4: Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinoms.	9
Abbildung 1-5: Darstellung elementarer Tumoreigenschaften.	10
Abbildung 1-6: Das Zusammenspiel epigenetischer Mechanismen zur Inaktivierung von Genen.	15
Abbildung 1-7: Schematische Darstellung des WNT-Signalweges.	18
Abbildung 1-8: Modell der potentiellen biphasischen Rolle des PCP-Signalweges in der humanen Tumorgenese.	21
Abbildung 1-9: Strukturelle Homologie der Vertreter der Dickkopf-Familie.	22
Abbildung 1-10: Strukturelle Homologie der Vertreter der SFRP-Familie zu den Frizzled-Rezeptoren.	24
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des <i>DKK3</i> -pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektors.	37
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung eines typischen sigmoidalen Kurvenverlaufs einer <i>Real-Time</i> PCR.	43
Abbildung 2-3: Prinzip der Bisulfit-Konversion genomischer DNA.	44
Abbildung 2-4: Prinzip der Pyrosequenzierung.	46
Abbildung 2-5: Messprinzip des <i>CASY@ Cell Counter and Analyzer</i>	59
Abbildung 3-1: Verlust der <i>DKK3</i> -mRNA-Expression in humanen, kryokonservierten Mammakarzinomen.	68
Abbildung 3-2: Verlust der <i>DKK3</i> -mRNA-Expression in humanen Mammakarzinomen (<i>in silico</i> -Datensatz).	70
Abbildung 3-3: Der <i>DKK3</i> -Protein-Expressionsverlust im humanen Mammakarzinom.	72
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der untersuchten 5'-Region des <i>DKK3</i> -Gens.	74
Abbildung 3-5: Erhöhte <i>DKK3</i> -DNA-Methylierung im humanen Mammakarzinom.	75
Abbildung 3-6: Methylierungsfrequenz von 14 einzelnen CpG-Dinukleotide in der 5'-Region des <i>DKK3</i> -Gens (<i>in silico</i> -Datensatz).	76
Abbildung 3-7: Der Verlust der <i>DKK3</i> -mRNA-Expression ist mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben assoziiert.	79

Abbildung 3-8: Verlust der <i>DKK3</i> -mRNA-Expression in humanen Mammakarzinom-Zelllinien.	80
Abbildung 3-9: Verifizierung der <i>DKK3</i> -Reexpression in stabil transfizierten Einzelklonen der beiden basalen Zelllinien MDA-MB-436 und MDA-MB-231 sowie der beiden luminalen Zelllinien MDA-MB-453 und MCF-7 mittels <i>Real-Time</i> PCR- und <i>Western-Blot</i> -Expressionsanalysen.....	81
Abbildung 3-10: Der Einfluss von <i>DKK3</i> auf das Koloniebildungsvermögen luminaler Mammakarzinom-Zelllinien.....	83
Abbildung 3-11: Der Einfluss von <i>DKK3</i> auf das Koloniebildungsvermögen basaler Mammakarzinom-Zelllinien.	84
Abbildung 3-12: Die Zellmorphologie der mesenchymalen Brustkrebszelllinie MDA-MB-436 in Abhängigkeit einer forcierten <i>DKK3</i> -Reexpression.	85
Abbildung 3-13: Der Einfluss von <i>DKK3</i> auf das Zellwachstum von Mammakarzinom-Zelllinien.	87
Abbildung 3-14: Der Einfluss von <i>DKK3</i> auf die Apoptoserate von Mammakarzinom-Zelllinien.	88
Abbildung 3-15: Der Einfluss von <i>DKK3</i> auf die Zell-Matrix-Adhäsion von Mammakarzinom-Zelllinien.	90
Abbildung 3-16: Der Einfluss von <i>DKK3</i> auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231.	92
Abbildung 3-17: Der Einfluss von <i>DKK3</i> auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-436.	93
Abbildung 3-18: Die ektopische Reexpression von <i>DKK3</i> resultierte in basalen MDA-MB-436- und MDA-MB-231-Zellen in einem Expressionsverlust mesenchymaler- bzw. einer Aufregulation epithelialer Marker.	94
Abbildung 3-19: Schema des Zellkultur-Analyseverfahrens zur Bestimmung des konzentrationsabhängigen Einflusses der Testsubstanzen auf das Zellwachstum sowie das Genexpressionsprofil des BT-20-Zellkulturmodells.	97
Abbildung 3-20: Der Einfluss bekannter WNT-Signalweg- und SFRP1-Inhibitoren auf das Zellwachstum des BT-20-Zellkulturmodells.	98
Abbildung 3-21: Der Einfluss der zwölf potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum des BT-20-Leervektor-Klons bei einer Konzentration von 10 µM.	100
Abbildung 3-22: Der Einfluss von acht ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum des BT-20-Zellkulturmodells.	102
Abbildung 3-23: Relative <i>SFRP1</i> -mRNA-Expression der beiden humanen Mammakarzinom-Zelllinien HCC-1143 und HCC-1806 im Vergleich zu der des BT-20-Leervektor-Klons.....	103
Abbildung 3-24: Der Einfluss von vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum von humanen Mammakarzinom-Zelllinien.	104

Abbildung 3-25: Exemplarische Darstellung der <i>Real-Time</i> PCR-basierten Expressionsanalyse ausgewählter Zielgene der SFRP1-Wirkung im BT-20-Zellkulturmodell.	107
Abbildung 3-26: Der Einfluss des SFRP1-Inhibitors WAY-316606 auf die mRNA-Expression von <i>PCDH10</i> im BT-20-Zellkulturmodell.	108
Abbildung 3-27: Der Einfluss der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf die mRNA-Expression von <i>PCDH10</i> im BT-20-Leervektor-Klon.	110
Abbildung 3-28: Der Einfluss der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Koloniebildungsvermögen des BT-20-Leervektor-Klons.	112
Abbildung 3-29: Der Einfluss der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf die Apoptoserate des BT-20-Leervektor-Klons.	114
Abbildung 3-30: Der Einfluss von vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika auf den Wundschluss des BT-20-Leervektor-Klons.	116
Abbildung 3-31: Der direkte Vergleich des Einflusses der vier potentiellen SFRP1-Mimetika auf das Zellwachstum sowie den Wundschluss des BT-20-Leervektor-Klons.	117

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Die molekulare Subtypen des humanen Mammakarzinoms.....	6
Tabelle 1-2: Je nach molekularem Subtyp empfohlene systemische Therapie	8
Tabelle 2-1: Verwendete humane Mammakarzinom-Zelllinien und ihre Ursprungsgewebe ..	29
Tabelle 2-2: Verwendete Transfektanden humaner Mammakarzinom-Zelllinien	29
Tabelle 2-3: Geräte	30
Tabelle 2-4: Software und Datenbanken	31
Tabelle 2-5: Lösungsmittel	31
Tabelle 2-6: Chemikalien.....	32
Tabelle 2-7: Allgemeine Puffer und Lösungen	33
Tabelle 2-8: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	33
Tabelle 2-9: Puffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und <i>Western Blot</i>	33
Tabelle 2-10: Puffer und Lösungen für die Zellkultur	33
Tabelle 2-11: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien	34
Tabelle 2-12: Zusammensetzung der Medien für die Bakterienkultivierung	34
Tabelle 2-13: Verwendete Primärantikörper	34
Tabelle 2-14: Verwendete Sekundärantikörper.....	35
Tabelle 2-15: Verwendete Inhibitoren	35
Tabelle 2-16: Molekularbiologische und proteinchemische Kits und Reagenzien	35
Tabelle 2-17: Oligonukleotide zum Nachweis der stabilen genomischen Plasmid-Integration	35
Tabelle 2-18: Oligonukleotide für die <i>Real-Time</i> PCR.....	36
Tabelle 2-19: Oligonukleotide für die Pyrosequenzierung.....	36
Tabelle 2-20: Oligonukleotide für Sanger-Sequenzierung.....	37
Tabelle 2-21: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die cDNA-Synthese	40
Tabelle 2-22: Zusammensetzung einer Standard-PCR.....	40
Tabelle 2-23: Temperaturprofil einer Standard-PCR.....	41
Tabelle 2-24: Zusammensetzung eines <i>Real-Time</i> PCR-Reaktionsansatzes	42
Tabelle 2-25: Temperaturprofil einer typischen <i>Real-Time</i> PCR	42
Tabelle 2-26: Zusammensetzung einer Prä-Pyro-PCR	47
Tabelle 2-27: Temperaturprofil einer Prä-Pyro-PCR	47

Tabelle 2-28: Zusammensetzung einer Sequenzierungs-PCR	50
Tabelle 2-29: Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR	50
Tabelle 2-30: Aufsteigende Alkoholreihe	52
Tabelle 2-31: Absteigende Alkoholreihe	53
Tabelle 2-32: Letale G418-Konzentrationen	60
Tabelle 2-33: Transfektions-Schema	61
Tabelle 2-34 Verdünnungsreihe für die Einzelklon-Isolation	61
Tabelle 3-1: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des Kryogewebe-Kollektivs mit der <i>DKK3</i> -mRNA-Expression.....	69
Tabelle 3-2: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des <i>in silico</i> -Datensatzes (TCGA) mit der <i>DKK3</i> -mRNA-Expression.....	71
Tabelle 3-3: Korrelation der mittleren Methylierungsfrequenz des untersuchten <i>DKK3</i> -Genabschnitts mit der <i>DKK3</i> -mRNA-Expression.	78
Tabelle 3-4: Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) der drei getesteten WNT-Signalweg-Inhibitoren in der Zellwachstums-Analyse des BT-20-Zellkulturmodells.	99
Tabelle 3-5: Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) der acht getesteten putativen SFRP1-Mimetika in der Zellwachstums-Analyse des BT-20-Zellkulturmodells. ...	101
Tabelle 3-6: Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) der vier ausgewählten potentiellen SFRP1-Mimetika in der Zellwachstums-Analyse humaner Mammakarzinom-Zelllinien.	105
Tabelle 3-7: Ausgewählte, SFRP1-assoziierte Gene im BT-20-Zellkulturmodell.	107
Tabelle 3-8: Tabellarische Zusammenfassung der im BT-20-Zellkulturmodell infolge einer Inkubation mit den putativen SFRP1-Mimetika bzw. einer forcierten SFRP1-Reexpression beobachteten Effekte.....	118
Tabelle 6-1: Klinisch-pathologische Parameter des Mammakarzinom-Kryogewebe-Kollektivs für die <i>DKK3</i> -mRNA-Expressionsstudie.....	162
Tabelle 6-2: Klinisch-pathologische Parameter des Tissue Microarrays für die <i>DKK3</i> -Protein-Expressionsstudie.	163
Tabelle 6-3: Klinisch-pathologische Parameter des Mammakarzinoms-DNA-Kollektivs für die <i>DKK3</i> -Gen-Methylierungsstudie.	164
Tabelle 6-4: Klinisch-pathologische Parameter des <i>in silico</i> -Mammakarzinom-Kollektivs für die <i>DKK3</i> -mRNA-Expressionsstudie (<i>The Cancer Genome Atlas-Plattform</i>).	165
Tabelle 6-5: Klinisch-pathologische Parameter des <i>in silico</i> -Mammakarzinom-Kollektivs für die <i>DKK3</i> -Gen-Methylierungsstudie (<i>The Cancer Genome Atlas-Plattform</i>).	166
Tabelle 6-6: pTNM-Klassifikation des humanen Mammakarzinoms.....	167
Tabelle 6-7: UICC-Stadieneinteilung des humanen Mammakarzinoms	168

Tabelle 6-8: Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms.....	168
Tabelle 6-9: Bewertungssystem des histologischen Summscores	168
Tabelle 6-10: Über SFRP1 differenziell aufregulierte Transkripte im BT-20-Tumormodell ..	169
Tabelle 6-11: Über SFRP1 differenziell herabregulierte Transkripte im BT-20-Tumormodell	170

6.6 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 12. Mai 2017