

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Molekulare Bedeutung von p38 für Mammakarzinom-Zellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von  
Johanna Theresia Engelhardt  
geb. Kreuzburg  
aus Höxter

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Einleitung .....	1
2 Literaturdiskussion .....	3
2.1 Mammakarzinom.....	3
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms.....	3
2.1.2 Risikofaktoren .....	4
2.1.3 Formalpathogenetische-Reaktionsfolge .....	4
2.1.4 Einteilung des Mammakarzinoms .....	6
2.1.5 Therapie und klinischer Verlauf .....	8
2.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen .....	10
2.2.1 Aktivierung, Regulierung und Inhibition von p38 MAPK.....	10
2.2.2 Downstraming Produkte von p38 MAPK.....	11
2.2.3 Isoformen von p38 MAPK.....	13
2.3 Erläuterung der Transfektionsmethode .....	14
2.3.1 Bau und Funktion von Plasmamembranen .....	14
2.3.2 Wahl der Transfektionsmethoden .....	15
2.3.3 Wirkmechanismus von siRNA.....	16
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material .....	18
3.1.1 Kit-Systeme .....	18
3.1.2 Gebrauchsmaterialien.....	18
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.4 Geräte.....	19
3.1.5 Puffer und Lösungen .....	20
3.1.6 Zellmedium .....	21

3.1.7	siRNA .....	21
3.1.8	Chemikalien und Reagenzien .....	22
3.1.9	Primer .....	23
3.2	Zellkulturmethoden.....	24
3.2.1	Kontinuierliche Zelllinien .....	24
3.2.2	Steriles Arbeiten .....	25
3.2.3	Kultivierung humaner Zelllinien.....	25
3.2.4	Kryo-Konservierung .....	27
3.2.5	Zellkonzentrationsbestimmung .....	27
3.3	Transfektion .....	28
3.3.1	Vorbereitung zur Transfektion .....	28
3.3.2	Wahl der richtigen Transfektionsreagenzien.....	28
3.3.3	Durchführung der Transfektion .....	28
3.4	Arbeit mit Nukleinsäuren .....	32
3.4.1	RNA-Isolation.....	32
3.4.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
3.4.3	cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase PCR.....	33
3.4.4	Quantitativen Echtzeit-PCR .....	35
3.4.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	38
3.5	Funktionelle Zellanalyse.....	39
3.5.1	MTT- Assay .....	39
3.5.2	Migration in der Boydenkammer .....	39
4	Ergebnisse .....	42
4.1	Bestimmung der Haushaltsgene .....	42
4.2	Qualitätsüberprüfung der qRT-PCR .....	44
4.2.1	Nachweis der Amplifikationsprodukte .....	44
4.2.2	Überprüfung von Schmelzkurve und Schmelzpunkt .....	45
4.3	Vorversuche .....	48

4.3.1	Wahl der Zellzahl .....	48
4.3.2	An einem Beispiel dargestellter Vorversuch .....	48
4.4	Expressions-Nachweis von p38 $\alpha$ und p38 $\beta$ .....	51
4.5	Ergebnisse des p38 $\alpha$ Knockdowns .....	53
4.6	Einfluss des p38 $\alpha$ -Knockdowns auf die Zellviabilität .....	55
4.7	Einfluss des p38 $\alpha$ -Knockdowns auf die Zellmigration .....	57
5	Diskussion .....	61
5.1	Einfluss des Expressionsausmaßes von p38 $\alpha$ auf Mammakarzinom-Zellen	61
5.2	Auswirkungen des p38 $\alpha$ -Knockdowns auf die Viabilität .....	62
5.3	Auswirkung des p38 $\alpha$ -Knockdowns auf die Migration .....	64
5.4	Methodendiskussion.....	68
5.4.1	Diskussion der Expressionsanalyse .....	68
5.4.2	Wahl des Zeitintervalls zur Analyse des Zellverhaltens .....	69
5.5	Ausblick.....	72
6	Zusammenfassung.....	73
7	Literaturverzeichnis .....	75
8	Anhang.....	85
8.1	Werte zur Abbildung 11 .....	85
8.2	Werte zur Abbildung 12.....	85
8.3	Werte zur Abbildung 13.....	86
8.4	Werte zum Kapitel 5.2 .....	87
8.5	Werte zur Abbildung 14 .....	87
8.6	Werte zum Kapitel 5.3 .....	88
9	Danksagung .....	89
10	Lebenslauf.....	90

## Abkürzungsverzeichnis

AK	aktinischen Keratose
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5J	ATP synthase-coupling factor 6
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA1	BReast CAncer 1
BRE-Graduierung	Bloom und Richardson
cDNA	korrespondierende DNA
CK	Casein kinase
Cp	Crossing Point
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>dNTP</i>	Desoxyribonukleosidtriphosphaten
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
dsRNA	doppelsträngiges RNA-Molekül
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ER	Estrogen receptor
ERK	extrazellulär-signalregulierte Kinasen
FCS	Fetal calf serum
GMP	Guanosinmonophosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDI	UNDP-Index für menschliche Entwicklung
HPRT	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase
ICL	Invasive lobuläre Karzinom
IMP	Inosinmonophosphat
IMP	Inosinmonophosphat
JAK	Janus-family tyrosine kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccharide
MAP2K	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK	MAP kinase activated protein kinase
MEKK	MAPK/Erk kinase kinase
miRNA	microRNA
MK	MAP kinase activated protein kinase
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MKP	MAP kinase phosphatase
MSK	Mitogen and stress activated kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid

NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NPI	Nottingham Prognostic Index
NST	No special type (Brustkrebs)
OD	der optischen Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PKA	Protein kinase A
PR	Progesterone receptor
pRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RAS	Rat sarcoma
RE	Relative Einheit
<i>Ribo Lock</i>	RN-ase Inhibitoren
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reversen Transkriptase
<i>RT-Buffer</i>	Erststrang-Puffers
SAPKs	stress-aktivierte Proteinkinasen
SCC	Plattenepithelkarzinom
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	short interfering RNA
TAB1	TAK1-bindendes Protein 1
TK	Thymidinkinase
TKL	Tyrosinekinase-like kinase
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TNBC	dreifach negativen Mammakarzinoms
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNM	Tumor Nodus Metastasen
TP53	Tumor Protein 53
Tsd.	Tausend
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Kennzeichen von Tumoren.....	5
Abbildung 2 Übersicht p38-Signalkaskade .....	12
Abbildung 3 Transfektionsvorgang und Funktion von siRNA.....	17
Abbildung 4 Formel zu Berechnung der Fehlerfortpflanzung.....	38
Abbildung 5 Auswertung des Migrations-Versuches .....	41
Abbildung 6 Expressionsniveau möglicher Haushaltsgene von MCF-7-Zellen.....	44
Abbildung 7 Nachweis der Amplifikationsprodukte der Primer. ....	45
Abbildung 8 Schmelzkurven und Schmelzpunkt von HPRT .....	47
Abbildung 9 Vorversuch eines p38 Knockdowns bei MCF-7-Zellen .....	49
Abbildung 10 Vergleich der Viabilität nach p38 $\alpha$ Knockdown zur Nativ-Kontrolle.....	51
Abbildung 11 Quantitative Expressions-Analyse von MAPK14 und MAPK11 .....	52
Abbildung 12 P38 $\alpha$ -Reduktion nach Knockdown mit MAPK14-spezifischer siRNA..	55
Abbildung 13 Viabilität nach p38 $\alpha$ Knockdown und Negativ-Kontrolle.....	57
Abbildung 14 Migration nach p38 $\alpha$ -Knockdown und der Negativ-Kontrolle .....	59
Abbildung 15 Mikroskopische Aufnahme der porösen Membran der Boydenkammer	60
Abbildung 17 P53 im Phospho-Kinase-Array.....	65
Abbildung 16 Hemmende Wirkung von siRNA auf die mRNA und ihr Protein.....	71

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Grundlegende Merkmale der molekularen Subtypen von Brustkrebs .....	7
Tabelle 2 Verwendete Primer .....	23
Tabelle 3 Zellkulturgefäße .....	26
Tabelle 4 Transfektionsunterschiede der Zelllinien.....	30
Tabelle 5 Transfektionsreagenz I .....	31
Tabelle 6 Transfektionsreagenz II .....	31
Tabelle 7 Reaktionsansatz I der cDNA-Synthese.....	34
Tabelle 8 Reaktionsansatz II der cDNA-Synthese.....	35
Tabelle 9 Verdünnungsreihe.....	36
Tabelle 10 Pipettierschema qRT-PCR.....	37
Tabelle 11 Schmelzpunkte der qRT-PCR-Produkte .....	46

## 1 Einleitung

Der älteste Nachweis von Brustkrebs reicht mehr als 4.200 Jahre zurück. So fanden Anthropologen 2015 im ägyptischen Qubbet el-Hawa einen Sarg mit dem wohl ersten Hinweis in der Geschichte, ein weibliches Skelett mit klassischen Verformungen des metastasierten Mammakarzinoms. Einen schriftlichen Nachweis bietet der Papyrus Edwin Smith. Darauf wurde neben 48 weiteren chirurgischen Verfahren die Therapie des Mammakarzinoms beschrieben mit den Worten: "Es gibt keine Behandlung." (1, 2). Glücklicherweise hat sich dies inzwischen gravierend geändert. Laut Schätzungen des Global Cancer Observatory ist die Letalität des Mammakarzinoms seit Mitte der 90er Jahre rückläufig, bei steigender Inzidenz. Dies ist zurückzuführen auf die unermüdliche Erforschung von Therapie- und Präventionsmöglichkeiten. Trotz aller Erkenntnisse und Bemühungen sind jedoch im Jahr 2020 weltweit 650.000 Frauen aufgrund von Brustkrebs verstorben. Es besteht also weiterhin erheblicher Bedarf an Therapiekonzepten (3, 4). Ein wichtiger Schwerpunkt ist dabei die Identifizierung neuer therapeutischer Zielgene wie MAPK14, welches für p38 $\alpha$  codiert (5).

P38 ist eine Serin-/Threonin-Kinase und gehört zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Zu unterscheiden sind vier Isoformen, wobei p38 $\alpha$  aufgrund seiner hohen Expression in Mammakarzinom-Zellen eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird. P38 $\alpha$  vermittelt eine Vielzahl von zellulären Verhaltensweisen als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Zellwachstum und -differenzierung, Apoptose, Entzündung sowie Reaktionen auf verschiedene Umweltbelastungen (6-8). Auch eine Beeinflussung der Tumorgenese wird vermutet. So wird weltweit derzeit der tumorfördernde bzw. tumorhemmende Effekt von p38 $\alpha$  in Bezug auf das Mammakarzinom erforscht (9).

Vorarbeiten mit dem p38-spezifischen Inhibitor Skepinone-L geben Hinweise auf einen tendenziell tumorhemmenden Einfluss von p38 auf Brustkrebszellen (10, 11). In dieser Arbeit sollte eben dieser Effekt durch gezieltes Ausschalten von p38 $\alpha$  auf posttranskriptionaler Ebene überprüft werden. Dabei sollte die Methode der Transfektion von Mammakarzinom-Zellen mit MAPK14-spezifischer siRNA etabliert und ein Transfektionsprotokoll erstellt werden. Inhaltlich sollte geklärt werden, ob der mit Skepinone-L gefundene Effekt tatsächlich p38-abhängig ist, ferner ob p38 einen tumorhemmenden oder einen tumorfördernden Effekt auf Mammakarzinom-Zellen

besitzt. Die erwarteten Ergebnisse könnten dazu beitragen, gezielt Medikamente für die Therapie von Brustkrebs zu entwickeln.

Migration gilt als wesentliches Merkmal von Krebszellen. Es handelt sich dabei um die Fähigkeit von Zellen, den Zellverband zu verlassen, in andere Gewebe einzuwandern und dort Metastasen zu bilden. Ähnliche Rückschlüsse können über die Viabilität als Merkmal maligner Krebszellen getroffen werden (12). Eine gesteigerte Viabilität impliziert, dass die Zellen in der Lage sind, Apoptose zu umgehen und ihr Überleben zu sichern. Insofern sind die Untersuchung von Migration und Viabilität etablierte Verfahren, um Hinweise auf einen tumorfördernden bzw. tumorhemmenden Effekt von p38 in Bezug auf das Mammakarzinom zu gewinnen.

Auf dieser Basis wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das funktionelle Zellverhalten mit *MAPK14*-spezifischer-siRNA transfizierter Zellen analysiert. Als Zielwert für einen erfolgreichen p38 $\alpha$ -Knockdown wurde dabei die Grenze bei mindestens 60 % angesetzt; ab dieser Marke wird ein Effekt auf das zelluläre Verhalten erwartet. Die Restexpression liegt dann unter 40 %. Die Effektivität des Knockdowns wurde anhand der Genprodukte bestimmt, die mithilfe der qRT-PCR identifiziert werden. Mit Negativ-Kontroll-siRNA behandelte Zellen dienten dabei als Referenz. Zur Untersuchung wurden zwei maligne Zelllinien herangezogen, die sich in der Genexpression von Progesteron- und Östrogenrezeptoren unterscheiden, sowie eine immortalisierte, nicht-karzinöse Epithelzelllinie als Vergleichsgrundlage.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Mammakarzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. So wurden im Jahr 2018 weltweit ca. 2.1 Mio. Neuerkrankungen und 630 Tsd. Todesfälle registriert (13). Mit regionalen Unterschieden konnte ein insgesamt stetiger Anstieg der Inzidenz beobachtet werden (14).

In Deutschland wird davon ausgegangen, dass jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt, Männer sind mit 1 % aller Neuerkrankungen weitaus weniger betroffen. So meldete das Robert Koch-Institut 69.000 Neuerkrankungen und 6.000 In-situ-Tumoren für das Jahr 2017. Dabei lag das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist abhängig von dem UICC-Stadium bei Erstdiagnose. Diese variiert von annähernd 100 % in Stadium 1 bis hin zu 29 % im Stadium 4 und verdeutlicht in beeindruckender Weise die Bedeutung der Früherkennung (15). So konnte (in Deutschland seit 2002) die Chance nach Erkrankung an einem Mammakarzinom zu genesen durch die Einführung des Brustkrebs-Mammographie-Screenings für Frauen im Alter von 50 – 69 Jahren erheblich verbessert werden. Studien weisen auf eine Reduktion der Mortalität um bis zu 35 % hin, was dadurch zu erklären ist, dass das Mammakarzinom häufiger als In-situ-Tumor oder in gut therapierbarem Frühstadium entdeckt wird. Fortschritte in der Therapie sowie die Etablierung spezialisierter Brustkrebszentren haben zudem maßgeblich zur Verbesserung der Überlebenschancen beigetragen (15, 16). Daneben scheinen auch soziale und gesellschaftliche Faktoren eine wesentliche Rolle zu spielen. Eine von der WHO veranlasste Studie aus dem Jahr 2020 hat gezeigt, dass Länder mit einem geringen UNDP-Index für menschliche Entwicklung (HDI) eine weitaus größere Belastung durch Neuerkrankungen von prämenopausalem Brustkrebs aufweisen sowie eine höhere Mortalität im Vergleich zu Ländern mit höherem Einkommen. In Ländern mit hohem HDI konnte hingegen ein Anstieg von postmenopausalem Brustkrebs verzeichnet werden. Dieser ist, so wird vermutet, am ehesten auf eine höhere Prävalenz der bekannten Risikofaktoren zurückzuführen (14).

### 2.1.2 Risikofaktoren

Hinsichtlich der Risikofaktoren wird grundsätzlich zwischen solchen hereditärer und hormoneller Natur unterschieden. Allerdings können auch Umwelteinflüsse zur Entstehung von Brustkrebs beitragen.

Bei 10 % aller Brustkrebs-Erkrankungen lässt sich eine erbliche Komponente finden. Neben den seltenen, aber klar definierbaren Keimbahnmutationen der BRCA1-, BRCA2- oder PALB2-Gene sowie anderer erblicher Krebs syndrome, z.B. des Li-Fraumeni-Syndroms, gehört auch die positive Familienanamnese bei Verwandten 1. Grades dazu (17, 18).

Hormonelle Risikofaktoren beruhen auf einem langen hormonell aktiven Zeitraum. Dieser kann z.B. durch frühe Menarche, späte Menopause, Nullipara, späte erste Schwangerschaft sowie fehlende oder kurze Stillzeit entstehen. Östrogen produzierende Ovarialtumoren, Hormonersatztherapie bei klimakterischen Beschwerden in der Postmenopause und Adipositas (v.a. in der Postmenopause) erhöhen ebenfalls das Karzinom-Risiko. Als möglicher Risikofaktor wird zudem die Einnahme oraler Kontrazeptiva diskutiert (19).

Zu den Mammakarziom fördernden Umwelteinflüsse gehören die Strahlenbelastung (besonders in jungen Jahren), der Konsum von Alkohol und Zigaretten. Aber auch ein Mangel an sportlichen Aktivitäten erhöht das Risiko (18, 20).

### 2.1.3 Formalpathogenetische-Reaktionsfolge

Am Anfang der Entstehung eines Mammakarzinoms steht eine Hyperplasie aufgrund einer initial proliferativen Deregulierung. Durch genetische Instabilität entwickelt diese im Verlauf einzelne Zellklone, welche kaskadenartig weitere genetische Störungen nach sich ziehen. Dabei kommt es u.a. zur Aktivierung unterschiedlicher Onkogene bzw. zur Hemmung von Tumorsuppressorgenen. Neoplasien, welche die Basalmembran noch nicht überwunden haben, werden als Carcinoma in situ bezeichnet. Diese Form der Entartung hat noch keinen Anschluss an die Blutversorgung und kann nicht metastasieren. Das invasive Karzinom entsteht aus dem Carcinoma in situ. Zum besseren Verständnis der Tumorgenese haben Hanahan und Weinberg 2011 die sog. Hallmarks of cancer beschrieben (20). Dabei handelt es sich um zehn Fähigkeiten der Tumorzelle, ihre Progression zu fördern und ihr

Überleben zu sichern (Abbildung 1). Demnach können Tumorzellen ihr eigenes Wachstum selbst stimulieren, sich unlimitiert teilen und sich durch genomische Instabilität und Mutation einen Überlebensvorteil verschaffen. Außerdem sind sie in der Lage Wachstumsinhibitoren, Apoptose und Angriffe des Immunsystems zu umgehen. Sie können Angiogenese betreiben, Metastasen bilden, den Metabolismus der Zelle regulieren und stehen im Zusammenhang mit tumorfördernden Entzündungen (12, 21). Das Bestreben, diese Fähigkeiten gezielt zu unterbinden, kennzeichnet den Ansatz unserer derzeitigen onkologischen Therapie und bildet dabei gleichzeitig das Fundament aktueller Krebsforschung.

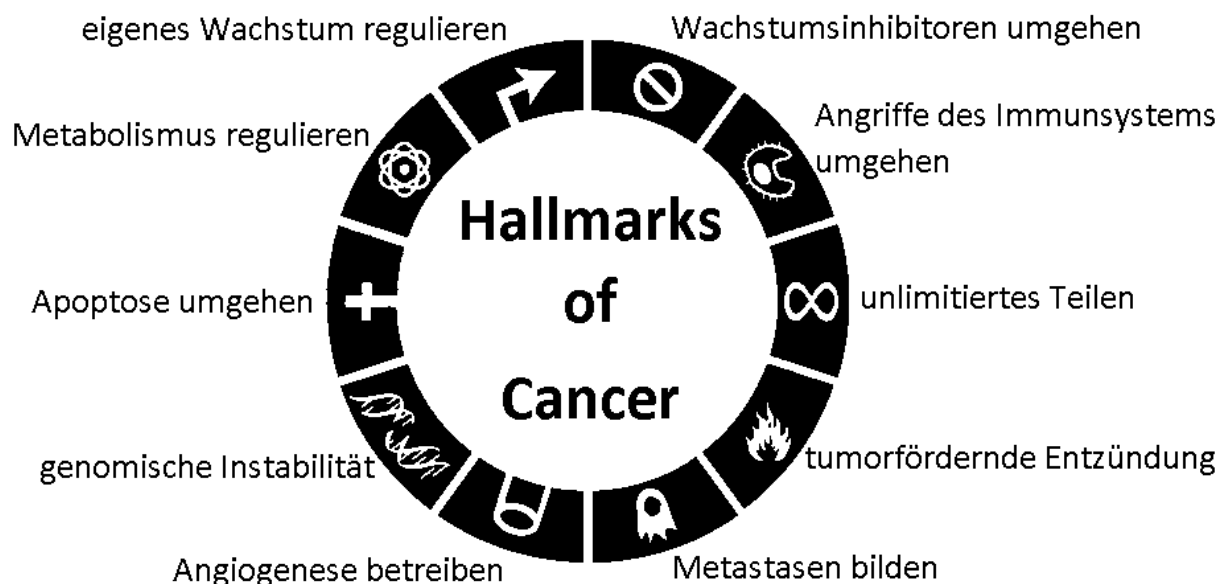


Abbildung 1 Kennzeichen von malignen Tumoren.

Die Abbildung zeigt zusammengefasst die von Hanahan et al. definierten Hallmarks of Cancer, welche nahezu in allen malignen Tumoren auftreten.

Modifiziert nach Hanahan & Weinberg, 2011 (12).

#### 2.1.4 Einteilung des Mammakarzinoms

Neoplastische Veränderungen der Brust werden anhand ihrer pathomorphologischen Faktoren eingeteilt. Eine entscheidende Rolle spielen dabei der histologische Typ, die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse, der Differenzierungsgrad sowie der Proliferationsindex.

Die Einteilung des invasiven Mammakarzinoms erfolgt nach der WHO-Klassifikation des Ursprungsgewebes. Dabei wird zum einen unterschieden zwischen dem Invasiven Karzinom ohne speziellen Typ (NST), das etwa 75 % aller Mammakarzinome ausmacht, und dem Invasiven Karzinom mit speziellem Typ. Letzteres wird weiter unterteilt in Subtypen, von denen das Invasive lobuläre Karzinom (ICL) mit 76 % am häufigsten vertreten ist. Weitere Subtypen sind tubuläre und kribiforme Karzinome, die als wenig aggressiv eingestuft werden, wohingegen das Inflammatorische Karzinom mit einer schlechten Prognose einhergeht. Muzinöse und neuroendokrine Tumoren stellen weitere Subtypen dar (20, 22).

Zur quantitativen Abschätzung des Tumormaliginitätsgrades dient aktuell das Grading nach Elston und Ellis, die das Vorläufer-Verfahren von Bloom und Richardson (BRE-Graduierung) modifizierten und verbesserten. Mikroskopisch werden dabei das Ausmaß der Kernatypie, der Anteil tubulärer Strukturen sowie der Mitoseindex beurteilt und in Form eines Zahlenwertes zusammengefasst (Ellis-Score), der den Malignitätsgrad beschreibt (20, 23, 24).

Diagnostische Bedeutung hat darüber hinaus die Überexpression von Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR), die etwa 75 % aller invasiven Mammakarzinome betrifft und bereits seit 1960 bekannt ist. Dabei stimuliert Östrogen das Brustepithel zur Proliferation und fördert so gegebenenfalls das Wachstum des Tumors. Der Hormonstatus wird als positiv erachtet, wenn an mind. 1 % der Tumorzellkerne der Rezeptor nachgewiesen werden kann. Seit 1980 wird zudem immunhistochemisch der HER2/neu-Status untersucht. HER/2 steht für *human epidermal growth factor receptor 2*, welcher sich auf dem Chromosom 17 befindet. Er kann in 15 % der Fälle aller Mammakarzinomen nachgewiesen werden, ist assoziiert mit einem guten Ansprechen auf die Antikörpertherapie mit Trastuzumab und auf Lapatinib und deshalb therapeutisch von Bedeutung (25, 26).

Bei Zytokeratin 5/6 (CK 5/6) handelt sich um ein Strukturprotein des Zytoskeletts welches mit Hilfe von Antikörper in der Immunhistochemie nachgewiesen wird und

zum Ausschluss einer Invasion verwendet werden kann. Zudem dient der Nachweis von CK5/6 dazu, den basal-ähnlichen Subtyp des dreifach negativen Mammakarzinoms (TNBC) zu definieren, welches die anschließende Therapieentscheidung beeinflusst (27).

Mit Hilfe der beschriebenen pathomorphologischen Faktoren ist es möglich, jeden einzelnen Tumor sehr genau in seinen Eigenschaften zu beschreiben und anhand eines Algorithmus in vier Subtypen zu unterteilen: Luminal A und Luminal B, HER2-positiv und Basal-ähnlicher-Typ (Tabelle 1). Diese Klassifizierung ermöglicht eine gezielte Therapie, welche das Genexpressionsmuster des jeweiligen Tumors berücksichtigt. Zudem konnte mittels retrospektiver Studien ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Subtypen und des klinischen Verlaufs festgestellt werden (23, 28-30).

*Tabelle 1 Grundlegende Merkmale der molekularen Subtypen von Brustkrebs*

*Nach dem Leitlinienprogramm der Onkologie (23, 31)*

<b>Molekularer Subtyp</b>	<b>Expression von Steroidhormonrezeptors, HER2 und Cytokeratin</b>
<b>Luminal A</b>	ER+ und/oder PR+, HER2/neu-, CK5/6–
<b>Luminal B</b>	ER+ und/oder PR+, HER2/neu+, CK5/6–
<b>Basal-like</b>	ER-, PR-, HER2/neu-, CK5/6+
<b>HER2/neu</b>	ER-, PR-, HER2/neu+, CK5/6-

### 2.1.5 Therapie und klinischer Verlauf

Die Wahl der Therapie des Mammakarzinoms wird für jede Patientin im Rahmen eines interdisziplinären Tumorbordes anhand der aktuellen S3-Leitlinien individuell getroffen. Dabei spielen nicht nur die UICC/AJCC-Klassifikation und der molekulare Subtyp eine entscheidende Rolle, sondern auch der Allgemeinzustand und der Wunsch der Patientin. Im Allgemeinen wird unterschieden zwischen dem primär kurativen und dem palliativen Therapieansatz, wobei in der Regel erst im fortgeschrittenen Stadium (nach der UICC/AJCC-Klassifikation Stadium IV) bei Vorliegen von Fernmetastasen ein palliatives Vorgehen gewählt wird.

Laut den aktuellen S3-Leitlinien des Mammakarzinoms 2020 besteht die Therapie aus drei Säulen. Zum einem dem operativen Vorgehen, in dem zwischen brusterhaltender Therapie (BET) und Mastektomie unterschieden wird, zum anderen der primär systemischen Therapie sowie der Strahlentherapie, die sowohl adjuvant als auch neoadjuvant erfolgen können.

Bezüglich der systemischen Therapie ist zu erwähnen, dass Tumoren des Typs Luminal A in der Regel eine endokrine Therapie erhalten. Dabei wird postmenopausal ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator gegeben, wie Tamoxifen oder ein Aromatasehemmer; prämenopausal sind GnRH-Analoga die Mittel der Wahl. HER2-positive Mammakarzinome erhalten eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen HER2, beispielsweise mit Trastuzumab. Bei den übrigen Subtypen wird eine Polychemotherapie empfohlen. Klassische Chemotherapeutika sind in der Mammakarzinom-Therapie Anthracyclin, Taxan und Alkylanzien, aber auch Immunsuppressiva wie Methotrexat. Neuere Wirkstoffklassen sind die mTOR- und CDK4/6-Inhibitoren. Diese werden hauptsächlich bei Fernmetastasen oder bei Therapieresistenz angewendet (23).

Zunehmend Beachtung in der Therapieentscheidung bei Mammakarzinom findet auch der Multigentest, der bei Colon- und Pankreaskarzinomen zur Stratifizierung der klonalen Struktur bereits üblich ist. In der Brustkrebsdiagnostik wird er zurzeit hauptsächlich im Rahmen von Studien verwendet. Er ermöglicht, dass die einzelnen Subklone des Tumors sequenziert und nötige Kombinationstherapien eingeleitet werden können. Besonders in fortgeschrittenen Stadien mit Fernmetastasierung könnten diese zukünftig einen positiven Einfluss auf die Lebenserwartung haben (23, 32, 33).

Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung kann der klinische Verlauf stark variieren. Dabei hat sich bei nicht metastasierten Formen der Nottingham Prognostic Index (NPI) als bewährtes Hilfsmittel zur postoperativen Prognose-Einschätzung erwiesen. Dieser berücksichtigt neben der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus auch den histologischen Grad des Tumors. Es wird empfohlen, den NPI mit bekannten Prädiktivfaktoren wie dem Hormon-Status, dem HER2-Status, dem histologischen Subtyp sowie mit dem Alter der Patientin und dem Status der Wechseljahre zu ergänzen (34).

Für metastasierte Tumoren, Tumorrezidive und das TNBC ist gegenwärtig von einer besonders schlechten Prognose auszugehen. Sie bilden häufig Resistenzen mit einer hohen Anzahl von Subklonen und sprechen z.T. sehr schlecht auf die bisher bekannten Therapien an. Vor diesem Hintergrund erscheint es besonders wichtig, die schon vorhandenen Möglichkeiten weiterzuentwickeln und darüber hinaus neue Ansätze für eine gezielte Therapie zu finden, um die Prognose dieser schweren Verläufe zukünftig zu verbessern (32, 35). Ein besseres Verständnis der Signalwege in der Zelle ist aus diesem Grund anzustreben. Einer der wichtigsten Signalwege in der Tumorentstehung und Progression ist der der Mitogen-aktivierten Proteinkinase.

## 2.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zu den bei Eukaryoten evolutionär konservierten Enzymen. Sie vermitteln eine Vielzahl von zellulären Verhaltensweisen als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Zellwachstum und -differenzierung, Apoptose, Entzündung oder Reaktionen auf Umweltbelastungen (6).

Bei Säugetieren, so auch beim Menschen, lassen sich die MAPK, die zu den Serin/Threonin-Kinasen zählen, in Untergruppen einteilen: die JNKs (c-Jun N-terminale Kinasen), die ERKs (extrazellulär-signalregulierte Kinasen) sowie BMK1 (Big-MAPK-1) und die p38-MAPKs (36).

Das Zusammenwirken dieser Enzyme beschreibt die MAPK-Kaskade. Es handelt sich dabei um ein in der Regel dreistufiges Signalsystem, bestehend aus einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K), einer MAP-Kinase-Kinase (MAP-2K) und einer MAP-Kinase (MAPK). Alle MAPKs werden über ein Threonin-Xaa-Tyrosin-Motiv dual phosphoryliert. Diese duale Phosphorylierung bewirkt spezifische Möglichkeiten der Aktivierung einzelner MAPK-Untergruppen, wodurch ihre unabhängige Regulierung möglich wird (37). P38 wurde bereits als mögliches Target für die Therapie von Brustkrebs in Erwägung gezogen, konnte sich jedoch bislang nicht durchsetzen. Dies lag zumeist an Nebenwirkungen besonders an dem Nervensystem, dem Herzen und der Leber (38, 39).

### 2.2.1 Aktivierung, Regulierung und Inhibition von p38 MAPK

P38 kann sowohl klassisch über den kanonischen als auch alternativ über den nicht-kanonischen Weg aktiviert werden. Dem kanonischen Weg liegt das bereits beschriebene dreistufige MAPK-Kaskadensystem zugrunde. Ein alternativer Weg zeichnet sich durch die Autophosphorylierung von p38 durch TAK1 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase-7) aus (38, 40, 41).

Deaktiviert wird die p38-MAPK durch die Familie der dual-spezifischen MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP), welche aus zehn Untergruppen besteht. Diese binden und dephosphorylieren MAPKs und tragen so zu deren Regulierung bei. Als besondere Eigenschaft der MKPs ist zu nennen, dass diese sich auch durch ein negatives Feedback selbst regulieren können (42).

Ein weiterer Regulationsmechanismus, verläuft über die sog. Gerüstproteine (*scaffolding proteins*). Diese vermitteln die strukturelle und funktionelle Organisation der dreistufigen MAPK-Kaskade und spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation von Signalstärke, -amplitude und -dauer (43). In diesem Bereich besteht jedoch noch erheblicher Forschungsbedarf um genauere Aussagen zu treffen.

### 2.2.2 Downstraming Produkte von p38 MAPK

P38 konnte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. So induzieren beispielsweise DNA-Doppelstrangbrüche die Translokation von p38 vom Zytoplasma in den Zellkern. Über die Aktivierung zahlreicher Kinasen löst p38 dort im Zellzyklus einen G2-Arrest aus und fördert die Reparatur der DNA. Zu diesen Kinasen gehören MSK1, MSK2, MK2, MK3, MNK1, MNK2 sowie p53 (8, 37, 44-46).

MSK1 und MSK2 haben über die Transkriptionsfaktoren CREB-1 und NF- $\kappa$ B einen direkten Einfluss auf die Genexpression. Sie können besonders schnell Reaktionen auf Stress sowie mitogene Stimuli generieren (8). NF $\kappa$ B wird eine wichtige Rolle bei Zelldifferenzierung und Apoptose zugeschrieben (47, 48). MK2 und MK3 wiederum beeinflussen die Zellmigration, indem sie die Bildung des Aktin-Zytoskeletts regulieren (49, 50). P53 zählt zu den Tumorsuppressorgenen, die den Zellzyklus regulieren, beschädigte DNA-Einzelstränge erkennen und die Apoptose einleiten (51). Es ist das am häufigsten mutierten Gen in Bezug auf menschliche Krebserkrankungen. Besonders im Zusammenhang von Progressions- und Metastasierungprozessen von Brustkrebs spielt die Mutation von p53 eine entscheidende Rolle (52). Dabei wird p53 hauptsächlich von p38 $\alpha$ , einer der vier Isoformen von p38 MAPK, aktiviert (53) (Abbildung 2.).

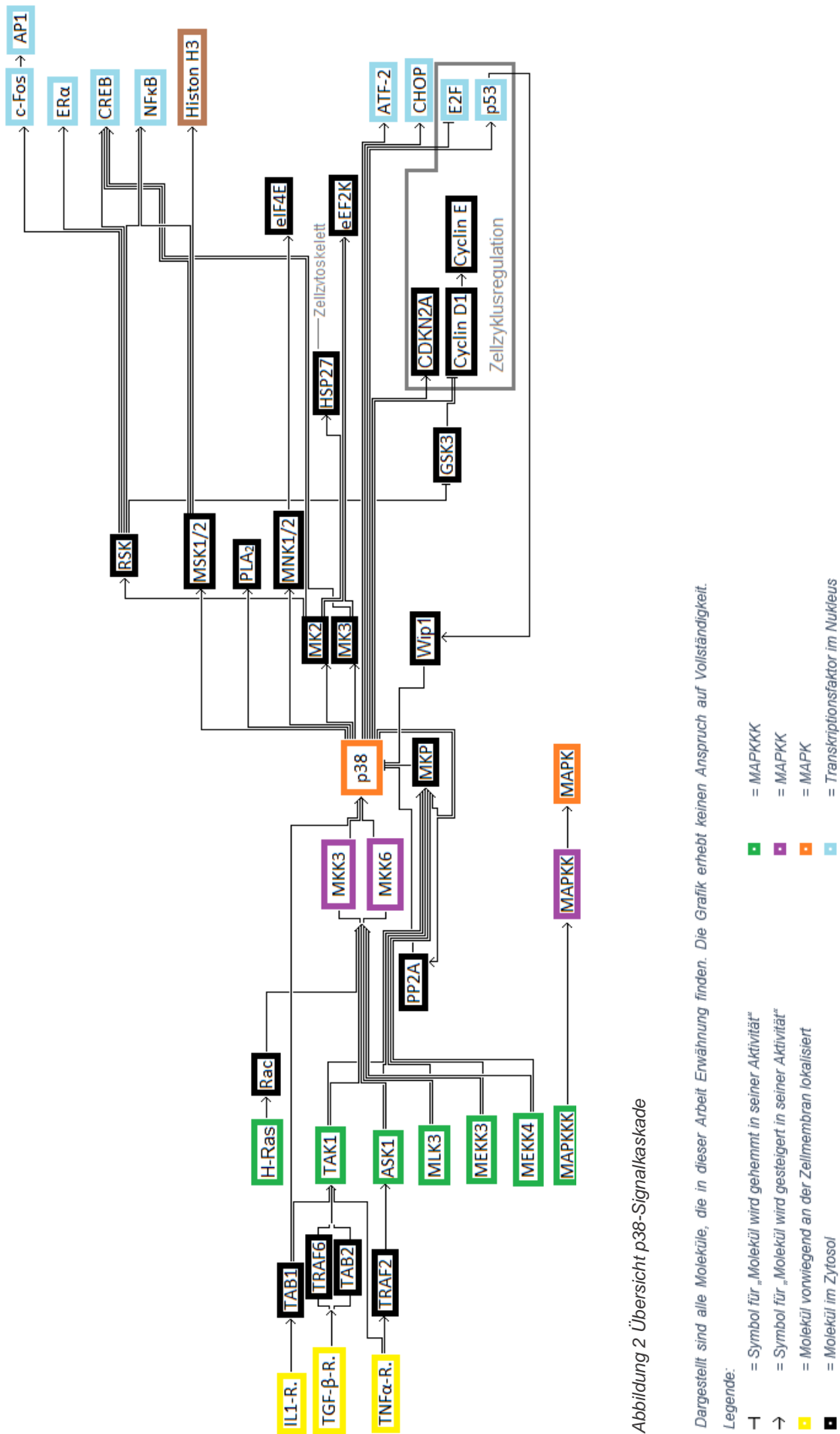


Abbildung 2 Übersicht p38-Signalkaskade

Dargestellt sind alle Moleküle, die in dieser Arbeit Erwähnung finden. Die Grafik erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Legende:

- ⊣ = Symbol für „Molekül wird gehemmt in seiner Aktivität“
- = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“
- (Yellow) = Molekül vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert
- (Black) = Molekül im Zytoplasma
- (Green) = MAPKKK
- (Purple) = MAPKK
- (Orange) = MAPK
- (Blue) = Transkriptionsfaktor im Nukleus

### 2.2.3 Isoformen von p38 MAPK

MAPK p38 ist ein 38 kDa großes Protein mit vier bekannten Isoformen. Diese werden von unterschiedlichen Genen kodiert und unterscheiden sich zum Teil sowohl in ihrer Gewebeexpression als auch in ihrer Funktion (8). P38 $\gamma$  (*MAPK12* oder ERK6) kommt gehäuft in der Skelettmuskulatur vor und p38 $\delta$  (*MAPK13* oder SAPK4) findet man vor allem in endokrinen Drüsen (8), beide werden deshalb hier im weiteren unberücksichtigt bleiben. P38 $\alpha$  (*MAPK14*) und p38 $\beta$  (*MAPK11*) sind ubiquitär vorhanden. Ihnen wurden vergleichbare Funktion zugeschrieben, wobei neuste Erkenntnisse eine mögliche Aktivierung von PP2A durch p38 $\beta$  zeigen, welches wiederum ERK und AKT hemmt (54). Im Focus dieser Arbeit steht die Variante p38 $\alpha$ , da diese in hohem Maß in Mammakarzinom-Zellen nachgewiesen werden konnte und ihm bereits in der Vergangenheit ein besonderer Zusammenhang in der Progression zugeschrieben wurde (55).

Versuche mit genetisch manipulierten Mäusen zeigten, dass diese Knockout-Mäuse bei Ausschaltung von p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  keine gravierenden Fehlbildungen entwickeln. Die Ausschaltung von p38 $\alpha$  hatte dagegen bereits im Embryonalstadium schwere morphologische Defekte der Plazenta zur Folge (55). Bei Versuchstieren mit dem doppelten Knockout von *MKK3* und *MKK6* konnten ähnliche Defekte beobachtet werden. Wurde nur eines der beiden Gene außer Funktion gesetzt, wiesen die Mäuse lediglich ein Immundefizit auf (8, 56). Insgesamt lässt sich daraus für den hier gegebenen Zusammenhang die existenzielle Bedeutung der p38 $\alpha$  ableiten.

Hinweise auf einen tumorsuppressiven Effekt gibt die Untersuchung des Zellverhaltens mittels des spezifischen Hemmstoffs Skepinone-L, der auf molekularer Ebene p38 $\alpha$  (und p38 $\beta$ ) hemmt. Entgegen den Erwartungen fällt diese Hemmung nicht so ausgeprägt aus wie die durch den Inhibitor SB203580, der ebenfalls p38 inhibiert. Ursache dafür könnte sein, dass SB203580 auch andere Kinasen hemmt bzw. aktiviert. Gegenstand der aktuellen Forschung ist die exakte Wirkweise von SB203580 (10).

Um die Ursache der geringen Hemmung durch Skepinone-L zu verstehen, gilt es p38 $\alpha$  auf der posttranskriptionellen Ebene mittels siRNA zu hemmen und die Ergebnisse des Zellverhaltens mit einander zu vergleichen. Bei dieser Transfektion handelt es sich um einen komplexen Mechanismus, der im Folgenden beschrieben wird.

## 2.3 Erläuterung der Transfektionsmethode

### 2.3.1 Bau und Funktion von Plasmamembranen

Die Plasmamembran grenzt den intrazellulären vom extrazellulären Raum ab. Sie bietet Schutz vor Umwelteinflüssen, reguliert diverse Transportvorgänge von und zur Zelle und stellt deren Kommunikation nach außen her. Eine intakte und funktionsfähige Plasmamembran ist somit essenziell für das Überleben der Zelle, größere Schäden an ihr lösen die Einleitung der Apoptose aus (57).

Als Grundgerüst aller Biomembranen dient eine ca. 5 - 8 nm starke Lipid-Doppelschicht, deren Moleküle so angeordnet sind, dass ihre hydrophoben (Fettsäure-)Anteile im Inneren der Membran eine dichte, hydrophobe Barriere bilden. Ihre hydrophilen (Phosphat-)Anteile sind nach außen gerichtet und bilden dort die hydrophilen Grenzschichten der Membran. Geläufigste Vertreter solcher Membranlipide sind die Phosphoglyceride, Sphingomyeline sowie Cholesterin. Entscheidend für die Permeabilitätseigenschaften und angepasst an die jeweilige Funktion der Membran ist letztlich die Ausstattung mit Membranproteinen, die in die Lipid-Doppelschicht eingebettet sind (57).

Gase und kleine lipophile Substanzen können durch die Zellmembran diffundieren, wohingegen geladene Teilchen spezielle Ionenkanäle oder *Carrier* benötigen. Die Aufnahme von Makromolekülen in das Zellinnere kann beispielsweise über Endozytose oder mit Hilfe von sog. Liposomen geschehen (58).

Liposome sind kugelförmige Vesikel, deren mit Flüssigkeit gefüllter Innenraum durch eine unilamellare oder multilamellare Phospholipid-Doppelschicht nach außen abgegrenzt ist. Ähnlich der Zellmembran weist auch sie amphiphile Eigenschaften auf (57). Liposome können deshalb über adsorptive Endozytose mit der Zellmembran interagieren und dabei geladene Makromoleküle aus ihrem Innenraum in das Innere der Zelle überführen. Experimentell ermöglicht dieser Mechanismus das gezielte Einbringen von Fremdmaterial, insbesondere von Nukleinsäuren, in Zellen. Das Verfahren wird dann als Transfektion bezeichnet (59).

### 2.3.2 Wahl der Transfektionsmethoden

Allgemein beschreibt der Begriff Transfektion einen nicht-viralen Gentransfer, bei dem durch gezielte Intrusion Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Es kann sich dabei um DNA, RNA oder, wie in dieser Arbeit, um siRNA handeln.

Grundsätzlich können dazu physikalische, biologische oder chemische Verfahren angewendet werden. Zu den physikalischen Verfahren gehören die Mikroinjektion und die Elektroporation, die hauptsächlich bei schwer zu transfizierenden Primärzellen angewendet werden und hohen materiellen Aufwand sowie wie eine gewisse Expertise voraussetzen.

Biologische Verfahren nutzen die schon vorhandenen rezeptorvermittelten Transportmechanismen der Zelle, um DNA-Plasmide in die Zelle zu befördern. Dazu gehört beispielsweise die Transfektion mit Transferrin-Polykation-Konjugaten.

Am geläufigsten sind jedoch die chemischen Verfahren, wobei zwischen der Calcium-Phosphat-Präzipitation, die Transfektion mit Polykationen (DEAE-Dextran) und der Lipofektion zu unterscheiden ist. Welches Verfahren angewandt wird, richtet sich nach den Eigenschaften der zu transfizierenden Zelllinie und nach der einzubringenden Nukleinsäure (59, 60). Grundlage dieser Arbeit ist eine Transfektion mittels Lipofektion.

Die Lipofektion wurde 1987 erstmalig von Felgner et al. beschrieben. Sie entwickelten ein DNA-Transfektionsprotokoll, welches ein synthetisches kationisches Lipid, N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) verwendeten, um einen Lipid-DNA-Komplex zu bilden. Dieser bewirkte die Aufnahme über die Plasmamembran sowie Expression der darin gebundenen DNA. Zu Beginn wurde die Fusion von Lipoplex und Plasmamembran vermutet, jetzt wird jedoch von einer adsorptiven Endocytose ausgegangen. Der genaue Mechanismus ist weiterhin Bestandteil aktueller Forschung (59-61). Das Transfektionsprotokoll lässt sich auch auf andere Nukleinsäuren übertragen und wird hier für das Einbringen von siRNA eingesetzt.

DOTMA zeichnet sich durch seine amphipatischen Eigenschaften aus und neigt dazu, in wässriger Lösung Liposom ähnliche Strukturen auszubilden. Zurückzuführen ist dies auf eine hydrophile Ammoniumgruppe, welche über einen Propylrest mit zwei lipophilen Fettsäureketten verbunden ist. In wässriger Lösung lagern sich diese lipophilen Anteile aneinander und bilden über die hydrophilen Aminogruppen mit den zu transfizierenden Nukleinsäuren einen Liposom-DNA/RNA-Komplex, welcher als

Lipoplex bezeichnet wird (62). Der an der Oberfläche positiv geladene Lipoplex ist in der Lage, elektrostatische Abstoßungskräfte zu überwinden und so mit der negativ geladenen Plasmamembran zu fusionieren. Rose et al. konnten 1991 zeigen, dass ungeladene Helferlipide, z. B. L-Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), die Endozytose unterstützen und damit die Effizienz der Transfektion verbessern (63, 64). Die Lipofektion wird in dieser Arbeit zum Einbringen der *MAPK14-spezifischen-siRNA* sowie der Negativ-Kontroll-siRNA in verschiedene Brustkrebs-Zelllinien verwendet.

### 2.3.3 Wirkmechanismus von siRNA

„Durch RNA-Interferenz (RNAi) kann die Expression spezifischer Gene reduziert und wichtige Erkenntnisse über die Funktion dieser Gene gewonnen werden. Sie beruht auf physiologischen Regulationsmechanismen bei der Transkription eukaryotischer Gene.“ (65) Dabei ist zu unterscheiden zwischen einer natürlichen Regulation durch miRNA (microRNA) und der in dieser Arbeit verwendeten künstlichen Beeinflussung durch siRNA (short interfering RNA).

In die Mammakarzinom-Zelle eingebracht wird ein doppelsträngiges RNA-Molekül (dsRNA), welches eine dem *MAPK14*-Gen komplementäre mRNA-Sequenz besitzt. Die siRNA entsteht, indem die dsRNA in der Zelle von einer Ribonuclease, dem sog. DICER, in kleine, doppelsträngige Abschnitte von 20 – 25 Basenpaaren gespalten wird. Diese siRNA-Moleküle binden zusammen mit einem Multienzymkomplex, dem *RNA-induced silencing complex* (RISC), an die mRNA und verhindert so die Translation für p38 $\alpha$  (Abbildung 3). Es handelt sich dabei um eine transiente Hemmung. Das bedeutet, dass die Zelle wieder uneingeschränkt p38 $\alpha$  exprimiert, sobald die siRNA abgebaut wurde (65, 66).

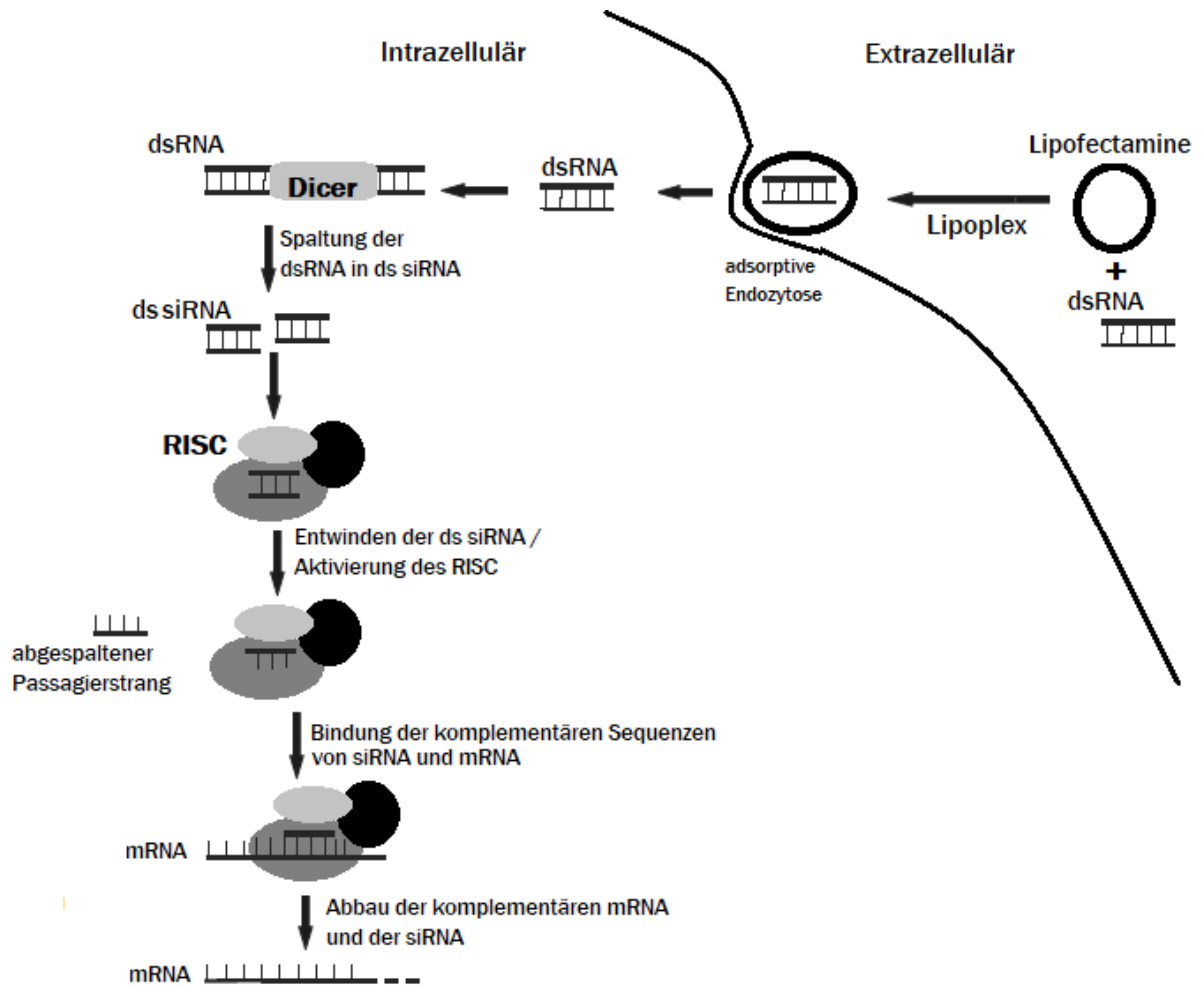


Abbildung 3 Transfektionsvorgang und Funktion von siRNA

Vereinfachte Abbildung der Transfektion von siRNA mittels Lipofectamine, sowie die Funktionsweise von siRNA im Zellinneren (59, 60).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Kit-Systeme

NucleoSpin® RNA Plus	Macherey-Nagel, Düren
E.Z.N.A® HP Total RNA isolation Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, USA
Lipofectamin® 300 Transfections Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
MTT- Formazan Kit	Sigam Aldrich, Saint Louis, USA

##### 3.1.2 Gebrauchsmaterialien

Boyden-Migrationskammer, 48-Well-Mikro-Chemotaxis-Kammer	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Mehrkanalpipetten Eppendorf Research Plus (10-100 µl, 30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden
Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100- 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Scheren	Labotec, Wiesbaden
Teigschaber	Rösle, Marktoberdorf

##### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Cellstar Zellkulturplatten (6-Well, 96- Well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Deckgläser Marienfeld 24x50 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen
Einwegpipetten Cellstar, serologisch (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen

Einweghandschuhe, Supreno	Microflex, Chemnitz
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5, 1 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
LUNA™ Cell Counting Slides	logos Biosystems, Südkorea
Pasteurpipetten, Kunststoff	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 101-1000 µl)	StarLab, Hamburg
Pierce Maleic Anhydride Activated Plates, Clear, 96-Well	Thermo Scientific, Waltham, USA
Polycarbonatmembranen 25x80 mm, Porengröße 8 µm	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sapphire Microplatte 96Well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Viewseal Abdeckfolie	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellspatel, Cell Lifter	Fisherbrand, China
Zellkulturschale (6 mm, 96 mm)	TPP Techno Plastic Products, Schweiz

### 3.1.4 Geräte

Absaughilfe <i>Vacuboy</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald
<i>AquaLine</i> AL 18 Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen
Axioskop 40 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Cellspin®/THARMACspin Zytozentrifuge	THARMAC Cellspin®, Waldsolms
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Computer	Dell, Round Rock, USA
Eismaschine	Ziegra, Hannover
ELISA Reader GLOMAX multi	Promega detections system, Mannheim
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80°C	Nalge Nunc Int, Penfield, USA
Gelielektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen

Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4°C	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
LightCycler®480 Real-Time PCR	Roch, Penzberg
LUNA™ Automated Cell Counter	logos Biosystems, Südkorea
MikroWelle	Moulinex, Frankreich
NanoDrop ®1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
PerfectSpin® P	PeqLab, Erlangen
Spannungsgerät, EPS300	Parma Biotech
Thermocycler	Biometra, Jena
UV Fotokammer, E-Box Vilber	PeqLab, Erlangen
Vortex Mixer REAX 2000	StarLab, Hamburg

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

Agarosegel (2 %)	1 g Agarose 50 ml 1x TAE
<i>Orange Dye</i> (5x)	30 % Sucrose 0,35 % Orange G
TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 18,91 g EDTA
Ethidiumbromidlösung	5 µg/ml
Puffer nach Weise	1 Puffertablette 1 l dH <sub>2</sub> O
Solubilisierungspuffer	Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10% Salzsäure (1:100)

### 3.1.6 Zellmedium

Einfriermedium (67)	50 ml FCS 5 ml DMSO
Medium für MDA-MB-231 und MCF-7 (67)	500 ml RPMI 50 ml FCS 5 ml P/S
Medium für MCF-10A (67)	500 ml RPMI 25 ml FCS 5 ml P/S 20 µl EGF (20 µg/ml) 1 ml Hydrocortison (1,4 x 10 <sup>6</sup> M) 50 µl Choleratoxin (100 ng/ml) 500 µl Insulin

### 3.1.7 siRNA

Negativ-Kontroll siRNA 20 nmol	Qiagen, Cambridge, USA
<i>MAPK14</i> -spezifische siRNA 10 µm in 300 µl	Signal Silencing, Beverly, USA
<i>MAPK11</i> -spezifische siRNA 10 µm in 300 µl	Signal Silencing, Beverly, USA

## 3.1.8 Chemikalien und Reagenzien

10X M-MuLV Buffe	BioLabs, Boston,USA
Aqua stabil	Julabo, Seebach
Aquapuwa	Fresenius, Bad Homburg
Biozym Mix	Biozym, Oldendorf
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Collagen human type I	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Collagen type IV	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTP	Promega,USA
DPBS	Gibco, Carlsbad, USA
EDTA-Na4	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
EGF	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Ethanol absolute, p.a.	AppliChem, Darmstadt
FCS	PAALaboratories, Pasching, Österreich
Hemacolor Lösungen 2 und 3	Merck, Darmstadt
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Insulin	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Kapa SYBER Fast Mix	Kapa Biosystem, South Africa
M-MuLV Reverse Transkriptase 200U/µl	BioLabs, Boston,USA
Nagellack Express Nailcare	Maybelline Jade, New York, USA
Oligo dt 50µl	Invitrogen, Waltham, USA
Opti-MEM	Gibco, Paisley, UK
Penicillin/Streptomycin (Anti-Anti, 100x)	Gibco, Carlsbad, USA
Puffer nach Weise Tabletten	Merck, Darmstadt
RiboLock RNaseInhibitor 40l/µl	Thermo scientific,Vilnius, Lithaun
RNase- Free Water	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor 40l/µl	Thermo scientific,Vilnius, Lithaun
RPMI Medium 1640	Gibco, Carlsbad, USA
SDS (10%ig)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

## 3.1.9 Primer

Tabelle 2 Verwendete Primer

Verwendet wurden Primer von der Firma Metabion aus Planegg, Deutschland. Die nachfolgende Tabelle zeigt den Expressionsprimer mit Forward- und Reversesequenz, Annealing-Temperatur in Grad Celsius und die jeweils erzeugte Produktgröße in Basenpaaren sowie die verwendete Zeit der einzelnen Zyklen.

Name	Sequenz (5'-3')	Annealing (°C)	Produktgröße (bp)	Zeit (sec.)
<b>ACTB</b>	Fw: GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA Rw: GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA	60	200	5/5/1
<b>ATP5J</b>	Fw: TCA TGC TCT GCC AAA CCC TT Rw: ACT AGC ATC AAC AGG TCC TCC	61	150	5/5/1
<b>HPRT</b>	Fw: ATT GAC ACT GGC AAA ACA ATG C Rw: AAG TAG GCT GTG TGT GGG TG	61	110	5/5/1
<b>hMAPK14</b>	Fw: ACT GTC TCC AGT GGG CTC T Rw: CAC GTA ACC CCG TTT TGT G	60	72	5/5/1
<b>hMAPK11</b>	FW:AAG CGA CTA CAT TGA CCA GC Rw:GTC GTG GTA CTG GCT GAA GT	60	265	10/10/10

## 3.2 Zellkulturmethoden

### 3.2.1 Kontinuierliche Zelllinien

**MCF-10A** American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland

MCF-10A steht für Michigan Cancer Foundation-10A. Es handelt sich um die immortalisierte, nicht karzinöse Epithel-Zelllinie einer 36-jährigen kaukasischen Frau ohne jegliche Rezeptorüberexpression. Die Zellen wurden im Rahmen einer Reduktionsplastik bei fibrozystischer Mastopathie entnommen (67-69).

**MCF-7** ATCC, Rockville Maryland

MCF-7 steht für Michigan Cancer Foundation-7. Es handelt es sich um die immortalisierte Brustkrebs-Zelllinie einer 69-jährigen kaukasischen Frau. Die Kultur wurde 1970 aus dem malignen Pleuraerguss eines duktales-invasiv-Karzinoms gewonnen. Die Zellen sind ER- und PR-positiv, HER2/neu wird nicht exprimiert (67, 69, 70). Zudem liegt eine heterozygote Transition im *PIK3CA*-Gen sowie eine homozygote Deletion im *CDKN2A*-Gen vor (71).

**MDA-MB-231** ATCC, Rockville Maryland

MDA-MB steht für M.D.Anderson metastasis breast cancer. Es handelt es sich um die immortalisierte Brustkrebs-Zelllinie einer 51-jährigen kaukasischen Frau. Die Kultur wurde 1973 aus dem malignen Pleuraerguss eines Adenokarzinoms gewonnen. Der Tumor exprimiert weder ER/PR noch HER2/neu, ist vielmehr gekennzeichnet durch die Überexpression des *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor und des *transforming growth factor alpha* (TGF- $\alpha$ ) Rezeptor (67, 69, 72). Zudem bestehen einige Genmutationen. Dazu gehört die homozygote *gain-of function* (R280K)-Mutation im *p53*-Gen, eine homozygote *CDKN2A*-Deletion im *CDKN2A*-Gen, eine heterozygote Transversion im *BRAF*-Gen, eine heterozygote Transition im *KRAS*-Gen sowie die homozygote Transversion im *NF2*-Gen (71).

### 3.2.2 Steriles Arbeiten

Um unerwünschte Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden die Arbeiten standardgemäß an einer sterilen Sicherheitswerkbank und mit sterilem Equipment durchgeführt. Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch in einem keimarmen Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nicht sterile Ausrüstungsgegenstände wurden mit Reinigungsalkohol (*Terralin liquid*) desinfiziert. Zur Arbeit mit den Zellen wurden stets Einweg-Handschuhe getragen.

### 3.2.3 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden vorab in einem zellspezifischen Medium (Kapitel 3.1.6) im Inkubator bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (5 %) und einer Luftfeuchtigkeit > 90% kultiviert. Um die Kulturen dauerhaft am Leben zu halten, wurde in regelmäßigen Abständen das Kulturmedium gewechselt und die Kulturen bei konfluentem Wachstum von ca. 80 % gesplittet. Die so entstandenen Portionen wurden entweder im Versuch verwendet, oder unter höherer Passagenummer weiter kultiviert.

Nachdem schon in der Vorbereitung alle benötigten Lösungen im Wärmebad auf 37 °C gebracht worden waren, wurde zu Beginn das alte Kulturmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der verbleibende Inhalt zunächst mit 10 ml DPBS gewaschen. Mittels 1 ml Trypsin-EDTA wurden die adhären Zellen abgelöst, wobei die Inkubationszeit bei 37 °C für die malignen Zelllinien *MDA-MB-231*, und *MCF-7* jeweils 60 s betrug, für die benigne Zelllinie *MCF-10A* dagegen 7 min. Durch Zugabe von 9 ml Kulturmedium wurde die Wirkung des Trypsin-EDTA gestoppt und die Zellsuspension anschließend in eine neue Zellkulturflasche überführt. Diese Angaben beziehen sich auf die T-75 Flaschen und können in der Verwendung von anderen Behältnissen abweichen (Tabelle 3).

*Tabelle 3 Zellkulturgefäße*

*Die Tabelle gibt Angaben über die verwendeten Zellkulturgefäße, ihren Verwendungszweck, die Kulturfläche so wie das eingesetzte zellspezifische Medium und die Trypsin Menge.*

<b>Zellkulturgefäße</b>	<b>T-75 Flasche</b>	<b>T-25 Flasche</b>	<b>60mm Schale</b>	<b>96 Well-Platte</b>
<b>Verwendungszweck</b>	Zellkultivierung	Migrationsversuch	Knockdown Nachweis	MTT
<b>Kulturfläche [cm<sup>2</sup>]</b>	75	25	22,1	2,7
<b>Medium [ml]</b>	15	5	4	0,2
<b>Trypsin / EDTA [ml]</b>	1	0,4	0,2	-

### 3.2.4 Kryo-Konservierung

Zur Kryo-Konservierung wurde wie bei der Zellkultivierung zuerst das Medium abgesaugt. Auch hier wurden die Kulturen mit 10 ml DPBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin-EDTA behandelt um die Zellen abzulösen. Nach zellkulturspezifischer Inkubationszeit wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von jeweils 9 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur 5 min lang mit 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in FCS mit 10 % DMSO gelöst und jeweils 1 ml davon in ein Kryogefäß überführt. Angestrebt war dabei eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Kryogefäße wurden mit den Daten für Zelllinie, Passagenummer und Datum sowie mit dem Kürzel des Labormitarbeiters beschriftet und anschließend in einem Isopropylbehälter für 24 h bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  tiefgefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) überführt und eingelagert werden konnten.

Zur Reaktivierung wurden die Kryogefäße dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  aufgetaut, was in der Regel nur wenige Minuten dauerte. Im Anschluss wurde die Zellsuspension nach Zugabe von 1 ml Kulturmedium bei Raumtemperatur 5 min lang mit 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 3 ml des zellspezifischen Mediums gelöst und in die jeweilige Zellkulturflasche überführt.

### 3.2.5 Zellkonzentrationsbestimmung

Bereits vor Beginn jeder Versuchsreihe wurde mit Hilfe des *LUNA™ Automated Cell Counter* der Ausgangswert der jeweiligen Zellkonzentration bestimmt. Dazu wurden 15  $\mu\text{l}$  der zuvor resuspendierten Zellsuspension auf den zum System gehörenden Objektträger pipettiert und in das Gerät eingebracht. Im Hinblick auf einen korrekten Wert wurde nicht nur das Bild scharf eingestellt, sondern auch vor Beginn jeder Zählung sichergestellt, dass sich im auszählenden Bildbereich keine Zellklumpen befanden. Der Wert für die Zellkonzentration wurde als [Zellzahl/ml] ermittelt.

### 3.3 Transfektion

#### 3.3.1 Vorbereitung zur Transfektion

Die Transfektion von siRNA ist ein komplexer und störungsanfälliger Vorgang. Unabdingbar für den Erfolg ist, dass ausschließlich vitale und nicht gestresste Zellen transfiziert werden. Da für die Transfektion ausschließlich mit antibiotikafreiem Zellmedium gearbeitet wurde, bestand im Vergleich zur üblichen Zellkultur ein erhöhtes Infektionsrisiko. Im Hinblick darauf wurde bereits zu Beginn der Laborversuche mittels Schnelltest ein Mycoplasmenbefall ausgeschlossen, der im Verlauf der Untersuchungen in regelmäßigen Abständen wiederholt wurde. Ein solcher Befall wäre makro- oder mikroskopisch nicht sichtbar gewesen. Dies hätte jedoch massiven Einfluss nicht nur auf die Transfektionseffizienz, sondern auch auf die Viabilität der transfizierten Zellen und die damit verbundenen Zellverhaltensanalysen gehabt.

#### 3.3.2 Wahl der richtigen Transfektionsreagenzien

Wang et al. zeigten, dass für die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen das Verhältnis von Transfektionseffizienz und Zellviabilitätseinbußen bei der Verwendung von Lipofectamin 3000 und P3000 als Transfektionsreagenzien am günstigsten ist (73). Mit dem Ziel, einen p38 $\alpha$  Knockdown von mindestens 60 % zu erreichen, wurde die siRNA mit Hilfe der Transfektionsreagenzien in die zu untersuchenden Zellen eingebracht. Das Verfahren stellt die Grundlage der hier beschriebenen Versuche dar. Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die Transfektion in der 60 mm Schale um im Verlauf die Effizienz des Knockdowns bestimmen zu können.

#### 3.3.3 Durchführung der Transfektion

In der Vorbereitung wurden die Zellkulturen wie bereits beschrieben gesplittet und in 60 mm Schalen ausgesät. Die ausgebrachte Zellzahl richtete sich dabei nach der jeweiligen Replikationszahl und Zellgröße der unterschiedlichen Zellenlinien (Tabelle 4). Insgesamt wurde pro Schale immer ein Gesamtvolumen von 4 ml aus Zellkultur und zellspezifischem Medium angesetzt. Zur Transfektion wurde die *MAPK14*-spezifische-siRNA verwendet, als Vergleichswert diente die Negativ-Kontroll-siRNA von Qiagen.

Die eigentliche Transfektion wurde am darauffolgenden Tag bzw. Tagen durchgeführt. Als Vorbereitung dazu wurde zunächst in einem 2 ml Reaktionsgefäß der Reaktionsansatz I hergestellt (Tabelle 5). Diesem wurde nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur der Reaktionsansatz II (Tabelle 6) hinzugefügt. Die Lösung wurde mithilfe des Vortex vermischt, zentrifugiert und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurden die Zellkulturen zweimal gewaschen. Dazu wurde das zellspezifische Medium abgesaugt und jeweils 3 ml DPBS in die Schalen gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurde diese Waschlösung wieder abgesaugt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurden im dritten Schritt jeweils 715 µl Opti-MEM sowie das Transfektionsreagenz mit der siRNA auf die Zellen gegeben. Zur besseren Verteilung der Reagenzien wurden die Schalen leicht geschwenkt und anschließend bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit > 90 % inkubiert. Nach 4 h wurde das Medium erneut abgesaugt und damit das Transfektionsreagenz entfernt. In die Kulturgefäße wurden als Nährmedium jeweils 4 ml Opti-MEM sowie 400 µl FCS pipettiert und die Zellen zur weiteren Kultivierung erneut im Inkubator gelagert. Nach 24 h, nach 48 h und nach 72 h wurde jeweils der vorgesehene Teil der Schalen entnommen um aus den Zellen die RNA zu isolieren und über qRT-PCR den Knockdown von p38α zu überprüfen.

Für die Analyse des Zellverhaltens mussten je nach Verfahren unterschiedliche Zellkulturgefäße verwendet werden. Für die Migration wurde die Transfektion in der T-25 Zellkulturflasche durchgeführt, für den MTT-Assay in der 96-Well-Platte. Dabei wurde die Menge des Opti-MEM, des P3000 und des Lipofectamin an das Gefäßvolumen angepasst (Tabelle 3). Die Menge der *MAPK14*-spezifischen- und Negativ-Kontroll-siRNA richteten sich jeweils nach der Zellzahl (Tabelle 4).

Tabelle 4 Transfektionsunterschiede der Zelllinien

Die Tabelle gibt die zellspezifische Anzahl von Zellen sowie die verwendete Menge von MAPK14-spezifischen-siRNA, das jeweilige Transfektionsintervall und den Zeitraum vom Ausplattieren der Zellen bis zur Transfektion an.

Zelllinie, Verbleib auf der Schale nach Transfektion	Zellzahl	siRNA [ $\mu$ l]	Zeitraum vom ausplattieren der Zellen bis zur Transfektion [h]
<b>MCF-10A 24h</b>	$5 \times 10^5$	3	24
<b>MCF-10A 48h</b>	$4 \times 10^5$	3	24
<b>MCF-10A 72hh</b>	$3 \times 10^5$	3	24
<b>MCF-7 24h</b>	$3 \times 10^5$	4	48
<b>MCF-7 48h</b>	$2,5 \times 10^5$	4	48
<b>MCF-7 72h</b>	$2 \times 10^5$	4	48
<b>MDA-MB-231 24h</b>	$5 \times 10^5$	2,5	48
<b>MDA-MB-231 48h</b>	$4 \times 10^5$	2,5	48
<b>MDA-MB-231 72h</b>	$3 \times 10^5$	2,5	48

*Tabelle 5 Transfektionsreagenz I*

*Die Tabelle gibt die Zusammensetzung des Reaktionsansatz I an. Dieser wird im Anschluss für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert.*

<b>Reagenz</b>	<b>MAPK14-siRNA [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Kontroll-siRNA [<math>\mu</math>l]</b>
<b>Opti-MEM</b>	250	250
<b>siRNA (Zelllinien-spezifisch) (Tabelle 4)</b>	2,5-4	15
<b>P3000</b>	16	16

*Tabelle 6 Transfektionsreagenz II*

*Die Tabelle gibt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes II an. Dieser wird im Anschluss zu dem Reaktionsansatz I hinzugefügt und für 20 min. bei Raumtemperatur Inkubiert.*

<b>Reagenz</b>	<b>MAPK14-siRNA [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Kontroll-siRNA [<math>\mu</math>l]</b>
<b>Opti-MEM</b>	200	200
<b>Lipofectamin 3000</b>	12	12

### 3.4 Arbeit mit Nukleinsäuren

#### 3.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Prinzip der *Silica Matrices*, mit dem NucleoSpin®RNA Plus Kit an einem speziell für die RNA-Isolation eingerichteten Arbeitsplatz, um mögliche Kontamination mit RN-asen zu vermeiden. Da RNA-Moleküle bei Raumtemperatur instabil sind, wurden bereits in der Vorbereitung alle zu verwendenden Säulen und Auffangbehälter beschriftet und die benötigten Utensilien bereitgestellt, um die einzelnen Aufreinigungsschritte möglichst ohne Zeitverzug zu verrichten und den RNA-Verlust so gering wie möglich zu halten.

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde unter der sterilen Werkbank das Kulturmedium der verwendeten Zellkultur abgesaugt. An einem speziellen RNA-Isolationsplatz wurden dann 350 µl *RNA Lysis Buffer* auf die Zellen gegeben, diese anschließend mit einem sterilen Spatel abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das umgehend bei -80 °C im Gefrierschrank konserviert wurde, um die folgenden Schritte mit mehreren Proben gebündelt durchführen zu können.

Zur Verwendung in den Versuchen wurden die Zellen auf Eis langsam aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann direkt auf die Säule einer *NucleoSpin®gDNA Removing Column* mit Auffanggefäß gegeben und der Ansatz bei 11.000 g für 30 s zentrifugiert. Diese Säule wurde anschließend verworfen.

Dem Lysat im Auffanggefäß, also der von DNA befreiten Probe, wurden 100 µl *Binding Solution* zugesetzt und mit der Pipette vermischt. Die so entstandene Suspension wurde nun auf die Säule einer *NucleoSpin®RNA Plus Colum* überführt, die aufgrund ihrer Ladung die RNA bindet. Dieser Ansatz wurde zunächst 15 s bei 11.000 g zentrifugiert, Nacheinander folgten dann drei Waschvorgänge, wobei nach jedem Schritt der Inhalt des Auffanggefäßes verworfen wurde. Im ersten Schritt wurden 200 µl des *Waschpuffers 1* auf die Säule gegeben und bei 11.000 g für 15 s zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurden 600 µl des *Waschpuffers 2* entsprechend zugesetzt und das System erneut für 15 s bei 11.000g zentrifugiert. Um die *NucleoSpin®RNA Plus Colum* zu trocknen, wurden im dritten Schritt noch einmal 250 µl des *Waschpuffers 2* auf die Säule gegeben und diesmal für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert.

Die getrocknete *NucleoSpin®RNA Plus Colum* wurde sodann in ein Nuklease-freies Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Um sie von der Säule zu trennen, wurde der Ansatz erneut für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Das aufgefangene Lysat wurde noch einmal auf die Säule pipettiert und die Zentrifugation wiederholt, um die Ausbeute an RNA zu erhöhen. Zur Quantifizierung der RNA-Konzentration wurde ein Aliquot entnommen und die gewonnene RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert

### 3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung der RNA-Konzentration wurde der *NanoDrop One UV-Vis* verwendet. Es handelt sich dabei um ein Spektralphotometer, welches die RNA-Konzentration über deren Lichtabsorption bei 260 nm misst und unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz  $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} * c * d$  berechnet ( $E_{\lambda}$  = molaren Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\epsilon_{\lambda}$  = dekadische Extinktionskoeffizient,  $c$  = Stoffmengenkonzentration,  $d$  = Schichtdicke). Mittels der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und bei 280 nm wurde zudem die Reinheit der Probe bestimmt. Für ein aussagekräftiges Ergebnis sollte in diesem Fall der Quotient von A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> bei 2,0 liegen. Die Messungen wurden mit jeweils 1 µl RNA-Lösung und für jede Probe in doppelter Ausführung durchgeführt (74).

### 3.4.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase PCR

Bei der cDNA-Synthese wird einsträngige mRNA in ihre korrespondierende DNA (cDNA) umgeschrieben. Als zentrales Enzym diente in den hier durchgeführten Versuchen die reverse Transkriptase M-MLV, die aus dem Retrovirus *Moloney murine leukemia virus* stammt und eine RNA-abhängige DNA-Polymerase darstellt. Sie bindet an einen Oligo-T-Primer, welcher an der Poly(A)-Sequenz des 3'-Endes der mRNA andockt. Durch diesen Ansatz sollte sichergestellt werden, dass ausschließlich RNA amplifiziert wird.

In der Vorbereitung wurden in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß pro Einzelprobe 2,5 µg der zuvor gewonnenen RNA in einem Volumen von 14 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Der Reaktionsansatz I, der aus 1 µl *Oligo dT Primer* und 1 µl *Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's)* besteht, wurde hinzugefügt und gut

vermischt (Tabelle 7). Das Reaktionsgefäß wurde anschließend in den Thermocycler gestellt.

Darin wurden zunächst die Sekundärstrukturen der RNA denaturiert indem die RNA-Lösung mit Reaktionsansatz I für 5 min auf 80 °C erhitzt wurde. Nach anschließender Abkühlung auf 4 °C konnte der Reaktionsansatz II hinzugegeben werden. Dieser bestand aus 1 µl RNase-Inhibitoren (*Ribo Lock*), 2 µl des Erststrang-Puffers (*RT-Buffer*) und 1 µl der reversen Transkriptase (RT) (Tabelle 8). Bei 42 °C erfolgte dann innerhalb von 60 min die Synthese der cDNA und daran anschließend bei 90 °C für 10 min eine Hitzeinaktivierung derselben. Abschließend wurde die so gewonnene cDNA auf 4 °C heruntergekühlt. Für die sich anschließende quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurde ein Aliquot in der 1:10-Verdünnung erstellt. Die Lagerung der nicht direkt weiter verwendeten cDNA erfolgte bei -20 °C.

*Tabelle 7 Reaktionsansatz I der cDNA-Synthese*

*Die Tabelle gibt die Zusammensetzung, die Menge und die jeweilige Konzentration der verwendeten Reagenzien an. Die Zugabe des Reaktionsansatzes I erfolgt vor Reaktionsbeginn. Die Mengenangabe bezieht sich auf eine Probe der cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase PCR.*

<b>Reagenz</b>	<b>Menge [µl]</b>	<b>Konzentration</b>
<b>RNA freies H2O</b>	ad 14	
<b>Oligo dt-Primer</b>	1	10 nM
<b>dNTP</b>	1	2,5 nM
<b>Gesamtvolumen</b>	16	

Tabelle 8 Reaktionsansatz II der cDNA-Synthese

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung, die Menge und die jeweilige Konzentration der verwendeten Reagenzien an. Die Zugabe des Reaktionsansatzes II erfolgt nach Abschluss der initialen Denaturierung, sobald die Probe eine Temperatur von 4°C erreicht hat. Die Mengenangabe bezieht sich auf eine Probe der cDNA-Synthese.

Reagenz	Menge [µl]	Konzentration
<b>RT Buffer</b> (Erststrang-Puffer)	2	10x
<b>Ribo Lock</b> (RNase Inhibitor)	1	
<b>Reverse Transkriptase</b>	1	200 U/ml
<b>Gesamtvolumen</b>	4	

#### 3.4.4 Quantitativen Echtzeit-PCR

Um die relative Expression der untersuchten Gene zu bestimmen, wurde ein Gerät zur quantitativen Echtzeit-PCR verwendet, der *LightCycler 480 II* von Roche. Mittels integriertem Fluoreszenzphotometer wird darin während der Amplifikation die Menge der gebildeten DNA in Echtzeit gemessen. Als Fluoreszenzfarbstoff dient dabei das interskalierende SYBR-Green®, welches nur an dsDNA bindet, somit hier an das zuvor gewonnene Produkt der PCR. Der Amplifikationszyklus, an dem ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird, wird als *Crossing Point* (Cp) bezeichnet. Dieser spiegelt die exponentielle Phase der Amplifikation wider und ermöglicht es, die Menge der eingesetzten cDNA zu bestimmen.

Vor Beginn der eigentlichen Versuche muss eine Standardkurve basierend auf einer Verdünnungsreihe mit cDNA erstellt werden. Um als aussagekräftiger Referenzwert zu dienen war es nötig, dass dieser das gewünschte Gen in hohen Maßen exprimiert. Vor diesem Hintergrund war die cDNA von Ovarialkarzinom (OVACR-3 und IGROV-1) geeignet (Tabelle 9) (75). Diese wird bei jeder PCR mitgeführt. Im Anschluss an jede qRT-PCR erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse, bei der unter langsamer Temperaturzunahme die doppelsträngige DNA in ihre beiden Einzelstränge dissoziiert.

Anhand des Abfalls der Fluoreszenzintensität bei steigender Temperatur kann das Vorhandensein von unerwünschten Nebenprodukten ausgeschlossen werden.

Der Reaktionsansatz für die hier durchgeführte qRT-PCR (Tabelle 10) wurde mit Hilfe einer Matrix Electronic Pipette von Thermo Fisher in eine 96-Well Platte pipettiert. Pro Reaktionsgefäß wurde jeweils 1 µl der cDNA-Probe hinzugefügt. Für jede Probe wurde dabei ein Duplikat angesetzt mit dem Ziel, später zur Auswertung den Mittelwert zu verwenden. Im Anschluss wurde die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen, zentrifugiert und in das qRT-PCR Gerät gelegt. Vor dem Start wurde die passende Annealing-Tempertur für die verwendeten Primer gewählt (Tabelle 2) und die Dauer der einzelnen Programmschritte dem verwendeten Master Mix angepasst. Nach Ablauf der PCR wurden die fertigen Platten bis zur weiteren Verwendung bei 7 °C gelagert.

*Tabelle 9 Verdünnungsreihe*

*Die Tabelle zeigt die Verdünnungsreihe mit der jeweiligen Konzentration. Sie wurde aus der cDNA von Ovarilkarzinomzellen der Linien OVACR-3 und IGROV -1 hergestellt.*

<b>Verdünnungsreihe der Standardreihe</b>	<b>Konzentration [µg/µl]</b>
<b>1:5</b>	2
<b>1:10</b>	1
<b>1:20</b>	0,5
<b>1:40</b>	0,25
<b>1:80</b>	0,125
<b>1:160</b>	0,0625

Tabelle 10 Pipettierschema qRT-PCR

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung und die Menge der einzelnen Reagenzien für eine 1  $\mu$ l-Probe der qRT-PCR an.

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
RNA freies H <sub>2</sub> O	3,2
Forward- Primer ( 10 $\mu$ M)	0,4
Reverse- Primer (10 $\mu$ M)	0,4
Kapa SYBER Fast / Biozym Mastermix	5
<b>Gesamtvolum</b>	<b>9</b>

Die Auswertung erfolgte über die *LightCycler 480 Software*. Die Normalisierung aller Genexpressionsanalysen wurde mit zuvor festgelegten Haushaltsgenen durchgeführt. Zur Verrechnung wurde ein Quotient gebildet. Dabei wurde die Konzentration der relativen Genexpression durch den geometrischen Mittelwert, der Konzentration der Haushaltsgene dividiert. Die Expression wurde in Relativen Einheiten (RE) angegeben. Um anschließend die Knockdown-Effizienz zu bestimmen, wurden die normalisierten Genexpressionen der mit MAPK14-spezifischen-siRNA Proben durch die mit der Negativ-Kontroll-siRNA behandelten Proben dividiert.

Die Fehlerbetrachtung erfolgte über die Berechnung der Fehlerfortpflanzung. Dazu wurde ein Quotient gebildet. Der Dividend war die Standardabweichung der Konzentration der relativen Genexpression, der mit MAPK14-spezifischen-siRNA behandelten Probe geteilt durch den geometrischen Mittelwert, der Konzentration der Haushaltsgene der mit MAPK14-spezifischen-siRNA behandelten Probe. Der Divisor war die Konzentration der relativen Genexpression, der mit Negativ-Kontrolle-siRNA behandelten Probe geteilt durch die Konzentration der Haushaltsgene der mit Negativ-Kontroll-siRNA behandelten Probe (Abbildung 4).

Standardabweichung der Konzentration der relativen Genexpression der mit MAPK14-spezifischer-siRNA behandelten Probe

---

Geometrischer Mittelwert der Haushaltsgene der mit MAPK14-spezifischer-siRNA behandelten Probe

---

Konzentration der relativen Genexpression der mit Negativ-Kontroll-siRNA behandelten Probe

---

Geometrischer Mittelwert der Haushaltsgene der mit Negativ-Kontroll-siRNA behandelten Probe

---

Abbildung 4 Formel zu Berechnung der Fehlerfortpflanzung

### 3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Produkte diente die Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurden in diesem Fall RNA-Moleküle nach Größe aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht als einzelne Banden sichtbar gemacht.

Standardgemäß wurde dafür zunächst ein 2 %iges Agarosegel angesetzt. 1 g Agarose und 50 ml 1 x TEA-Puffer wurden in einem Erlenmeyerkolben gelöst und in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Das dabei verdunstete Wasser wurde anschließend durch destilliertes Wasser ersetzt, die etwas abgekühlte Gellösung in eine Gelschiene gegossen und der Kamm zur Bildung der Taschen eingesteckt, die später die zu untersuchenden Proben aufnehmen sollten. Nach ca. 15 min war das Gel so weit verfestigt, dass der Kamm entfernt und das Gel in die mit 1 x TEA-Puffer gefüllte Laufkammer des Elektrophoresegerätes gelegt werden konnte.

Für das Experiment wurden jeweils 5 µl der zuvor per PCR gewonnenen RNA-Proben mit 4 µl des Ladepuffers *Orange Dye* angesetzt und in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert. In die erste und letzte Tasche der Kammerreihe wurden jeweils 5 µl eines mit Bromphenolblau versetzten Markers aufgetragen, der als Referenzwert fungiert. Die Auftrennung erfolgte bei ca. 100 V in ca. 45 min in Richtung der Kathode. Sobald der Marker die Lauffront erreicht hatte, wurde der Stromfluss gestoppt und das Gel für ca. 15 min in ein Färbe-Bad mit Ethidiumbromid gelegt. Abschließend wurde die Gelplatte mit dem Pfannenheber aus dem Färbe-Bad genommen und in einem frischen Wasserbad kurz gewaschen. Mit Hilfe von UV-Licht konnten dann die RNA-Banden visualisiert und in der UV-Fotokammer E-Box Vilber von PeqLab für die weitere Auswertung fotografiert werden.

### 3.5 Funktionelle Zellanalyse

#### 3.5.1 MTT- Assay

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt, der die Anzahl von metabolisch aktiven Zellen misst. Die Zellen werden dazu mit dem membrangängigen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) behandelt, welcher ausschließlich durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen zu dunkelblauen Formazan-Kristallen metabolisiert wird. Die Quantifizierung erfolgt anschließend im ELISA-Reader mittels kolorimetrischer Messung der Extinktion des dunkelblauen Farbstoffs dieser Kristalle (76, 77).

Zur Vorbereitung wurden in eine 96 Well-Platte jeweils 10.000 Zellen pro Well zur Behandlung mit *MAPK14*-spezifischer-siRNA bzw. mit der Negativ-Kontroll-siRNA ausplattiert. Das Gesamtvolumen der Zellen in zellspezifischem Medium betrug dabei jeweils 200 µl/ Well. Als unbehandelter Nativwert dienten Ansätze mit 7.000 Zellen 200 µl/ Well. Innerhalb von 24 h bzw. 48 h erfolgte dann die jeweils vorgesehene Transfektion der Zellen (Kapitel 3.3.3).

Zu Beginn des MTT-Assays wurde aus den Wells das vorhandene Medium abgesaugt und durch jeweils 100 µl serumfreies Medium ersetzt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der MTT-Lösung auf die Proben gegeben. Nach 4 h Inkubationszeit bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit > 90 % wurden pro Well 100 µl eines Solubilisierungspuffers auf die Zellen gegeben, der aus Natriumdodecylsulfat (SDS) und 10 % Salzsäure im Verhältnis 1:100 besteht. Diesem kam dabei die Funktion zu, die Zellen zu lysieren und die Löslichkeit der Formazan-Kristalle zu erhöhen. Nach weiterer Inkubation von 4 h bei 37 °C und 250 rpm auf dem Wärmeschüttler wurde die 96 Well-Platte zur photometrischen Messung in den GlowMax (Promega) gegeben. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 560 nm und mit einem Referenzwert von 750 nm.

#### 3.5.2 Migration in der Boydenkammer

Als Migration wird hier die zielgerichtete chemotaktische Bewegung von Zellen in Richtung eines zellspezifischen Lockstoffs bezeichnet. Untersucht wurde die Migration der verschiedenen Zelltypen in einer sog. Boydenkammer. Sie besteht aus zwei übereinanderliegenden Kammern, getrennt durch eine poröse Polycarbonat-Membran

mit einer Porengröße von 8  $\mu\text{m}$ , welche die Zellen nur durch zielgerichtete Bewegung überwinden können und auf deren Unterseite sie sich danach ansammeln. Als Lockstoff dienten 20  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen I bei den Zelllinien MCF-7 und MCF-10A sowie 20  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen IV bei der Zelllinie MDA-MB-231.

In der Vorbereitung wurden jeweils  $4 \times 10^5$  Zellen in eine T-25 Zellkulturflasche ausplattiert und innerhalb von 24 h bzw. 48 h dem geplanten Versuchsansatz entsprechend transfiziert (Kapitel 3.3.3). 24 h vor Versuchsbeginn wurde das zellspezifische Medium angesaugt und die Kultur auf ein serumfreies Medium umgestellt, um eine zielgerichtete Migration anzuregen.

Nach weiteren 48 h wurden diese Zellen mittels Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Trypsin mit 5 ml DPBS verdünnt und abzentrifugiert. Dabei wurde die Probe für 5 min bei 12.000 g zentrifugiert, danach das DPBS durch 200  $\mu\text{l}$  serumfreies Opti-MEM ersetzt und schließlich die Zellkonzentration bestimmt.

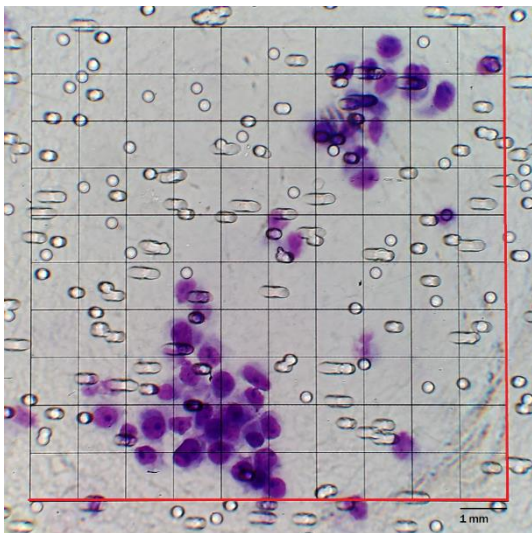
Zur Vorbereitung der Migration wurden zunächst die Wells der unteren Kammer mit jeweils 29  $\mu\text{l}$  Lockstoff befüllt und mit der zuvor für 2 min in DPBS eingeweichten Polycarbonat-Membran verschlossen. Zu beachten war, dass ihre glänzende Seite unten lag und alle Wells vollständig überdeckte. Anschließend wurde ein Dichtungsring aufgesetzt und die obere Kammer mit Hilfe von Schrauben auf der unteren Kammer befestigt. Um die Migration zu starten, wurden schließlich die Wells der oberen Kammer jeweils mit einer Suspension aus  $3 \times 10^5$  Zellen der jeweils zu untersuchenden Zelllinie in 50  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium befüllt.

Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und einer Luftfeuchtigkeit > 90 % wurde der Inhalt der oberen Kammer mitsamt den nicht migrierten Zellen auf ein Papiertuch entleert und verworfen. Die obere Kammer mitsamt Dichtungsring wurde von der Apparatur abgeschraubt, um die Membran zu entnehmen.

Die migrierten Zellen befanden sich nun an auf der glänzenden unteren Seite dieser Polycarbonat-Membran. Um sie weiter zu untersuchen, wurde die Membran mit dieser Seite nach oben zum Trocknen ausgelegt, nachdem sie zuvor in zwei Klammern eingespannt und auf der matten Seite mit Puffer nach Weise gewaschen und an einem Küchenspatel abgezogen worden war.

Vor der Auszählung im Lichtmikroskop wurden die anhaftenden Zellen zunächst für 1 min in Ethanol gebadet, um sie auf der Membran zu fixieren, und anschließend, nachdem sie erneut getrocknet waren, mit dem Hemacolor Färbe-Kit System einzufärben. Dazu wurde die Membran 3 x durch die rote und 6 x durch die blaue Färbe-Lösung gezogen und danach ein letztes Mal in Puffer nach Weise gewaschen, bis alle Farbschlieren entfernt waren. Die getrocknete Membran wurde schließlich mit den migrierten Zellen, also der glänzenden Seite, nach unten auf einem Objektträger platziert und mit Immersionsöl und einem Deckglas fixiert. Abschließend wurden die Ränder des Deckglases mit Nagellack verschlossen und das nun fertige Präparat zum Trocknen ausgelegt.

Mit Hilfe eines Rasterokulars wurden bei 40-facher Vergrößerung schließlich die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (Abbildung 5). Erfasst wurden dabei alle gefärbten Zellen, die entweder vollständig im Raster lagen oder den unteren bzw. den äußeren rechten Rand berührten. Für jede Probe wurden zehn Ausschnitte pro Well ausgewählt und zu den Auszählungsergebnissen jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Dabei betrug der Durchmesser des Weills 3,2mm was eine Gesamtfläche pro Wells 8 mm<sup>2</sup> ergibt. Die insgesamt ausgewertete Fläche 2,5 mm<sup>2</sup>.



*Abbildung 5 Auswertung des Migrations-Versuches*

*Mikroskop-Ausschnitt der Migration von MCF-7-Zellen in der Rasterokular-Einstellung bei 40-facher Vergrößerung. Das Raster besteht aus 10 x 10 Kleinquadraten mit einer Fläche von je 1 mm<sup>2</sup>. Gezählt wurden dabei alle lila gefärbten Zellen, die entweder vollständig im Raster lagen oder den unteren bzw. den äußeren rechten, rot markierten Rand berührten.*

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung der Haushaltsgene

Als Haushaltsgene werden Gene bezeichnet, die in vielen Zellen auf einem konstanten Niveau exprimiert werden. Die Proteine, für die sie codieren, sind essenziell für die Aufrechterhaltung basaler zellulärer Funktionen und reagieren kaum auf äußere Einflüsse (78, 79).

In der relativen Genexpressionsanalyse werden die ermittelten Expressionen zu untersuchender Gene auf die Expression der Haushaltsgene normiert. Dies dient zum Abgleich der eingesetzten cDNA-Menge und damit zur Verringerung der Varianz zwischen den einzelnen Proben und als ergänzende endogene Kontrolle (78).

Für die Genexpressionsanalyse wurden die vier etablierten Haushaltsgene *ATP5J*, *PPIA*, *HPRT* und *ACTB* getestet und dessen Expressionen untereinander verglichen. Exemplarisch wird hier der Knockdown-Ansatz von MCF-7-Zellen Versuchsreihe 1 dargestellt. Die zugehörige Versuchsreihe bestand aus sechs Proben des beschriebenen Ansatzes, die mit unterschiedlichen siRNAs (Negativ-Kontroll- und MAPK14-spezifische-siRNA) transfiziert und bis zu drei Tage (24 h, 48 h und 72 h) weiter kultiviert wurden. Für diese Proben wurde jeweils die Relative Expression (RE) möglicher Haushaltsgene einzeln bestimmt, um sie anschließend untereinander zu vergleichen.

Die Expression von *PPIA* blieb in den mit Kontroll-siRNA-behandelten Zellen in den 24 h- und 48 h-Proben nahezu konstant und stieg in der 72 h-Probe auf das Doppelte an. Die Expression in den mit der MAPK14-spezifischen-siRNA behandelten Zellen verdoppelt sich von der 24 h-Probe zur 48 h-Probe. In der 72 h-Probe war wiederum eine verminderte Expression sichtbar.

*ACTB* hingegen zeigte einen leichten Anstieg der Expression in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen von der 24 h- zur 48 h-Probe, wohingegen die 72 h-Probe einen deutlichen Abfall der Expression aufwies. In den Zellen, welche mit der MAPK14-spezifischen-siRNA behandelt wurden, lag die relative Expression in der 24 h-Probe bei 1,9 RE und fiel dann markant auf nahezu Null.

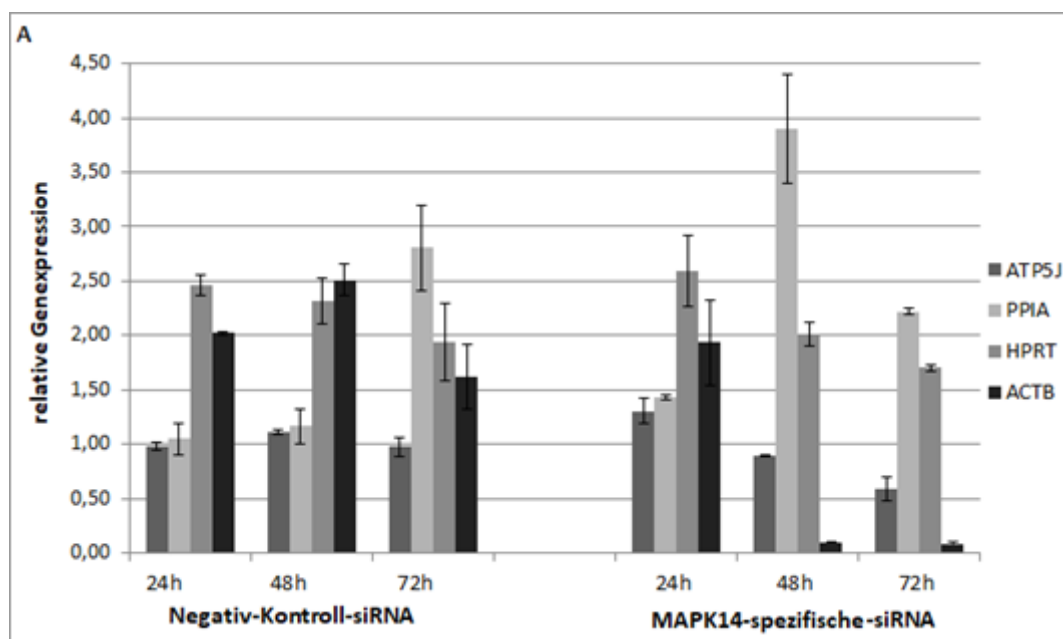
Wesentlich konstanter stellen sich die übrigen Messwerte dar. *ATP5J* zeigte nur sehr geringe Schwankungen in der Expression in allen mit Kontroll-siRNA behandelten

Zellen. In den mit MAPK14-siRNA behandelten Zellen nahm die *ATP5J*-Expression vom 24 h- bis zum 72 h-Zeitpunkt um etwa die Hälfte ab. Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung mit Vorsicht zu betrachten.

*HPRT* zeigte in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine zunächst nahezu konstante Expression, die nach 72 h leicht abfiel. Die Werte der Proben für die mit MAPK14-siRNA behandelten Zellen sanken kontinuierlich von der 24 h- zur 72 h-Probe (Abbildung 6).

Zusammenfassend zeigen die Gene *ATP5J* und *HPRT* im Vergleich miteinander ein sehr ähnliches Verhältnis der relativen Expressionen der Kontroll-siRNA- und MAPK14-spezifischen-siRNA-Proben. Auch die Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontroll- und MAPK14-siRNA-Proben des gleichen Zeitpunkts waren konstant ( $\Delta$  in Abbildung 6 B). *ACTB* und *PPIA* zeigten dagegen größere Schwankungen in ihrer relativen Expression und unterschieden sich deutlich von *ATP5J* und *HPRT*. Sie schieden daher als Haushaltsgene in dem hier gegebenen Zusammenhang aus.

Die Normalisierung aller Genexpressionsanalysen in dieser Arbeit konnte durch die Bildung des Quotienten mit dem geometrischen Mittelwert für die relativen Expressionen der Gene *ATP5J* und *HPRT* erfolgen (Anhang).



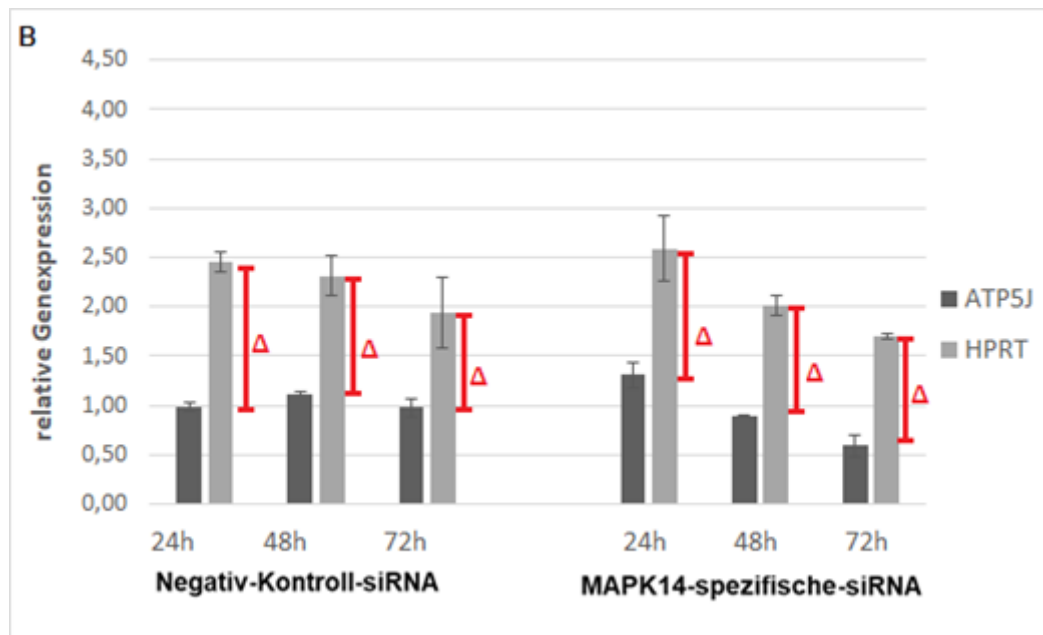


Abbildung 6 Expressionsniveau möglicher Haushaltsgene von MCF-7-Zellen

Dargestellt ist exemplarisch die relative Genexpression, der Haushaltsgene in einem Knockdown-Versuch von MCF-7-Zellen Versuchsreihe 1. A zeigt die relative Genexpression von ATP5J, PPIA, HPRT und ACTB im Verhältnis zueinander. B ist ein Ausschnitt von A und stellt zur bessern Übersicht nur die Expression von ATP5J und HPRT dar. Die in Rot dargestellten Markierungen bilden die Differenz von ATP5J und HPRT ab. Die Messung erfolgte in Duplikaten, die jeweilige Standardabweichung bezieht sich auf die Duplikate.

## 4.2 Qualitätsüberprüfung der qRT-PCR

### 4.2.1 Nachweis der Amplifikationsprodukte

Um sicherzustellen, dass die neu zu etablierenden Primer für *MAPK14* und *MAPK11* das gewünschte Produkt amplifizieren, wurde eine Gelelektrophorese in einem 2 % Agarose-Gel durchgeführt. Dabei konnten die Produkte von *MAPK11* und *MAPK14* auf der Höhe von 72 bp bzw. 265 pb eindeutig identifiziert werden. Unerwünschte Nebenprodukte konnten ausgeschlossen werden (Abbildung 7).

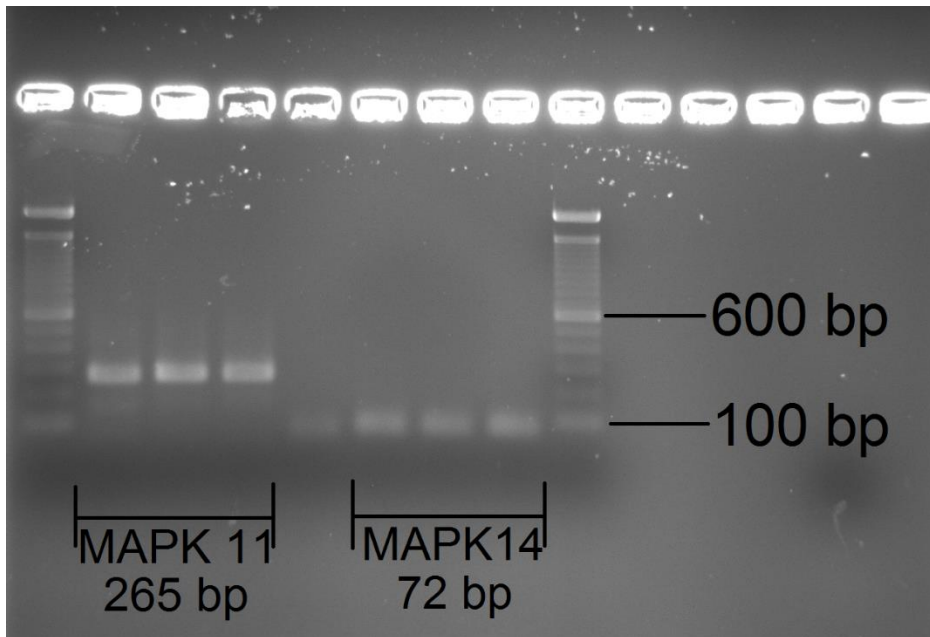


Abbildung 7 Nachweis der Amplifikationsprodukte der Primer.

Aufgetragen wurden in der Gelelektrophorese die pRT-PCR Produkte der Zelllinien MDA-MB-321, MCF-7 und MCF-10A (v. l. n. r.), die drei Banden links für MAPK11 (p38 $\beta$ ) und die drei Banden rechts für MAPK14 (p38 $\alpha$ ). Außen befindet sich ein Marker von 100 pb bis 600 pb in 100er Schritten abgestuft, rechts mit entsprechender Beschriftung für die Produktgröße in bp.

#### 4.2.2 Überprüfung von Schmelzkurve und Schmelzpunkt

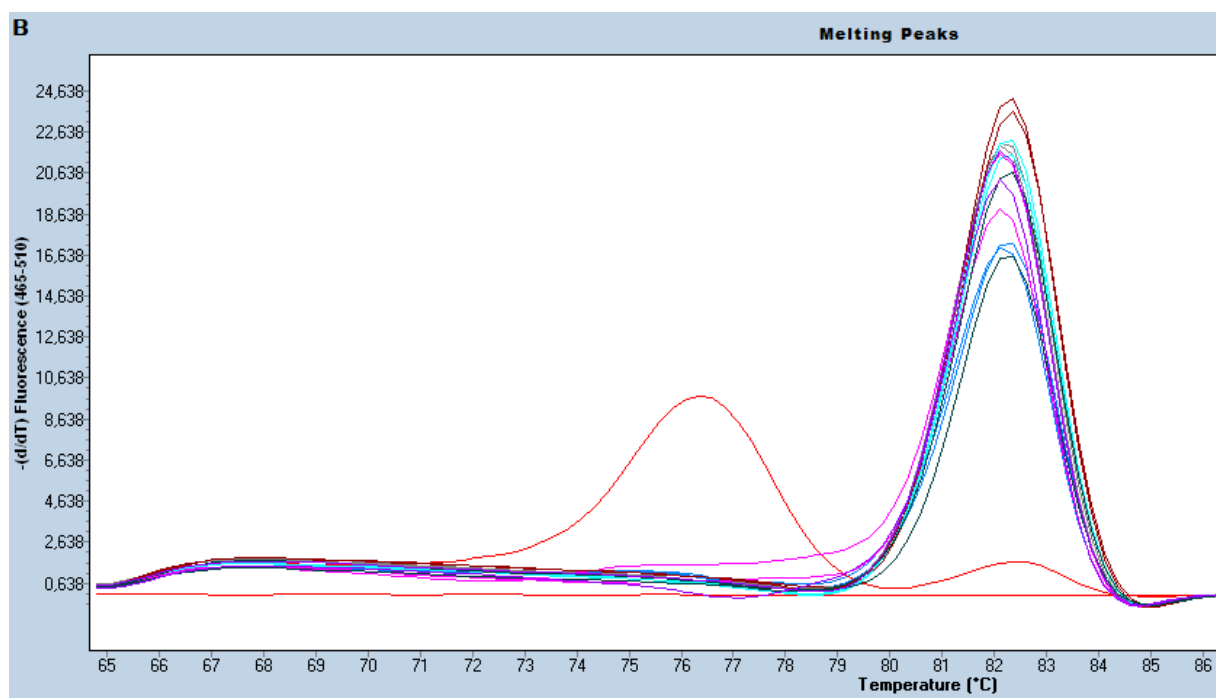
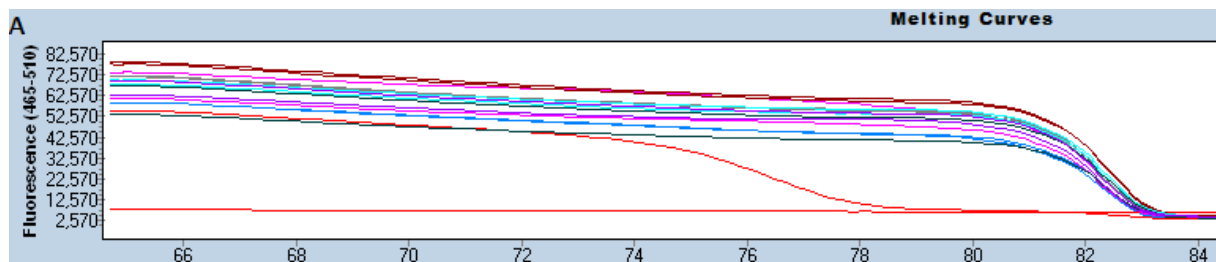
Zur Auswertung jeder qRT-PCR gehören die Überprüfung der Schmelzpunkte, sowie die Schmelzkurvenanalysen. Damit sollte sichergestellt werden, dass die PCR frei von Verunreinigungen war, da diese sich als Unerwünschtes Nebenprodukt äußern und das Ergebnis verfälschen. Jedem PCR-Produkt wurde eine Schmelzkurve mit dem dazugehörigen Schmelzpunkt zugeordnet (Tabelle 11). Die exemplarisch abgebildeten Schmelzkurven des Haushaltsgens *HPRT* im p38 $\alpha$ -Knockdown-Versuch mit MCF-7-Zellen lassen keinerlei Abweichungen in den sechs mit siRNA behandelten Duplikaten sowie in den Duplikaten der Standardreihe vom erwarteten Verlauf erkennen. Zudem wird Standardgemäß ein Duplikat der Negativkontrolle mit analysiert. Die erste Negativkontrolle zeigte, dass keine Amplifikation stattgefunden hat, wobei die zweite Negativkontrolle zwei versetzte Peaks bei 76,5 °C und bei 82,5 °C aufzeigte (Abbildung 8). Dies gilt als Hinweise für Nebenprodukte, kann jedoch, solange sie nur in der Negativkontrolle auftritt, vernachlässigt werden.

Demzufolge liegen keine Hinweise vor, die das Ergebnis der qRT-PCR in Frage stellen könnten.

Tabelle 11 Schmelzpunkte der qRT-PCR-Produkte

Schmelzpunkte der qRT-PCR-Produkte, die durch die in dieser Arbeit verwendeten Primer ermittelt wurden. Dabei sind jeweils die Schmelzpunkte von einem Anker der Standardreihe gewählt worden, die beispielhaft für das jeweilige qRT-PCR-Produkt stehen und als Vergleichswert für nachfolgende Versuche dienen.

PCR – Produkt	Schmelzpunkt [°C]
MAPK14	82,2
MAPK11	88,6
ATP5J	81,0
HPRT	81,6
ACTB	86,8
PPIA	86,5



C			
Samples			
Include	Color	Pos	Name
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: blue;">■</span>	A1	1:40
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: blue;">■</span>	A2	1:40
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: red;">■</span>	A3	h20
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: red;">■</span>	A4	h20
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: magenta;">■</span>	D3	MCF7 s1 24
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: magenta;">■</span>	D4	MCF7 s1 24
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: gray;">■</span>	D5	1 MCF7 s1 48
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: gray;">■</span>	D6	1 MCF7 s1 48
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: darkred;">■</span>	D9	MCF7 s1 72
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: darkred;">■</span>	D10	MCF7 s1 72
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: cyan;">■</span>	D11	MCF7 MAPK 24
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: cyan;">■</span>	D12	MCF7 MAPK 24
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: darkgreen;">■</span>	E1	1 MCF7 MAPK 48
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: darkgreen;">■</span>	E2	1 MCF7 MAPK 48
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: purple;">■</span>	E5	MCF7 MAPK 72
<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: purple;">■</span>	E6	MCF7 MAPK 72

Abbildung 8 Schmelzkurven und Schmelzpunkt von HPRT

Abgebildet sind die Schmelzkurven und die Schmelzpunkte der Produkte des Haushaltsgens HPRT im p38 $\alpha$ -Knockdown-Versuch mit MCF-7-Zellen. A zeigt die Schmelzkurve, B den Schmelzpeak und C die farbliche Zuordnung zu den einzelnen Proben. Dabei wurden alle Proben in Duplikaten aufgetragen. So handelte es sich um drei mit der MAPK14-spezifischen-siRNA transfizierten Duplikate, die als MCF7 MAPK und dann dem jeweiligem Zeitintervall beschriftet wurden, und drei Duplikate, welche mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfeziert wurden und die Beschriftung MCF7s1 und das jeweilige Zeitintervall tragen. Zudem wurden jeweils ein Duplikat der 1:40 Verdünnung der etablierten Standardreihe und die Negativkontrolle aufgetragen. Das Duplikat der Standardreihe diente als Referenzwert zur Bestimmung der relativen Expression. Die Auswertung erfolgte über die LightCycler 480 Software.

## 4.3 Vorversuche

### 4.3.1 Wahl der Zellzahl

Voraussetzung für das Erreichen eines effizienten Knockdowns ist ein optimales Mengenverhältnis von zu transfizierenden Zellen, siRNA und Transfektionsreagenz. Dabei variiert die Lipoplexzusammensetzung je nach Zelltyp. Um dieses Verhältnis zu ermitteln bzw. zu optimieren, waren umfangreiche Vorversuche nötig.

Als unverzichtbarer Zwischenschritt musste aus den transfizierten Zellen zunächst die RNA isoliert werden. Daraus erfolgte anschließend die cDNA-Synthese und im Verlauf die qRT-PCR zur Ermittlung der Knockdown Effizienz. Es stellte sich heraus, dass für die RNA eine Minimalkonzentration von 100 ng/µl anzustreben war; außerdem sollte eine Maximalkonzentration von 1.000 ng/µl nicht überschritten werden. Unterhalb dieser Werte ist die Konzentration zu gering, um später die Produkte in der qRT-PCR zu bestimmen. Oberhalb der Werte verstopften während der RNA-Isolation die Säulen, so dass die Extraktion nicht erfolgreich zu Ende geführt werden konnte.

Um dieses Problem zu lösen, musste insbesondere die Zellzahl experimentell den vorgesehenen Zeitintervallen angepasst werden. Es zeigte sich, dass grundsätzlich die Zahl der ausplattierten Zellen umso höher sein muss, je kürzer das Zeitintervall für die Transfektion angesetzt ist. Präzise Werte für die effiziente Zellzahl erforderten Vorversuche, in denen parallel auch die optimale Menge an Transfektionsreagenzien ermittelt wurde (Tabelle 4). Zudem war ein durchschnittlicher Reinheitswert von  $A_{260}/A_{280} = 1,80 - 2,0$  bzw.  $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$  notwendig.

### 4.3.2 An einem Beispiel dargestellter Vorversuch

An einem Beispiel dargestellter Vorversuch des p38 $\alpha$  Knockdowns mit MCF-7-Zellen zeigt das Abstimmen von Zellzahl und Transfektionsreagenz. Der Ansatz erfolgte mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  für das 24 h-Intervall, mit  $4 \times 10^5$  für das 48 h-Intervall. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt, zu dem die Zellen zur RNA-Isolation von der Kulturschale abgenommen wurden.

Eingeleitet wurde die Transfektion jeweils 48 h nach dem ausplattieren der Zellen und erfolgt mit 3 µl *MAPK14*-spezifischer-siRNA pro Schale und mit 15 µl Negativ-Kontroll-siRNA. So zeigt sich in der Auswertung eine Knockdown Effizienz mit

einer Restexpression nach dem 24 h-Intervall von 72 % und dem 48 h-Intervall mit 54 % (Abbildung 9).

Als Konsequenz aus diesem zunächst nicht zu verwertenden Ergebnis wurde für den neuen Ansatz die Menge an *MAPK14*-spezifische-siRNA auf 4  $\mu$ l pro Schale erhöht und die Zellzahl auf  $3 \times 10^5$  für das 24 h-Intervall, auf  $2,5 \times 10^5$  für das 48 h-Intervall reduziert. Mit diesem Ansatz wurde der zu erwartende Effizienzwert schließlich erreicht (Kapitel 4.5).

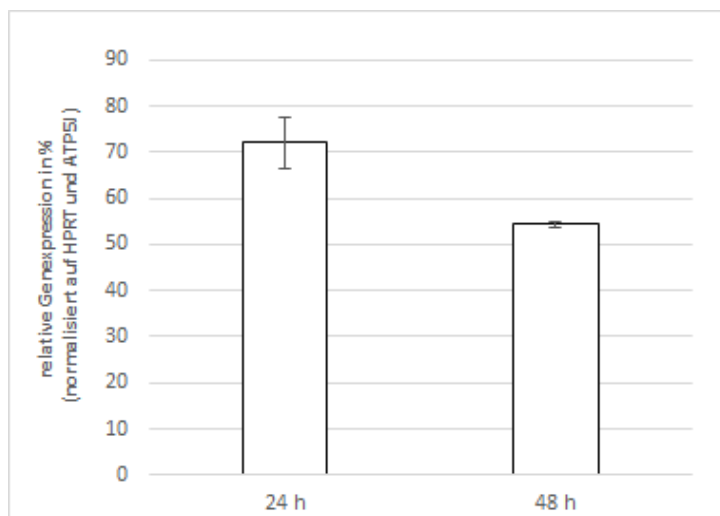
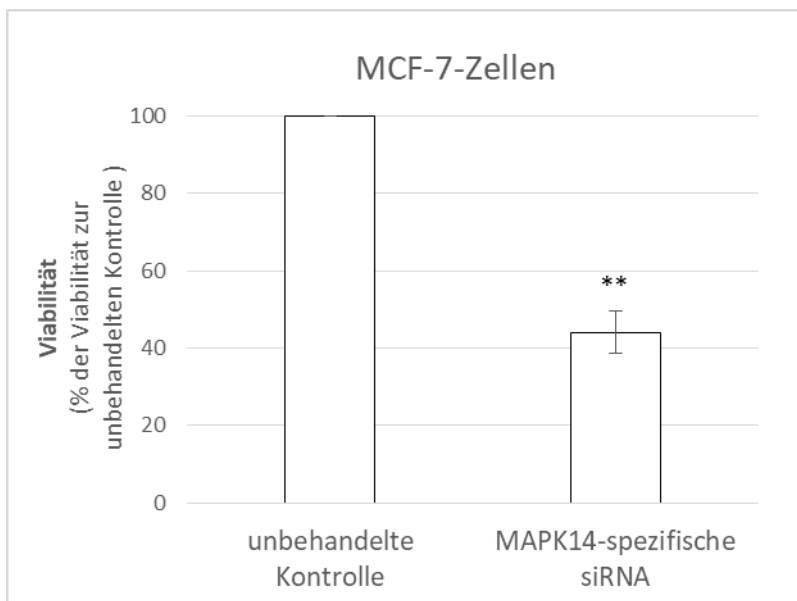
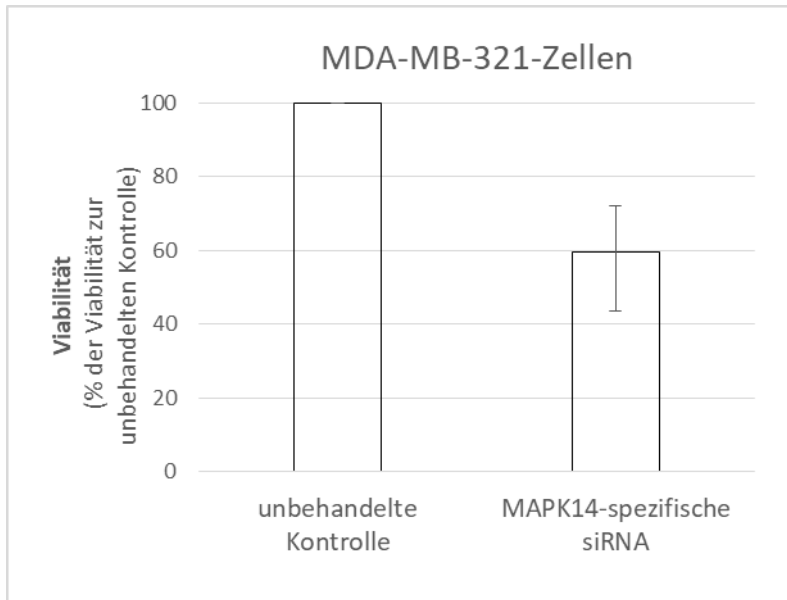


Abbildung 9 Vorversuch eines p38 Knockdowns bei MCF-7-Zellen

Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen für das 24 h-Intervall und  $4 \times 10^5$  für das 48 h-Intervall ausgesät. Das Zeitintervall bezieht sich auf den Zeitpunkt, an dem die Zellen zur RNA-Isolation von der Schale genommen wurden. 48 h nach dem Ausplattieren in das Transfektionsgefäß wurden die Zellen transfiziert. Es wurden pro Schale 3  $\mu$ l *MAPK14*-spezifischer-siRNA und von der Negativ-Kontroll-siRNA 15  $\mu$ l eingesetzt. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Angegeben ist die auf die Haushaltsgene *ATP5J* und *HPRT* normalisierte relative Genexpression in % sowie die Fehlerfortpflanzung.

Im Verlauf der Vorversuche stellte sich auch heraus, dass die malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 jeweils 48 h benötigten, um nach dem Splitt-Vorgang so gut auf der 60 mm Schale anzuwachsen, dass sie die Transfektion mit einer angemessenen Viabilität überstehen. Bei der benignen Zelllinie MCF-10A genügte dagegen schon 24 h zum sicheren Anwachsen. Im Vergleich zur Nativkontrolle lag die Viabilität 48 h nach Transfektion bei den MDA-MB-231-Zellen bei 60 %, bei den MCF-7-Zellen bei

44 % und bei den MCF-10A-Zellen bei 55 %. Dabei zeigten die MCF-7- und MCF-10A-Zellen kaum Schwankungen in ihrer Viabilitätsausprägung mit einer signifikanten Abweichung des Mittelwertes ( $p$ -Wert  $< 0,01$ ). Die MDA-MB-231-Zelllinie wies dagegen eine Standardabweichung von 16 % auf (Abbildung 10).



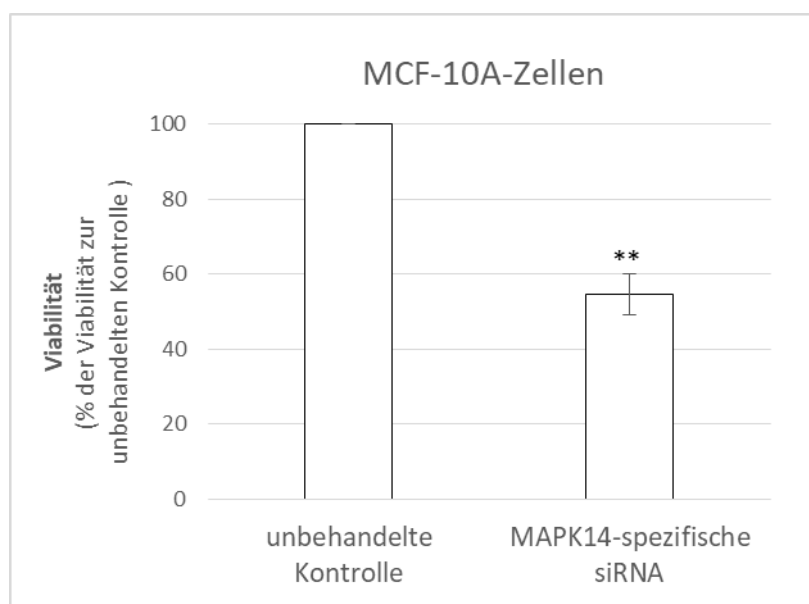


Abbildung 10 Vergleich der Viabilität nach p38 $\alpha$  Knockdown zur Nativ-Kontrolle

Angegeben ist die Viabilität der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A in %, sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Nativ-Kontrollen der jeweiligen Zelllinien wurden dabei auf 100 % gesetzt. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt, bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* und bei einem p-Wert < 0,01 mit zwei \* gekennzeichnet.

#### 4.4 Expressions-Nachweis von p38 $\alpha$ und p38 $\beta$

Um die Bedeutung von p38 $\alpha$  zwischen den einzelnen Mammakarzinom-Zelllinien vergleichen zu können, wurde vorab das Genexpressionsniveau der einzelnen unbehandelten Zelllinien in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression von p38 $\beta$ , welchem eine ähnliche Funktion zugeschrieben wird, gemessen. Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt und mit den Haushaltsgenen *ATP5J* und *HPRT* normalisiert.

Die maligne Zelllinie MDA-MB-321 zeigte mit 7,3 RE das höchste Expressionsniveau von *MAPK14* sowie eine hohe Expression von *MAPK11* mit einem Wert von 5,5 RE. Die Standardabweichungen betragen 1,3 RE bzw. 0,6 RE.

In den MCF-7-Zellen waren die Expressionen von *MAPK11* und *MAPK14* mit einer Differenz von 0,3 RE annähernd gleich. Zu beachten war die ausgeprägte Varianz von *MAPK11* mit einer Standardabweichung von 2,8 RE. *MAPK14* verhielt sich im Gegensatz dazu mit einer Standardabweichung von 0,5 RE stabil.

Die MCF-10A-Zellen zeigten im Vergleich zu den MDA-MB-231-Zellen eine gegensätzliche Expression von *MAPK14* und *MAPK11*. Dabei war *MAPK11* mit 5,6 RE annähernd doppelt so hoch exprimiert wie *MAPK14* mit 2,9 RE. Die Standardabweichung der Mittelwerte hatte ähnliche Ausmaße wie die der MCF-7-Zellen. Die *MAPK11*-Expression wies eine Standardabweichung von 2,2 RE auf. Die *MAPK14* Expression war mit einer Standardabweichung von 0,2 RE konstant.

So zeigten die malignen Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 eine höhere Expression von *MAPK14* als die benigne Zelllinie MCF-10A. Während in den MDA-MB-231-Zellen die Expression von *MAPK14* überwiegt, war sie in den MCF-7-Zellen nahezu äquivalent zur *MAPK11*-Expression. In den MCF-10A-Zellen wurde wesentlich weniger *MAPK14* als *MAPK11* exprimiert. Zu beachten, war zudem die starke Varianz in der *MAPK11* Expression, wohingegen *MAPK14* in allen drei Zelllinien konstant exprimiert wurde (Abbildung 11).

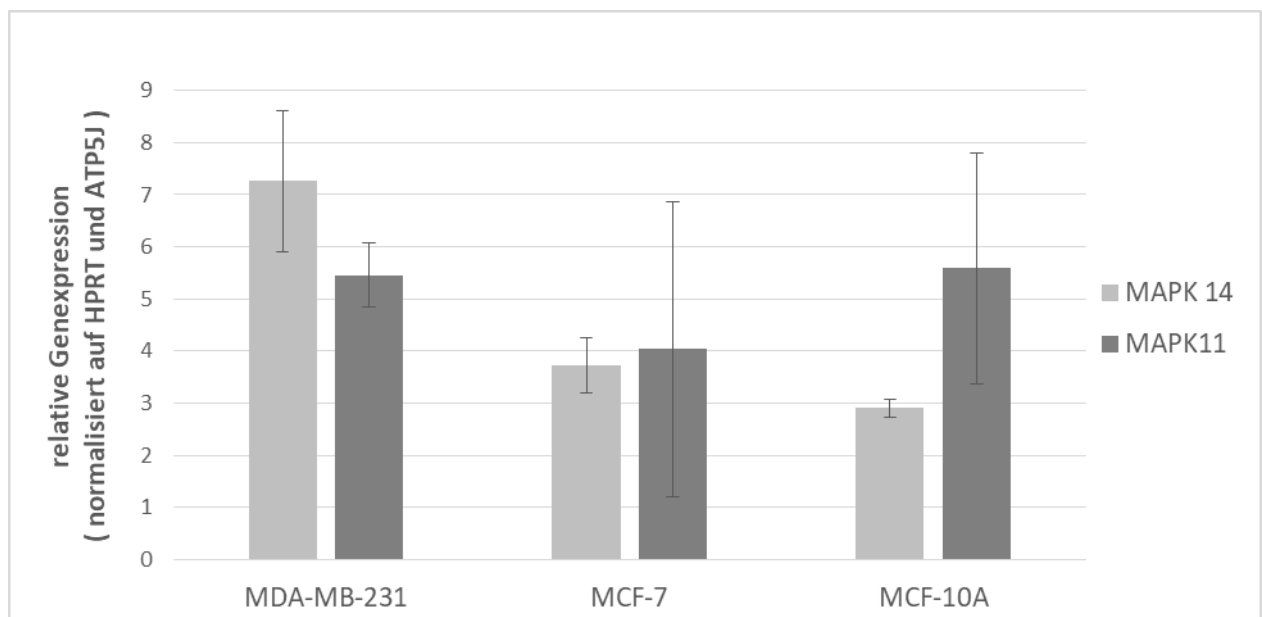


Abbildung 11 Quantitative Expressions-Analyse von *MAPK14* und *MAPK11*

Die relative Genexpression von *MAPK14* (*p38 $\alpha$* ) und *MAPK11* (*p38 $\beta$* ) wurde bei unbehandelten gesunden Zellen mittels qPCR quantifiziert. Dabei wurden die malignen Zelllinien MDA-MB-321 und MCF-7, sowie die benigne Zelllinie MCF-10A verwendet. Es sind jeweils die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen abgebildet. Angegeben sind die auf die Haushaltsgene *ATP5J* und *HPRT* normalisierten Expressionen und die jeweiligen Standardabweichungen der Mittelwerte.

## 4.5 Ergebnisse des p38 $\alpha$ Knockdowns

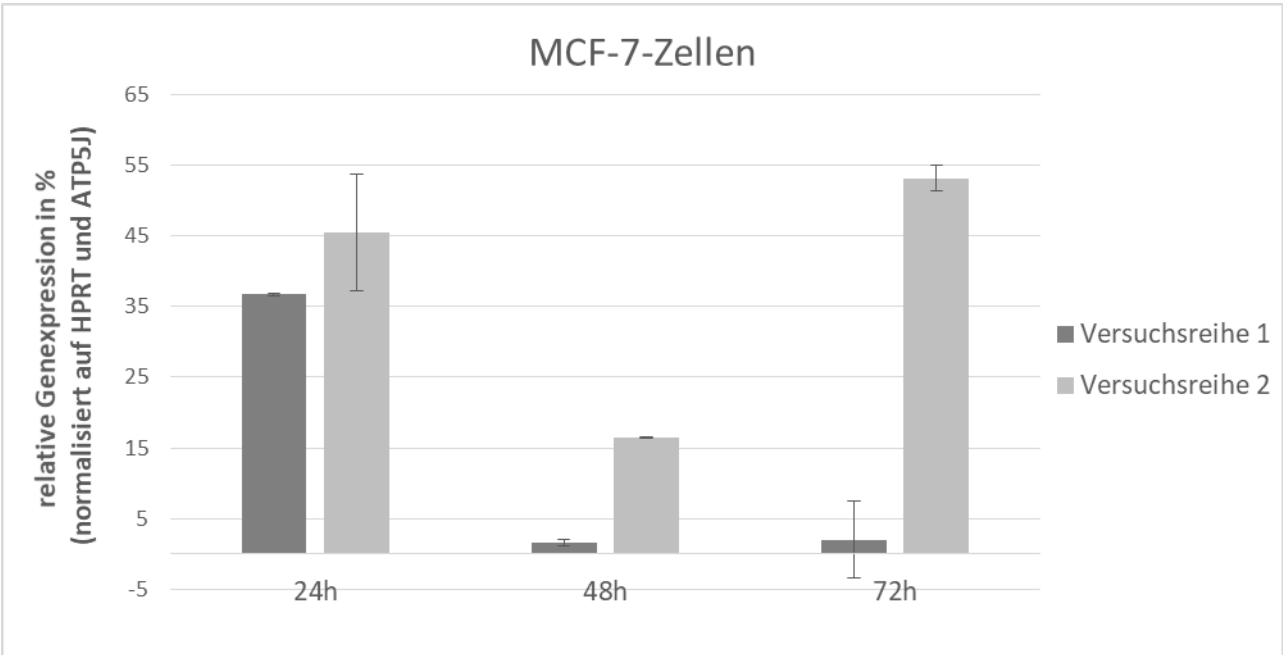
Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Genexpression von p38 $\alpha$  auf maximal 40 % Restexpression zu reduzieren, da dann erst davon auszugehen war, dass die Reduktion einen Einfluss auf das Zellverhalten zeigt.

Die MDA-MB-231-Zellen zeigten in beiden Versuchsreihen 24 h nach der Transfektion eine Reduktion der p38 $\alpha$ -Expression auf 33 % bzw. 35 %. 48 h nach der Transfektion konnte eine weitere Reduktion auf 6 % bzw. 17 % beobachtet werden, bevor diese 72 h nach der Transfektion wieder auf 12 % bzw. 29 % anstieg. Dabei fiel der durch die Fehlerfortpflanzung ermittelte Fehler in Versuchsreihe 1  $< 0,7$  % und in Versuchsreihe 2  $< 3$  % in jeweils allen drei Zeitintervallen gering aus.

Die MCF-7-Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf der p38 $\alpha$ -Suppression auf. Die Restexpression fiel 24 h nach der Transfektion auf 36 % bzw. 45 % und 48 h nach der Transfektion auf 2 % bzw. 17 %. 72 h nach der Transfektion stieg die Expression bei Versuchsreihe 2 wieder auf 53 % an. In Versuchsreihe 1 war die Zunahme der Expression vom 48 h-Wert zum 72 h-Wert mit 0,5 % wesentlich geringer. Der errechnete Fehler für den 24 h- und 48 h-Wert war in Versuchsreihe 1  $< 0,4$  % und für den 72 h Wert 5,5 %. Versuchsreihe 2 zeigte ebenfalls einen geringen Fehler  $< 2$  % für den 48 h und 72 h Wert an. Der 24 h-Wert wies einen Fehler von 8 % auf. Dieser Fehler wurde mit Hilfe der Fehlerfortpflanzung ermittelt.

Die p38 $\alpha$ -Expression sank in den MCF-10A-Zellen 24 h nach der Transfektion auf 25 % bzw. 30 %. 48 h nach der Transfektion lag der Wert bei 3 % bzw. 5 % und 72 h nach Transfektion konnte in Versuchsreihe 2 ein Anstieg der p38 $\alpha$ -Expression auf 52 % beobachtet werden. Der 72 h-Wert der Expression in der Versuchsreihe 1 konnte nicht ermittelt werden, da die RNA-Menge zu gering war um ein zuverlässiges Ergebnis zu generieren. Der mithilfe der Fehlerfortpflanzung berechnete Fehler in Versuchsreihe 1 betrug bei dem 24 h-Wert 4 % und bei dem 48 h-Wert 6 %. In Versuchsreihe 2 lag der Fehler für den 24 h-Wert bei 2 %, für den 48 h-Wert bei 0,4 % und für den 72 h-Wert bei 11 %.

Zusammenfassend zeigte sich in allen drei Zelllinien eine Zunahme der Effizienz des p38 $\alpha$ -Knockdowns vom 24 h-Wert zum 48 h-Wert. Darauf folgte eine Abnahme der Effizienz vom 48 h-Wert zum 72 h-Wert, was auf den Abbau der siRNA innerhalb der Zelle zurückzuführen ist (Abbildung 12).



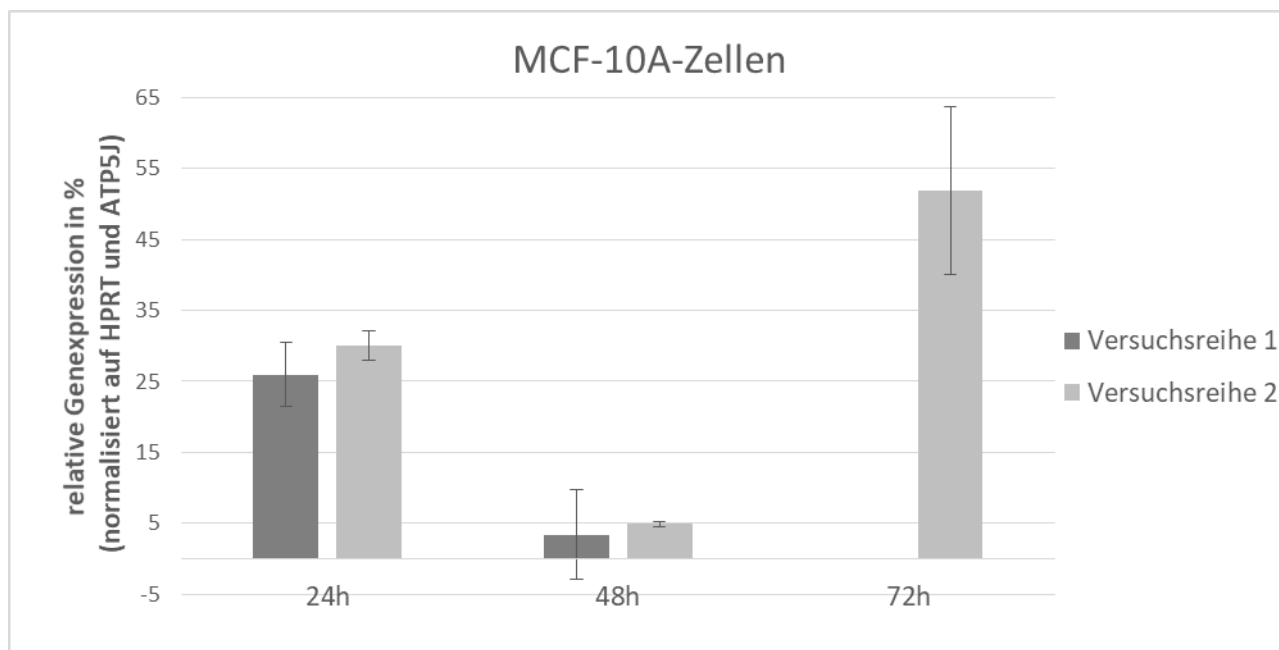


Abbildung 12  $P38\alpha$ -Reduktion nach Knockdown mit MAPK14-spezifischer-siRNA  
 Angegeben ist die Restexpression von  $p38\alpha$  in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A. Der angegebene Zeitpunkt von 24 h, 48 h und 72 h bezieht sich auf den Moment, an dem die Zellen nach der Transfektion, zur RNA-Isolation von der Schale genommen wurden. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Angegeben ist die auf die Haushaltsgene ATP5J und HPRT normalisierte relative Genexpression in % sowie der mithilfe der Fehlerfortpflanzung ermittelte Fehler. Für die MCF-10A-Zelllinie konnte auf Grund einer zu geringen RNA-Menge in Versuchsreihe 1 kein Ergebnis für den 72 h-Wert ermittelt werden.

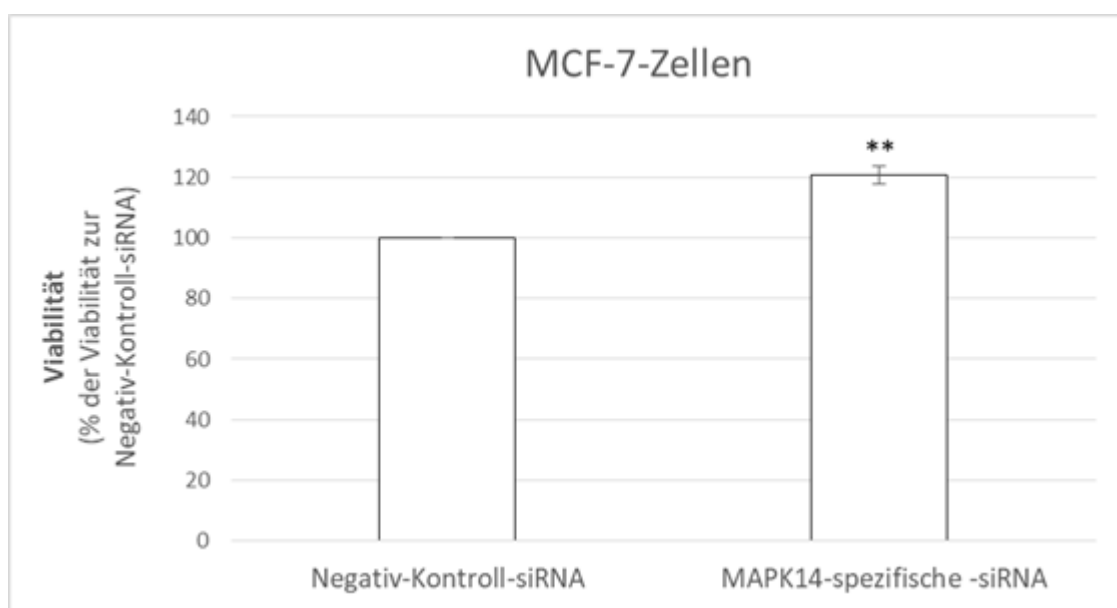
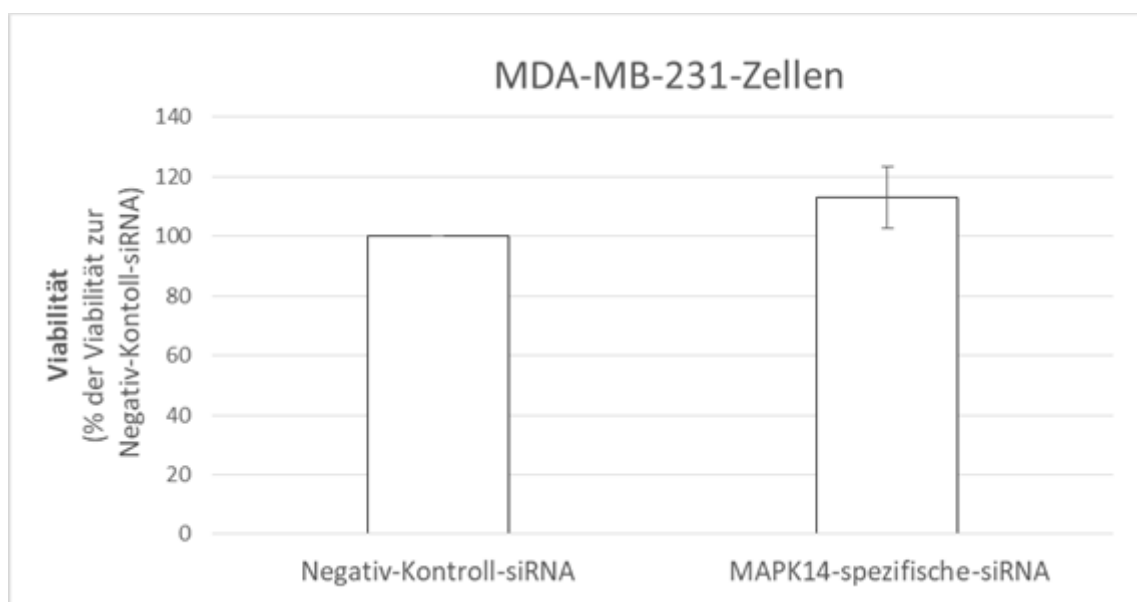
#### 4.6 Einfluss des $p38\alpha$ -Knockdowns auf die Zellviabilität

Die Zellviabilität der Brustkrebszellen wurde mithilfe des MTT-Tests ermittelt. Dabei galt es, die Viabilität der Zellen mit dem induzierten  $p38\alpha$ -Knockdown mit der der Negativ-Kontrolle zu vergleichen.

In der MDA-MB-231-Zelllinie wurde eine Steigerung der Viabilität auf 113 % im Vergleich zu Kontrolle beobachtet. Im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien lagen die Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen hier zu weit auseinander, um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu generieren. Die MCF-7-Zellen verzeichneten mit einem p-Wert  $< 0,01$  eine hochsignifikante Steigung der Viabilität auf 121 %. Dieser p-Wert beschreibt, dass die Annahme der Alternativhypothese in über 99 % der Fälle richtig wäre. Auch in den MCF-10A-Zellen erhöhte sich die Viabilität mit einem

p-Wert < 0,05 signifikant auf 117 %. Die Annahme der Alternativhypothese wäre in diesem Fall ebenfalls in über 95 % der Fälle gerechtfertigt (Abbildung 13).

Die Eindeutigkeit der Ergebnisse der MCF-7- und MCF-10A-Zellen beruht sowohl auf den geringen Standardabweichungen als auch auf der großen Differenz der einzelnen Mittelwerte von der mit MAPK14-spezifischen-siRNA behandelten Zellen im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Hemmung von p38 $\alpha$  zu einer relevanten Steigerung der Viabilität sowohl in den malignen als auch in der benignen Zelllinie führte.



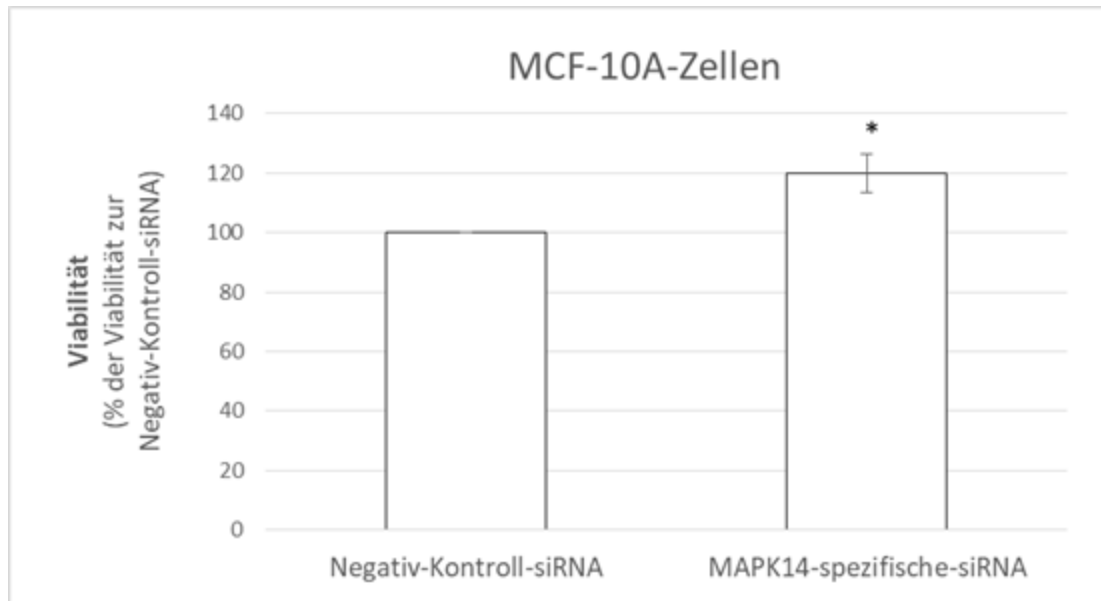


Abbildung 13 Viabilität nach p38 $\alpha$  Knockdown und Negativ-Kontrolle

Angegeben ist die Viabilität der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A in %, sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfizierten Zellen dienten als Referenzwert und wurden dafür auf 100 % gesetzt. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die mit der negativ-Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde mit dem t-Test ermittelt. Es wurde eine p-Wert < 0,05 mit einem \*, bei einem p-Wert < 0,01 mit zwei \* gekennzeichnet.

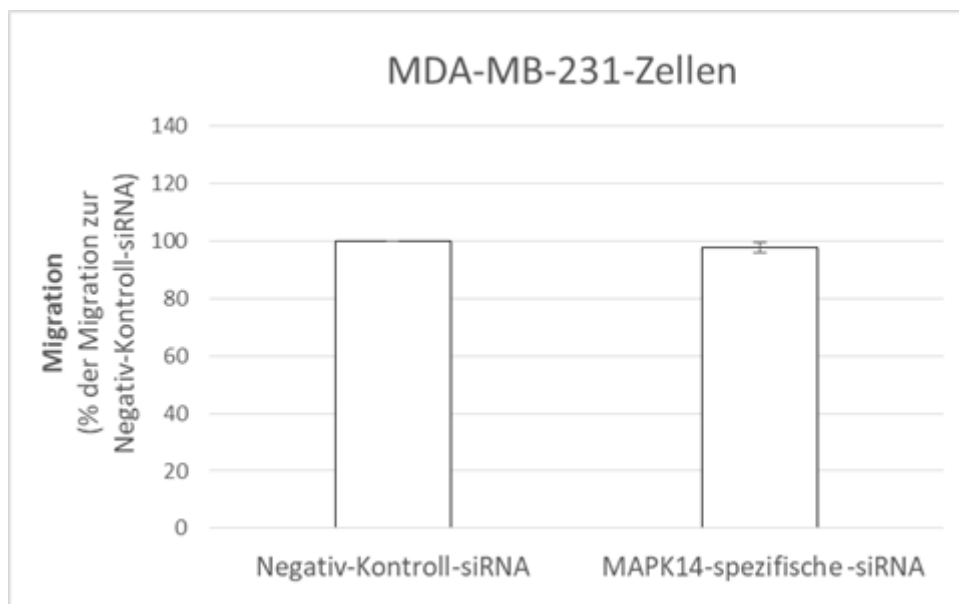
#### 4.7 Einfluss des p38 $\alpha$ -Knockdowns auf die Zellmigration

Die chemotaktische Migrationsfähigkeit, der mit MAPK14-spezifischen- und Negativ-Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde mithilfe der Boydenkammer ermittelt und erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Wahl des Lockstoffes und die jeweilige Konzentration wurden zellspezifisch an unbehandelten Zellen in Vorversuchen getestet.

Das Migrationsverhalten zwischen den MDA-MB-231-Zellen, welche mit der MAPK14-spezifischen-siRNA transfiziert wurden, und ihrer Kontrolle war annähernd gleich. Dabei lag die Differenz der Mittelwerte bei unter 4 %. Der geringe p-Wert von 0,1 beruhte somit mehr auf einer sehr geringen Standardabweichung als auf einer großen Differenz der Mittelwert.

Die mit MAPK14-spezifischer siRNA transfizierten MCF-7-Zellen zeigten eine deutliche Steigerung der Migration von 30 % im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Dabei lag der p-Wert für die Abweichung der Mittelwerte bei 0,09. Die MCF-10A-Zellen, welche mit der *MAPK14*-spezisischen siRNA behandelten wurden, migrierten 32 % weniger als ihre Kontrolle. Hier ergab der t-Test für die Abweichung des Mittelwertes einen p-Wert von 0,08. Die Abweichungen der Migration der MCF-7- und MCF-10A-Zellen waren nicht signifikant, jedoch zeigten die niedrigen p-Werte eine Tendenz an.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die malignen MDA-MB-231-Zellen durch einen p38 $\alpha$ -Knockdowns keine Änderung des Migrationsverhaltens zeigten, wohingegen die malignen MCF-7-Zellen eine deutliche Steigerung aufwiesen. Die benignen MCF-10A-Zellen zeigten im Vergleich eine ausgeprägte Verminderung der Migration (Abbildung 14)(Abbildung 15).



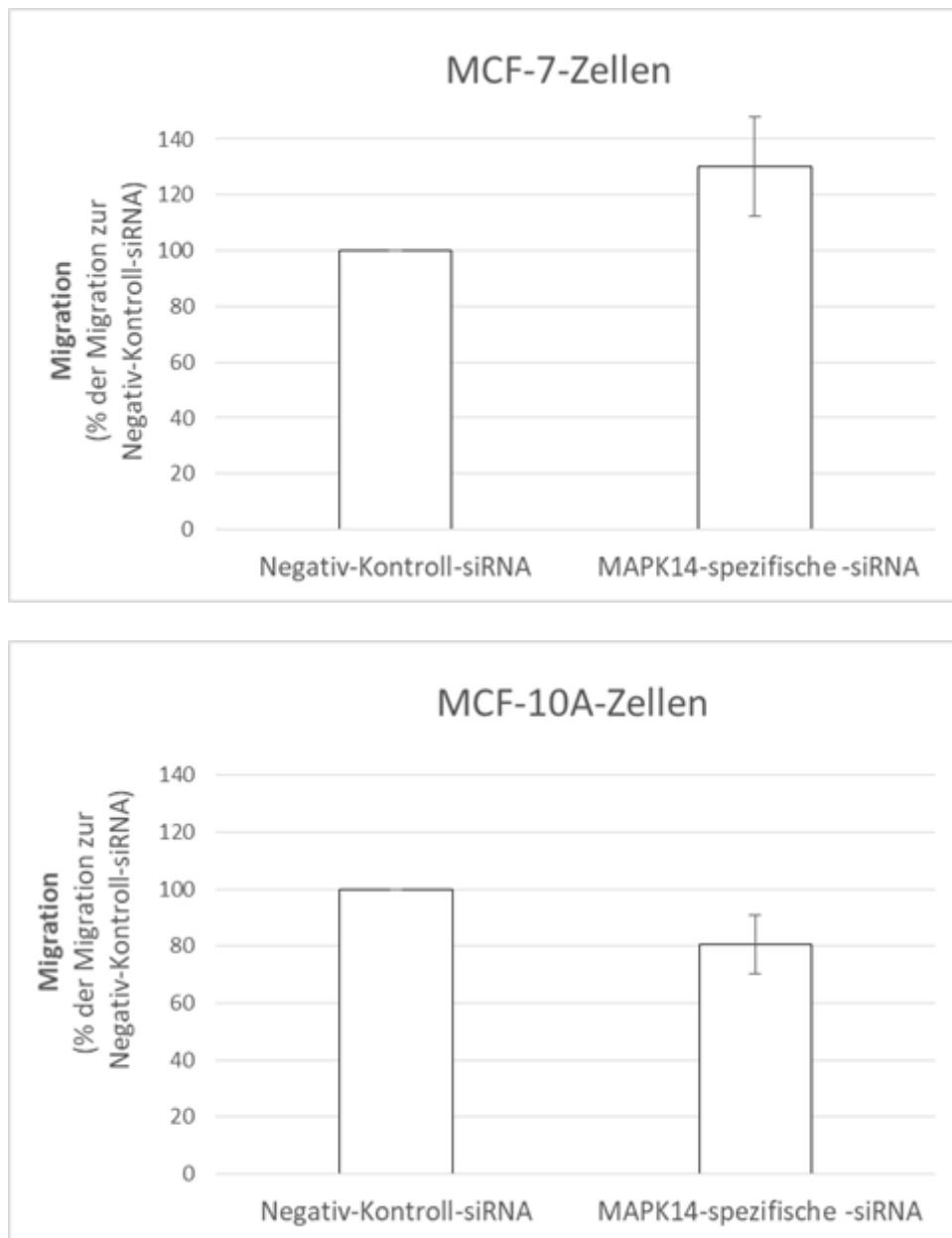


Abbildung 14 Migration nach  $p38\alpha$ -Knockdown und der Negativ-Kontrolle  
Angegeben ist die Migration der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A in %, sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfizierten Zellen dienten als Referenzwert und wurden dafür auf 100 % gesetzt. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die Negativkontrolle und wurde mit dem t-Test ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem \* gekennzeichnet.

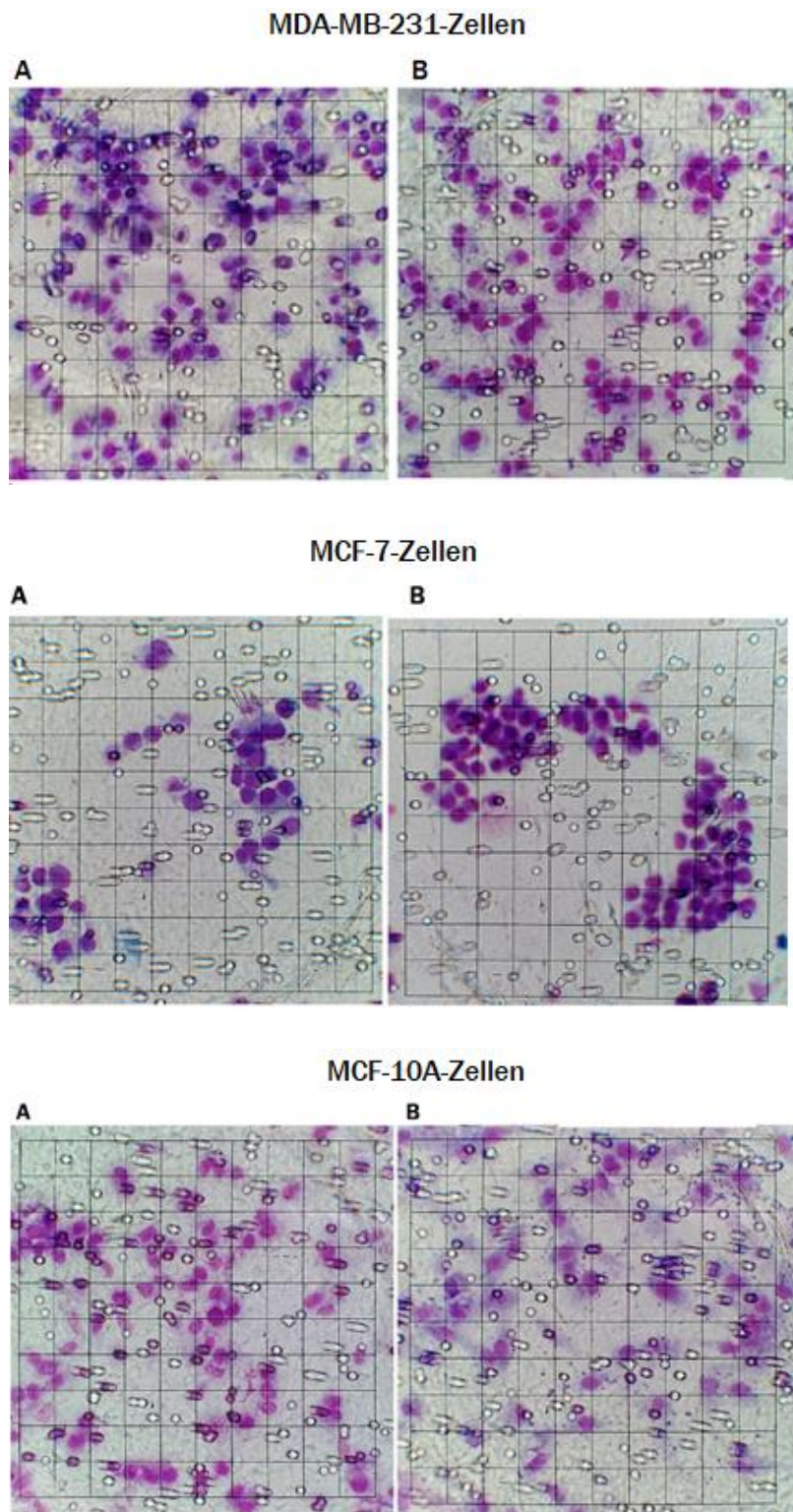


Abbildung 15 Mikroskopische Aufnahme der porösen Membran der Boydenkammer mit violettegefärbten Zellkernen bei 40-facher Vergrößerung. Dargestellt sind die Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A. Dabei bildet A die mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfizierten und B die mit der MAPK14-spezifischen-siRNA transfizierten Zellen ab. Das Raster (Rasterokular mit  $1 \text{ cm}^2$ ) hat eine Kantenlänge von  $250 \mu\text{m}$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss des Expressionsausmaßes von p38 $\alpha$ auf Mammakarzinom-Zellen

Wagner und Nebreda et al. beschrieben, dass hohe Konzentrationen aktiver p38 MAPK bei Brustkrebspatienten mit einer schlechten Prognose, mit Lymphknotenmetastasierung und Therapieresistenz in Verbindung gebracht werden können (80). Der TNBC ist häufig eine sehr aggressive Brustkrebsform und geht mit einer schlechten Prognose einher (35). So zeigte auch in dieser Arbeit die TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 eine höhere Expression von p38 $\alpha$  mit 7,3 RE als die MCF-7-Zellen mit 3,7 RE. Aber auch für die ER-positive Zelllinie MCF-7 wird ein Zusammenhang zwischen Resistenzen gegenüber der endokrinen Therapie und dem Anstieg des p38 MAPK-Levels diskutiert. Dabei berichteten Antoon et al. über einen möglichen *crossstalk* zwischen dem ER und p38, wobei letztere zu einer vermehrten Phosphorylierung des ER führt und dies langfristig eine Tamoxifen-Resistenz bewirkt (81). Untermauert wurde diese These von Massarweh et al., die in einem Mausmodell nachweisen konnten, dass ER-positive MCF-7-Zellen, die eine Resistenz gegen Tamoxifen entwickelt haben, gleichzeitig einen Anstieg des aktivierten p38 aufweisen (82).

Gegenteiliges zeigen Ahmad et al. anhand einer retrospektiven Studie. So wurde dargestellt, dass eine hohe p38-Expression mit klinisch-pathologischen Variablen assoziiert war, welche für eine gute Prognose charakteristisch sind. Namentlich gehören dazu kleinere Tumorgröße, fehlende lymphovaskuläre Invasion sowie ein niedriger NPI-Score (83). Zudem beschreiben Choo et al., dass Hautbiopsien mit der Diagnose einer aktinischen Keratose (AK), die zu einem Plattenepithelkarzinom (SCC) fortgeschritten waren, eine massive Reduktion des phosphorylierten p38 $\alpha$  aufweisen. Es könnte also ein Zusammenhang bestehen zwischen dem Verlust der p38 $\alpha$ -Aktivität und der AK-zu-SCC-Progression, was ebenfalls für tumorsuppressive Eigenschaften von p38 $\alpha$  sprechen würde (84).

Ergänzend konnten Bulavin et al. in Mäusen durch einen gezielten Wip1-Knockout eine Verlangsamung der Tumorgenese des Mammakarzinoms erzielen, der mit einem Anstieg des aktivierten p38 $\alpha$  einherging. Bei gleichzeitiger Verabreichung des p38-Inhibitors SB203580 wurde der tumorsuppressive Effekt aufgehoben (5, 85). Die

Autoren führen dies auf die Modulation des *CDKN2A*-Tumorsuppressor-Locus durch die hohe Aktivität von p38 $\alpha$  zurück. Letzterer codiert für das *CDKN2A/p16INK4a*-Protein, welches maßgeblich den Zellzyklus reguliert und in mutierter Form für einen Großteil der Tumoren verantwortlich ist (86). Auch in den für diese Arbeit verwendenden MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen lag eine *CDKN2A-Deletion* vor. So konnte in diesen beiden Zelllinien weder *CDKN2A* noch sein *downstream*-Produkt *MTAP* nachgewiesen werden (87-89). Im Umkehrschluss bedeutet das für diese Arbeit, dass die Höhe der p38 $\alpha$ -Expression keinen Einfluss auf die Steuerung des Zellzyklus über den klassischen *CDKN2A*-Signalweg hätte und alternative Wege benötigt würden. Diesbezüglich besteht erheblicher Forschungsbedarf. In wie weit p38 $\alpha$  Einfluss auf das Zellverhalten hat wurde an Hand von Analysen des funktionellen Zellverhaltens erfasst.

## 5.2 Auswirkungen des p38 $\alpha$ -Knockdowns auf die Viabilität

Einer der tumorsuppressiven Mechanismen, die p38 $\alpha$  zugeschrieben werden, ist die Einleitung der Apoptose bei zellulärem Stress (9). Im Umkehrschluss müsste dann die Hemmung von p38 $\alpha$  die Viabilität fördern. Um dies zu überprüfen, wurde die Viabilität mit Hilfe des MTT-Assays untersucht.

Erwartungsgemäß zeigten sowohl die beiden malignen als auch die benigne Zelllinie nach p38 $\alpha$ -Knockdown eine Steigerung der Viabilität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Dies bestätigt das Ergebnis von Vorarbeiten mit dem p38-spezifischen Inhibitor Skepinone-L, welcher ebenfalls eine Steigerung der Viabilität in allen drei Zelllinien bewirkte.

Zu beobachten war, dass die Steigerung der Viabilität mit dem p38 $\alpha$ - und p38 $\beta$ -spezifischen Inhibitor Skepinone-L deutlich stärker ausfiel als die alleinige Hemmung von p38 $\alpha$  mittels Knockdown. So stieg die Viabilität der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit Skepinone-L auf bis zu 140 %, mit der selektiven Hemmung von p38 $\alpha$  durch den Knockdown dagegen auf nur 121 %. Noch ausgeprägter zu beobachten war dieser Effekt bei den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-10A. Dort erhöhte sich die Viabilität nach Hemmung mittels Skepinone-L auf 200 % bzw. 160 %, der Knockdown von p38 $\alpha$  bewirkte hingegen eine Viabilitätssteigerung von nur 113 % bzw. 117 %. Auf molekularer Ebene war die Hemmung von p38 effektiver als auf posttranslationaler

Ebene, sie wies dabei allerdings größere Schwankungen auf. Das Ergebnis ist so zu bewerten, dass nur die Hemmung auf posttranslationaler Ebene signifikante Ergebnisse lieferte, jedoch insgesamt geringer ausfiel.

Ursächlich für die erheblichen Unterschiede der Viabilität hinsichtlich der beiden Inhibitionswege könnte ein gegenregulatorischer Effekt von p38 $\beta$  sein. Dieses wird zwar direkt von Skepinone gehemmt, jedoch nicht bei dem in dieser Arbeit durchgeführten p38 $\alpha$ -Knockdown. So beschreiben Canovas und Nebreda et al., dass es gegenregulatorisch zu einem Anstieg von Isoformen kommen kann, welche dann die gehemmte Funktion übernehmen. Bestätigt wird dies von Matesanz et al., die in Adipozyten bei p38 $\alpha$ -Hemmung ebenfalls ein Anstieg von p38 $\delta$  nachweisen konnten (9, 90).

Unabhängig von diesen gegenregulatorischen Effekten kann die Hypothese, dass p38 $\alpha$  einen tumorsuppressiven Effekt auf Mammakarzinom-Zellen hat, anhand von Vorarbeiten sowie anhand der aus dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse weiter verfolgt werden. Weitere Quellen bekräftigen diesen Ansatz. So zeigen Yang et al., dass eine stressinduzierte p38 $\alpha$ -Aktivierung das Drosha-vermittelte zelluläre Überleben hemmt und demzufolge zur Apoptose führt (54). Dolado et al. belegen, dass eine durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte DNA-Schädigung den p38-MAPK Signalweg aktiviert und die Apoptose der Zelle einleitet, um karzinogenen Effekten vorzubeugen. Sehr aggressive Krebszelllinien profitierten demnach von einer Entkoppelung dieses Zusammenhangs (91).

Es gibt jedoch auch *crosstalks*, die die Apoptose hemmen und die Viabilität fördern, beispielsweise über die p38-MK2-RIPK1-Achse. Dabei aktiviert p38 $\alpha$  die MK2, welche wiederum durch Inaktivierung von RIPK1 dessen pro-apoptotisches Potenzial unterdrückt (92, 93). Dies widerspricht jedoch nicht der Aussage, dass p38 eine tumorsuppressive Wirkung hat, da RIPK1 von dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aktiviert wird und somit p38 $\alpha$  als Modulator von TNF- $\alpha$  über RIPK1 gesehen werden kann. Diese Modulation kann als Antitumor-Immunantwort interpretiert werden (94).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass p38 eine wichtige Funktion in der Tumorprävention durch stressinduzierte Apoptose in genetisch geschädigten Zellen übernimmt. Zur Beurteilung der Ergebnisse sollte zudem der gegenregulatorische Anstieg der Isoformen nicht außeracht gelassen werden, da dieser den hemmenden Effekt von p38 $\alpha$  wahrscheinlich stark mindert.

### 5.3 Auswirkung des p38 $\alpha$ -Knockdowns auf die Migration

Ein weiterer tumorsuppressiver Mechanismus, der p38 $\alpha$  zugeschrieben wird, ist die Verhinderung der epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durch Förderung der E-cadherin Expression (95, 96). Der Begriff EMT, geprägt von Hanahan und Weinberg, beschreibt die Differenzierung von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Im Vordergrund stehen dabei die Fähigkeit, die Adhäsionen zwischen der umgebenden extrazellulären Matrix und den an sie angrenzenden Zellen zu lösen, sowie die Fähigkeit zur Invasion in umliegende Gewebe und Gefäße. Diese beiden Eigenschaften unterscheiden maligne Zellen von benignen Zellen und gelten als Voraussetzung für die Bildung von Metastasen (12, 97).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass maligne MCF-7-Zellen, die zuvor mit *MAPK14*-spezifischer siRNA behandelt worden waren, um 30 % stärker migrierten als ihre Negativ-Kontrolle. Dies bestätigt das Ergebnis von Vorarbeiten mit dem p38-spezifischen Inhibitor Skepinone-L, welcher ebenfalls eine Steigerung der Migration von MCF-7-Zellen im Vergleich zur Kontrolle bewirkte. Die mit *MAPK14*-spezifischer siRNA behandelten malignen MDA-MB-231-Zellen zeigten hingegen keine Veränderung sowohl im Vergleich zu den Zellen, welche mit der Kontroll-siRNA behandelten wurden, als auch zu den unbehandelten Zellen. Dabei war jedoch auffällig, dass die Zellen der Linie MDA-MB-231 insgesamt deutlich stärker migrierten als die der Linien MCF-7 und MCF-10A. So sind bei gleichen Versuchsbedingungen die nativen MDA-MB-231-Zellen rund 17 % häufiger migriert als die nativen MCF-7-Zellen und 10 % mehr als die nativen MCF-10A-Zellen (Kapitel 8.6).

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Unterschied zwischen den Zellen, welche mit *MAPK14*-spezifischer- oder Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert wurden, sowie den unbehandelten Zellen könnte darin liegen, dass die eingesetzte Zelllinie MDA-MB-231 auch unabhängig von der Behandlung eine stark ausgeprägte Migration zeigten. Als Ursache dafür kann die *gain-of function (R280K)* Mutation des *TP53*-Gens gesehen werden, welche laut Chen et al. sowohl die Zellmotilität als auch das invasive Verhalten der Zelle fördert. Gerade im TNBC kann die p53-Mutation als Treiber-Mutation verstanden werden, da sie oft in hoher Konzentration exprimiert wird und stabiler ist als der Wildtyp p53 (52, 97-99). So ist es möglich, dass die Zelle jeweils bereits durch das p53 einen maximalen Impuls zur Migration erhält und der p38 $\alpha$ -Knockdown nicht mehr ins Gewicht fällt. Unterstrichen wird diese These durch Untersuchungen

innerhalb der Arbeitsgruppe. Anhand eines Phospho-Kinase-Arrays konnte gezeigt werden, dass in den MDA-MB-231-Zellen zwei von drei Phosphorylierungsstellen von p53 stark phosphoryliert sind, wohingegen die Zelllinien MCF-10A und MCF-7, wenn überhaupt, eine sehr schwache Phosphorylierung dieser Stellen zeigen (Abbildung 16).

Phosphorylierungsstelle	S15	S46	S392	Referenzspots (pos. Kontrolle)
MCF-10A				
MCF-7				
MDA-MB-231				

Abbildung 16 P53 im Phospho-Kinase-Array

Dargestellt sind die Phosphorylierungen des Proteins p53 der Zelllinien MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231 an den Stellen S15, S46 und S392 als Chemilumineszenz-Signal. Rechts sind die zu den jeweiligen Membranen gehörenden positiv-Kontrollen als Referenz abgebildet. Die Ausschnitte sind in den Größenverhältnissen maßstabsgerecht abgebildet. Quantitative Vergleiche sind nur im Bezug zum jeweiligen Referenzspot möglich. Die Phospho-Kinase-Arrays wurden mit dem Kit-System der Firma RD Systems (Minneapolis USA) – Human Phospho-Kinase Array ARY003B/C – erstellt. Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von der eigenen Arbeitsgruppe zu Verfügung gestellt.

Ein weiter Aspekt, der in Bezug auf den fehlenden Unterschied der Migration von siRNA behandelten MDA-MB-231-Zellen beachtet werden sollte, ist die hohe Stoffwechselaktivität. Cloutier et al. beschrieben, dass in aggressiven Tumorzellen die molekularen Mechanismen des mRNA- und Proteinabbaus hoch aktiv sind (100). Demzufolge ist wahrscheinlich, dass auch die siRNA schneller abgebaut und so ihr hemmender Einfluss minimierte wurde. Ursächlich dafür ist die massive Erhöhung des 26S Proteasoms, welches den Proteinabbau kontrolliert. So konnten Tsvetkov et al. zeigen, dass die TNBC Zelllinie MDA-MB-321 eine wesentlich höhere Konzentration

davon besitzt als benigne MCF-10A-Zellen. Es wird berichtet, dass eine spezifische Hemmung von 26S Proteasom in den MDA-MB-231-Zellen einen so weitreichenden Einfluss auf den Zellstoffwechsel hat, dass dieser zum Zelltod führt. Die MCF-10A-Zellen wurden hingegen durch die Hemmung kaum beeinflusst (101). Unterstützt wird diese These durch die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass auch die Viabilitätssteigerung bei MDA-MB-231-Zellen geringer ausfällt als bei den beiden anderen Zelllinien, obwohl die MDA-MB-231-Zellen im nativen Zustand eine zum Teil mehr als doppelt so hohe p38 $\alpha$ -Expression aufwiesen. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Expressions-Analyse. Dabei zeigte sich in den p38 $\alpha$ -Knockdown Versuchsreihen für MDA-MB-231 ein Anstieg der relativen Genexpression von 6 % auf 12 % bzw. von 17 % auf 29 %, jeweils vom 48 h zum 72 h-Intervall.

Unter p38 $\alpha$ -Knockdown zeigten die benignen MCF-10A-Zellen ein vermindertes Migrationsverhalten im Vergleich zur Kontrolle. Auch Kim et al. illustrierten, dass durch den p38 MAPK-Inhibitor SB203580 der H-ras-p38-MKP-2-Signalweg gehemmt und so das Migrationsverhalten signifikant vermindert wird. Dies wurde anhand von MCF-10A-Zellen gezeigt, welche zuvor mit einem mutierten H-ras (pBW1423) transfiziert wurden. Dabei dienten die transfizierten MCF-10A-Zellen dazu, den *crosstalk* zwischen H-ras und p38 hervorzuheben und dessen migrations- und invasionfördernden Einfluss zu verdeutlichen (102, 103). Ähnliches berichten Yong et al. über den Signalweg ErbB2-H-ras-p38 MAPK, der ebenfalls durch die Gabe von SB203580 eine signifikante Minderung der Migration in mit H-ras-transfizierten MCF-10A-Zellen aufzeigt (104).

Insgesamt spricht damit die verminderte Migration nach p38 $\alpha$ -Knockdown eher für einen tumorpromovierenden und gegen einen tumorsuppressiven Einfluss von p38 $\alpha$  auf die benigne Zelllinie MCF-10A. Im Gegensatz dazu zeigen die malignen Zelllinien nach p38 $\alpha$ -Knockdown eine vermehrte Migration, dies würde für einen tumorsuppressiven Einfluss von p38 $\alpha$  auf die Zellen sprechen.

Die Rolle von p38 scheint deutlich Zelltyp- und Funktionsabhängig zu sein. So wird beispielsweise in Bezug auf das hepatozelluläre Karzinom (HCC), das Prostatakarzinom, das Urothelkarzinom und das maligne Melanom p38 $\alpha$  als Aktivator für Migration und Invasion gesehen (55, 105-108). Gegenteiliges wird über die Rolle von p38 in dem Metastasierungsprozess von Brustkrebs in den Knochen berichtet (96, 109). Auch in Bezug auf das Ovarialkarzinom gilt p38 $\alpha$  als eine Kinase, welche die

Metastasenbildung supprimiert (110). Dieses Phänomen bezeichnen Martínez-Limón et al. als die duale Rolle der p38 MAPK. Aus dessen Veröffentlichung von 2020 geht hervor, dass p38 auf die benignen Zellen eher einen tumorsuppressiven und auf die malignen Zellen eher ein tumorpromovierenden Einfluss hat (38). Dies kann anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden.

## 5.4 Methodendiskussion

### 5.4.1 Diskussion der Expressionsanalyse

Die Expression von p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich eine zum Teil deutlich stärkere Expression beider MAPKs in den malignen Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 im Vergleich zu der benignen MCF-10A-Zelllinie und bestätigte so die Forschungsergebnisse von Chen et al. von 2017 (7). Die Ursache der unterschiedlichen Expressionausprägung könnte zum einen in den Zellen selbst liegen, die auf Umwelteinflüsse mit einer Oszillation der MAPK-Aktivität reagieren (111), zum anderen könnte auch die Wahl der Haushaltsgene ursächlich sein, die in der qRT-PCR-Analyse zur Normalisierung der relativen Expression berücksichtigt wurden. Allgemein wird empfohlen, zur Normalisierung mehrere etablierte Haushaltsgene zu untersuchen, um mögliche Varianzen zwischen den Proben auszugleichen (112, 113).

In dieser Arbeit wurden die in der Arbeitsgruppe etablierten Haushaltsgene *ATP5J* und *HPRT* verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass in ihrem Zusammenspiel keines der beiden über- oder unterexprimiert wurde. *ATP5J*, auch als *ATP5PF* bezeichnet, wird von dem Gen *ATP5PF* kodiert. Es bildet eine Enzymuntereinheit, welche im Menschen über den Transport von H<sup>+</sup> den Protonengradienten an der Mitochondrienmembran aufrechterhält (114). *HPRT* ist ein Enzym, das maßgeblich an dem zelleigenen Recyclingprozess von freien Purin-Basen beteiligt ist. Dabei überträgt es Phosphoribose von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) auf Hypoxanthin- bzw. Guaninbasen, um Inosinmonophosphat (IMP) bzw. Guanosinmonophosphat (GMP) zu bilden. Aufgrund des konstanten GMP-Bedarfs der Zelle galt *HPRT* als zuverlässiges Haushaltsgen (57). Mittlerweile wird diese Einschätzung jedoch kontrovers diskutiert. De Kok et al. zeigten, dass *HPRT* besonders in Tumorzellen eine gute Wahl zur genauen Normalisierung von Expressionen ist. Auch in dieser Arbeit zeigte *HPRT* in allen Versuchen ein zuverlässiges Expressionsniveau. Bedenken von Townsend et al., dass *HPRT* zur Normalisierung von Tumorzellen aufgrund von unregelmäßigen und verstärkten Expressionen nicht geeignet ist, konnten nicht bestätigt werden (79, 112, 115).

#### 5.4.2 Wahl des Zeitintervalls zur Analyse des Zellverhaltens

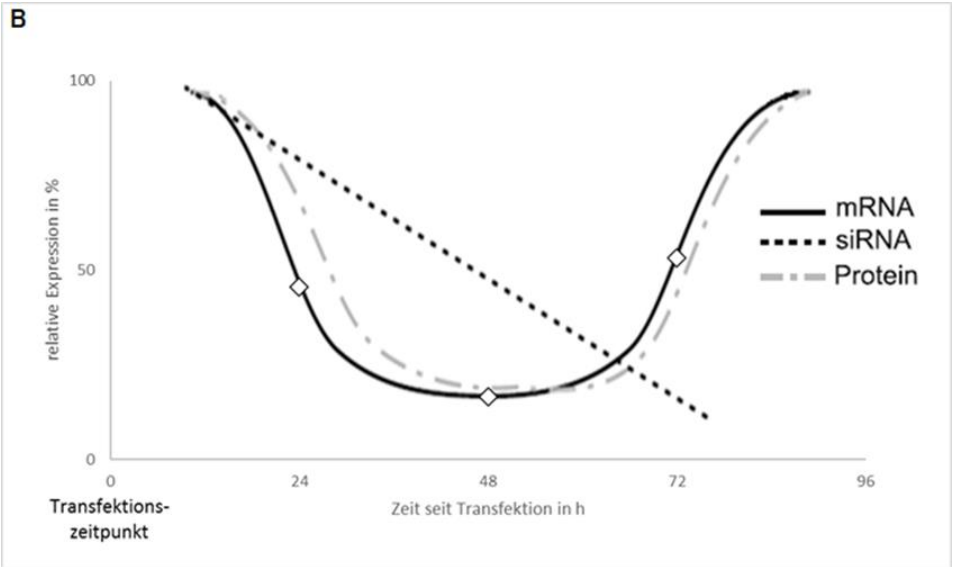
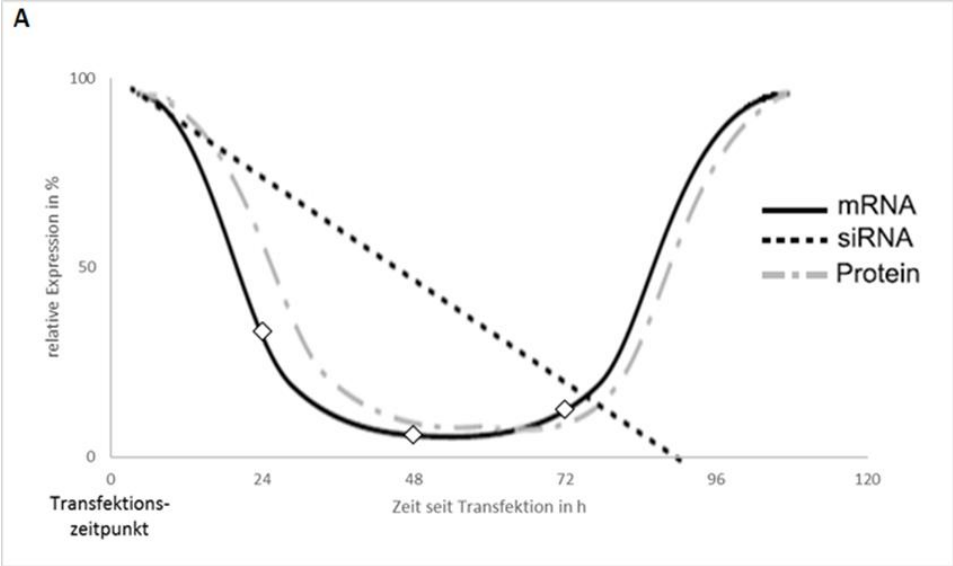
Die in dieser Arbeit durchgeführte Transfektion fällt in die Kategorie der transienten Transfektionen. Die Menge an mRNA sollte im Verlauf der ersten 48 h exponentiell abfallen und sich dann in den folgenden 48 h wieder dem Ausgangswert von 100 % annähern. Die Menge der siRNA sollte hingegen linear bis unter die Nachweisgrenze abnehmen. Dieser Vorgang variiert abhängig von der Zelllinie und der eingesetzten siRNA-Menge. Etwas zeitverzögert, aber nahezu parallel zur Entwicklung der mRNA-Mengen, sollte sich die Konzentrationsveränderung des Proteins verhalten (60).

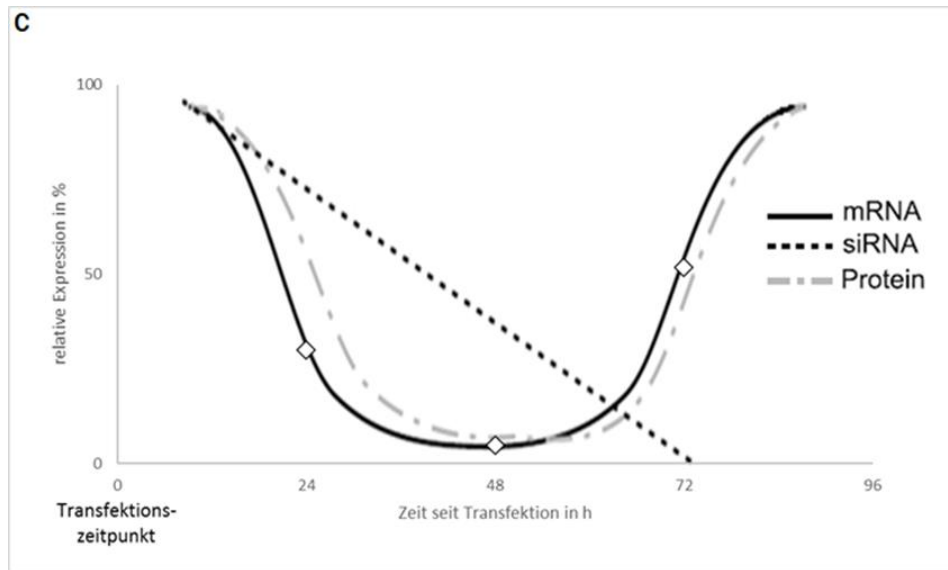
Insgesamt lässt sich dieser Zusammenhang dahingehend interpretieren, dass die siRNA die Wirkung der mRNA und damit die Mengenentwicklung ihrer Produkte hemmt, dabei aber selbst kontinuierlich abgebaut wird. Unterschreitet die Menge an siRNA einen bestimmten Wert, so wird die Hemmung der mRNA zunehmend aufgehoben. Dabei wird die Entwicklung des Proteins nach dem gleichen Muster gehemmt. Dieses Model galt es mithilfe der qRT-PCT zu stützen, um im Anschluss das Zellverhalten dementsprechend analysieren zu können.

Nachfolgend wurden die ermittelten Werte der Knockdown-Effizienzen auf die Kurven dieses Models, welches von C. Mülhardt in dem Buch „der Experimentator“ dargestellt wurde, übertragen. So konnte exemplarisch in allen Versuchen ein Abfall der mRNA-Konzentration vom 24 h-Wert auf den 48 h-Wert und ein anschließender Anstieg vom 48 h-Wert auf den 72 h-Wert beobachtet werden (Abbildung 17). Diese Ergebnisse stimmten mit dem Model für die Mengenentwicklung überein, so dass anhand dessen festgelegt wurde, die Analysen des Zellverhaltens 48 h nach der Transfektion durchzuführen. Damit sollte der Zeitpunkt, an dem der größtmögliche Effekt der p38 $\alpha$  Hemmung vorlag, ausgenutzt werden.

Obwohl mit den exakt gleichen Versuchsparametern gearbeitet wurde, variierte die Knockdown-Effizienz des 48 h-Wertes innerhalb einer Zelllinie um bis zu 15 %. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der physiologische Status der Zellen immer unterschiedlich ist und transfizierte Zellen sensibler auf Umwelteinflüsse reagieren als ihre Nativkontrolle (116). Da die Schwankungen des 48 h-Werts mit 15 % dem natürlichen Maß entsprachen und die Knockdown-Effizienz weit unter 60 % lag, wurde aus praktischen Gründen davon abgesehen zu jedem Versuch in der Zellverhaltensanalyse die Knockdown Effizienz zu bestimmen. Um die

Reproduzierbarkeit der Versuche sicher zu stellen, wurden stichpunktartige Kontrollen durchgeführt.





<b>D</b>	<b>Knockdown Effizienz im 24 h Intervall in [%]</b>	<b>Knockdown Effizienz im 48 h Intervall in [%]</b>	<b>Knockdown Effizienz im 72 h Intervall in [%]</b>
<b>MDA-MB-231</b>	33	6	12
<b>MCF-7</b>	45	16	53
<b>MCF-10A</b>	30	5	52

Abbildung 17 Hemmende Wirkung von siRNA auf die mRNA und ihr Protein

Der angegebene Zeitpunkt von 24 h, 48 h und 72 h bezieht sich auf den Moment, an dem die Zellen nach der Transfektion zur RNA-Isolation von der Schale genommen wurden. Die mit den Rauten abgebildeten mRNA-Mengen sind eigens ermittelte Werte der jeweiligen Versuchsreihen. Die siRNA- und Proteinmengen spiegeln die voraussichtlichen Mengenentwicklungen nach dem Modell, welches von C. Mülhardt in dem Buch „der Experimentator“ dargestellt wurde, wider (60). Die Kurven der mRNA-Mengen wurden in ihrer Ausdehnung an die ermittelten Werte angepasst. In A sind die Werte der MDA-MB-231-Zelllinie, in B der MCF-7-Zelllinie und in C der MCF-10A-Zelllinie in % abgebildet. D gibt tabellarisch die entsprechenden Werte wieder.

## 5.5 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die weitere Erforschung der Funktion von p38 $\alpha$ , einer der vier Isoformen der p38 MAPK. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es in der Zelle zu einem gegenregulatorischen Anstieg, der nicht gehemmten Isoformen kommen könnte. Es erscheint somit sinnvoll, diesen Mechanismus gezielt zu überprüfen, z.B. durch Messung der Genexpression aller bekannten Isoformen, ggf. vor bzw. nach einem p38-Knockdown. Um die Funktion und das Zusammenspiel der einzelnen Isoformen der p38 MAPK sowie die Kompensationsmechanismen der Zelle besser zu verstehen, liegt es nahe, zunächst die Wirkung eines Knockdowns von p38 $\beta$  mit anschließender Analyse des Zellverhaltens zu untersuchen, weil auch diese Isoform in nennenswerter Menge in Mammakarzinom-Zellen vorkommt. Auch ein kombinierter Knockdown von p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  könnte in diesem Zusammenhang wertvolle Erkenntnisse bringen.

Bemerkenswert ist, dass gerade die maligne TNBC-Linie MDA-MB-231 nach dem Knockdown die geringsten Veränderungen zeigte. Tatsächlich wäre aufgrund der ursprünglich hohen p38 $\alpha$ -Expression ein gegenteiliger Effekt zu erwarten gewesen. Im Hinblick darauf, dass die TNBC-Zelllinie besonders aggressiv ist, wäre die Entwicklung einer wirksamen Therapie wünschenswert, weil aktuell noch keine hinreichend spezifischen Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen. Gerade die nähere Untersuchung der Auswirkungen einzelner Mutationen könnte jedoch zu neuen Basiskennnissen über die natürlichen Signalwege in der Zelle führen.

Unerwartet war die verminderte Migration nach dem Knockdown im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zu den malignen Zellen, die die benignen Zellen zeigten. Ursächlich für das ambivalente Verhalten dieser MCF-10A-Zelllinie könnten auch Einflüsse sein, die im Verlauf der Vorkultur gewirkt haben, z.B. während der 24 h in serumfreiem Medium vor Beginn der eigentlichen Versuche. Diese Behandlung könnte auf die benignen Zellen einen anderen Effekt gehabt haben als auf die malignen. Diese Vermutung zu überprüfen wäre von grundsätzlicher Bedeutung für die Planung von Laborexperimenten mit Zellkulturen. Darüber hinaus könnte es von Nutzen sein, bei p38 $\alpha$ -Knockdown den Einfluss von Stress auf das zelluläre Verhalten zu untersuchen, da p38 einer der wichtigen Faktoren ist, die bei Stress die Zellantwort generieren.

## 6 Zusammenfassung

Seit ihrer Entdeckung vor ca. 25 Jahren wird der p38 MAPK eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Zellwachstum und -differenzierung, Einleitung der Apoptose und Migration zugeschrieben (9). Aufgrund dieser Eigenschaften stellt die p38 MAPK ein mögliches *target* für die Therapie von Brustkrebs dar. In Anlehnung an Vorarbeiten unter Verwendung von Skepinone-L, einem spezifischen Inhibitor von p38 $\alpha$  und p38 $\beta$ , wurde in dieser Arbeit die Hemmung der Translation von p38 $\alpha$  mittels siRNA untersucht.

Bei der benignen Zelllinie MCF-10A und bei den beiden malignen Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 wurde nach Transfektion mit MAPK14-spezifischer siRNA eine Knockdown-Effizienz von mehr als 80 % erreicht. Insofern erwies sich die Transfektion mittels siRNA als zuverlässige Methode, um die Translation von p38 $\alpha$  in der Zelle zu hemmen. Grenzen zeigten sich jedoch im Hinblick auf die Sensibilität des Verfahrens. Kleinste Umwelteinflüsse oder Protokollabweichungen hatten deutliche Veränderungen der Knockdown-Effizienz zur Folge. Zudem litt die Viabilität der Zellen offenbar erheblich unter der Transfektion, gestresste Zellen überlebten diese Behandlung teilweise nicht.

Die funktionellen Zellanalysen zeigten, dass die Viabilität nach p38 $\alpha$ -Hemmung mittels Knockdown in allen drei Zelllinien anstieg. Dies bestätigt das Ergebnis von Vorarbeiten mit dem p38-spezifischen Inhibitor Skepinone-L, welcher ebenfalls eine Steigerung der Viabilität in allen drei Zelllinien bewirkte. Im Vergleich zur Hemmung durch Skepinone-L fiel der Anstieg der Viabilität nach p38 $\alpha$ -Knockdown jedoch bei allen untersuchten Zelllinien deutlich geringer aus. Dies könnte auf die gegenregulatorische Aktivierung von p38 $\beta$  zurückzuführen sein.

In der Analyse der Migration zeigten die unterschiedlichen Zelllinien kein einheitliches Verhalten. Nach p38 $\alpha$ -Knockdown migrierten die MCF-7-Zellen vermehrt, die MCF-10A-Zellen vermindert und die MDA-MB-231-Zellen zeigten keinen Unterschied zur Negativkontrolle.

Das Verhalten der MCF-7-Zellen ist somit kongruent zu dem, welches bereits in Vorarbeiten untersucht wurde und legt nahe, dass die gemessenen Einflüsse auf die Viabilität und Migration tatsächlich auf die Hemmung von p38 $\alpha$  zurückzuführen sind.

Zudem kann für die Zelllinie MCF-7 der tumorhemmende Einfluss von p38 $\alpha$  bestätigt werden.

Gesondert zu betrachten ist in diesem Zusammenhang die TNBC-Zelllinie MDA-MB-231. Sie ist gekennzeichnet durch schwerwiegende Mutationen und gilt im Phänotyp als äußerst aggressiv. Im unbehandelten Zustand zeigten diese Zellen die höchste p38 $\alpha$ -Expression, nach p38-Knockdown keine Veränderung der Migration und die geringste Steigerung der Viabilität. p38 scheint demnach keinen wesentlichen Einfluss zu haben. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Zellverhalten über eine Vielzahl untereinander vernetzter Signalwege beeinflusst wird. Gerade durch Mutationen kann dies Zusammenspiel erheblich verändert sein (52, 99). Insgesamt kann daher für die TNBC-Linie MDA-MB-231 ein tumorhemmender Effekt von p38 $\alpha$  nur in äußerst geringem Ausmaß vermutet werden. Nicht geklärt werden konnte der Zusammenhang für die benigne Zelllinie MCF-10A. Diese zeigte zwar eine gesteigerte Viabilität, jedoch eine verminderte Migration.

Die Ergebnisse legen eher eine tumorhemmende Tendenz nahe. Die vielfältige Vernetzung der Wirkung von p38 $\alpha$  mit weiteren Kinasen und die sensible Reaktion des Zellverhaltens auf äußere Einflüsse lassen jedoch aktuell keine klare Aussage zu und bieten vielfältige Ansätze für weitere Forschung.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Ariel IM. The Role of Surgery in the Treatment of Breast Cancer: Historical Review and Current Status. High-Risk Breast Cancer. Heidelberg: Springer-Verlag; 1991. p. 3-23.
2. Tauxe W. A tumour through time. *Nature*. 2015;527(7578):S102-3.
3. Zurrida S, Veronesi U. Milestones in breast cancer treatment. *Breast J*. 2015;21(1):3-12.
4. International Agency for Research on Cancer 2020. Breast Source: Globocan 2020 2020 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>].
5. Igea A, Nebreda AR. The Stress Kinase p38 $\alpha$  as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2015;75(19):3997-4002.
6. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer*. 2013;4(9-10):342-59.
7. Chen L, Mayer JA, Krisko TI, Speers CW, Wang T, Hilsenbeck SG, et al. Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69(23):8853-61.
8. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429(3):403-17.
9. Canovas B, Nebreda AR. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021:1-21.
10. Breitbach A. Wirkung unterschiedlicher p38 MAPK-Inhibitoren auf das funktionelle Verhalten von Mammakarzinomzellen. Universität Mainz (Dissertation). 2020.
11. Koeberle SC, Romir J, Fischer S, Koeberle A, Schattel V, Albrecht W, et al. Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nat Chem Biol*. 2011;8(2):141-3.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
13. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.

14. Heer E, Harper A, Escandor N, Sung H, McCormack V, Fidler-Benaoudia MM. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *The Lancet Global Health*. 2020;8(8):e1027-e37.
15. Koch-Institut R, e.V. GdeKiD. Krebs in Deutschland 2015/2016. 2019.
16. Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW. Screening for breast cancer. *JAMA*. 2005;293(10):1245-56.
17. Cance CGoHFIB. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet*. 2001;358(9291):1389-99.
18. K McPherson CMS, J M Dixon. ABC of Breast Diseases Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. 2000.
19. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(23):2228-39.
20. Riede U-N, Werner M. Brustdüse. Allgemeine und Spezielle Pathologie. Freiburg: Springer-Verlag GmbH Deutschland 2017. p. 709-21.
21. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
22. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):149-54.
23. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG), Deutschen Krebshilfe (DKH). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020,AWMF Registernummer:032-045OL Langversion 2020 [Available from: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.3/LL\\_Mammakarzinom\\_Langversion\\_4.3.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.3/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.3.pdf)].
24. ELSTON CW, ELLIS O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-u. 1991.
25. Louisa M Gannon<sup>1</sup> Maura B Cotter<sup>2</sup> aCMQ. The classification of invasive carcinoma of the breast. 2013.

26. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784-95.
27. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1533-9.
28. Network TCGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.
29. Therese Sørlie<sup>a, b, c</sup>, Charles M. Perou<sup>a, d</sup>, Robert Tibshirani<sup>e</sup>, Turid Aas<sup>f</sup>, Stephanie Geisler<sup>g</sup>, Hilde Johnsen<sup>b</sup>, Trevor Hastie<sup>e</sup>, Michael B. Eisen<sup>h</sup>, Matt van de Rijn<sup>i</sup>, Stefanie S. Jeffrey<sup>j</sup>, Thor Thorsen<sup>k</sup>, Hanne Quistl<sup>l</sup>, John C. Matesec<sup>m</sup>, Patrick O. Brown<sup>n</sup>, David Botstein<sup>o</sup>, Per Eystein Lønning<sup>g</sup>, and Anne-Lise Børresen-Dale<sup>b, .</sup> Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. 2001.
30. Charles M. Perou<sup>\*2</sup> TS, Michael B. Eisen<sup>\*</sup>, Matt van de Rijn<sup>§</sup>, Stefanie S. Jeffrey<sup>k</sup>, Christian A. Rees<sup>\*</sup>, Jonathan R. Pollack<sup>¶</sup>, Douglas T. Ross<sup>¶</sup>, Hilde Johnsen<sup>3</sup>, Lars A. Akslen<sup>#</sup>, éystein Flugel, Alexander Pergamenschikov<sup>\*</sup>, Cheryl Williams<sup>\*</sup>, Shirley X. Zhu<sup>§</sup>, Per E. Lønning<sup>\*\*</sup>, Anne-Lise Børresen-Dale<sup>3</sup>, Patrick O. Brown<sup>¶22</sup> & David Botstein<sup>\*</sup>. Molecular portraits of human breast tumours. 2000.
31. Badowska-Kozakiewicz AM, Budzik MP. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn).* 2016;20(6):436-43.
32. Yates LR, Gerstung M, Knappskog S, Desmedt C, Gundem G, Van Loo P, et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med.* 2015;21(7):751-9.
33. Ärzteblatt D. Präzise Brustkrebstherapie dank Genprofil von Subtypen. *Deutsches Ärzteblatt | Jg 116 | Heft 19 | 10 Mai 2019.* 2019.
34. Lee AH, Ellis IO. The Nottingham prognostic index for invasive carcinoma of the breast. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(2):113-5.
35. Lyons TG. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(11):82.
36. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(11).

37. Yu Shi MG. In the Cellular Garden of Forking Paths How p38 MAPKs Signal for Downstream Assistance.pdf>. *Biological Chemistry* | Band 383: Heft 10 2002.
38. Martinez-Limon A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6).
39. Soni S, Anand P, Padwad YS. MAPKAPK2: the master regulator of RNA-binding proteins modulates transcript stability and tumor progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):121.
40. Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, et al. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol.* 2005;6(4):390-5.
41. Baoxue Ge HG, 2 Franco Di Padova,2 Betty Huang,3 Ligu New,1 Richard J. Ulevitch,1 Ying Luo,3,4 Jiahuai Han1\*. MAPKK-Independent Activation of p38 Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38. 2002.
42. Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* 2007;26(22):3203-13.
43. Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene.* 2007;26(22):3185-202.
44. Maik-Rachline G, Lifshits L, Seger R. Nuclear P38: Roles in Physiological and Pathological Processes and Regulation of Nuclear Translocation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
45. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7420-6.
46. Wood CD, Thornton TM, Sabio G, Davis RA, Rincon M. Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):428-37.
47. Pires BR, Mencialha AL, Ferreira GM, de Souza WF, Morgado-Diaz JA, Maia AM, et al. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169622.
48. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986;47(6):921-8.

49. Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, et al. Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol.* 2002;22(13):4827-35.
50. Ronkina N, Kotlyarov A, Gaestel M. MK2 and MK3--a pair of isoenzymes? *Front Biosci.* 2008;13:5511-21.
51. Pierre May EM. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999.
52. Hui L, Zheng Y, Yan Y, Bargonetti J, Foster DA. Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene.* 2006;25(55):7305-10.
53. Stramucci L, Pranteda A, Bossi G. Insights of Crosstalk between p53 Protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK Signaling Pathway in Cancer. *Cancers (Basel).* 2018;10(5).
54. Arriazu E, Vicente C, Pippa R, Peris I, Martínez-Balsalobre E, García-Ramírez P, et al. A new regulatory mechanism of protein phosphatase 2A activity via SET in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2020;10(1):3.
55. del Barco Barrantes I, Coya JM, Maina F, Arthur JS, Nebreda AR. Genetic analysis of specific and redundant roles for p38alpha and p38beta MAPKs during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(31):12764-9.
56. Nobuyuki Tanaka<sup>+</sup> MK, Hervé Enslen<sup>1,‡</sup>, Chen Dong<sup>§</sup>, Mark Wysk<sup>1,¶</sup>, Roger J. Davis<sup>1</sup> & Richard A. Flavell<sup>+</sup>. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. 2002.
57. Müller-Esterl W, Brandt U, Anderka O, Kerscher S, Kieß S, Katrin R. *Biochemie : Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler.* 3 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum 2018.
58. Fahlke C, Linke W, Raßler B, Wiesner R. *Taschenatlas Physiologie :mit 505 Abbildungen und 26 Tabellen.* 1 ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
59. Teifel M. Transfektion von Säugerzellen. In: Jansohn M, Rothhämel S, editors. *Gentechnische Methoden :Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5 ed. Heidelberg: Springer Spektrum 2012. p. 351-78.
60. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie.* 7 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2013.
61. Philip L. Felgner TRG, Marilyn Holm, Richard Roman, Hardy W. Chan, Michael Wenz, Jeffrey P. Northrop, Gordon M. Ringold and Mark Danielsen. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. 1987.

62. T Ren YS, G Zhang and D Liu. Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse. 2000.
63. Rose JK, Buonocore L, Whitt MA. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques*. 1991;10(4):520-5.
64. Hui SW, Langner M, Zhao YL, Ross P, Hurley E, Chan K. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J*. 1996;71(2):590-9.
65. Brix JB, Heinrich P, Koch H-G, Löffler G. Gentechnik in höheren Organismen – Transgene Tiere und Gentherapie. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9th ed. 2014 ed. Heidelberg: Springer Spektrum 2014. p. 681-3.
66. Arnemann J. Small interfering RNA. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 3 ed. Berlin, Heidelberg: Springer 2019. p. 2176-.
67. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515-27.
68. Larry Tait HDS, and Jose Russo<sup>2</sup>. Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of an Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-101. *Cancer Res* 1990 Sep 15;50(18):6087-94. 1990.
69. American Type Culture Collection. Cell Lines by Gene Mutation 2019 [Available from:  
[https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Cell\\_Lines\\_by\\_Gene\\_Mutation.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Cell_Lines_by_Gene_Mutation.ashx).
70. H. D. Soule JV, A. Long, S. Albert, and M. Brennan A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma 1973.
71. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH, Kallemeijn WW, Schutte M. Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Res*. 2007;5(2):195-201.
72. R. Cailleau RY, M. Olive, and W. J. Reeves, J. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 53, Issue 3, September 1974, Pages 1973.
73. Wang T, Larcher LM, Ma L, Veedu RN. Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules*. 2018;23(10).

74. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010(45).
75. Matrone A, Grossi V, Chiacchiera F, Fina E, Cappellari M, Caringella AM, et al. p38alpha is required for ovarian cancer cell metabolism and survival. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20(2):203-11.
76. Justus-Liebig-Universität Gießen. Analysen - Teil 2: Zell- und Molekularbiologische Tests 2021 [Available from: <https://www.uni-giessen.de/fbz/fsp/meu/methodenplattform/analysen2/Teil-2-Zellproliferation>].
77. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6).
78. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*. 2013;29(10):569-74.
79. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*. 2005;85(1):154-9.
80. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):537-49.
81. Antoon JW, Bratton MR, Guillot LM, Wadsworth S, Salvo VA, Elliott S, et al. Pharmacology and anti-tumor activity of RWJ67657, a novel inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase. *Am J Cancer Res*. 2012;2(4):446-58.
82. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res*. 2008;68(3):826-33.
83. Ahmad DA, Negm OH, Alabdullah ML, Mirza S, Hamed MR, Band V, et al. Clinicopathological and prognostic significance of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;159(3):457-67.
84. Choo MK, Kraft S, Missero C, Park JM. The protein kinase p38 $\alpha$  destabilizes p63 to limit epidermal stem cell frequency and tumorigenic potential. *Sci Signal*. 2018;11(551).
85. Bulavin DV, Phillips C, Nannenga B, Timofeev O, Donehower LA, Anderson CW, et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet*. 2004;36(4):343-50.

86. Jiao Y FY, Wang X. Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(11):1289-98.
87. Raschke S, Balz V, Efferth T, Schulz WA, Florl AR. Homozygous deletions of CDKN2A caused by alternative mechanisms in various human cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42(1):58-67.
88. de Oliveira SF, Ganzinelli M, Chilà R, Serino L, Maciel ME, Urban Cde A, et al. Characterization of MTAP Gene Expression in Breast Cancer Patients and Cell Lines. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145647.
89. Green JL, Okerberg ES, Sejd J, Palafox M, Monserrat L, Alemayehu S, et al. Direct CDKN2 Modulation of CDK4 Alters Target Engagement of CDK4 Inhibitor Drugs. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(4):771-9.
90. Matesanz N, Nikolic I, Leiva M, Pulgarín-Alfaro M, Santamans AM, Bernardo E, et al. p38 $\alpha$  blocks brown adipose tissue thermogenesis through p38 $\delta$  inhibition. *PLoS Biol*. 2018;16(7):e2004455.
91. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2007;11(2):191-205.
92. Dondelinger Y, Delanghe T, Rojas-Rivera D, Priem D, Delvaeye T, Bruggeman I, et al. MK2 phosphorylation of RIPK1 regulates TNF-mediated cell death. *Nat Cell Biol*. 2017;19(10):1237-47.
93. Jaco I, Annibaldi A, Lalaoui N, Wilson R, Tenev T, Laurien L, et al. MK2 Phosphorylates RIPK1 to Prevent TNF-Induced Cell Death. *Mol Cell*. 2017;66(5):698-710.e5.
94. Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Ségui B. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10:1818.
95. Strippoli R, Benedicto I, Foronda M, Perez-Lozano ML, Sánchez-Perales S, López-Cabrera M, et al. p38 maintains E-cadherin expression by modulating TAK1-NF-kappa B during epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4321-31.
96. Hong B, Li H, Zhang M, Xu J, Lu Y, Zheng Y, et al. p38 MAPK inhibits breast cancer metastasis through regulation of stromal expansion. *Int J Cancer*. 2015;136(1):34-43.

97. Chen S, Chiu SK. AP4 activates cell migration and EMT mediated by p53 in MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2015;407(1-2):57-68.
98. Yamamoto S, Iwakuma T. Regulators of Oncogenic Mutant TP53 Gain of Function. *Cancers (Basel).* 2018;11(1).
99. Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2012;33(11):2007-17.
100. Cloutier M, Wang E. Dynamic modeling and analysis of cancer cellular network motifs. *Integr Biol (Camb).* 2011;3(7):724-32.
101. Tsvetkov P, Adler J, Myers N, Biran A, Reuven N, Shaul Y. Oncogenic addiction to high 26S proteasome level. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):773.
102. Kim MS, Lee EJ, Kim HR, Moon A. p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 2003;63(17):5454-61.
103. Shin I, Kim S, Song H, Kim HR, Moon A. H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14675-83.
104. Yong HY, Kim IY, Kim JS, Moon A. ErbB2-enhanced invasiveness of H-Ras MCF10A breast cells requires MMP-13 and uPA upregulation via p38 MAPK signaling. *Int J Oncol.* 2010;36(2):501-7.
105. Arechederra M, Priego N, Vázquez-Carballo A, Sequera C, Gutiérrez-Uzquiza Á, Cerezo-Guisado MI, et al. p38 MAPK down-regulates fibulin 3 expression through methylation of gene regulatory sequences: role in migration and invasion. *J Biol Chem.* 2015;290(7):4383-97.
106. Browne AJ, Göbel A, Thiele S, Hofbauer LC, Rauner M, Rachner TD. p38 MAPK regulates the Wnt inhibitor Dickkopf-1 in osteotropic prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(2):e2119.
107. Kumar B, Koul S, Petersen J, Khandrika L, Hwa JS, Meacham RB, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res.* 2010;70(2):832-41.
108. Naffa R, Vogel L, Hegedűs L, Pászty K, Tóth S, Kelemen K, et al. P38 MAPK Promotes Migration and Metastatic Activity of BRAF Mutant Melanoma Cells by Inducing Degradation of PMCA4b. *Cells.* 2020;9(5).

109. Yao Y, Fang ZP, Chen H, Yue L, Min DL, Tang LN, et al. HGFK1 inhibits bone metastasis in breast cancer through the TAK1/p38 MAPK signaling pathway. *Cancer Gene Ther.* 2012;19(9):601-8.
110. Hickson JA, Huo D, Vander Griend DJ, Lin A, Rinker-Schaeffer CW, Yamada SD. The p38 kinases MKK4 and MKK6 suppress metastatic colonization in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66(4):2264-70.
111. Zhang Y, Liu H, Yan F, Zhou J. Oscillatory dynamics of p38 activity with transcriptional and translational time delays. *Sci Rep.* 2017;7(1):11495.
112. Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM. Validation of Common Housekeeping Genes as Reference for qPCR Gene Expression Analysis During iPS Reprogramming Process. *Sci Rep.* 2018;8(1):8716.
113. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 2004;37(1):112-4, 6, 8-9.
114. National Center for Biotechnology Information USNLoM. ATP5PF ATP synthase peripheral stalk subunit F6 [ *Homo sapiens (human)* ] 2021 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/522>].
115. Townsend MH, Felsted AM, Ence ZE, Piccolo SR, Robison RA, O'Neill KL. Falling from grace: HPRT is not suitable as an endogenous control for cancer-related studies. *Mol Cell Oncol.* 2019;6(2):1575691.
116. Cahill AL, Moore JM, Sabar FI, Harkins AB. Variability in RNA interference in neuroendocrine PC12 cell lines stably transfected with an shRNA plasmid. *J Neurosci Methods.* 2007;166(2):236-40.

## 8 Anhang

### 8.1 Werte zur Abbildung 11

Angegeben ist die relative Genexpression von MAPK14 und MAPK11 der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A sowie die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen.

	MAPK14-Expression [relative Genexpression]		MAPK11-Expression [relative Genexpression]	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
MDA-MB-231-Zellen	7,3	1,3	5,5	0,6
MCF-7-Zellen	3,7	0,5	4,0	2,8
MCF-10A-Zellen	2,9	0,2	5,6	2,2

### 8.2 Werte zur Abbildung 12

A zeigt die Restexpression von MAPK14 in der MDA-MB-231-Zelllinie, B in der MCF-7-Zelllinie und C in der MCF-10A-Zelllinie. Der angegebene Zeitpunkt von 24 h, 48 h und 72 h bezieht sich auf den Moment, an dem die Zellen nach der Transfektion, zur RNA-Isolation von der Schale genommen wurden. Die Messung erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen. Angegeben ist die, auf die Haushaltsgene ATP5J und HPRT normalisierte, relative Genexpression in % sowie die Fehlerfortpflanzung. In C konnte auf Grund einer zu geringen RNA-Menge in Versuchsreihe 1 für den 72 h Wert kein Ergebnis ermittelt werden.

A	MDA-MB-231-Zellen			
	Versuchsreihe 1		Versuchsreihe 2	
	Rest-expression [%]	Fehlerfortpflanzung [%]	Rest-expression [%]	Fehlerfortpflanzung [%]
24h-Wert	33,3	0,6	34,7	2,9
48h-Wert	5,9	0,7	17,4	0,2
72h-Wert	12,6	0,6	28,7	1,2

B	MCF-7-Zellen			
	Versuchsreihe 1		Versuchsreihe 2	
	Rest-expression [%]	Fehlerfortpflanzung [%]	Rest-expression [%]	Fehlerfortpflanzung [%]
24h-Wert	36,7	0,2	45,4	8,2
48h-Wert	1,6	0,4	16,5	0,1
72h-Wert	2,0	5,5	53,1	1,8

C	MCF-10A-Zellen			
	Versuchsreihe 1		Versuchsreihe 2	
	Rest-expression [%]	Fehlerfortpflanzung [%]	Rest-expression [%]	Fehlerfortpflanzung [%]
24h-Wert	26,0	4,5	30,1	2,2
48h-Wert	3,3	6,3	4,9	0,4
72h-Wert			51,9	11,8

### 8.3 Werte zur Abbildung 13

Anggeben ist die Viabilität der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A in % sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfizierten Zellen dienten als Referenzwert und wurden dafür auf 100 % gesetzt. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die mit SL behandelten Zellen, wurde mit dem t-Test ermittelt.

	MDA-MB-231-Zellen		MCF-7-Zellen		MCF-10A-Zellen	
	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]
VR1	100	114,1	100	122,8	100	125,3
VR2	100	124,9	100	118,8	100	112,6
VR3	100	99,8	100	118,6	100	121,2
Mittelwert	100	112,9	100	120,8	100	119,7
Stabw.		10,3		2,9		6,5
t-Test		0,2		0,005		0,03

## 8.4 Werte zum Kapitel 5.2

Vergleich der Viabilität nach p38 $\alpha$  Knockdown, ihrer Negativ-Kontrolle und der Nativ-Kontrolle. Angegeben ist die Viabilität der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A in % sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Nativ-Kontrolle diente als Referenzwert und wurde dafür auf 100 % gesetzt. Die Signifikanz der Ergebnisse bezog sich ebenfalls auf unbehandelten Zellen und wurde mit dem t-Test ermittelt.

	MDA-MB-231-Zellen			MCF-7-Zellen			MCF-10A-Zellen		
	Nativ-Kontrolle [%]	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]	Nativ-Kontrolle [%]	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]	Nativ-Kontrolle [%]	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]
Mittelwert	100	52,6	59,7	100	36,6	44,1	100	45,7	54,7
Stabw.		12,3	16,3		5,2	5,6		2,3	5,4
t-Test			0,05			0,005			0,005

## 8.5 Werte zur Abbildung 14

Angegeben ist die Migration der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A in % sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfizierten Zellen dienten als Referenzwert und wurden dafür auf 100 % gesetzt. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die mit SL behandelten Zellen, wurde mit dem t-Test ermittelt.

	MDA-MB-231-Zellen		MCF-7-Zellen		MCF-10A-Zellen	
	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]	Negativ-Kontroll-siRNA [%]	MAPK14-spezifische siRNA [%]
VR1	100	96,6	100	131,2	100	87,3
VR2	100	99,6	100	147,4	100	68,5
VR3	100	92,7	100	112,1	100	85,8
Mittelwert	100	96,3	100	130,2	100	80,5
Stabw.		3,5		17,7		10,4
t-Test		0,2		0,1		0,08

## 8.6 Werte zum Kapitel 5.3

Angegeben ist die Migration der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MCF-10A nach der gezählten Zellzahl, sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Ergebnisse bezog sich auf unbehandelten Zellen und wurde mit dem t-Test ermittelt.

	MDA-MB-231-Zellen			MCF-7-Zellen			MCF-10A-Zellen		
	Nativ-Kontrolle [Zellzahl]	Negativ-Kontroll-siRNA [Zellzahl]	MAPK14-spezifische siRNA [Zellzahl]	Nativ-Kontrolle [Zellzahl]	Negativ-Kontroll-siRNA [Zellzahl]	MAPK14-spezifische siRNA [Zellzahl]	Nativ-Kontrolle [Zellzahl]	Negativ-Kontroll-siRNA [Zellzahl]	MAPK14-spezifische siRNA [Zellzahl]
VR1	31,5	34,5	33,3	71,2	36,3	47,6	27,0	18,3	16,0
VR2	62,7	63,3	63,0	46,0	32,0	49,8	36,3	24,3	16,7
VR3	88,5	82,9	76,8	35,8	23,7	26,5	99,3	64,3	54,8
Mittelwert	60,9	60,2	57,7	51,0	30,7	41,3	54,2	35,6	29,1
Stabw.	28,5	24,3	22,2	14,9	5,2	10,5	32,1	25,0	22,2
t-Test		0,8	0,5		0,1	0,3			0,1

## 9 Danksagung

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Johanna Theresia Engelhardt, geb. Kreuzburg  
Geburtsdatum / Ort: 13.11.1989 in Höxter  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schule und Ausbildung

---

05/2020 Abschluss des Studiums der Humanmedizin  
Johannes Gutenberg Universität, Mainz  
06/2013 Allgemeine Hochschulreife  
Anna-Warburg-Schule, Hamburg  
mit Stipendium der Frauendorfer Förderstiftung  
10/2010 Abschluss der Ausbildung Gesundheits-und Krankenpflege,  
UKE, Hamburg

### Forschung

---

Seit 06/2020 Promotionsvorhaben

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit  
Universitätsmedizin Mainz

Thema: „Molekulare Bedeutung von p38 für Mammakarzinom-Zellen“