

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

Funktionelle Bedeutung von KDM5B und CBX5 für Zellen des triple-negativen
Mammakarzinoms

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

Vorgelegt von

Tristan Alexander Lüttge
aus Darmstadt

Mainz, 2026

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. P. Drees

1. Gutachter: x

2. Gutachter: x

Tag der Promotion: 19.06.2026

Nachnutzungslizenz:

Namensnennung (CC-BY-4.0)

Für meine Familie und Freunde

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Das Mammakarzinom	2
2.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	2
2.1.2 Klassifikation des Mammakarzinoms	3
2.1.3 Therapie des Mammakarzinoms	7
2.2 Die Rolle des Immunsystems und Einsatz von Immuntherapien beim Mammakarzinom	9
2.2.1 Allgemeine Einführung in Immuntherapien	9
2.2.2 Immuntherapeutische Ansätze beim TNBC	10
2.2.3 B-Zell vermittelte und gegen Neoantigene gerichtete Immunreaktionen im TNBC	13
2.3 CBX5	14
2.3.1 Überblick über CBX5	14
2.3.2 Aufbau und funktionelle Mechanismen der HP1-Familie	14
2.3.3 Der Einfluss von CBX5 auf den Zellzyklus und die Mitose	17
2.3.4 Die Rolle von CBX5 im Mammakarzinom	18
2.4 KDM5B	20
2.4.1 Überblick über KDM5B	20
2.4.2 Aufbau und funktionelle Mechanismen von KDM5B	21
2.4.3 Die Rolle von KDM5B in der Embryonalentwicklung	21
2.4.4 Die Rolle von KDM5B im Mammakarzinom	22
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	28
3.1.2 Puffer und Lösungen	29
3.1.3 Kit-Systeme	30
3.1.4 Zellkulturmedien	30
3.1.5 Primärantikörper	31
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.7 Gebrauchsmaterialien	32

3.1.8	Geräte	33
3.1.9	Software	34
3.1.10	Zelllinien	34
3.1.11	Small interfering RNA (siRNA).....	34
3.1.12	Primer.....	35
3.2	Zellkulturmethoden.....	35
3.2.1	Kontinuierliche Zelllinien	35
3.2.2	Steriles Arbeiten	37
3.2.3	Kultivierung humaner Zelllinien.....	37
3.2.4	Kryo-Konservierung von Zellen	38
3.2.5	Zellkonzentrationsbestimmung	39
3.3	Immuncytochemie	39
3.3.1	Funktionsweise der Immuncytochemie.....	39
3.3.2	Cytospin	39
3.3.3	Kultivierung auf 8-Kammer-Objektträgern	40
3.3.4	Antikörperfärbung	41
3.4	Transfektion und siRNA-Knockdown.....	42
3.5	Arbeit mit Nukleinsäuren	46
3.5.1	Gewinnung des Zelllysates.....	46
3.5.2	DNA-Extraktion.....	46
3.5.3	RNA-Isolierung	46
3.5.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	47
3.5.5	Synthese von cDNA durch Reverse Transkriptase PCR	48
3.5.6	Primer-Synthese	49
3.5.7	Quantitative Echtzeit-PCR.....	50
3.5.8	Agarose Gelelektrophorese	53
3.6	Zellfunktions-Assays	53
3.6.1	Migrationsversuch in der Boydenkammer	53
3.6.2	Zelladhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatix	55
3.6.3	Zellproliferationsassay (ELISA BrdU-Kit).....	57
3.6.4	Alamar Blue Viabilitäts-Assay.....	60
3.7	Integration von siRNA-Knockdown und Zellfunktionsversuchen	61
3.8	Daten-Management und Statistik	62
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Untersuchung der Expression von CBX5 und KDM5B mit Immuncytochemie	63

4.1.1	Etablierung immuncytochemischer Färbungen von CBX5 und KDM5B	63
4.1.2	Expression von CBX5	67
4.1.3	Expression von KDM5B	71
4.2	Etablierung eines siRNA-Knockdowns von <i>CBX5</i> und <i>KDM5B</i>	75
4.2.1	Auswahl der Referenzgene und Bestimmung der Knockdowneffektivität	75
4.2.2	Qualitätsüberprüfung der qPCR	81
4.3	Funktionalität von CBX5 und KDM5B im TNBC-Zellmodell	83
4.3.1	Etablierung von Zellmigrations- und Zelladhäsionsassays	83
4.3.2	Zellproliferation nach CBX5- und KDM5B-Knockdown	85
4.3.3	Zellviabilität nach CBX5- und KDM5B-Knockdown	87
4.3.4	Zelladhäsion nach CBX5- und KDM5B-Knockdown	88
4.3.5	Zellmigration nach CBX5- und KDM5B-Knockdown	90
5	Diskussion	91
5.1	CBX5-Expression	91
5.2	KDM5B-Expression	92
5.2.1	KDM5B-Expression in Zelllinien und Gewebe	92
5.2.2	Lokalisation der KDM5B-Expression	93
5.3	Einflüsse der siRNA-Transfektion auf die Ergebnisse der Zellfunktionsversuche	95
5.4	Einfluss der CBX5-Expression auf die Zellfunktion	96
5.5	Einfluss der KDM5B-Expression auf die Zellfunktion	97
5.6	Die Rolle von CBX5 und KDM5B in der Tumorthherapie	99
5.6.1	Bedeutung der Lokalisation der CBX5- und KDM5B-Expression für die Immuntherapie	99
5.6.2	Bedeutung von CBX5 und KDM5B als Targets für andere Therapieformen	100
5.7	Ausblick	100
6	Zusammenfassung	101
7	Literaturverzeichnis	102
8	Anhang	119
8.1	Immuncytochemische Färbungen	119
8.1.1	Färbungen mit Anti-CBX5-Antikörper	119
8.1.2	Färbungen mit Anti-KDM5B-Antikörper	123
8.2	Werte zu der siRNA-Knockdown-Etablierung	127
8.3	Werte zu den Zellfunktionsversuchen	129
9	Danksagung	136

10	Tabellarischer Lebenslauf.....	137
----	--------------------------------	-----

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

ACTB
AGO2
AKT-Inhibitoren
APCs
ARID
ATP5J
BL1
BL2
BLIA
BLIS
bp
BrdU
BSA
CAF-1p150

CAR-T-Zellen
CBX5
CD
cDNA
CNAs
Cp
CSC
CSD
CSPG4
CTLA-4

DAB
DDIR
DMSO
DNA
DNMTs
dNTP
DOTMA

DPBS
DR-E
EDTA
EGF
ELISA
EMT
EZM
FAM
FCS
FRA
FS
GnRH-Analoga
H3K4

Bedeutung

Beta-Actin
Argonaut
Protein Kinase B Inhibitoren
Antigenpräsentierende Zellen
AT-rich Interaction Domain
ATP-Synthase Untereinheit F6
Basal-like 1
Basal-like 2
Basal-like Immune Activated
Basal-like Immune Suppressed
Basenpaare
5-Brom-2'-desoxyuridin
Bovines Serumalbumin
Chromatin Assembly Factor 1 Subunit
p150
Chimäre Antigen Rezeptor T-Zellen
Chromboxprotein 5
Cluster of Differentiation
Komplementäre DNA
Copy Number Alterations
Crossing Point
Tumorstammzellen
Chromo Shadow Domain
Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4
Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated
Protein 4
Diaminobenzidin
DNA-Damage Immune Response
Dimethylsulfoxid
Desoxyribonukleinsäure
DNA-Methyltransferasen
Desoxyribonukleosidtriphosphate
N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
Dulbecco's phosphate-buffered saline
DNA-Repair Pathway-enriched
Ethylendiamintetraacetat
Epidermal growth factor
Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Epithelial-Mesenchymal-Transition
Extrazelluläre Matrix
Fettsäuremetabolismus
Fetales Kälberserum
Folate Receptor-alpha
Fettsäure
Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga
Lysin 4 von Histon H3

H3K4me2	Dimethyliertes Lysin 4 an Histon H3
H3K4me3	Trimethyliertes Lysin 4 an Histon H3
H3K9me2/3	Di- oder trimethyliertes Lysin 9 von Histon H3
H3S10p	Phosphorylierung des Histon H3 an der Aminosäure Serin 10
HDMT	Histondemethyltransferase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HMBS	Hydroxymethylbilane-Synthase
HMT	Histonmethyltransferase
HP1 α	Heterochromatin Protein 1 α
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRD	Homologous Recombination Deficiency
ICC	Immunocytochemie
IFN- γ	Interferon-gamma
IgkC	Immunglobulin kappa C
IM	Immunomodulatory
Imm-E	Immune Pathway-enriched
Immunity_H	Immunity High
Immunity_L	Immunity Low
Immunity_M	Immunity Medium
KDM5B	Lysin Demethylase 5B
LAR	Luminal Androgen Receptor
lncRNA	Long Non-coding RNA
MES	Mesenchymal
Met-E	Metabolic Pathway-enriched
MHC-I	Major Histocompatibility Complex Class I
miRNAs	Mikro-RNAs
MSL	Mesenchymal Stem-like
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation-Sequencing
OD	Optische Dichte
Oligo dt	Oligo Deoxythymidine
Opti-MEM	Optimized Minimum Essential Medium
P/S	Penicillin / Streptomycin
PARP-Inhibitoren	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitoren
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PEV	Position Effect Variegation
PHD	Plant Homeodomain
PI3K-Inhibitoren	Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitoren
POGZ	Pogo Transposable Element-derived Protein with Zinc Finger Domain
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A
PTEN-Gen	Phosphatase und Tensin Homolog-Gen
qPCR	Real-Time Quantitative PCR
RISC	RNA-induced Silencing Complex

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROR1	Receptor-tyrosine-kinase-like Orphan Receptor 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
Str-E	Stromal Pathway-enriched
SUV39h1	Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1
TAA _s	Tumor-associated Antigens
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-binding protein
TEM8	Tumor Endothelial Marker 8
TH1	T-Helferzellen vom Typ 1
TH2	T-Helferzellen vom Typ 2
TIL _s	Tumor infiltrierenden Lymphozyten
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
Zf-C5HC2	Zinkfinger-Domäne
Zn	Zinkfinger

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Krebsneuerkrankungen in Deutschland.....	3
Abbildung 2: Schematische Einteilung des Mammakarzinoms.....	5
Abbildung 3: Überblick über den Wirkmechanismus verschiedener Anti-Tumorimpfstoffe.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bindung von HP1 α -Dimeren an Nukleosomen.....	16
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des KDM5B-Proteins.	21
Abbildung 6: Schematische Übersicht der KDM5B-Interaktionen.....	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transfektion von siRNA in eine Zelle mittels Lipofektion.....	43
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz. .	45
Abbildung 9: Abbildung eines vergrößerten Ausschnittes der mRNA von CBX5 und KDM5B und der Ansatzpunkte der designten Primer.	50
Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Boydenkammer.	55
Abbildung 11: Skizzierte Darstellung der Funktionsweise des ELISA-BrdU-Assays zur Analyse der Zellproliferation.	59
Abbildung 12: Reduktion von Resazurin zu Resorufin.....	60
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Zellfunktionsversuche.....	62
Abbildung 14: Auswahl immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5 oder Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	64
Abbildung 15: Vergleich immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5- oder Anti-KDM5B-Primärantikörper und unterschiedlicher Pufferlösungen.	65
Abbildung 16: Vergleich immuncytochemischer Färbungen nach unterschiedlicher Inkubation mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper.	67
Abbildung 17: Auswahl immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper aus vier Versuchsdurchläufen sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	69
Abbildung 18: Vergrößerte Darstellung immuncytochemischer Färbungen verschiedener Zelllinien mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper auf 8-Kammer-Objektträgern.....	70
Abbildung 19: Vergrößerte Darstellung verschiedener Mitosestadien.	71
Abbildung 20: Auswahl immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper aus vier Versuchsdurchläufen sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	73
Abbildung 21: Vergrößerte Darstellung immuncytochemischer Färbungen verschiedener Zelllinien mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper auf 8-Kammer-Objektträgern.....	74
Abbildung 22: Vergrößerte Darstellung einer Auswahl immuncytochemischer Färbungen verschiedener Zelllinien mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper.	75
Abbildung 23: Relative Expression der Referenzgene ACTB, ATP5J, HMBS, HPRT, PPIA und TBP in den Zelllinien MDA-MB-468 und MCF-7.	77
Abbildung 24: Relative Expression der Referenzgene ACTB, ATP5J, HMBS, HPRT und PPIA in der Zelllinie MDA-MB-468.....	78

Abbildung 25: Knockdowneffizienz und Restexpression von CBX5 in Zellen der Zelllinie MDA-MB-468.....	80
Abbildung 26: Knockdowneffizienz und Restexpression von KDM5B in Zellen der Zelllinie MDA-MB-468.....	81
Abbildung 27: Nachweis der Amplifikationsprodukte der Primer für CBX5 und KDM5B.	81
Abbildung 28: Darstellung der Schmelzpunkte und Schmelzkurven von KDM5B-qPCR-Produkten zur Qualitätskontrolle der qPCR.	83
Abbildung 29: Mittelwerte von migrierten Zellen pro mm ² der Zelllinie MDA-MB-468 unter Verwendung der Lockstoffe Fibronectin, Kollagen I und Kollagen IV in einer Boydenkammer.	84
Abbildung 30: Adhäsion von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 an die EZM-Komponenten Fibronectin, Kollagen I sowie Kollagen IV.	85
Abbildung 31: Zellproliferation von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit CBX5- bzw. KDM5B-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.	86
Abbildung 32: Zellproliferation von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 96 Stunden nach siRNA-Transfektion mit CBX5- bzw. KDM5B-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.	87
Abbildung 33: Viabilität von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit CBX5- bzw. KDM5B-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.	87
Abbildung 34: Viabilität von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 96 Stunden nach siRNA-Transfektion mit CBX5- bzw. KDM5B-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.	88
Abbildung 35: Adhäsion von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 an mit Kollagen I beschichteten Wellplatten. 48 Stunden nach siRNA-Transfektion mit CBX5- bzw. KDM5B-siRNA sowie eine BSA-Kontrolle mit unbehandelten Zellen, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.....	89
Abbildung 36: Adhäsion von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 an mit Kollagen I beschichteten Wellplatten. 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit CBX5- bzw. KDM5B-siRNA sowie eine BSA-Kontrolle mit unbehandelten Zellen, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.....	90
Abbildung 37: Migration von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit CBX5-, KDM5B- bzw. Kontroll-siRNA bei Verwendung des Lockstoffs Kollagen I in einer Boydenkammer.....	90
Abbildung 38: Erster Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	119
Abbildung 39: Zweiter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	120
Abbildung 40: Dritter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	121

Abbildung 41: Vierter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	122
Abbildung 42: Erster Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	123
Abbildung 43: Zweiter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	124
Abbildung 44: Dritter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	125
Abbildung 45: Vierter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle.....	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben	28
Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung	29
Tabelle 3: Verwendete Kit-Systeme mit Herstellerangaben.....	30
Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und Medienzusätze mit Herstellerangaben	30
Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien inklusive der jeweiligen Medienzusätze ...	30
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper.....	31
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	31
Tabelle 8: Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	32
Tabelle 9: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben	33
Tabelle 10: Verwendete Software mit Herstellerangaben.....	34
Tabelle 11: Verwendete Zelllinien und deren Herkunft	34
Tabelle 12: Verwendete siRNAs mit Angabe von Target, NM-Nummern, Gene Globe ID, Hersteller und Katalognummer	34
Tabelle 13: Verwendete Primer mit Angabe von Sequenz (5'-3'), Annealing Temperatur (°C) und Produktgröße (bp).....	35
Tabelle 14: Verwendete Mengen von Kulturmedium und Trypsin für Zellkulturgefäße unterschiedlicher Größe, angegeben in ml.	38
Tabelle 15: Bestandteile von Reaktionsansatz I der Transfektion und verwendete Menge in µl.....	44
Tabelle 16: Bestandteile von Reaktionsansatz II der Transfektion und verwendete Menge in µl.....	44
Tabelle 17: Bestandteile von Reaktionsansatz I der cDNA-Synthese und verwendete Menge in µl.....	48
Tabelle 18: Bestandteile von Reaktionsansatz II der cDNA-Synthese und verwendete Menge in µl.	49
Tabelle 19: Bestandteile des qPCR-Mastermixes und pro Ansatz verwendete Menge in µl.....	51
Tabelle 20: Zusammensetzung der im Adhäsions-Assay verwendeten Puffer.	57
Tabelle 21: Inhalt des Zellproliferation ELISA BrdU-Kits.....	58
Tabelle 22: Zuordnung von qPCR-Produkten und ihren zugehörigen Schmelzpunkten.	82

1 Einleitung

Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC) ist eine sehr heterogene Untergruppe des Mammakarzinoms und ist aktuell mit einer eher schlechten Prognose assoziiert. Dies liegt neben der häufig aggressiven Tumordinfiltration auch an bisher limitierten Therapiemöglichkeiten. Aufgrund dessen ist es besonders wichtig, in diesem Feld die Suche nach neuen Therapieoptionen zu forcieren (1).

Da vor allem im Bereich der Immuntherapien in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt wurden, ist es naheliegend auch das TNBC auf sein Potenzial bezüglich möglicher Immuntherapien zu untersuchen. In vorausgegangenen Projekten wurden so beispielsweise tumorinfiltrierende Plasmazellen in TNBC-Tumorproben festgestellt. Bei der Analyse potenzieller Zielstrukturen dieser humoralen Immunantwort traten neben einer Vielzahl anderer Peptide insbesondere die beiden Proteine CBX5 und KDM5B hervor.

Um herauszufinden, ob sich CBX5 oder KDM5B als potenzielle Zielstrukturen für eine TNBC-Immuntherapie eignen, wurden die Eigenschaften von CBX5 und KDM5B in dieser Arbeit in einem TNBC-Zellmodell näher untersucht. Dabei standen folgende Fragestellungen im Fokus: Werden CBX5 und KDM5B in TNBC-Zellen exprimiert? Liegen sie dort dem Immunsystem zugänglich vor? Welche Funktion haben sie in TNBC-Zellen inne?

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression und Lokalisation von CBX5 und KDM5B in den vier TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-468, HS-578T und BT-549 sowie der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 und der normalen Brustepithelzelllinie MCF-10A zu untersuchen. Weiterführend wurde auch der Einfluss von CBX5 und KDM5B auf für die Zellfunktion wichtige Parameter wie Zellproliferation, Zellviabilität, Zelladhäsion und Zellmigration in der TNBC-Zelllinie MDA-MB-468 analysiert.

Damit soll diese Arbeit einen Beitrag zu der Identifikation und Analyse neuer potenzieller Zielstrukturen für die Entwicklung einer möglichen Immuntherapie für das TNBC leisten, um die Prognose von an TNBC erkrankten Patientinnen zu verbessern.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einer Inzidenz von ca. 2,3 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr nach dem Lungenkarzinom die weltweit zweithäufigste Tumorentität mit einem Anteil von ca. 11,6 % an neu aufgetretenen Tumorerkrankungen, dicht gefolgt vom kolorektalen Karzinom (2). Mit ca. 666 000 weltweiten Todesfällen pro Jahr ist das Mammakarzinom für insgesamt ca. 6,9 % der tumorassoziierten Todesfälle verantwortlich (2). Betrachtet man nur das weibliche Geschlecht, so ist das Mammakarzinom mit einem Anteil von ca. 23,8 % an allen neu aufgetretenen Tumorerkrankungen die mit Abstand größte Tumorentität und macht mit ca. 15,4 % einen Großteil der tumorassoziierten Todesfälle aus (2).

In vielen hochentwickelten Industrieländern ist die Inzidenz des Mammakarzinoms traditionell sehr hoch (3-7). Allerdings kann hier seit einigen Jahren eine Reduktion der Mortalität beobachtet werden, welche sich auf Fortschritte in den Therapiemöglichkeiten sowie frühe Erkennung durch beispielsweise Screening-Maßnahmen zurückführen lässt (2, 6, 8-10). Währenddessen steigen Inzidenz und Mortalität gerade in Schwellenregionen wie Südamerika, Afrika und Asien in den letzten Jahrzehnten schnell und stetig an (2, 11-16).

In Zukunft ist durch Bevölkerungswachstum und demographischen Wandel mit einer globalen Zunahme der Inzidenz des Mammakarzinoms zu rechnen (17). So ist beispielsweise zu erwarten, dass bis 2040 die jährliche Zahl an Neuerkrankungen auf ca. 3 Millionen und die Anzahl an assoziierten Todesfällen auf ca. 1 Million pro Jahr ansteigen (17).

Auch in Deutschland ist das Mammakarzinom mit ca. 70 000 jährlichen Neuerkrankungen, welche ca. 30,5 % der bei Frauen neu aufgetretenen Tumorerkrankungen ausmachen, die mit großem Abstand häufigste Tumorerkrankung der Frau (Abbildung 1) (18). Durch ca. 18 000 jährliche Todesfälle sind in Deutschland ebenfalls, mit ca. 17,6 %, der größte Teil aller jährlichen, tumorassoziierten Todesfälle bei Frauen auf diese Erkrankung zurückzuführen (18).

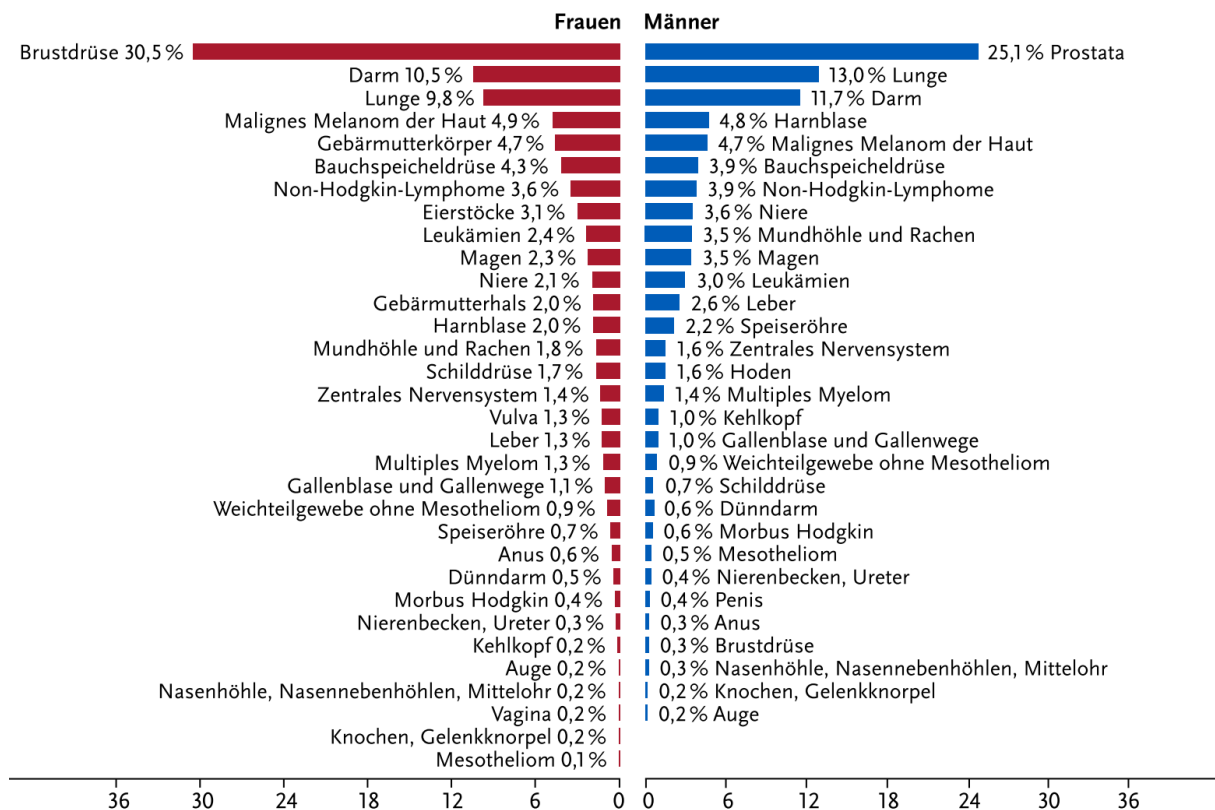


Abbildung 1: Übersicht der Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Darstellung des prozentualen Anteils der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2020. Nicht-melanotischer Hautkrebs wurde nicht berücksichtigt. Die Abbildung wurde aus (18) übernommen.

Insgesamt stellt das Mammakarzinom, durch seine hohe und stetig steigende Inzidenz, global eine große und zunehmende Herausforderung dar. Deren Bewältigung erfordert internationales und umfangreiches Engagement (19).

2.1.2 Klassifikation des Mammakarzinoms

2.1.2.1 Allgemeine Einteilung des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist eine sehr vielfältige Tumorentität (20, 21). Neben histopathologischen Klassifikationen, die beispielsweise eine Einteilung in invasiv-lobuläres, invasiv-duktales, tubuläres, muzinöses, sekretorisches, papilläres oder adenoid-zystisches Karzinom vornehmen (22), kann das Mammakarzinom auch mithilfe der Tumorbilogie beispielsweise anhand von Genexpressionsmustern kategorisiert werden (23-25).

Tumoren des Mammakarzinoms lassen sich orientierend in hormonrezeptorpositive Tumoren, welche eine Expression von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren zeigen, HER2-positive Tumoren, die den Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

(HER2) aufweisen, und sogenannte triple-negative Tumoren, die keinen dieser drei Rezeptoren exprimieren, einteilen (Abbildung 2) (26). Innerhalb dieser Gruppen lassen sich verschiedene molekulare Subtypen voneinander unterscheiden.

2.1.2.2 Einteilung des rezeptorpositiven Mammakarzinoms

Das rezeptorpositive Mammakarzinom wird anhand von Genexpressionsanalysen in die Subtypen Luminal A, Luminal B, Luminal HER2 und HER2-enriched unterteilt. Die Gemeinsamkeit der Subtypen Luminal A, Luminal B und Luminal HER2 liegt in der Expression von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren. Sie unterscheiden sich jedoch in der HER2-Expression: Beim Subtyp Luminal A wird HER2 nicht exprimiert, bei Luminal B kann es exprimiert sein, und bei Luminal HER2 ist es exprimiert. Abseits davon steht der Subtyp HER2-enriched, der keine Expression von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren aufweist, dafür aber über eine HER2-Amplifikation verfügt (Abbildung 2) (27-30).

2.1.2.3 Einteilung des triple-negativen Mammakarzinoms

Das triple-negative Mammakarzinom ist eine insgesamt sehr heterogene Gruppe von Tumoren (31, 32). Trotzdem lassen sich auch hier verschiedene Subtypen unterscheiden, wobei mehrere unterschiedliche Konzepte propagiert werden. Zum einen wird das TNBC in die beiden Unterkategorien Basal-like und Normal-like unterteilt (27, 33). Der Basal-like-Subtyp charakterisiert sich durch eine hohe Expression der Zytokeratine 5 und 7 sowie von Laminin. Der Normal-like Subtyp hingegen zeichnet sich durch die Expression vieler Gene aus, die mit Fettgewebe oder anderen nicht epithelialen Zellen assoziiert werden (28). Diese Einteilung wird allerdings kritisch diskutiert, da beispielsweise gezeigt werden konnte, dass nicht alle als Basal-like klassifizierte Tumoren zum TNBC gehören (34, 35).

Zum anderen ist ebenfalls die Unterteilung nach Genexpressionsprofilen in Basal-like 1 (BL1), Basal-like 2 (BL2), Mesenchymal (MES) und Luminal Androgen Receptor (LAR) geläufig (Abbildung 2). Die ursprünglich ebenfalls diskutierten Subtypen Immunomodulatory (IM) und Mesenchymal Stem-like (MSL) wurden aufgrund ihrer Nähe zu tumorinfiltrierenden Lymphozyten und tumorassoziierten Stromazellen wieder verworfen (36-38). Um den wichtigen Einfluss der Veränderung von immunsystemregulierenden Signalwegen beim TNBC hervorzuheben, ist in einer anderen Klassifikation neben MES und LAR von Basal-like Immune Suppressed (BLIS) sowie Basal-like Immune Activated (BLIA) die Rede (39).

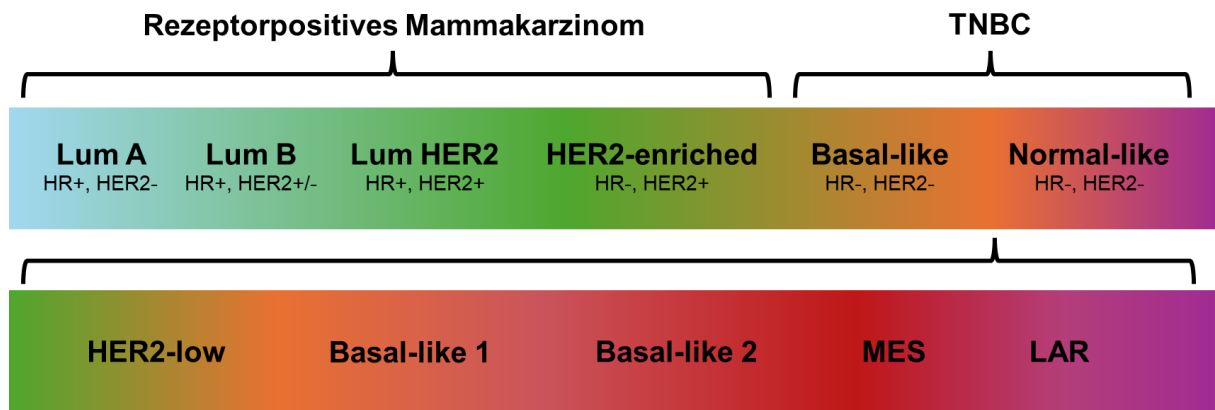


Abbildung 2: Schematische Einteilung des Mammakarzinoms. Unterteilung in rezeptorpositives Mammakarzinom, bestehend aus Luminal A, Luminal B, Luminal HER2 und HER2-enriched, sowie TNBC. Zum TNBC gehören die Subgruppen Basal-like 1, Basal-like 2, MES und LAR. Auch HER2-low-Tumoren werden trotz geringer HER2-Expression teilweise als TNBC bezeichnet. Abbildung angelehnt an (33).

Auch in neueren Konzepten zur TNBC-Klassifikation spielen das Immunsystem, Veränderungen in regulierenden Signalwegen und genetische Expressionsmuster eine entscheidende Rolle. Beispielsweise konnte bei einer Einteilung in Immunity High (Immunity_H), Immunity Medium (Immunity_M) und Immunity Low (Immunity_L), die auf Grundlage einer Analyse der immungenetischen Profile von 29 Immunsignaturen vorgenommen wurde, bei Immunity_H-Tumoren eine größere Anzahl an tumorinfiltrierenden Immunzellen sowie eine bessere Überlebensprognose beobachtet werden (40). In einem anderen Ansatz wurden TNBC-Tumoren nach Veränderungen in Zellsignalwegen in vier Subgruppen unterteilt, die als Immune Pathway-enriched (Imm-E), Stromal Pathway-enriched (Str-E), DNA-Repair Pathway-enriched (DR-E), und Metabolic Pathway-enriched (Met-E) bezeichnet werden (41).

Eine weitere TNBC-Klassifikationsvariante beruht auf einer Kombination aus einer Analyse einer möglichen Beeinträchtigung des zellulären Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche, der sogenannten Homologous Recombination Deficiency (HRD), und einem molekularen Profil, das die Reaktion von Tumorzellen und insbesondere des Immunsystems auf entstandene DNA-Schäden beschreibt, und als DNA-Damage Immune Response (DDIR) Signature bezeichnet wird. Daraus ergeben sich gleich mehrere Subgruppen, von denen die DDIR⁺/HRD⁺-Tumoren durch eine erhöhte Reaktion des Immunsystems die beste Prognose aufweisen. DDIR⁺/HRD⁻- und DDIR⁻/HRD⁺-TNBCs verfügen über eine mittlere Prognose, obwohl bei letzterer

Subgruppe die Aktivität des Immunsystems reduziert ist. DDIR⁻/HRD⁻-TNBCs hingegen haben eine eher schlechte Prognose und repräsentieren eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren mit reduzierter Aktivität des Immunsystems und Resistenz gegenüber Chemotherapie (42).

Zuletzt wurden außerdem Veränderungen im Fettsäuremetabolismus (FAM) in TNBC-Tumoren herangezogen, um diese zu klassifizieren. Der Metabolismus von Fettsäuren (FS) spielt eine Rolle bei der Entwicklung von TNBC-Tumoren und kann dazu beitragen, Immunprofile in der Tumormikroumgebung genauer zu charakterisieren. Basierend darauf können TNBC-Tumoren in die zwei Subgruppen high-FS und low-FS eingeteilt werden. Während sich die low-FS-Tumoren durch eine effektive Infiltration von Immunzellen sowie eine gute Prognose auszeichnen, sind high-FS-Tumoren geprägt von einer eher ineffektiven Immunzellinfiltration und schlechteren Überlebensaussichten (43).

2.1.2.4 Weitere Einteilungen des Mammakarzinoms

Zusätzlich existiert eine Einteilung von Mammakarzinom-Tumoren nach dem Claudin-low-Phänotyp. Dieser ist charakterisiert durch eine geringe Expression von Genen für Zell-Zell-Kontakte, eine hohe Expression von Genen, die mit einem Übergang von epithelial zu mesenchymal in Verbindung gebracht werden, sowie Genexpressionsmuster, die an Stammzellen oder andere niedrig differenzierte Zellen erinnern. Ursprünglich wurde Claudin-low als zusätzliche, eigenständige Subgruppe oder als Untergruppe des triple-negativen Mammakarzinoms diskutiert. Inzwischen wird Claudin-low jedoch als gruppenübergreifender Phänotyp betrachtet, der in allen, bereits bekannten intrinsischen Subtypen - wie Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like oder Normal-like - auftreten kann und dabei die jeweiligen genexpressionsbasierten Eigenschaften seines intrinsischen Subtyps beibehält. Obwohl Claudin-low in allen Subtypen auftreten kann, sind die meisten Claudin-low-Tumoren triple-negativ. Eine Assoziation mit einer verschlechterten Prognose konnte widerlegt werden (44-46).

Durch die Weiterentwicklung der Klassifikation zur Differenzierung von Tumoren hinsichtlich der Expression von HER2 ist inzwischen neben der Einteilung in HER2-positiv und HER2-negativ auch eine Differenzierung in HER2-low und HER2-null möglich (47, 48). Viele Tumoren, die zuvor als HER2-negativ bezeichnet wurden, werden dadurch nun als HER2-low eingestuft. Dies betrifft Tumoren aller intrinsischen

Subtypen, wie beispielsweise Luminal A und Luminal B, aber auch zuvor als TNBC klassifizierte Tumoren (49, 50). In HER2-negativem TNBC zeigten sich gegenüber HER2-low-TNBC beispielsweise niedrigere Differenzierungsstadien, eine höhere Expression von mit Immunglobulinen assoziierten Genen sowie höhere Niveaus immuntherapeutischer Biomarker (51). Neu entwickelte Therapiekonzepte, wie beispielsweise das HER2-gerichtete Antikörperkonjugat Trastuzumab-Deruxtecan, verleihen der Identifikation von HER2-low-Tumoren eine besondere Relevanz (52).

Eine alternative Klassifikation des Mammakarzinoms orientiert sich an der Auswirkung somatischer *Copy Number Alterations* (CNAs) auf das Transkriptom des Tumorgewebes. Anhand dieser Veränderungen der DNA-Kopienzahl und der daraus resultierenden Beeinflussung der RNA-Expression lassen sich Mammakarzinome in insgesamt zehn verschiedene integrative Cluster einteilen (53).

Die Unterteilung des Mammakarzinoms in verschiedene molekulare Subgruppen ist insbesondere aufgrund daraus resultierender Unterschiede in Therapie und Prognose relevant (54-57), unterliegt jedoch aufgrund des Fortschritts in der Analyse von genetischen Expressionsmustern und neuer Technologien wie dem *Next-Generation-Sequencing* (NGS) einer stetigen Veränderung und Weiterentwicklung (58, 59). Zudem besteht die Herausforderung, dass in einem Tumor durchaus mehrere Subtypen parallel vorliegen können (60), sich Subtypen unter der Therapie verändern (61, 62) oder mehrere Metastasen mit unterschiedlichen Subtypen gleichzeitig vorhanden sein können (63).

2.1.3 Therapie des Mammakarzinoms

2.1.3.1 Allgemeine Therapieansätze

Für eine effektive Therapie des Mammakarzinoms sind die Feststellung des Tumorstadiums sowie die Identifikation des molekularen Subtyps von besonderer Bedeutung. Während primär chirurgische Therapieansätze insbesondere bei lokal begrenzten Tumoren Verwendung finden, kommen in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien sowie bei Fernmetastasierung auch systemische Therapien zum Einsatz (64-66).

Die chirurgische Therapie des Mammakarzinoms besteht entweder aus einer brusterhaltenden Therapie oder aus einer vollständigen Mastektomie, gegebenenfalls

mit Lymphknotenentfernung und häufig kombiniert mit anschließender Strahlentherapie, um Tumorrezidive zu vermeiden (67, 68).

2.1.3.2 Therapie des rezeptorpositiven Mammakarzinoms

Neben chirurgischen und strahlentherapeutischen Therapieansätzen existieren für das rezeptorpositive Mammakarzinom zielgerichtete Therapien, die die Prognose deutlich verbessern. Diese können sowohl adjuvant als auch neoadjuvant eingesetzt werden (69). Bei hormonrezeptorpositiven Tumoren kommen beispielsweise selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren wie Tamoxifen oder alternativ Aromatasehemmer zum Einsatz (70-72). Auch eine Kombination mit Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRH-Analoga) ist möglich (73). Für HER2-positive Tumoren sind verschiedene Antikörpertherapien, beispielsweise mit Trastuzumab oder Pertuzumab, zugelassen (74-77). Auch für als HER2-low klassifizierte Tumoren wurde ein neuartiges Therapiekonzept in Form des Antikörperkonjugats Trastuzumab Deruxtecan entwickelt. Dieses besteht aus einem gegen HER2 gerichteten Antikörper, der mit einem Topoisomerase-I-Inhibitor gekoppelt ist (52, 78, 79).

2.1.3.3 Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms und neuartige Therapiekonzepte

Diese zielgerichteten Therapieoptionen bestehen für das triple-negative Mammakarzinom, das etwa 15 % aller Mammakarzinome ausmacht und durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet ist, in dieser Form nicht (1, 80, 81). Stattdessen kommen vor allem systemische Chemotherapien zum Einsatz, die beispielsweise auf einem Anthrazyklin in Kombination mit Cyclophosphamid sowie einem Taxan basieren und gegebenenfalls um eine platinhaltige Substanz erweitert werden (82, 83).

Aufgrund der schlechten Prognose und fehlender zielgerichteter Therapiemöglichkeiten stellt die Behandlung des triple-negativen Mammakarzinoms eine besondere Herausforderung dar. Deshalb ist es besonders wichtig, potenzielle Targets für gezielte Therapien zu identifizieren und neue Therapieansätze für das triple-negative Mammakarzinom zu entwickeln (1, 84).

Neu entwickelte Therapiekonzepte sind beispielsweise Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitoren (PARP-Inhibitoren) oder Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitoren (PI3K-Inhibitoren) sowie Protein-Kinase-B-Inhibitoren (AKT-Inhibitoren) (85). PARP-Inhibitoren erschweren durch die Blockade des PARP-Enzyms die Reparatur von DNA-Schäden, weshalb sie insbesondere bei der Behandlung von Tumoren mit

Defekten in den *BRCA1*- oder *BRCA2*-Genen eingesetzt werden können (86, 87). PI3K-Inhibitoren oder AKT-Inhibitoren hingegen machen sich im TNBC häufig vorkommende Veränderungen im *Phosphatase-und-Tensin-Homolog-Gen* (*PTEN*-Gen) zunutze. Mutationen oder ein Verlust des *PTEN*-Gens führen zu einer übermäßigen Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, was wiederum eine erhöhte Zellproliferation und damit Tumorwachstum zur Folge hat (88-90). Zusätzlich spielt auch die Entwicklung neuartiger Immuntherapien beim TNBC eine bedeutende Rolle (91).

2.2 Die Rolle des Immunsystems und Einsatz von Immuntherapien beim Mammakarzinom

2.2.1 Allgemeine Einführung in Immuntherapien

Eine grundlegende Eigenschaft von Tumoren ist es, der Zerstörung durch das körpereigene Immunsystem zu entkommen. Dies geschieht laut der Immunoediting-Hypothese in drei Schritten. Während zunächst potenziell maligne Zellen, beispielsweise solche mit fehlerhafter DNA-Reparatur, vom Immunsystem erkannt und zerstört werden, kommt es in der zweiten Phase zu einer Art Koexistenz zwischen Tumor und Immunsystem. Tumorzellen werden zwar nicht mehr vollständig vernichtet, aber der Tumor wird trotzdem vom Immunsystem an der weiteren Entwicklung gehindert. Die dritte Phase ist durch ein vollständiges Entkommen des Tumors vom Immunsystem gekennzeichnet, wodurch Tumorwachstum und Metastasierung möglich werden (92, 93).

Tumoren gelingt dies durch den Erwerb genetischer Veränderungen, die verschiedene Mechanismen zur Unterdrückung des Immunsystems aktivieren. Ein Beispiel dafür ist die Entwicklung einer Expression sogenannter Immune-Checkpoint-Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen, was die Aktivität von T-Zellen unterdrückt und so das Immunsystem unterdrückt. Bekannte Immune-Checkpoint-Moleküle sind unter anderem der Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1), welcher auf T-Zellen an das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) bindet und die T-Zellen inaktiviert, oder das auf T-Zellen exprimierte Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4). CTLA-4 sorgt durch die Bindung von CD80- und CD86-Molekülen dafür, dass diese nicht mehr für eine Bindung an CD28 zur Verfügung stehen, was eine T-Zell-Stimulation verhindert. (94-98).

Das grundlegende Konzept der Immuntherapie beruht auf einer Verstärkung oder Wiederherstellung der Fähigkeiten des körpereigenen Immunsystems zur Erkennung und Bekämpfung von Tumorzellen. Dabei spielt vor allem das adaptive Immunsystem aufgrund seiner Fähigkeit, spezifische Antigene anzugreifen, eine besondere Rolle. Zu den bisher entwickelten Immuntherapien zählen beispielsweise Impfstoffe, monoklonale Antikörper, chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) oder Checkpoint-Inhibitoren (99, 100).

Bei CAR-T-Zellen handelt es sich um patienteneigene T-Zellen, die genetisch mit einem chimären Antigenrezeptor modifiziert werden und somit spezifisch Antigene auf Tumorzellen erkennen und diese attackieren können (101).

2.2.2 Immuntherapeutische Ansätze beim TNBC

Das Immunsystem spielt sowohl beim Wachstum als auch bei der Bekämpfung des triple-negativen Mammakarzinoms eine wichtige Rolle (102). So zeigte sich beispielsweise, dass im TNBC ein hohes Niveau von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) mit einer besseren Prognose assoziiert ist (103). Diese TILs setzen sich zum Großteil aus T-Zellen zusammen, aber auch natürliche Killerzellen und B-Zellen sind darunter (104, 105). Je nach Zusammensetzung können die TILs entweder zu einem tumorschädlichen oder tumorunterstützenden Mikromilieu beitragen. Während CD8+ zytotoxische T-Zellen, CD4+ T-Helferzellen vom Typ 1 (TH1), natürliche Killerzellen, M1-Makrophagen und dendritische Zellen Tumorzellen bekämpfen und vor Tumorwachstum schützen, sorgen CD4+ T-Helferzellen vom Typ 2 (TH2), CD4+ FOXP3+ regulatorische T-Zellen und M2-Makrophagen für eine Hemmung der zytotoxischen T-Zellen, unterstützen die Proliferation von B-Lymphozyten und tragen insgesamt zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort bei, die Tumorwachstum begünstigt (106, 107). Das TIL-Niveau eines Tumors kann bei einem im Frühstadium befindlichen und mit Chemotherapie behandelten TNBC als prognostischer Faktor zur Einschätzung des fernrezidivfreien und krankheitsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens herangezogen werden (108, 109).

Impfungen sind eine aussichtsreiche Möglichkeit, sich die Stärken des Immunsystems bei der Tumorbekämpfung zunutze zu machen, und werden auch für die Therapie des TNBCs erprobt (110-112). In Form einer aktiven Immunisierung wird dabei durch die Impfstoffe eine gezielte Immunantwort von CD8+ zytotoxischen T-Zellen und CD4+ T-Helferzellen vom Typ 1 gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene

ausgelöst (113, 114). Um einen therapeutischen Effekt erzielen zu können, ist jedoch zuvor die Identifikation eines geeigneten Zielantigens nötig. Besonders geeignet sind sogenannte Neoantigene, die spezifisch für die mutierten Tumorzellen der Patientinnen sind und nicht in normalen Zellen vorkommen. So kann eine Immunreaktion gegen gesundes Gewebe vermieden werden (115, 116).

Während einige der erprobten Impfstoffe aus synthetischen Nachbauten von Tumorproteinen (117-119) oder von auf Tumorzelloberflächen exprimierten Kohlenhydraten, wie beispielsweise dem Sialyl-Thomsen-nouveau-Antigen, bestehen (120-123), basieren andere auf für Tumorantigene codierenden DNA- oder mRNA-Sequenzen (124, 125). Mit der Hilfe von Vektoren werden diese Sequenzen in antigenpräsentierende Zellen der Patienten eingebracht und dort im Zuge der Proteinbiosynthese zum Tumorantigen translatiert. Dieses wird von der Zelle prozessiert und präsentiert und so eine antigenspezifische Immunreaktion ausgelöst (Abbildung 3) (126-128). Dabei haben mRNA-Sequenzen im Gegensatz zu DNA-Sequenzen den Vorteil, dass sie nicht in das Genom der Wirtszelle integriert werden, wodurch keine Insertionsmutationen vorkommen können. Sie gelangen lediglich ins Cytoplasma der Zellen und können dort schnell und einfach, ohne vorherige Transkription, translatiert werden (125).

Durch mRNA-Impfstoffe können sowohl von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen als auch durch Antikörper bzw. B-Zellen vermittelte humorale Immunantworten ausgelöst werden (125, 129). Ein weiterer Vorteil ist, dass personalisierte, auf die Patienten zugeschnittene mRNA-Impfungen, basierend auf mittels NGS identifizierten Neoantigen-Expressionsprofilen der Tumoren, realisiert werden können (130-134).

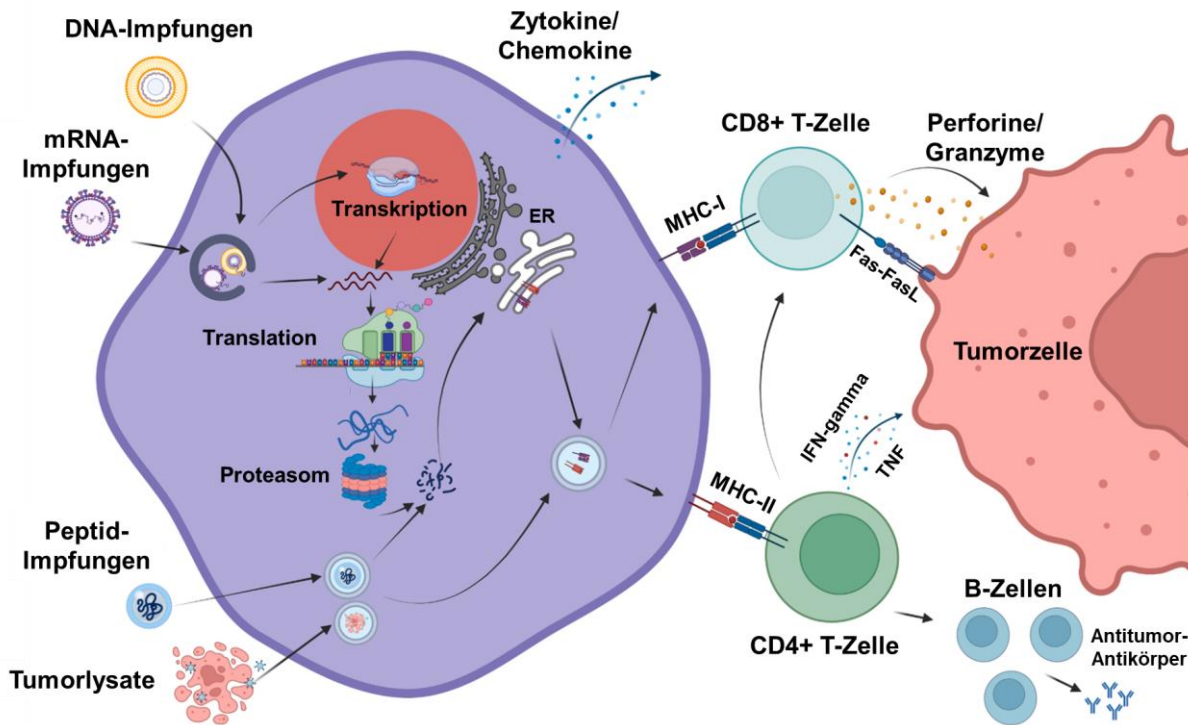


Abbildung 3: Überblick über den Wirkmechanismus verschiedener Anti-Tumorimpfstoffe. Die durch RNA-Impfungen eingebrachte mRNA wird in der Zelle zu Proteinen translatiert, welche anschließend vom Proteasom in kleinere Peptide zerlegt werden. Bei Einbringen von DNA aus DNA-Impfstoffen muss zuvor zusätzlich transkribiert werden. Die entstandenen kleineren Peptide können im Anschluss entweder als Antigene über Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) präsentiert werden und dadurch zur Aktivierung von CD8+ T-Zellen beitragen, oder von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) über MHC-II präsentiert und zur Aktivierung von CD4+ T-Zellen genutzt werden. Ähnliches gilt für Peptidimpfungen oder Tumorlysate. Zytotoxische T-Zellen attackieren anschließend die Tumorzellen mittels Degranulation von Perforinen oder Granzymen oder induzieren einen Fas-vermittelten Zelltod. Aktivierte CD4+ T-Zellen hingegen unterstützen die Proliferation von CD8+ T-Zellen, setzen Zytokine wie Interferon-gamma (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor (TNF) frei und führen eine humorale Immunantwort herbei, die aus von B-Zellen produzierten Anti-Tumor-Antikörpern besteht. Abbildung modifiziert nach (112).

Um die Unterdrückung des Immunsystems durch Tumorzellen zu verhindern, wurden außerdem gegen PD-L1 gerichtete Immune-Checkpoint-Inhibitoren wie beispielsweise Atezolizumab oder Pembrolizumab für die Therapie des TNBC entwickelt (135-140). Auch der Einsatz von gegen sogenannte Tumor-Associated Antigens (TAAs) gerichteten CAR-T-Zellen beim TNBC wird diskutiert. Mögliche Ziele sind unter anderem Mesothelin, Folate Receptor-alpha (FRA), Tumor Endothelial Marker 8

(TEM8), Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4), Receptor-Tyrosine-Kinase-Like Orphan Receptor 1 (ROR1) oder MUC1 (141, 142).

2.2.3 B-Zell vermittelte und gegen Neoantigene gerichtete Immunreaktionen im TNBC

B-Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren durch das Immunsystem - durch die Produktion von Immunglobulinen, ihre regulatorischen Fähigkeiten, die Antigenpräsentation zur T-Zell-Aktivierung sowie durch die Ausschüttung von Zytokinen (143, 144). Im TNBC konnte ein Zusammenhang zwischen tumorinfiltrierenden B-Zellen, insbesondere Plasmazellen, und einer verbesserten Prognose festgestellt werden (145, 146).

Eine Studie zu Genexpressionsprofilen zeigte bei hochproliferierenden Mammakarzinomen eine Assoziation des B-Zell-Metagens mit einer verbesserten Prognose (147). Des Weiteren korreliert die Präsenz von Tumor-infiltrierenden B-Zellen, insbesondere von Immunglobulin-kappa-C (IgkC)-positiven Plasmazellen, in Mammakarzinom-Tumoren ohne Lymphknotenbefall, mit einem längeren metastasefreien Überleben (148, 149). Auch bei mit adjuvanter Chemotherapie behandelten Patientinnen mit Mammakarzinom im Frühstadium konnte ein positiver prognostischer Einfluss von IgkC mit einem verlängerten metastasefreien Überleben beobachtet werden (150). In einer prospektiv-retrospektiven Studie konnte der positive prognostische Einfluss von IgkC bestätigt und zusätzlich eine verbesserte Prognose bei TNBC-Patientinnen mit einem hohen IgkC-Level im Tumor festgestellt werden (151). Unabhängig davon konnte außerdem bewiesen werden, dass der prognostische Einfluss von Immun-mRNA-Markern wie beispielsweise von CXCL13, das als Chemokin für die Rekrutierung von B-Zellen verantwortlich ist, am stärksten im TNBC ausgeprägt ist (152).

Um die Rolle des humoralen Immunsystems im TNBC, insbesondere in Form von tumorinfiltrierenden Plasmazellen, näher zu verstehen und mögliche immunogene und tumorspezifische Neoantigene, die als möglicherweise neue therapeutische Ziele in Frage kommen, zu identifizieren, ist eine Analyse der Antikörperspezifitäten von tumorinfiltrierenden Plasmazellen notwendig.

Nachdem in einer retrospektiven immunhistochemischen Analyse ein hohes Niveau an tumorinfiltrierenden Plasmazellen in TNBC-Tumorschnitten festgestellt werden

konnte (153, 154), wurden in weiteren Arbeiten die Antikörpersignaturen im Blutplasma von TNBC-Patientinnen mit einem hohen Niveau an tumorinfiltrierenden Plasmazellen sowie von TNBC-Patientinnen mit einem niedrigen Niveau an tumorinfiltrierenden Plasmazellen und einer gesunden Kontrollgruppe untersucht und miteinander verglichen. Dies geschah mit der Intention, potenzielle Zielstrukturen der humoralen Immunantwort zu identifizieren. Die Einteilung der Proben in hohes bzw. niedriges Niveau an tumorinfiltrierenden Plasmazellen erfolgte zuvor anhand der Analyse der Expression von CD38 und IgkC in korrespondierenden TNBC-Tumorschnitten. Es folgte ein Phage-Display-Screening zur Identifikation der Zielstrukturen. Nach Isolation und Vervielfältigung der in den an die Zielmoleküle gebundenen Phagen enthaltenen DNA mittels PCR schloss sich eine NGS-Analyse an. Die daraus resultierenden potenziellen Zielpeptide wurden daraufhin mit einem ELISA weiter validiert. Nach einem zusätzlichen Vergleich mit weiteren gesunden Kontrollen kristallisierten sich die beiden Proteine CBX5 und KDM5B als Zielstrukturen heraus, bei denen sich gesunde und pathologische Proben am stärksten unterschieden. Diese kämen somit als potenzielle therapeutische Zielstrukturen beim TNBC in Frage und sollten näher untersucht werden (155).

2.3 CBX5

2.3.1 Überblick über CBX5

Das Chromoboxprotein 5 (CBX5), auch als Heterochromatin-Protein 1 α (HP1 α) bezeichnet, ist Bestandteil komplexer epigenetischer Mechanismen zur Regulation der Genexpression. Durch die Bindung an di- oder trimethyliertes Lysin 9 des Histons H3 trägt HP1 α zur Ausbildung dichter, geordneter Heterochromatinstrukturen bei. Dies verhindert die Transkription der betroffenen Genomabschnitte und unterdrückt somit die entsprechende Genexpression (156, 157). Neben HP1 α , das vom *CBX5*-Gen codiert wird, gehören auch HP1 β und HP1 γ zur HP1-Proteinfamilie. Diese werden durch die Gene *CBX1* bzw. *CBX3* codiert (158, 159).

2.3.2 Aufbau und funktionelle Mechanismen der HP1-Familie

Die Proteine der HP1-Familie lassen sich strukturell in drei Abschnitte gliedern. Das N-terminale Ende (NTE) des Proteins wird als Chromo Domain und das C-terminale Ende (CTE) als Chromo Shadow Domain (CSD) bezeichnet. Verbunden werden diese beiden Abschnitte über eine flexible Hinge-Domain (160, 161).

Die Chromo Domain bindet spezifisch an das di- oder trimethylierte Lysin 9 von Histon H3 (H3K9me_{2/3}), wobei die Bindungsaffinität proportional zum Grad der Methylierung von Lysin 9 ansteigt (162-164). Die Bindungsspezifität zu H3K9me_{2/3} wird zusätzlich durch Phosphorylierung N-terminaler Serinreste von HP1 verstärkt (165). Außerdem kann es zu Interaktionen zwischen der Chromo Domain und dem methylierten Lysin 26 des Verknüpfungshistons H1.4 kommen, was ebenfalls zur Chromatinverdichtung beiträgt (166, 167).

Trotz einer der Chromo Domain sehr ähnlichen Struktur fungiert die CSD primär als Bindestelle für andere Proteine der HP1-Familie. Darunter fallen neben HP1 α auch HP1 β und HP1 γ . Es kommt zur Bildung von Homo- und Heterodimeren, wodurch eine Y-förmige Interaktionsstelle für andere Proteine entsteht (Abbildung 4) (168, 169). Ermöglicht wird eine Protein-Protein-Interaktion an dieser Stelle durch ein Pentapeptid-Motiv, bestehend aus Prolin, gefolgt von einer beliebigen Aminosäure, gefolgt von Valin, wiederum gefolgt von einer beliebigen Aminosäure, gefolgt von Leucin, das mit PxVxL abgekürzt wird (170). Über diese Bindestelle interagiert HP1 mit zahlreichen an der Regulation der Genexpression beteiligten Proteinen, wie beispielsweise TIF1 α , TIF1 β , SP100 oder der Chromatin Assembly Factor 1 Subunit p150 (CAF-1p150) (171, 172). Des Weiteren kann die CSD über das ähnliche PxxVxL-Motiv auch direkt mit einer Region auf Histon H3 interagieren (173).

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass HP1 α -Monomere und HP1 α -Dimere unterschiedliche Einflüsse auf die Genomarchitektur haben. Während HP1 α -Monomere eine Chromatinstruktur mit Abständen zwischen den Nukleosomen vermitteln, sorgen HP1 α -Dimere für eine lokale Reduzierung dieser Abstände, was zu dichter gepackten Chromatinarealen führt (174).

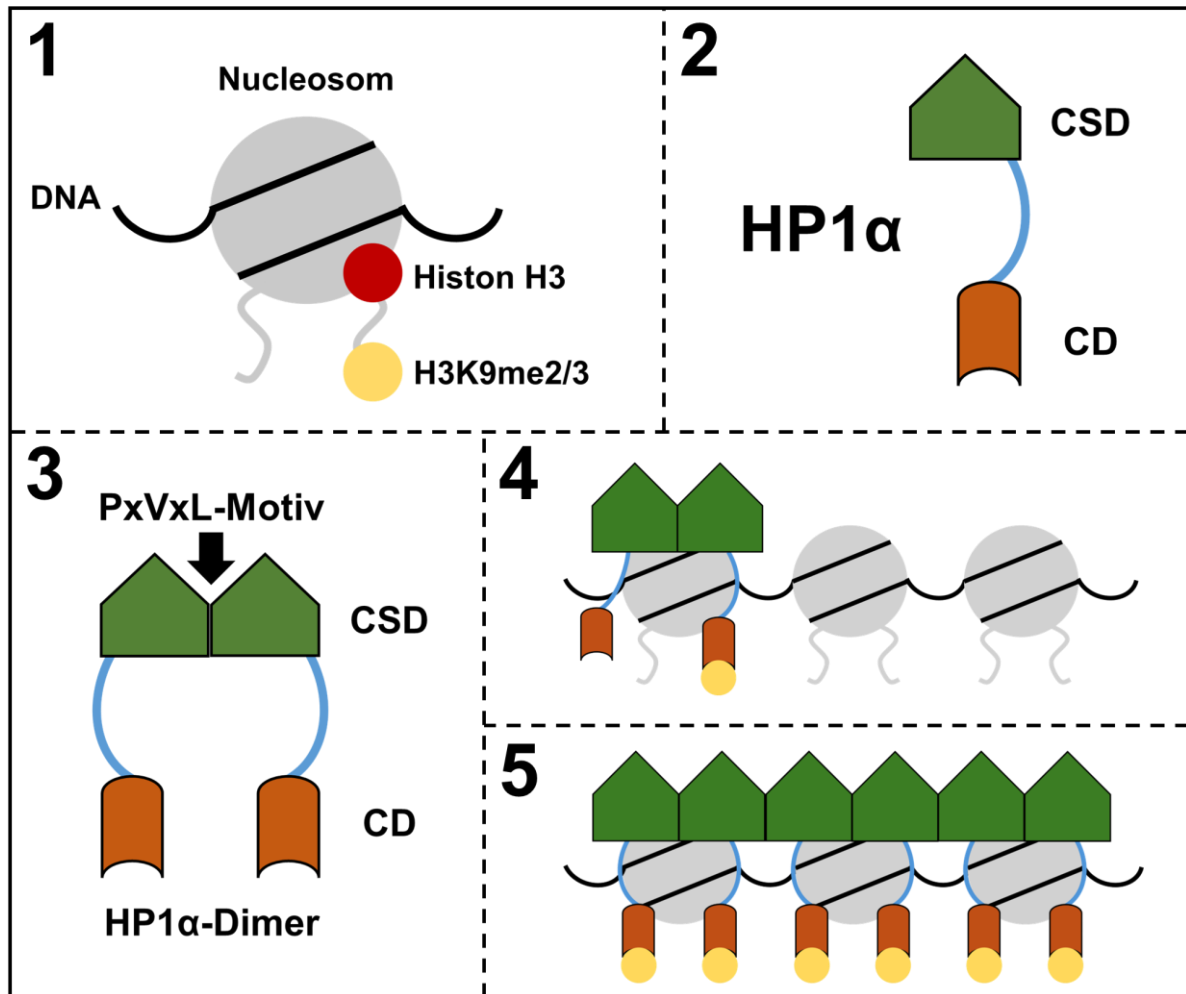


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bindung von HP1α-Dimeren an Nukleosomen. 1) Nukleosom mit schematischer Markierung von Histon H3 in Rot und H3K9me2/3 in Gelb. 2) HP1α mit Chromo Domän und CSD. 3) HP1α-Dimer mit Y-förmiger Bindestelle an den zusammengelagerten CSDs, die das PxVxL-Motiv enthält. 4) An ein Nukleosom gebundenes HP1α-Dimer. Bindung einer Chromo Domän an H3K9me2/3. 5) Bindung mehrerer HP1α-Dimere an benachbarte Nukleosomen. Abbildung verändert nach (175).

Unabhängig vom PxVxL-Motiv interagiert HP1 über die CSD mit dem Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1 (SUV39h1). Wird SUV39h1 über HP1 an H3K9me2/3 gebunden, kommt es zu einer Rekrutierung von weiteren SUV39h1-Proteinen. Diese wiederum führen zu einer Methylierung benachbarter H3K9-Reste. Dadurch entstehen neue Bindestellen für HP1-Proteine, deren Bindung eine erneute Rekrutierung von zusätzlichen SUV39h1-Proteinen nach sich zieht. Die daraus resultierende Kettenreaktion verdeutlicht, wie HP1 die Ausbreitung von Heterochromatin in angrenzende Euchromatinregionen vermittelt (176). Dieser Mechanismus wird als

Position Effect Variegation (PEV) bezeichnet (177). Ein Mangel an HP1 unterdrückt die PEV, während eine Überexpression sie verstärkt (178, 179). Darüber hinaus können HP1-Proteine im Verbund mit SUV39h1 über ihre CSD auch direkt an DNA-Methyltransferasen (DNMTs) binden, was zu einem sich selbst verstärkenden repressiven Chromatinzustand beiträgt und Gen-Silencing verstärkt (180).

Darüber hinaus gibt es an der CSD von HP1 noch weitere Interaktionsmöglichkeiten für Proteine. Dazu zählen der Chromatin-Remodeling Factor BRG1 sowie das Pogo Transposable Element-derived Protein with Zinc Finger Domain (POGZ) (181, 182). Zusätzlich ist eine Interaktion zwischen der CSD und der ersten Helix der Histon-Falte von Histon H3 beschrieben (183), die durch eine Vielzahl von Histonphosphorylierungen, beispielsweise vermittelt über die JAK2-Kinase oder die DYRK1A-Kinase, reguliert wird (184, 185). Diese sogenannte Shadock-Region von Histon H3 kann wiederum ebenfalls mit BRG1 interagieren (186). So entsteht eine HP1-vermittelte transkriptionelle Repression, die unabhängig von einer Methylierung an H3K9 ist (181).

Auch die flexible Hinge-Domain spielt eine wichtige Rolle bei der Beziehung zwischen HP1 und Chromatin (187). Ähnlich wie die Chromo Domain kann auch sie mit dem Histon H1 interagieren (166). Zusätzlich dazu ist die Hinge-Domain durch Wechselwirkung mit RNA und RNA-induced Silencing Complex (RISC) Proteinen für die Navigation und Lokalisation von HP1-Proteinen entlang der Chromosomen verantwortlich (188, 189). Gemeinsam mit Proteinen des RNA-Interferenz (RNAi) Mechanismus fungiert HP1 als Instrument für transkriptionelle Genstilllegung (190). Es wird außerdem diskutiert, ob dieses System, neben seiner regulatorischen Aktivität bei der Transkription, auch zum alternativen Splicing und dem Inkludieren bzw. Exkludieren von Exons beiträgt (191).

2.3.3 Der Einfluss von CBX5 auf den Zellzyklus und die Mitose

Aufgrund seiner chromatinstrukturierenden Eigenschaften ist das *CBX5*-Genprodukt HP1 α auch an komplexen zellulären Prozessen wie der Mitose beteiligt (192). Während der Mitose führt eine Phosphorylierung des Histon H3 an der Aminosäure Serin 10 (H3S10p) durch die Aurora-B-Kinase dazu, dass HP1-Proteine nicht mehr an das benachbarte methylierte H3K9 binden können, was zur Dissoziation der HP1-Proteine von den Chromosomen führt (193, 194). Die Destabilisierung der HP1 α -Chromatinbindung wird durch POGZ vermittelt, das über die CSD spezifisch an HP1 α bindet und während der M-Phase die Aktivität der Aurora-B-Kinase reguliert (182). Die

Reduktion der HP1 α -Bindungsaffinität ist notwendig, um eine korrekte Chromosomenkondensation für die Mitose zu ermöglichen (195). Postmitotisch unterstützt die Reetablierung der HP1 α -Bindung eine Rückkehr zur normalen Chromatinstruktur (196).

In der G2/M-Phase des Zellzyklus kommt es zu einer Phosphorylierung der Hinge-Domain von HP1 α durch die NDR1-Kinase. Diese spezifische Phosphorylierung trägt dazu bei, dass während der frühen Mitose HP1 α an den Kinetochoren lokal angereichert wird. Dies begünstigt die Bindung von SGO1 an mitotische Zentromere und ist nötig, um eine richtige Chromosomenausrichtung und Spindelbildung zu gewährleisten. Das Fehlen der NDR-Kinase führt in Zellen zu einem Verlust dieser mitosespezifischen HP1 α -Phosphorylierung und resultiert in einem Zellzyklusarrest in der Prometaphase (197, 198).

Durch Interaktionen mit DNA-Replikationsfaktoren wie CAF-1p60 und CAF-1p50 ist HP1 α außerdem in der *de novo*-DNA-Synthese während der S-Phase involviert. Im Komplex mit den CAF-1-Proteinen stellt HP1 α die Verteilung und Reetablierung der ursprünglichen Chromatinmarkierungen sicher (196, 199, 200).

2.3.4 Die Rolle von CBX5 im Mammakarzinom

Die Rolle von HP1 α in verschiedensten Tumorentitäten, wie Prostata-, Cholangio-, Urothel-, Bronchial- oder klarzelligem Nierenzellkarzinom, ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussionen (201-206). Im Gegensatz zu HP1 β und HP1 γ wird HP1 α in Mammakarzinom-Zelllinien wie HS-578T sowie in Tumorzellen stärker exprimiert als in nicht tumorösen Zellen wie HS-578Bst oder gesundem Brustgewebe. Eine Herunterregulation von HP1 α hatte zwar keinen Einfluss auf die Zellproliferation, jedoch stieg die Anzahl an fehlerhaften Mitosevorgängen. Darauf basierend geht eine Theorie davon aus, dass die HP1 α -Expression in Tumorzellen reflektorisch erhöht ist, um eine funktionierende Mitose zu gewährleisten (207). Hinzu kommt, dass hohe HP1 α -Expressionslevel im Mammakarzinom mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert sind (208). Widersprüchlich dazu wird jedoch auch berichtet, dass eine hohe HP1 α -Expression mit einem längeren rezidivfreien Überleben korreliert (209).

In hochinvasiven Mammakarzinom-Zelllinien wie HS-578T, BT-549 und MDA-MB-231 zeigte sich im Vergleich zu eher weniger invasiven Zelllinien wie T47D und MCF7 eine Herunterregulation von HP1 α , wohingegen die Expression von HP1 β und HP1 γ

unverändert blieb (210, 211). Unterstützend dazu demonstrierten Untersuchungen von *in vivo*-Tumorproben eine reduzierte Expression von HP1 α in Mammakarzinom-Metastasen im Vergleich zum Primärtumor (211). Während ein Knockdown von HP1 α in den wenig invasiven Zellen der Zelllinie MCF-7 einen Anstieg der Zellinvasion bewirkte, verursachte eine Überexpression von HP1 α in Zellen der hochinvasiven Zelllinie MDA-MB-231 einen Rückgang der Zellinvasion (211, 212). Basierend auf diesen Erkenntnissen wird HP1 α als Metastasen-Suppressor eingestuft (175). Dabei unterliegt HP1 α im Mammakarzinom, in Bezug auf seinen Einfluss auf Metastasierung, zusätzlich der Regulation durch miRNAs wie miR-223-3p oder miR-2355-5p sowie durch Long Non-coding RNAs (lncRNAs) wie SNHG11 (213, 214). MiRNAs beispielsweise binden an der 3'-untranslated Region von mRNA, was dazu führt, dass diese abgebaut oder die Translation blockiert wird, wodurch die Genexpression post-transkriptionell kontrolliert wird.

Zusätzlich steht ein möglicher Zusammenhang zwischen HP1 und BRCA1 im Raum. So sind HP1-Proteine essenziell für die Aufrechterhaltung der tumorunterdrückenden Funktion von BRCA1. Das Tumorsuppressorprotein BRCA1 ist über den Mechanismus der homologen Rekombination direkt an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt und kann über seine regulatorische Funktion in DNA-geschädigten Zellen einen Zellzyklusarrest herbeiführen. Eine Veränderung in der Expression von HP1 α könnte somit zu einer Kompromittierung der BRCA1-Funktion führen und dadurch Tumorgenese fördern (215). Darüber hinaus werden bei DNA-Schäden HP1-Proteine gezielt an die beschädigten Stellen rekrutiert, und insbesondere HP1 α unterstützt die Arbeit von an der DNA-Reparatur beteiligten Proteinen wie p53-binding Protein 1 und RAD51 (216, 217). Andere Daten hingegen suggerieren, dass hohe HP1 α -Level die DNA-Reparatur behindern (218).

Weiteren Hypothesen zufolge ist HP1 α an der Regulation der Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT) und der Unterhaltung von Tumorstammzellen (CSC) beteiligt (175). Letztere Vermutung geht auf die Interaktion von HP1-Proteinen mit TIF1 β zurück, welche eine wichtige Rolle bei der Konservierung der transkriptionellen Integrität von hämatopoetischen Stammzellen spielt (219). Auch im Bronchialkarzinom ist das CBX5-Gen in der Regulation von stammzellähnlichen Tumorzellen involviert (220). In Kontrast dazu gibt es Berichte, dass HP1 α eine Schlüsselrolle in der Steuerung der Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen zu Endothelzellen spielt. So fördert eine

Überexpression von HP1 α in endothelialen Vorläuferzellen sowohl Differenzierung als auch Angiogenese und könnte Neovaskularisierung begünstigen (221).

Während der EMT hingegen ist eine Snail1-vermittelte Lösung von HP1 α -Proteinen von perizentrischem Heterochromatin beschrieben. Dies erlaubt möglicherweise eine für die EMT nötige Umstrukturierung des Heterochromatins (222). Dieser Prozess wird zusätzlich durch SUMOylierung reguliert. Unter SUMOylierung versteht man einen posttranslationalen Modifikationsprozess, bei dem das Protein Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) an andere Proteine angehängt wird, wodurch deren Aktivität, Stabilität, Lokalisation oder Interaktionen beeinflusst werden. Während eine SUMOylierung in der Hinge-Domain zu einer erneuten Anlagerung von HP1 α an perizentrisches Heterochromatin führen würde, wird dies durch die SUMO-spezifische Protease SENP7 unterbunden (223). SENP7 bindet an die CSD von HP1 α über das PxVxL-Motiv und katalysiert von dort aus die De-SUMOylierung von HP1 α . Diese HP1 α -Hypo-SUMOylierung ermöglicht den Zugang zu Promotor-Regionen von mesenchymalen Genen, welche zuvor durch eine Anreicherung von SUMOylierten HP1 α stillgelegt waren. Das wiederum resultiert in einer Förderung der EMT (224).

Auch die bereits beschriebene Rolle von HP1 α bei der DNA-Reparatur wird durch SUMOylierung beeinflusst. So führt eine HP1 α -Hyper-SUMOylierung, resultierend aus niedriger Expression der längeren SENP7-Isoform SENP7L, zu einer Schwächung der DNA-Reparatur. Expressionslevel von SENP7L können somit als prognostischer Faktor für die Wirksamkeit alkylierender Chemotherapeutika herangezogen werden (225).

2.4 KDM5B

2.4.1 Überblick über KDM5B

Die Lysin-Demethylase 5B (KDM5B) ist eine Histon-Demethylase, welche an Lysin 4 von Histon H3 (H3K4) die Demethylierung katalysiert (226). Sie ist außerdem unter den Synonymen JARID1B oder PLU-1 bekannt (227). Insbesondere die trimethylierte (H3K4me3) und dimethylierte Form (H3K4me2) des Lysin 4 am Histon H3 markieren Promotorregionen aktiv transkribierter Gene (228, 229). Durch Demethylierungen an dieser Stelle wird der Zugang der Transkription auf diese Bereiche erschwert, was eine transkriptionelle Repression zur Folge hat (230, 231).

2.4.2 Aufbau und funktionelle Mechanismen von KDM5B

Das KDM5B-Protein ist in mehrere funktionelle Domänen gegliedert, die einen unterschiedlichen Beitrag zur Enzymaktivität leisten (Abbildung 5) (232). Insbesondere die JmjN- und JmjC-Domänen sind essenziell für die Demethylase-Aktivität. So katalysiert die JmjC-Domäne beispielsweise eine Hydroxylierung, die zu einer Demethylierung von Lysin 4 führt (233-235).

Die AT-rich Interaction Domain (ARID) hingegen ist nicht direkt an der Katalyse der enzymatischen Reaktion beteiligt (236). Stattdessen unterstützt die ARID die richtige Substraterkennung, indem sie, im Fall von KDM5B, die Bindung an DNA-Sequenzen mit einem hohen Cytosin- und Guanin-Anteil ermöglicht (237, 238). Im Gegensatz zu anderen Proteinen der ARID-Familie erfolgt die DNA-Bindung von KDM5B über die ARID ohne erkennbare Sequenzspezifität und ist nicht auf adenin- oder thymineiche DNA-Regionen angewiesen (239).

Währenddessen erkennen die drei Plant Homeodomain (PHD) Zinkfinger-Motive PHD1, PHD2 und PHD3 verschiedene Methylierungsstadien von H3K4 und regulieren die Bindungsaffinität von KDM5B an die jeweiligen Histone. So bindet der PHD1-Finger von KDM5B primär an das unmodifizierte Histon H3, während der dritte PHD3-Finger die trimethylierte Form H3K4me3 bevorzugt (240-242).

Darüber hinaus verfügt KDM5B über eine Zinkfinger-Domäne (Zf-C5HC2), die zur Interaktion mit Chromatinstrukturen beiträgt, sowie über eine zentrale PLU-Region (243). Neuere Erkenntnisse legen außerdem nahe, dass KDM5B auch unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität bei der Kontrolle der Genexpression eine regulatorische Rolle einnehmen kann (244).

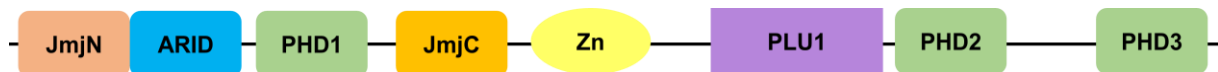


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des KDM5B-Proteins. KDM5B besteht aus einer JmjN-, JmjC-, ARID- und PLU1-Domäne, drei PHD-Motiven sowie einer Zinkfinger-Domäne (Zn). Abbildung verändert nach (245).

2.4.3 Die Rolle von KDM5B in der Embryonalentwicklung

Da die zentrale PLU-Region mit den Transkriptionsfaktoren PAX9 und BF-1 interagiert, welche vor allem während der Embryonalentwicklung aktiv sind, wurde die Expression von KDM5B in Mäuseembryonen näher untersucht. Dabei fiel auf, dass die KDM5B-

Expression eng mit der Entwicklung von Organen korreliert, bei denen es zu mesenchymal/epithelialen Wechselwirkungen kommt, wie beispielsweise den Milchdrüsen, den Zähnen, den Schnurrhaarfollikeln oder den Gliedmaßen. Insbesondere das Epithel der Milchdrüsen im Knospenstadium weist eine hohe KDM5B-Expression auf, die im Laufe der Schwangerschaft zunimmt, wenn sich aus den alveolaren Knospen die einzelnen Alveolen entwickeln, und anschließend wieder abnimmt. In den Epithelzellen der Milchdrüsen von adulten Tieren ist die KDM5B-Expression schließlich nur noch sehr gering ausgeprägt (246).

Ein systemischer Knockout von *KDM5B* in Mäuseembryonen führte zu früher embryonaler Letalität. Eine spezifische Deletion der ARID-Domäne resultierte in lebensfähigen Embryonen, bei denen die östrogenrezeptorabhängige Entwicklung der Brustdrüsen während der Pubertät und frühen Schwangerschaft verzögert war (247). Ähnliche Untersuchungen unterstützen diese Ergebnisse und demonstrieren, dass der Verlust von KDM5B in Mäusen zu einer vorzeitigen Sterblichkeit, reduzierter weiblicher Fruchtbarkeit und einer verzögerten Entwicklung der Milchdrüse führt. Auch ein verringerter Östrogenspiegel im Serum und eine reduzierte Proliferation von Milchdrüsenepithelzellen in der frühen Pubertät konnten beobachtet werden. Besonders in den Milchdrüsenepithelzellen verringert das Fehlen von KDM5B die Expression zentraler Regulatoren der Milchdrüsenmorphogenese und der luminalen Linien-Spezifikation, wie beispielsweise FOXA1 und des Östrogenrezeptors α (248).

2.4.4 Die Rolle von KDM5B im Mammakarzinom

Im Gegensatz zu KDM5A und KDM5C, die ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression von KDM5B in normalem adultem Gewebe limitiert. Lediglich im Hoden, insbesondere in Sertoli-Zellen, ist eine hohe Expression von KDM5B nachweisbar, während die Expression in der Plazenta, den Ovarien und den Tonsillen eher gering ist. Im Kontrast dazu konnte eine Expression von KDM5B in Mammakarzinomgewebe beobachtet werden, wobei diese in gutartigen Tumoranteilen geringer und in invasiven Tumoranteilen stärker ausgeprägt war. Dies zeigt, dass KDM5B im Mammakarzinomgewebe hochreguliert ist (249).

Auch in mehreren Mammakarzinomzelllinien, wie MCF-7, T47D, ZR-75 und MDA-MB-231, konnte eine Expression von KDM5B nachgewiesen werden. Diese war in der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 am stärksten ausgeprägt (250). Ein shRNA-Knockdown von *KDM5B* in MCF-7-Zellen führte zu einer Reduktion der

Zellproliferation sowie zu einem verminderten Übertritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus. Daraus wurde geschlussfolgert, dass KDM5B die Zellproliferation begünstigt, indem es den Übergang von der G1- in die S-Phase erleichtert. Ein Anstieg der Expression von Tumorsuppressorgenen wie *BRCA1*, *CAV1* und *HOXA5* nach *KDM5B*-Knockdown lässt außerdem vermuten, dass KDM5B durch transkriptionelle Repression dieser Tumorsuppressorgene Tumorzellproliferation und somit Tumorwachstum begünstigt (251). Insbesondere durch die Unterdrückung der Expression des antiangiogenen Transkriptionsfaktors *HOXA5* erhält KDM5B die angiogene Kapazität von Endothelzellen und fördert somit Tumor-Neoangiogenese und Tumorwachstum (252).

In einem Mausmodell, welches mit MCF-7-Zellen mit *KDM5B*-Knockdown transfiziert worden war, konnte ein Rückgang des durch Östradiol (E2) stimulierten Tumorwachstums beobachtet werden, was die Rolle von KDM5B bei der Förderung von östrogeninduziertem Wachstum im ER-positiven Mammakarzinom bestätigt (247). Zudem korreliert die *KDM5B*-Expression eng mit der von E2F1 und E2F2, Transkriptionsfaktoren, die den Zellzyklus und insbesondere den Übergang von G1 in die S-Phase regulieren (253). Ein weiteres Beispiel für die regulatorische Funktion von KDM5B beim Zellzyklus ist der Einfluss von KDM5B auf die *let-7e*-Expression. Durch die epigenetische Repression der tumorunterdrückenden Mikro-RNA *let-7e* kommt es zu einer verstärkten Cyclin D1-Expression, was wiederum die Zellzyklusprogression fördert (254).

Auch die Expression der antimetastatischen Mikro-RNA *miR-31* wird durch Rekrutierung von KDM5B an den Promotor unter Beihilfe des Onkogens *EMSY* unterdrückt und somit Zellmigration und Zellinvasion gefördert (255). *EMSY* bindet außerdem kompetitiv an die Jmjc-Domäne von KDM5B und fördert dadurch die Selbsterneuerung von CSC sowie die Tumorentstehung (256).

Gleichzeitig hat *KDM5B* einen Einfluss auf die regulatorischen Aktivitäten der lncRNA *MALAT1* und der Mikro-RNA *hsa-miR-448*. So führt das Silencing von *KDM5B* in TNBC-Zellen zu einer Hochregulierung von *hsa-miR-448* und einer Herunterregulation von *MALAT1*, verbunden mit einer reduzierten Zellmigration und Zellinvasion. Eine erhöhte *KDM5B*-Expression konnte wiederum durch *hsa-miR-448* reduziert werden, was nahelegt, dass *hsa-miR-448* den *KDM5B/MALAT1*-Weg stört (257). Ein weiteres Beispiel für eine Regulation von *KDM5B* durch Mikro-RNAs ist *miR-137*, deren direktes

Target *KDM5B* ist. Eine Überexpression von *miR-137* führt zu einer Reduktion von Zellproliferation und Zellmigration. In Mammakarzinomzelllinien ist *miR-137* herunterreguliert (258).

Untersuchungen in anderen Tumorentitäten legen ebenfalls nahe, dass *KDM5B*, trotz seiner regulatorischen Aktivität, wiederum selbst anderen regulatorischen Mechanismen unterliegt. Beispielsweise kann die *KDM5B*-Expression durch Bindung des Onkoproteins N-Myc an den *KDM5B*-Promotor unterdrückt werden, wodurch Zellproliferation reduziert wird (259).

Weiterhin ist *KDM5B* als Korepressor von TIEG1 in den Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Signalweg involviert. Gemeinsam mit TIEG1 unterdrückt *KDM5B* die Transkription von Smad7, einem Inhibitor des TGF- β -Signalwegs. Dies kann sowohl tumorsuppressive als auch tumorfördernde Auswirkungen haben (260). Ein weiterer tumorprotektiver Effekt ist, dass *KDM5B* im Komplex mit LSD1 und NuRD die Expression des Chemokins CCL14 reduziert und dadurch das angiogene und metastatische Potenzial von Mammakarzinomzellen unterdrückt (261).

Im Vergleich zu Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom ist *KDM5B* in triple-negativem Mammakarzinom geringer exprimiert. Eine Überexpression von *KDM5B* in MDA-MB-231-Zellen reduzierte die Zellmigration und Zellinvasion. Daraus wurde geschlussfolgert, dass *KDM5B* im triple-negativen Mammakarzinom auch eine tumorunterdrückende Funktion einnimmt (241). Zudem hemmte *KDM5B* die Expression der Pluripotenz-Gene *SOX2* und *NANOG* und verringerte die Stammzellpopulation in TNBC-Zelllinien (262).

Andere Ergebnisse weisen auf eine Schlüsselrolle von *KDM5B* in luminalzell-spezifischen Expressionsprogrammen hin. Demnach ist die *KDM5B*-Expression im luminalen Mammakarzinom notwendig, um die Expression basaltzell-spezifischer Gene zu unterdrücken. Gleichzeitig haben Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven Tumoren mit hoher *KDM5B*-Aktivität eine kürzere krankheitsspezifische Überlebenszeit. Diese Daten unterstreichen eine unterschiedliche *KDM5B*-Aktivität in luminalem und basalem Mammakarzinom sowie die Assoziation mit einer schlechten Prognose bei erhöhter *KDM5B*-Aktivität bei luminalen ER+-Tumoren (263). Eine Reduktion der *KDM5B*-Aktivität durch Deletion oder durch den Einsatz von *KDM5B*-

Inhibitoren in MCF-7-Zellen resultierte in einer erhöhten Sensitivität für den Einsatz von Hormontherapien, wie beispielsweise das Antiöstrogen Fulvestrant (264).

Trotz verschiedener Entwicklungsansätze sind bislang keine KDM5B-Inhibitoren für die klinische Anwendung zugelassen (265). Allerdings konnte die Expression eines weiteren von KDM5B unterdrückten Tumorsuppressorproteins, des Proteins HEXIM1, durch den Einsatz von KDM5B-Inhibitoren wieder hochreguliert werden. Dieser gezielte Einsatz von KDM5B-Inhibitoren hemmt die Proliferation von Mammakarzinomzellen (266). Weiterhin hemmen sowohl ein KDM5B-Knockdown als auch der Einsatz des KDM5B-Inhibitors AS-8351 die Proliferation und Migration von Mammakarzinomzellen, und auch die EMT kann dadurch umgekehrt werden. Interessanterweise ist KDM5B auch an der Unterdrückung des AMPK-Signalwegs beteiligt, welcher an der Regulation des Fettstoffwechsels beteiligt ist. Somit werden eine metabolische Reprogrammierung und daraus resultierendes unkontrolliertes Wachstum begünstigt (267).

In anderen Tumorentitäten wiederum gibt es außerdem Hinweise darauf, dass eine Überexpression von KDM5B neben einer erhöhten Zellproliferation und EMT auch mit einer gesteigerten Zellmigration und Zellinvasion einhergeht. Mechanistisch konnte eine KDM5B-vermittelte Modulation der H3K4me3-Markierung am Promotor des *PTEN*-Gens nachgewiesen werden, was mit einer Unterdrückung der *PTEN*-Transkription einherging. Dies demonstriert den Einfluss von KDM5B auf den wichtigen PTEN/AKT-Signalweg (268). Zusätzlich dazu bindet KDM5B auch an den *PIK3CA*-Promotor. Während eine Überexpression von KDM5B zu einer Verstärkung des PI3K/AKT-Signalwegs führt, kommt es bei einem Fehlen von KDM5B zu einer Reduktion des P110 α - und PIP3-Niveaus, was in einer verminderten Zellproliferation resultiert (269).

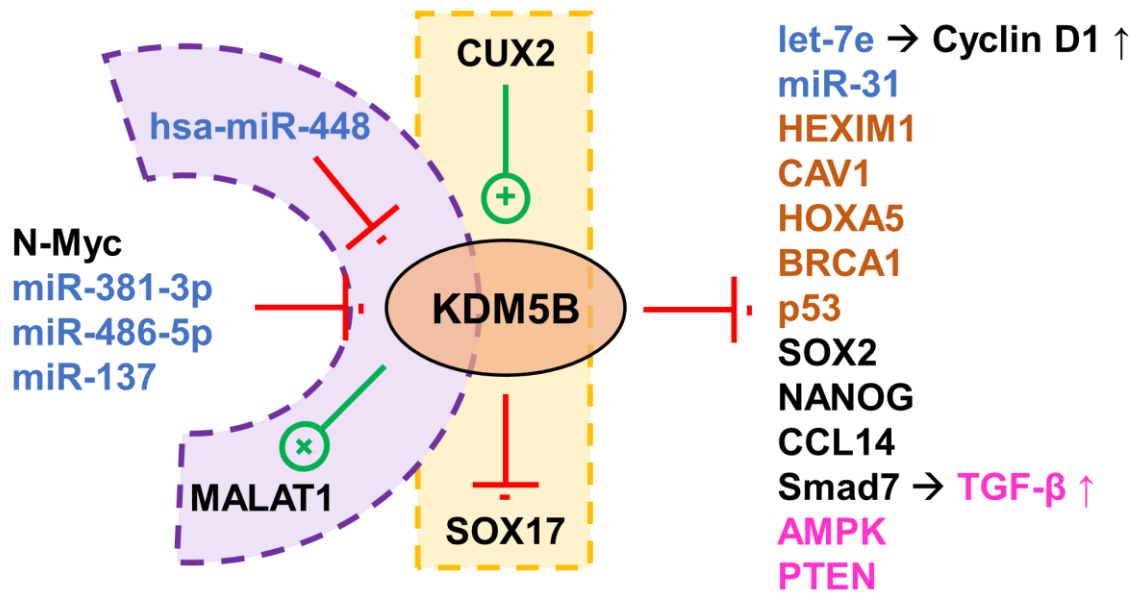
Im Mammakarzinom ist neben KDM5B auch CUX2 hochreguliert. CUX2 förderte die Expression von KDM5B durch transkriptionelle Aktivierung. KDM5B wiederum unterdrückte die Expression von SOX17 durch Histondemethylierung, was das Tumorstadium beschleunigt. Eine Hemmung von CUX2 hingegen reduziert die KDM5B-Expression und dadurch die Tumorentstehung und -progression im Mammakarzinom über eine Hochregulation von SOX17. Daraus lässt sich eine regulatorische CUX2/KDM5B/SOX17-Achse ableiten (270).

Auch auf das Tumorsuppressor-Protein p53 scheint KDM5B Einfluss zu haben. So führt *KDM5B*-Silencing zu einer deutlich erhöhten p53-Expression auf Proteinebene und zu einer gesteigerten, p53-vermittelten Apoptose von Mammakarzinomzellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die erhöhte KDM5B-Expression im Mammakarzinom p53-induzierte Zelloptose verhindert (271).

Zusätzlich ist KDM5B auch an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt. So wird KDM5B an DNA-Bruchstellen angereichert und trägt zu einer Rekrutierung von Ku70 und BRCA1 bei, die für eine nicht-homologe Endverknüpfung oder eine homologe Rekombination benötigt werden. Bei einem KDM5B-Mangel hingegen, kommt es zu einer Beeinträchtigung der DNA-Reparatur (272). Ein KDM5B-Mangel erhöht außerdem die H3K4-Methylierung und blockiert die Rekrutierung von XRCC1 an DNA-Bruchstellen, was zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika führt. Währenddessen hat eine Überexpression von KDM5B einen gegenteiligen Effekt und führt zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin (273).

KDM5B unterliegt, zusätzlich zu den bereits erwähnten Mikro-RNAs, außerdem der Regulation durch *miR-381-3p* und *miR-486-5p*, die beide an die 3'UTR von *KDM5B* binden und im Mammakarzinom herunterreguliert sind. Nach einer Transfektion mit *miR-486-5p* zeigt sich in MCF-7-Zellen eine starke Reduktion des KDM5B-Proteins, die mit einer Akkumulation von DNA-Schäden und einer erhöhten Strahlensensibilität einhergeht (274). Auch der gezielte Einsatz von KDM5B-Inhibitoren kann im Mammakarzinom zu einer Erhöhung der Strahlensensibilität führen (275).

Zuletzt kann KDM5B außerdem auch als prognostischer Faktor herangezogen werden und korreliert im Mammakarzinom mit einer schlechten Prognose. Besonders im luminalen Mammakarzinom geht eine erhöhte KDM5B-Expression mit einem verkürzten Gesamtüberleben einher (276). Auch in einer Vielzahl von anderen Tumorentitäten spielt die Aktivität von KDM5B eine zentrale Rolle (Abbildung 6) (277).



Legende:



Abbildung 6: Schematische Übersicht der KDM5B-Interaktionen. KDM5B interagiert mit einer Vielzahl von verschiedenen Partnern. Darunter sind beispielsweise zahlreiche regulatorische RNAs oder Tumorsuppressoren. Es ist aber auch in die Regulation bekannter Signalwege involviert. Besonders hervorgehoben sind der CUX/KDM5B/SOX17- sowie der hsa-miR-448/KDM5B/MALAT1-Pathway. Bei den Interaktionen kann es sowohl zu fördernden als auch zu hemmenden Effekten kommen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Chemikalien	Hersteller
100 bp-Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
AlamarBlue™ Cell Viability Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ampuwa® Aqua dest.	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Aqua stabil	Julabo, Seelbach
Borsäure (≥ 99,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dako REAL™ Antibody Diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dako Target Retrieval Solution, pH 6 (10X)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (10X)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA-Na ₂	Boehringer Mannheim, Mannheim
Ethanol (96 %)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol (99,8 %)	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid (100 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Fibronectin	Merck, Darmstadt
Glycerol (50 %)	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatologie Puffertabletten nach Weise pH 6,8	Merck, Darmstadt
Hemacolor® Rapid Staining of Blood Smear Solution 2	Merck, Darmstadt
Hemacolor® Rapid Staining of Blood Smear Solution 3	Merck, Darmstadt
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Kapa Sybr®Fast	Kapa Biosystems, Wilmington, USA
Kollagen I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagen IV	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
M-MuLV Reverse Transkriptase	New England BioLabs, Frankfurt a.M.

M-MuLV Reverse Transkriptase Buffer (10x)	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Nagellack P2 Color Victim P3000	Maesa Cosmetics, Wien, Österreich
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase- Free Water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti®Histofix 4,5 % Formaldehyd	Qiagen, Hilden bei Düsseldorf
Roti®-Histokitt II	Carl Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (1 M)	Carl Roth, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
Terg-a-zyme	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS, PUFFERAN® (≥ 99,9 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Tween® 20	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Versene EDTA (0,02 %)	AppliChem, Darmstadt
Xylol, Isomerengemisch	

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung

Puffer / Lösung	Inhalt
Agarosegel (2 %)	1 g Agarose 50 ml 1x TBE
Blockpuffer für Adhäsion	DPBS + 0,5 % BSA
DNA-Ladepuffer	50 % Glycerol 1 mM Na ₂ EDTA 0,4 % Bromphenolblau
Ethanol (70 %)	99,8 % Ethanol-Verdünnung mit VE-Wasser
Ethidiumbromidlösung	1 % Ethidiumbromid in Aqua dest.
Kristallviolett-Lösung	5 mg/ml Kristallviolett in 2 % Ethanol und Aqua dest.
Puffer nach Weise	1 x Hämatologie Puffertablette nach Weise pH 6,8 1 l Aqua dest.
SDS-Lösung (2 %)	2 % SDS in H ₂ O
TBE-Puffer (1x)	11 g Tris 6 g Borsäure 1 g EDTA III (EDTA-Na ₂) 1 l VE-Wasser
Terg-a-zyme Reinigungslösung	5 g Terg-a-zyme 500 ml VE-Wasser
Waschpuffer für Adhäsion	DPBS + 0,05 % Tween20

3.1.3 Kit-Systeme

Tabelle 3: Verwendete Kit-Systeme mit Herstellerangaben

Name	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Basel, Schweiz
Lipofectamine® 3000 Transfection Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NucleoSpin®RNA Plus	Macherey-Nagel, Düren

3.1.4 Zellkulturmedien

3.1.4.1 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und Medienzusätze mit Herstellerangaben

Zellkulturmedien / Medienzusätze	Hersteller
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Epidermal growth factor (EGF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Carlsbad, USA
Gibco RPMI Medium 1640	Gibco, Carlsbad, USA
Gibco RPMI Medium 1640 (phenolrotfrei)	Gibco, Carlsbad, USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Opti-MEM	Gibco, Carlsbad, USA
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Gibco, Carlsbad, USA

3.1.4.2 Zellkulturmedien nach Verwendungszweck

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien inklusive der jeweiligen Medienzusätze. Sortierung nach Verwendungszweck bzw. damit kultivierter Zelllinien

Verwendungszweck / Zelllinien	Verwendetes Kulturmedium
Einfriermedium	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % P/S + 10 % DMSO
Kultivierung der Zelllinie: - MCF-10A	RPMI 1640 + 5 % FCS + 1 % P/S + 20 ng/ml EGF + $1,4 \times 10^{-6}$ M Hydrocortison + 100 ng/ml Choleratoxin + 10 µg/ml Insulin
Kultivierung der Zelllinien: - BT-549 - HS-578T	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % P/S

- MCF-7 - MDA-MB-231 - MDA-MB-468	
Medium für Weiterkultur nach Transfektion	Opti-MEM + 10 % FCS oder RPMI 1640 phenolrotfrei + 10 % FCS
Transfektionsmedium	Opti-MEM

3.1.5 Primärantikörper

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper. Angabe von Spezies, Klon, Hersteller und Katalognummer

Antikörper	Spezies	Klon	Katalognummer	Hersteller
Anti-KDM5B	Maus	Clone 15G8.1	#MABE150	Merck, Darmstadt
HP1α Antibody	Kaninchen	polyklonal	#2616	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aluminiumfolie	Paclan, Mönchengladbach
Cell culture dishes CellStar™ (100 x 20 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar Cell Culture Plate (96-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cytoträger beschichtet, ein Kreis	Tharmac® Laboratory Solutions, Wiesbaden
Deckgläser Menzel-Gläser (18 x 18 mm, 24 x 60 mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Desinfektionstücher Schülke Wipes	Schülke & Mayr, Norderstedt
Easy Grip™ Tissue Culture Dish (60 x 15 mm)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA
Einmal Nitril Untersuchungshandschuhe	Shandong Intco Medical Products, Qingzhou, China
Filterkarten, ein Loch	Tharmac® Laboratory Solutions, Wiesbaden
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Kryoröhrchen Cryogenic Tubes Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luna™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Objektträger 8-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Pasteur Pipetten (150 und 230 mm)	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 101-1000 µl)	StarLab, Hamburg
Polycarbonatmembranen 25x80 mm, Porengröße 8 µm	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Probenröhrchen CellStar™ (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sapphire Microplatte 96-Well für Light Cycler	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Viewseal Abdeckfolie, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm², 175 cm²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.7 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
Bechergläser	Carl Roth, Karlsruhe
Boydenkammer 48-Well Micro Chemotaxis Chamber	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
CellClip, Edelstahlclip	Tharmac® Laboratory Solutions, Wiesbaden
CoolCell freezing container holds	Biozym Scientific GmbH
CoolCell® LX	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dako Pen	Dako, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Carl Roth, Karlsruhe
Feuchtkammer	Hauseigene Werkstatt
Glasflaschen	Carl Roth, Karlsruhe
Küchenschaber	Rösle, Marktoberdorf
Messzylinder	Carl Roth, Karlsruhe
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden
Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Racksysteme für Immuncytochemie	Thermo Scientific, Waltham, USA
Scheren	Labotec, Wiesbaden
Schutzbrillen	Uvex, Fürth
Single Cellfunnel®	Tharmac® Laboratory Solutions, Wiesbaden

3.1.8 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Geräte	Hersteller
Absaughandgriff VacuuHandControl VHC ^{pro}	Vacuubrand, Wertheim
Axioskop 40 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bildschirm	LG Group, Seoul, Südkorea
CO ₂ -Inkubator Thermo Scientific™ Heracell™ VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Computer	Dell, Round Rock, USA
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Kronberg im Taunus
Desinfektions- und Reinigungsautomat G7735	Miele, Gütersloh
Digitaler Timer und Stoppuhr	TFA Dostmann, Wertheim
Digitalmikroskop VHX-1000	Keyence, Osaka, Japan
Eismaschine	Ziegra, Hannover
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	Vacuubrand, Wertheim
Gefrierschrank -20 °C	Bauknecht, Stuttgart
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau
Gelelektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen
GloMax Multi Plus Detection System	Promega, Fitchburg, USA
Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inverses Labormikroskop Leica DM IL LED	Leica Microsystems, Wetzlar
Kryo Stickstofftank GT 140	Air Liquide, Düsseldorf
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
LightCycler®480 II	Roche, Basel, Schweiz
LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Magnetrührgerät IKA-Combimag RET	IKA-Werke, Staufen
Mikroskopkamera Leica DFC450 C	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrowellengerät	Moulinex, Alençon, Frankreich
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Plattenzentrifuge PerfectSpinP	PeqLab, Erlangen
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Heraeus, Hanau
Spannungsgerät EPS300	Pharmacia Biotech, Dübendorf
Spektralphotometer NanoDrop One	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler TProfessional	Biometra, Göttingen
Thermo-Shaker PHMP-4	Grant Instruments, Cambridge, England
UV Fotokammer E-Box Vilber	PeqLab, Erlangen
Vertikalautoklav LVSA 40/60	Zirbus Technology, Bad Grund (Harz)
Vortex VF2	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad Type JB1	Grant Instruments, Cambridge, England
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zytozentrifuge Cellspin® II	Tharmac® Laboratory Solutions, Wiesbaden

3.1.9 Software

Tabelle 10: Verwendete Software mit Herstellerangaben

Programm	Hersteller
Chemsketch	ACD Labs, Toronto, Kanada
LightCycler®480 II Software	Roche, Basel, Schweiz
Microsoft Excel 2016	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft, Redmond, USA

3.1.10 Zelllinien

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien und deren Herkunft

Zelllinie	Vertreiber
BT-549	CLS, Eppelheim
HS-578T	DSMZ, Braunschweig
MCF-10A	ATCC, Manassas, USA
MCF-7	ATCC, Manassas, USA
MDA-MB-231	ATCC, Manassas, USA
MDA-MB-468	DSMZ, Braunschweig

3.1.11 Small interfering RNA (siRNA)

Tabelle 12: Verwendete siRNAs mit Angabe von Target, NM-Nummern, Gene Globe ID, Hersteller und Katalognummer

Name	Target (Spezies)	NM-Nummern	Gene Globe ID	Hersteller	Kat. Nr.
Hs_CBX5_5 FlexiTube siRNA	CBX5 (Human)	NM_001127321, NM_001127322, NM_012117	SI03146479	Qiagen, Hilden bei Düsseldorf	10274 15
Hs_CBX5_6 FlexiTube siRNA	CBX5 (Human)	NM_001127321, NM_001127322, NM_012117	SI04310978	Qiagen, Hilden bei Düsseldorf	10274 15
Hs_JARID1B_5 FlexiTube siRNA	KDM5B (Human)	NM_006618	SI03045623	Qiagen, Hilden bei Düsseldorf	10274 15
Hs_JARID1B_6 FlexiTube siRNA	KDM5B (Human)	NM_006618	SI03089009	Qiagen, Hilden bei Düsseldorf	10274 15
Negativ-Kontroll siRNA AllStars®	-	-	-	Qiagen, Hilden bei Düsseldorf	10272 81

3.1.12 Primer

Tabelle 13: Verwendete Primer mit Angabe von Sequenz (5'-3'), Annealing Temperatur (°C) und Produktgröße (bp). Alle Primer wurden von Metabion bezogen.

Name	Sequenz (5'-3')	Annealing Temperatur (°C)	Produktgröße (bp)
ACTB	FW: GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA RV: GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA	60	202
ATP5J	FW: TCA GCC GTC TCA GTC CAT TT RV: ACT AGC ATC AAC AGG TCC TCC	61	150
CBX5	FW: GGA ACA GGG CAG ACG TTA G RV: GGT TTT CTT TCC CAT GTC GC	59	101
HMBS	FW: GGA GAC CAG GAG TCA GAC TG RV: AAG TAG GCT GTG TGT GGG TG	61	121
HPRT	FW: ATT GAC ACT GGC AAA ACA ATG C RV: AAG TAG GCT GTG TGT GGG TG	61	110
KDM5B	FW: CTA CCA AGA TGG GGT TTG CTC RV: GTC TGT GGT CAG GTT TGG CT	60	140
PPIA	FW: CGC CGA GGA AAA CCG TGT A RV: TGC TGT CTT TGG GAC CTT GT	61	127
TBP	FW: GGA TAA GAG AGC CAC GAA CCA C RV: TTA GCT GCT GGA AAA CCC AAC TTC TG	66	139

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Kontinuierliche Zelllinien

Es wurden etablierte kontinuierliche humane Zelllinien eingesetzt. Von den verwendeten Zelllinien gehören die vier Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-468, HS-578T und BT-549 zur Gruppe des triple-negativen Mammakarzinoms. Die beiden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 sind Teil der MD Anderson Serie, welche in

den 1970er Jahren von der Michigan Cancer Foundation aus Pleuraergüssen von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom isoliert und etabliert wurde (278).

MDA-MB-231, isoliert aus dem Punktionsmaterial einer 51-jährigen, kaukasischen Frau (278), gehört zum TNBCB-Subtyp, besitzt eine hohe Ki-67-Aktivität sowie Mutationen im *TP53*-, *BRAF*-, *TERT*- und *KRAS*-Gen (279-282). In der 2D-Kultur ist eine sternförmige Zellmorphologie zu beobachten (283).

Die Zelllinie MDA-MB-468 hingegen wurde aus dem Punktionsmaterial einer 51-jährigen afroamerikanischen Frau isoliert (278). Sie gehört zum BL1-Subtyp, besitzt eine hohe Ki-67-Aktivität und Mutationen im *TP53*-, *SMAD4*- und *BRCA2*-Gen (36, 280-282). Besonderheiten dieser Zelllinie sind die G6PD-Isoform A, trotz Heterozygotie der Spenderin, und eine *EGFR*-Amplifikation (278, 284, 285). Zellmorphologisch ist ein traubenförmiges Zellwachstum zu beobachten (283).

Die Zelllinie HS-578T wurde aus karzinosarkomatösem Brustgewebe einer 74-jährigen kaukasischen Frau etabliert (286). Obwohl sie zur Gruppe der triple-negativen Mammakarzinome gehört und mit einem claudin-low Status im Bereich des TNBCB-Subtyps einzuordnen wäre, zeigt eine Analyse der genetischen Expressionsprofile eine enge Verwandtschaft zur luminalen molekularen Subgruppe (281, 282, 285). Die Ki-67-Aktivität ist hoch und es bestehen *TP53*-, *PIK3CA*-, *MED12*- sowie *CDKN2A*-Mutationen (279, 280, 287). Es zeigt sich eine sternförmige Zellmorphologie (283).

Bei der Zelllinie BT-549 handelt es sich um Zellen, die 1978 aus Lymphknotenmetastasen einer 72-jährigen Frau isoliert wurden und zum TNBCB-Subtyp des triple-negativen Mammakarzinoms gehören (33, 279, 284, 288). Es besteht eine hohe Ki-67-Aktivität und neben einer *TP53*-Mutation liegen weitere Mutationen im *RB1*- sowie im *PTEN*-Gen vor (279, 287). Die Zellmorphologie ist sternförmig (283).

Die Zelllinie MCF-7 ist Östrogenrezeptor-positiv (289). Damit ist sie keine triple-negative Zelllinie, sondern gehört der Subgruppe luminal A an (33). Allerdings konnte die zusätzliche Expression eines Progesteronrezeptors nicht immer zuverlässig bestätigt werden (287). Isoliert wurde die Zelllinie in den 1970er Jahren aus Punktionsmaterial eines malignen Pleuraergusses einer 69-jährigen Frau (290). Das *TP53*-Gen liegt im Wildtyp vor, jedoch sind die Gene *MDM2* und *MDMX*, welche einen negativen regulatorischen Effekt auf *TP53* haben, amplifiziert (291). Die Ki-67-Aktivität

ist niedrig, das *PIK3CA*-Gen mutiert und die Zellmorphologie wird als klumpig beschrieben (279, 283).

Im Gegensatz zu den anderen aufgeführten Zelllinien handelt es sich bei der Zelllinie MCF-10A um eine nicht-tumoröse Zelllinie von Epithelzellen der Brust (292). Sie wurde aus Brustgewebe einer 36-jährigen Frau mit fibrozystischer Mastopathie isoliert (293). Die Zellen besitzen die Morphologie von kubischem Epithel und exprimieren weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren (294). Eine Analyse der genetischen Expressionsprofile beschreibt eine enge Verwandtschaft zum TNBCB-Subtyp (287).

3.2.2 Steriles Arbeiten

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze, wurden Arbeitsschritte, wenn möglich, unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Deren Arbeitsfläche sowie alle Arbeitsmaterialien und Geräte, die nicht steril unter der Werkbank geöffnet werden konnten, wurden mit in 70 % Ethanol getränkten Tüchern desinfiziert. Weiterhin wurden bei allen Arbeiten die Hände vor Arbeitsbeginn gewaschen, desinfiziert und Einmalhandschuhe aus Nitril getragen. Jegliche Absaugvorrichtungen für Flüssigmaterial wurden nach Verwendung ebenfalls mit 70 % Ethanol gespült. Alle nicht sterilen Verbrauchsmaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

3.2.3 Kultivierung humaner Zelllinien

Die verwendeten humanen Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert. Die jeweiligen Zelllinien wurden in Zellkulturmedien unter Verwendung spezifischer Medienzusätze kultiviert (Tabelle 5). Alle Zellkulturmedien sowie Trypsin wurden vor Gebrauch in einem keimarmen Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Der Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte in Abhängigkeit von der Wachstumsrate und Menge der jeweiligen Zellen. In den meisten Fällen war ein Wechsel des Zellkulturmediums nach 2-3 Tagen nötig. Die Menge des verwendeten Zellkulturmediums wurde an das Volumen der jeweils verwendeten Zellkulturflasche angepasst (Tabelle 14). Bei einer Konfluenz der Zellen zwischen 70 und 80 % wurden diese passagiert. Zum Passagieren von Zellen wurde das Zellkulturmedium bei leicht gekipptem Behälter abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gewaschen. Anschließend wurde zum Ablösen der Zellen Trypsin auf dem Zellrasen verteilt und für kurze Zeit bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert. Die verwendeten Trypsin-

Mengen richteten sich nach der Größe der Zellkulturflaschen (Tabelle 14). Danach wurde die Zellkulturflasche zum Lösen der Zellen geschwenkt und leicht beklopft. Unter dem Mikroskop erfolgte eine Sichtkontrolle, ob sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten. Es wurde darauf geachtet, nach Möglichkeit immer alle Zellen abzulösen, um die Zelllinie als Ganzes zu erhalten. Daraufhin wurde die Trypsinwirkung unter Resuspension mit Vollmedium abgestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde dann je nach gewünschtem Verhältnis in der Zellkulturflasche belassen oder in eine neue Zellkulturflasche überführt. Der Überstand wurde verworfen. Abschließend wurde die Zellkulturflasche mit zellspezifischem Vollmedium auf die entsprechenden Volumina aufgefüllt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete Mengen von Kulturmedium und Trypsin für Zellkulturgefäße unterschiedlicher Größe, angegeben in ml.

Zellkulturgefäß	Menge an Kulturmedium [ml]	Menge an Trypsin [ml]
100 mm Zellkulturschale	5	0,5
60 mm Zellkulturschale	4 - 5	0,5
T-25 Zellkulturflasche	5	0,5-0,8
T-75 Zellkulturflasche	12	1
T-175 Zellkulturflasche	18	2

3.2.4 Kryo-Konservierung von Zellen

Zum Erhalt für spätere Verwendung wurden Zellen in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank kryokonserviert. Dafür wurden die betreffenden Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in einer 10 % DMSO-Vollmedium-Lösung resuspendiert. Daraufhin wurden jeweils 1 ml dieser Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt, welche für 24 Stunden in speziellen *Cool/Cell freezing container holds* in einem Gefrierschrank bei -80 °C gelagert wurden. So konnte ein gezieltes Abkühlen mit -1 °C/Minute gewährleistet werden. Danach konnten die Kryoröhrchen unter Beachtung der Sicherheitsvorschriften in einen Stickstofftank überführt und dort gelagert werden.

Um die auf diese Art und Weise konservierten Zellen zu rekultivieren, wurden die Kryoröhrchen, wiederum unter Beachtung der Sicherheitsvorschriften, aus dem Stickstofftank geborgen und in einem 37 °C warmen, keimarmen Wasserbad

aufgetaut. Nach Überführung in eine sterile Werkbank wurde die Zellsuspension, um den zytotoxischen Effekt von DMSO abzuschwächen, zügig mit Vollmedium verdünnt und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes konnten die Zellen in zellspezifischem Vollmedium resuspendiert und weiterkultiviert werden.

3.2.5 Zellkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung von Zellkonzentrationen wurde der *Luna™ Automated Cell Counter* verwendet. Hierzu wurden jeweils 15 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und vom *Luna™ Automated Cell Counter* automatisch und standardisiert ausgezählt.

3.3 Immuncytochemie

3.3.1 Funktionsweise der Immuncytochemie

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten indirekten Form der Immuncytochemie (ICC) erfolgte die Detektion der Antigene, in diesem Fall der Zielproteine CBX5 und KDM5B, durch unkonjugierte Primärantikörper, welche in den Zellen an spezifische Epitope der Zielproteine binden. In einem zweiten Schritt erfolgte die Bindung eines mit einer Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers spezifisch an die bereits gebundenen Primärantikörper. Das Enzym Peroxidase fungierte dann, nach Zugabe eines Elektronen bereitstellenden Chromogens, wie in diesem Fall 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), als Katalysator für eine Oxidationsreaktion, die an den markierten Stellen eine bräunliche Färbung hervorrief.

Um diese immuncytochemischen Färbungen durchführen zu können, galt es zuerst die Zellen auf Objektträger aufzubringen und zu fixieren. Dies geschah mittels Cytospin oder durch Aussähen auf 8-Kammer-Objektträger.

3.3.2 Cytospin

Als Cytospin bezeichnet man eine Zentrifuge, die darauf spezialisiert ist, sich in Suspension befindliche Zellen auf Objektträger zu konzentrieren. Zur Vorbereitung wurden die mit einem hydrophoben Ring versehenen Objektträger mit Bleistift beschriftet und jeweils gemeinsam mit einem gelochten Filterpapier und einem *Cellfunnel* in *CellClip* Metallklammern eingelegt. Als Nächstes wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen abgelöst und in Suspension gebracht. Zum Ablösen der Zellen wurde in diesem Fall jedoch, anstelle von Trypsin, Versene in gleichen Mengen

verwendet, um mögliche Oberflächenproteine zu schonen. Lediglich beim Ablösen von Zellen der Zelllinie MCF-10A wurde weiterhin Trypsin verwendet, da auf Grund der starken Zell-Zell-Kontakte ein zuverlässiges Ablösen mit Versene nicht gelang. Die entstandene Zellsuspension wurde daraufhin für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3-5 ml DPBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration dieser Zellsuspension wurde der *Luna™ Automated Cell Counter* verwendet. Um eine ausreichende Konfluenz der Zellen auf den Objektträgern sicherzustellen und gleichzeitig Zellüberlagerungen zu vermeiden, wurde die Zellzahl pro Objektträger auf ca. 20 000 Zellen festgelegt. Dementsprechend wurde mit den benötigten Volumina aus der zuvor gewonnenen Zellsuspension und DPBS eine weitere Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 20 000 Zellen/ml erstellt. Nun konnten die *Cellfunnel* in den bereits vorbereiteten *CellClips* mit jeweils einem Milliliter der Zellsuspension befüllt und die Cytospin-Zentrifuge mit den *CellClips* beladen werden. Diese wurden dann für 10 Minuten bei 380 g zentrifugiert. Danach konnten die nun mit Zellen bestückten Objektträger aus den *CellClips* entfernt werden. Nach kurzem Trocknen wurden die Zellen auf den Objektträgern für 10 Minuten in Roti®Histofix 4,5 % Formaldehyd fixiert, dreimal in DPBS gewaschen und anschließend für zwei Tage an der Raumluft getrocknet. Danach konnten sie entweder direkt für immuncytochemische Färbungen weiterverwendet werden oder wurden luftdicht verpackt bei -20 °C eingefroren.

3.3.3 Kultivierung auf 8-Kammer-Objektträgern

Eine weitere Methode zur Aufbringung von Zellen auf Objektträgern ist die Kultivierung von Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern. Dazu wurden die Zellen aus ihren Zellkulturgefäßen abgelöst und in Suspension gebracht. Zum Ablösen wurden Trypsin oder Versene verwendet. Diese Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in zelllinienspezifischem Vollmedium resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mit einem *Luna™ Automated Cell Counter* bestimmt. Pro Well der Objektträger wurden ca. 5 000 Zellen ausgesät und jeweils mit 200 µl zelllinienspezifischem Kulturmedium versorgt. Anschließend wurden die so beladenen 8-Kammer-Objektträger für 24 – 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert. Danach konnte das Medium abgenommen und verworfen werden. Die Objektträger wurden nun in DPBS gewaschen und die am Boden der Objektträger angewachsenen Zellen für 10 Minuten in jeweils 200 µl Roti®Histofix 4,5 %

Formaldehyd pro Kammer fixiert. Daraufhin wurden die Objektträger drei weitere Male in DPBS gewaschen und für zwei Tage an der Raumluft getrocknet. Nicht direkt weiterverwendete Objektträger wurden luftdicht verpackt bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Antikörperfärbung

Zur Vorbereitung auf die Antikörperfärbung wurden die bei -20 °C eingefrorenen Objektträger bei Raumtemperatur aufgetaut und nach kurzem Trocknen 10 Minuten in DPBS rehydratisiert. Um durch die Formalinfixierung entstandene Proteinquervernetzungen aufzulösen und die Epitope für die Antikörper zugänglich zu machen, wurde zuerst eine Hitzedemaskierung durchgeführt. Dazu wurden mit auf den Primärantikörper abgestimmten Puffer gefüllte Küvetten in einem bereits vorgeheizten Dampfgerät für einige Minuten aufgewärmt. Für die Färbung von CBX5 wurde dabei die *Puffer Dako Target Retrieval Solution* mit einem pH-Wert von 6 sowie für die Färbung von KDM5B *Puffer Dako Target Retrieval Solution* mit einem pH-Wert von 9 verwendet. Vor Gebrauch wurden die Puffer in einem Verhältnis 1:10 mit VE-Wasser verdünnt. Danach wurden die mit Zellen beladenen Objektträger in die mit nun warmem Puffer gefüllten Küvetten gesteckt und für weitere 20 Minuten im Dampfgerät inkubiert. Anschließend konnten die Objektträger nach 20-minütigem Abkühlen aus der Pufferlösung entnommen und zweimal mit VE-Wasser gespült werden. Bei Objektträgern ohne ringförmige hydrophobe Probenbegrenzung wurden die Zellansammlungen mit Hilfe eines Fettstiftes umrahmt.

Zur Blockierung von möglicherweise vorhandenen endogenen Peroxidasen wurden pro umrahmte Zellansammlung 150 µl einer 3 % H₂O₂-Lösung auf die Objektträger aufgetragen und der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten in einer geschlossenen Feuchtekammer inkubiert. Die verwendete 3 % H₂O₂-Lösung wurde für jeden Versuchsdurchgang frisch aus einer 30 % H₂O₂-Stammlösung mit VE-Wasser in einem Verhältnis von 1:10 angesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die H₂O₂-Lösung auf Papier abgeklopft, die Objektträger wurden zweimal mit VE-Wasser gespült und für ungefähr drei Minuten in DPBS überführt.

Danach wurden, je nach Fläche der Zellansammlung 50 bis 100 µl einer primären Antikörperlösung auf die Zellen gegeben. Unmittelbar vor Verwendung wurden der Antikörper gegen CBX5 im Verhältnis 1:100 und der Antikörper gegen KDM5B im Verhältnis 1:50 mit *Dako Real Antibody Diluent* verdünnt sowie kurz gevortext. Auf die technischen Negativkontrollen wurde nur *Dako Real Antibody Diluent* ohne

Primärantikörper aufgetropft. Es folgte die Inkubation in einer geschlossenen Feuchtekammer. Bei der CBX5-Färbung geschah dies über Nacht bei ca. 4 °C und bei der KDM5B-Färbung für mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Objektträger dreimal für jeweils zwei Minuten mit DPBS gewaschen.

Dann wurden, je nach Größe des zu bedeckenden Areal, 50 bis 100 µl der Sekundärantikörperlösung *Dako Realtime Envision* auf die Objektträger aufgetragen. Nach einer dreißigminütigen Inkubationszeit in der geschlossenen Feuchtekammer bei Raumtemperatur wurden die Objektträger dreimal für jeweils zwei Minuten mit DPBS gewaschen. Die Anfärbung des Sekundärantikörpers erfolgte durch jeweils ca. 100 µl einer frisch angesetzten Diaminobenzidin (DAB)-Lösung. Dafür wurde die DAB-Lösung im Verhältnis 1:50 in DAB-Puffer verdünnt. Sobald eine sichtbare Färbung auftrat, spätestens jedoch nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten, wurden die Objektträger unverzüglich dreimal für jeweils zwei Minuten mit VE-Wasser gewaschen.

Für das Sichtbarmachen der Zellkerne erfolgte eine zehnminütige Hämalaun-Färbung mit anschließender Spülung unter fließendem Leitungswasser für weitere 10 Minuten. Nach einer weiteren kurzen Spülung der Objektträger in VE-Wasser wurden die nun angefärbten Zellen abschließend in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe entwässert und mit Roti®-Histokit sowie Deckgläsern eingedeckt. Die Entwässerung erfolgte durch jeweils einminütiges Baden der Objektträger zweimal in 70 % Ethanol, einmal in 96 % Ethanol, zweimal in 100 % Ethanol und dreimal in Xylol.

3.4 Transfektion und siRNA-Knockdown

Allgemein versteht man unter einer Transfektion das gezielte Einbringen von Fremd-Nukleinsäuren wie zum Beispiel RNA oder DNA in eukaryotische Zellen durch einen nicht-viralen Gentransfer. In dieser Arbeit wurde mit Lipofectamine 3000 ein lipidbasiertes Transfektionsreagenz für die Transfektion von siRNA in Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 verwendet. Dabei interagieren kleine unilamellare Liposomen, die aus einem synthetischen kationischen Lipid bestehen, mit siRNA zu Liposom-siRNA-Komplexen. Diese nach außen hin positiv geladenen Liposom-siRNA-Komplexe fusionieren daraufhin mit der negativ geladenen Zellmembran, was zu einer Aufnahme der siRNA in die Zelle führt (Abbildung 7) (295).

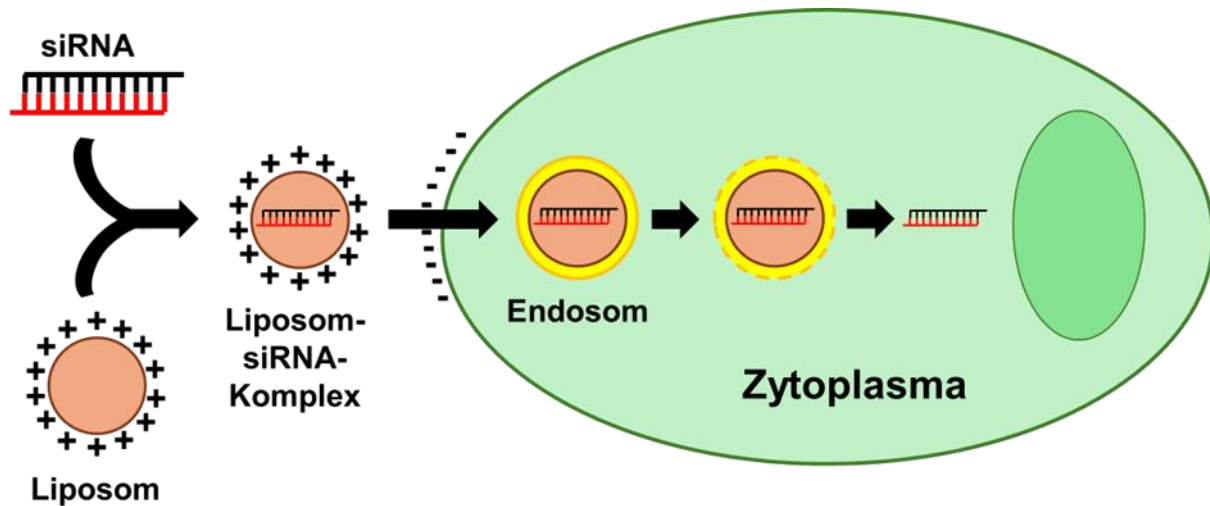


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transfektion von siRNA in eine Zelle mittels Lipofektion. Das aus kationischen Lipiden bestehende Liposom nimmt siRNA auf und bildet einen Liposom-siRNA-Komplex, welcher mit der negativ geladenen Zellmembran interagiert. Über Endozytose gelangt die siRNA in die Zelle und wird anschließend aus dem Endosom ins Zytoplasma freigesetzt. Abbildung angelehnt an (296).

Am ersten Tag der Transfektion wurden Zellen der MDA-MB-468-Zelllinie in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und in zelllinienspezifischem Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % kultiviert, sodass am darauffolgenden Tag die eigentliche Transfektion durchgeführt werden konnte. Hierfür wurde pro 60 mm Zellkulturschale in einem 2 ml Reaktionsgefäß ein Reaktionsansatz I (Tabelle 15) hergestellt, zu dem nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur Reaktionsansatz II (Tabelle 16) hinzugefügt wurde. Für die Transfektion wurde mit Opti-MEM ein sowohl Antibiotika- als auch Phenolrot freies Zellkulturmedium verwendet. Des Weiteren wurden, um die Effizienz des Knockdowns zu verbessern, für jedes Target zwei verschiedene siRNAs (Tabelle 12) miteinander kombiniert. Anschließend wurde das nun vollständige Transfektionsreagenz gevortext, abzentrifugiert und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen in den 60 mm Zellkulturschalen zweimal mit jeweils 3 ml Opti-MEM gewaschen und danach mit dem, die siRNA enthaltenden, Transfektionsreagenz, sowie 715 µl Opti-MEM behandelt und vier Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert. Daraufhin wurden Medium und Transfektionsreagenz abgenommen und die Zellen in jeweils 4 ml Opti-MEM oder

phenolrotfreiem RPMI 1640 mit jeweils 10 % FCS bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % weiterkultiviert.

Tabelle 15: Bestandteile von Reaktionsansatz I der Transfektion und verwendete Menge in µl.

Reaktionsansatz I	Menge [µl]
Opti-MEM	250
CBX5- / KDM5B-siRNA / Kontroll-siRNA	2 x 3,75 7,5
P3000	16

Tabelle 16: Bestandteile von Reaktionsansatz II der Transfektion und verwendete Menge in µl.

Reaktionsansatz II	Menge [µl]
Opti-MEM	200
Lipofectamin 3000	12

Die mittels Transfektion in die Zellen eingebrachte siRNA macht sich zur temporären Stilllegung einzelner Gene, in diesem Fall von *CBX5* bzw. *KDM5B*, den zellulären Mechanismus der RNA-Interferenz zunutze. Dieser beginnt mit der Spaltung von längerer doppelsträngiger RNA durch ein RNase-ähnliches, als Dicer bezeichnetes, Enzym in siRNAs mit einem Zwei-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende. Die entstandene siRNA bindet daraufhin an den RNA-induzierten Silencing-Komplex. In diesem Multiproteinkomplex werden die beiden siRNA-Stränge getrennt, wobei der Strang mit dem stabileren 5'-Ende in den aktivierten RISC integriert wird. Im Anschluss kann die Antisense-siRNA an die spezifische Ziel-mRNA des stillzulegenden Gens binden, wonach durch den gekoppelten RISC eine katalytische Spaltung dieser Ziel-mRNA erfolgt (Abbildung 8). Diese mRNA steht nun nicht mehr für die Translation zur Verfügung, wodurch die Funktion des Gens, in Form von daraus transkribierten und translatierten Proteinen, temporär bis zu einer erneuten Transkription unterdrückt wird (297-300).

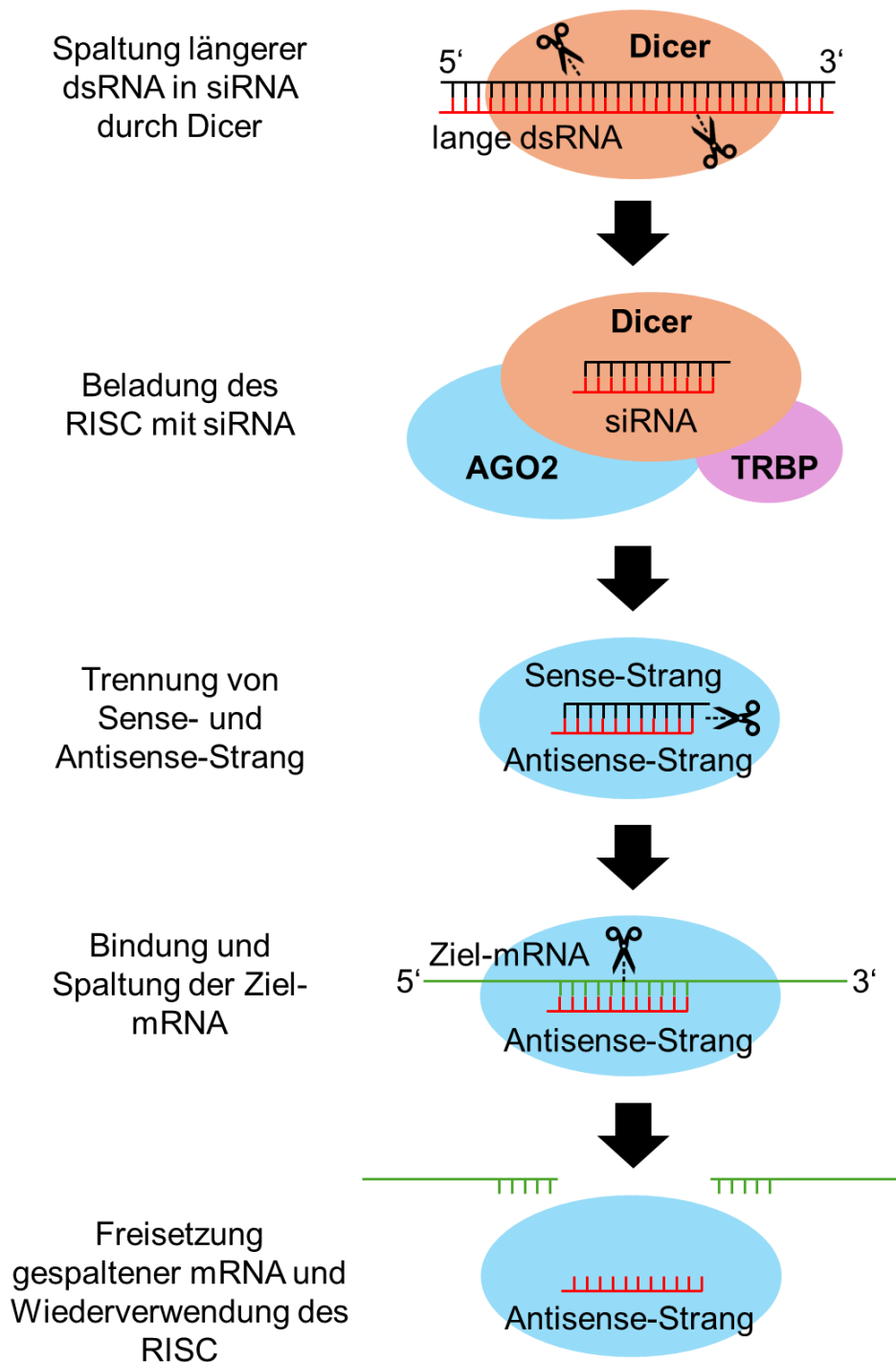


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz.

Nach der Dicer vermittelten Spaltung längerer dsRNA in siRNA wird diese mit Hilfe des Dicers und des RNA-bindenden Proteins TRBP in den RISC geladen. Der RISC wird hier ausschließlich durch sein zentrales Protein Argonaute 2 (AGO2) repräsentiert. Nach Abtrennung des Sense-Strangs kann mit dem Antisense-Strang die Ziel-mRNA spezifisch gebunden und vom RISC gespalten werden. Die gespaltenen mRNA-Fragmente werden daraufhin freigesetzt und der RISC kann weiterverwendet werden. Abbildung angelehnt an (300).

3.5 Arbeit mit Nukleinsäuren

3.5.1 Gewinnung des Zelllysates

Für die Gewinnung der RNA wurden mit siRNA transfizierte Zellen oder nicht transfizierte Kontrollzellen in 60 oder 100 mm Zellkulturschalen kultiviert. Nach Abnehmen des Kulturmediums unter einer sterilen Werkbank wurden die Zellen, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, an einen RNase-freien Arbeitsplatz überführt, der vor und nach jeder Benutzung mit Terralin gereinigt wurde. Dort wurden die Zellen pro Zellkulturschale mit jeweils 350 µl *RNA-Lysis Buffer* behandelt, mit einem sterilen Spatel von den Zellkulturschalen abgeschabt und in ein RNase-freies Reaktionsgefäß gebracht. Das gewonnene Lysat wurde, um den RNA-Verlust möglichst gering zu halten, umgehend bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Die anschließende DNA-Extraktion und RNA-Isolation erfolgten mithilfe des NucleoSpin®RNA Plus Kits. Vor Verwendung des Kits wurde zum Waschpuffer 2 96-100 % Ethanol hinzugegeben.

3.5.2 DNA-Extraktion

Um für die Isolierung der RNA störende DNA zu entfernen, wurde das zuvor gewonnene Zelllysate langsam auf Eis aufgetaut und auf eine *NucleoSpin®gDNA Removing Column* mit Auffanggefäß gegeben. Diese bindet die DNA auf Grund von deren negativer Ladung. Dieser Ansatz wurde dann für 30 s bei 11 000 g zentrifugiert, die Säule mit der gebundenen DNA verworfen und die sich im Auffanggefäß befindliche DNA-befreite Probe unverzüglich weiterverwendet.

3.5.3 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde die DNA-befreite Probe im Auffanggefäß mit 100 µl *Binding Solution* in Suspension gebracht. Diese Suspension wurde daraufhin auf die *NucleoSpin®RNA Plus Column*, welche die RNA aufgrund ihrer Ladung bindet, gegeben und bei 11 000 g für 15 s zentrifugiert. Der Inhalt des Auffanggefäßes wurde verworfen. Anschließend wurden in einem ersten Waschschriff 200 µl des Waschpuffers 1 auf die Säule gegeben, der Ansatz erneut bei 11 000 g für 15 s zentrifugiert und der Inhalt des Auffanggefäßes verworfen. In einem zweiten Waschschriff wurden 600 µl des Waschpuffers 2 auf die Säule pipettiert, der Ansatz ein weiteres Mal bei 11 000 g für 15 s zentrifugiert und der Inhalt des Auffanggefäßes verworfen. Bei einem darauffolgenden dritten Waschschriff wurden nun 250 µl des

Waschpuffers 2 auf die Säule gegeben und der Ansatz dieses Mal, um die Säule zu trocknen, für zwei Minuten bei 11 000 g zentrifugiert, sowie der Inhalt des Auffanggefäßes erneut verworfen. Die getrocknete Säule wurde in ein Nuklease-freies Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem H₂O von der Säule gelöst. Dieser Ansatz wurde nun bei 11 000 g für 1 min zentrifugiert. Wurde eine hohe RNA-Konzentration benötigt, wurde das aufgefangene Lysat erneut auf die Säule gegeben, um möglichst viel RNA von der Säule zu lösen. War ein großes Volumen der Probe gewünscht, wurden erneut 30 µl RNase-freies H₂O auf die Säule aufgetragen. In beiden Fällen wurde der Ansatz ein weiteres Mal für eine Minute bei 11 000 g zentrifugiert. Abschließend wurde für die Bestimmung der RNA-Konzentration ein 2,2 µl-Aliquot entnommen und die gewonnene RNA unverzüglich bei -80 °C gelagert.

3.5.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration sowie der Reinheit der zuvor isolierten RNA erfolgte durch Messung der Lichtabsorption mit Hilfe eines NanoDrop Photometers bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm. Gemessen wurde jeweils eine Menge von einem Mikroliter der unverdünnten RNA bzw. einem Mikroliter einer Kontrolle mit RNase-freiem H₂O. Alle Messungen erfolgten im Duplikat und nach jeder Messung wurde die Linse des NanoDrops mit einem Papiertuch gereinigt.

Die Bestimmung der Reinheit der RNA erfolgte durch die Bildung des Quotienten der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die optische Dichte diente dabei als Messgröße der Intensität der Absorption eines durch die RNA-Proben geleiteten Lichtstrahles. Dabei ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm hauptsächlich auf in Nukleinsäuren enthaltenen, π -elektronenreichen Basen, wie beispielsweise Adenin, zurückzuführen. Währenddessen wird eine Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm primär von in Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin verursacht. Beträgt das Verhältnis der optischen Dichten zwei, so spricht dies für eine hohe Absorption bei 260 nm, eine minimale Absorption bei 280 nm und somit eine relativ reine RNA-Probe. Ist das Verhältnis niedriger als zwei, entspricht das einer erhöhten Absorption bei 280 nm, weshalb eine Kontamination mit beispielsweise Proteinen in Betracht gezogen werden muss.

3.5.5 Synthese von cDNA durch Reverse Transkriptase PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist ein zweistufiger Prozess, bei dem RNA zuerst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und diese anschließend im Rahmen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird. Die synthetisierte und vervielfältigte cDNA steht dann im weiteren Verlauf für eine *Real Time Quantitative PCR* (qPCR) zur Verfügung.

Zu Beginn wurde der Reaktionsansatz I hergestellt, indem die eingesetzte RNA-Menge in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 14 µl aufgefüllt sowie jeweils 1 µl Oligo dt-Primer und 1 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) hinzugegeben wurden (Tabelle 17). Der Vorteil von Oligo dt-Primern besteht dabei darin, dass durch das Ansetzen am Poly-A-Schwanz nur prozessierte mRNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Pro RNA-Probe wurden jeweils, je nach RNA-Konzentration, zwischen 1,35 und 4 µg RNA eingesetzt, wobei für zusammenhängende Proben immer die gleiche RNA-Menge verwendet wurde.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz I durch Vortexen gut vermischt und, um die Sekundärstruktur der RNA zu denaturieren, im Thermocycler über 5 Minuten auf 80 °C erhitzt und dann auf 4 °C abgekühlt.

Tabelle 17: Bestandteile von Reaktionsansatz I der cDNA-Synthese und verwendete Menge in µl.

Reaktionsansatz I	Menge [µl]
RNase freies H ₂ O + RNA	14
Oligo dt-Primer	1 (10 nM)
dNTP	1 (2,5 nM)
Gesamtvolumen	16

Danach wurde zu Reaktionsansatz I der Reaktionsansatz II, bestehend aus 1 µl des RNase-Inhibitors *RiboLock*, 2 µl eines Erststrang-Puffers (RT-Buffer) und 1 µl der Reversen Transkriptase, hinzugefügt (Tabelle 18). Nun erfolgte im Thermocycler bei 42 °C für 60 Minuten die Synthese und Amplifikation der cDNA, welche anschließend

10 Minuten bei 90 °C hitzeinaktiviert und dann auf 4 °C abgekühlt wurde. In jeder Syntheserieihe wurde eine Kontrollprobe ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

Tabelle 18: Bestandteile von Reaktionsansatz II der cDNA-Synthese und verwendete Menge in µl.

Reaktionsansatz II	Menge [µl]
RT Buffer (Erststrang-Puffer)	2 (10x)
Ribo Lock (RNase Inhibitor)	1
Reverse Transkriptase	1 (200 U/ml)
Gesamtvolumen	4

Die Lagerung der fertigen cDNA erfolgte bei -20 °C. Für einen zeitnahen Einsatz in einer qPCR wurden Aliquots in 1:10 Verdünnung hergestellt und bei 4 °C gelagert. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis und alle verwendeten Substanzen wurden vor Gebrauch gevortext sowie abzentrifugiert.

3.5.6 Primer-Synthese

Die für die spezifische Amplifizierung der, nun in cDNA umgeschriebenen, früheren mRNA der beiden Zielgene *CBX5* und *KDM5B* benötigten spezifischen Primer wurden mit Hilfe des *Primer-BLAST-Tools* der *National Library of Medicine* vom *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* designend und anschließend bei Metabion bestellt (301). Die dafür nötigen NCBI-Referenz-Sequenzen (NM-Nummern) der proteinkodierenden Transkripte wurden der Datenbank von Ensembl.org entnommen (302). Beim Design der Primer wurde darauf geachtet, dass die Primer Exon-Grenzen überschreitend, also Intron-überspannend von Exon zu Exon angelegt sind (Abbildung 9). Vor Verwendung der Primer wurden diese zuerst in RNase-freiem H₂O gelöst, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 100 µM entstand. Die dafür jeweils benötigten Mengen von RNase-freiem H₂O wurden dem mitgelieferten Datenblatt entnommen. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot der Primer mit RNase-freiem H₂O in 1:10 Verdünnung erstellt. Die Lagerung der Primer-Stocks erfolgte bei -20 °C und die der Primer-Aliquots bei 4 °C.

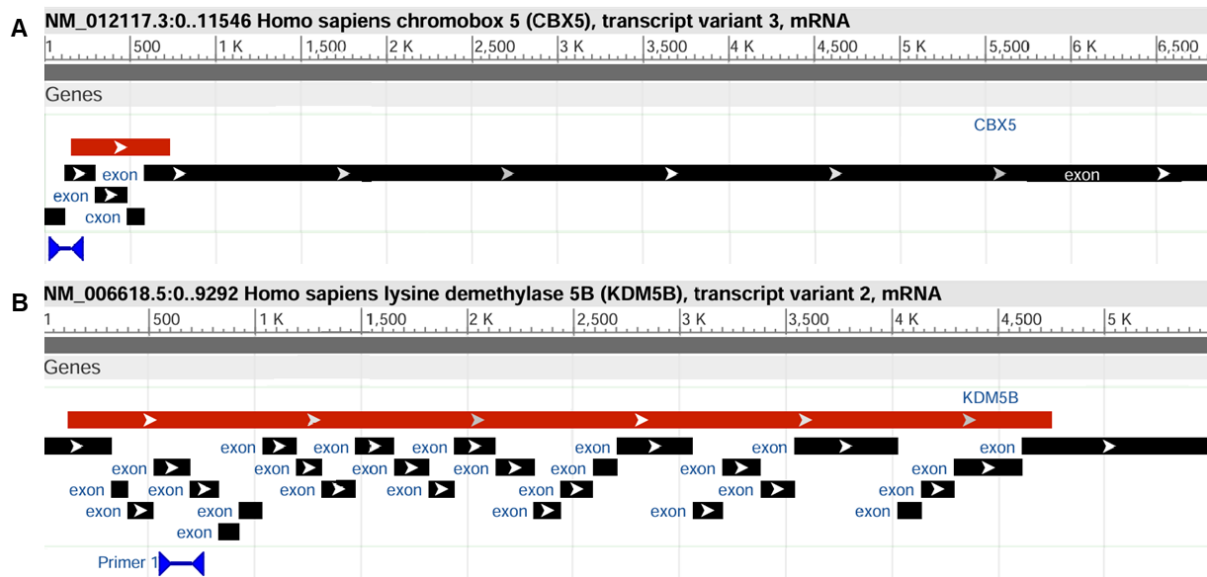


Abbildung 9: Abbildung eines vergrößerten Ausschnittes der mRNA von CBX5 und KDM5B und der Ansatzpunkte der designten Primer. Entnommen von (301). A) Skizzierung der mRNA einer Transkriptvariante von CBX5 mit zugehörigem Primer. B) Skizzierung der mRNA einer Transkriptvariante von KDM5B mit zugehörigem Primer. Die schwarzen Balken stellen die verschiedenen Exons, die blauen Balken die entsprechenden Primer und die roten Balken die jeweiligen proteinkodierenden Abschnitte dar.

3.5.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR handelt es sich um eine DNA-Amplifikationsmethode mit gleichzeitiger Quantifizierung der generierten DNA-Mengen. Dies gelingt durch Messung eines in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes nach jedem Zyklus der PCR. Bei gleichen eingesetzten cDNA-Mengen kann so, durch die spezifische Amplifikation eines Transkriptes, auf die unterschiedlichen Mengenverhältnisse des Transkriptes in den eingesetzten Proben geschlossen werden. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

Zu Beginn wurde, für das spätere Erstellen einer Standardkurve, eine cDNA-Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 angesetzt. Dafür wurden insgesamt 20 µl verschiedener, mindestens zweier, cDNAs eingesetzt und mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Verwendung fanden dabei cDNAs aus den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-468, IGROV und OVISE. Die angesetzten Verdünnungen wurden vor Verwendung sorgfältig gemischt.

Dann wurde der qPCR-Mastermix (Tabelle 19) hergestellt und mittels Vortexen und Abzentrifugieren sorgfältig vermischt. Pro Reaktionsansatz bestand dieser aus jeweils

5 µl Kapa SYBER® Fast, 3,2 µl RNase-freiem Wasser, 0,4 µl eines 10 µM *Forward*-Primers und 0,4 µl eines 10 µM *Reverse*-Primers. Da Kapa SYBER® Fast sehr licht- und temperaturempfindlich ist, wurde es erst bei Verwendung aus der Lagerumgebung entnommen.

Tabelle 19: Bestandteile des qPCR-Mastermixes und pro Ansatz verwendete Menge in µl.

qPCR-Mastermix	Menge [µl]
Kapa SYBER® Fast	5
RNase freies Wasser	3,2
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	0,4
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	0,4
Gesamtvolumen	9

Anschließend wurden pro Ansatz 9 µl des qPCR-Mastermixes auf eine 96-Well Sapphire Microplatte übertragen. Dafür wurden zuerst eine „reine“ Leerkontrolle, dann die Ansätze für die Verdünnungsreihe bzw. bei bereits etablierter Verdünnungsreihe ein entsprechender Anker, danach die Ansätze für die zu untersuchenden cDNA-Proben, inklusive RT- Probe, und zuletzt eine „unreine“ Leerkontrolle vorgelegt. Durch den Vergleich der „reinen“ und „unreinen“ Leerkontrolle konnten mögliche während des Pipettierens aufgetretene Kontaminationen ausgeschlossen werden. Dabei wurden, um später Mittelwerte bestimmen zu können, für jeden Bestandteil der Verdünnungsreihe und jede cDNA-Probe Duplikate angelegt.

Nun wurde jedem Ansatz 1 µl der entsprechenden cDNA, entweder aus der Verdünnungsreihe oder aus einer der cDNA-Proben, hinzugefügt. Die beiden Leerkontrollen blieben stets ohne cDNA. Die 96-Well Sapphire Microplatte wurde daraufhin mit einer transparenten Abdeckfolie luftdicht verschlossen, kurz abzentrifugiert und in den LightCycler®480 II eingelegt.

Im LightCycler®480 II erfolgte dann zuerst bei 95 °C eine zweiminütige Enzymaktivierung. Anschließend folgten insgesamt 45 PCR-Zyklen, jeweils bestehend aus einer fünfsekündigen Denaturierungsphase bei 95 °C, einer Primerannealingphase für 15 Sekunden bei primerabhängiger Temperatur (Tabelle 13) sowie einer Elongationsphase für weitere 15 Sekunden bei 70 °C. Nach jedem PCR-Zyklus erfolgte eine Detektion des Fluoreszenzsignals.

Der PCR-Zyklus, bei dem zum ersten Mal ein Fluoreszenzsignal gemessen wird, welches sich signifikant vom Hintergrund-Fluoreszenzniveau abhebt, wird *Crossing Point* (Cp) genannt. Dieser markiert den Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase, in der eine Bestimmung der eingesetzten cDNA-Mengen möglich ist.

Aus den Cp-Werten der gemessenen Proben-Duplikate wurde das arithmetische Mittel bestimmt und dieses in Bezug auf eine Standardreihe, welche aus den arithmetischen Mittelwerten der Cp-Werte der Duplikate der Verdünnungsreihe erstellt wurde, gesetzt. Dadurch gelang eine relative Quantifizierung der amplifizierten cDNA-Konzentration. Überstieg die Standardabweichung der Cp-Werte 0,25, wurde die Probe erneut analysiert.

Nach der Amplifikation erfolgte, um unerwünschte Nebenprodukte auszuschließen, eine Analyse der Schmelzpunkte und Schmelzkurven der entstandenen Produkte durch kontinuierliche Messung des Fluoreszenzsignals während eines langsamen Temperaturanstiegs von 65 °C bis 97 °C.

Bei der Auswertung wurde die relative Genexpression auf die Expression der zuvor in Vorversuchen ausgewählten Referenzgene *Beta-Actin* (*ACTB*), *Hydroxymethylbilane-Synthase* (*HMBS*) und *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* (*HPRT*) normiert. Der Einsatz von Referenzgenen als interne Kontrolle führt zu einer Verminderung der Varianz zwischen den einzelnen Proben, und Veränderungen in der Expression einzelner Gene können im Hinblick auf die allgemeine transkriptionelle Aktivität der Zellen besser beurteilt werden. Dafür wurde ein Quotient aus dem Mittelwert der relativen Genexpression der Zielproben und dem geometrischen Mittelwert der Mittelwerte der relativen Expression der Referenzgene gebildet.

Für die Fehleranalyse mittels Berechnung der Fehlerfortpflanzung wurde der Quotient aus der Standardabweichung der Konzentration der relativen Genexpression von mit *CBX5*- oder *KDM5B*-siRNA transfizierten Proben und dem geometrischen Mittel der Konzentration der ausgewählten Referenzgene dieser Proben durch den Quotienten aus der Konzentration der relativen Genexpression und dem geometrischen Mittel der Konzentration der ausgewählten Referenzgene von mit Kontroll-siRNA transfizierten Proben dividiert.

3.5.8 Agarose Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der qPCR-Produkte wurde neben der Analyse der Schmelzkurven auch eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden die in der qPCR entstandenen DNA-Moleküle in einem 2 % Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt und die einzelnen Banden mit Hilfe von Ethidiumbromid unter Anregung von UV-Licht sichtbar gemacht. Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA. Dabei verändert sich sein Absorptionsspektrum, und es kommt zu einer starken Zunahme der Intensität der Fluoreszenz-Emission bei der Anregung mit ultraviolettem Licht. Die Herstellung des 2 % Agarosegels erfolgte durch das Lösen von 1 g Agarose in 50 ml 1 x TBE-Puffer. Ein vollständiges Lösen der Agarose wurde durch mehrmaliges Erhitzen herbeigeführt. Nach kurzer Abkühlung der Gellösung wurden 5 µl Ethidiumbromid zugegeben und die Gellösung in eine Gelschiene gegossen sowie ein Kamm zur Bildung der Taschen eingesteckt. Nach ca. 20 Minuten wurde der Kamm aus dem nun verfestigten Gel entfernt und das Gel in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Laufkammer des Elektrophoresegerätes gelegt. In die vorbereiteten Geltaschen wurden nun jeweils ein Ansatz, bestehend aus 5 µl der zuvor in der qPCR amplifizierten cDNA-Proben und 4 µl des Ladepuffers, pipettiert. In die erste und letzte Tasche der Kammerreihe wurden dabei jeweils 6 µl eines mit Bromphenolblau versetzten 100 bp-Markers aufgetragen, welcher als Referenz diente. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei ca. 125 V in ca. 45 Minuten in Richtung der Anode. Spätestens jedoch, wenn der Marker die Lauffront erreichte, wurde der Stromfluss beendet. Abschließend wurden die DNA-Banden in einer UV-Fotokammer dargestellt und für eine weitere Auswertung dokumentiert.

3.6 Zellfunktions-Assays

3.6.1 Migrationsversuch in der Boydenkammer

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens der Zellen kam eine Boydenkammer (Abbildung 10) zum Einsatz. Dieses Konzept beruht auf dem Nachweis einer aktiven Migration von Zellen aus einer oberen Kammer durch Membranporen mit einer Größe von acht Mikrometern. In eine untere Kammer wurden je nach Versuchsaufbau als Lockstoffe 20 µg/ml Kollagen I, Kollagen IV oder Fibronectin gefüllt. Nach 16 Stunden erfolgten die Fixierung, Färbung und Zählung der migrierten Zellen auf der Unterseite der porösen Membran.

Am Tag vor Versuchsbeginn wurde die Zellkultur auf serumfreies Medium umgestellt. Dabei wurde serumfreies, bzw. für Migration nach vorangegangener Transfektion, serum- und phenolrotfreies RPMI 1640 ohne weitere Zusätze verwendet.

Am Versuchstag wurde zuerst der untere Teil der Migrationskammer pro Well mit jeweils 29 µl in serumfreiem Medium gelöstem Lockstoff mit einer Konzentration von 20 µg/ml befüllt. Als Negativkontrolle wurde eine Reihe nur mit serumfreiem Medium gefüllt. Dann wurde eine mit acht Mikrometern großen Poren durchsetzte Membran, welche zuvor für zwei bis drei Minuten in DPBS eingelegt worden war, mit der glänzenden Seite nach unten auf den unteren Teil der Migrationskammer gelegt. Darauf wiederum wurden ein Dichtungsring und der obere Teil der Migrationskammer aufgelegt und mit Schrauben fixiert. Nun wurde der obere Teil der Migrationskammer pro Well mit 15 000, in 50 µl serumfreiem Medium suspendierten, Zellen befüllt, was einer Zellkonzentration von 3×10^5 /ml entspricht. Dabei galt besondere Sorgfalt, um eine luftblasenfreie Füllung des oberen Kammerteils zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen in der vollständig bestückten und zusammengesetzten Migrationskammer für 16 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der obere Teil der Migrationskammer geleert, die Schrauben wurden gelöst sowie der obere Kammerteil und der Dichtungsring entfernt. Die freigelegte Membran wurde an beiden Enden mit Klammern fixiert und immer nur auf der rauen Seite abgelegt, sodass die migrierten Zellen auf der glänzenden Seite stets nach oben zeigten. Nun wurde die raue Seite der Membran vorsichtig durch den Puffer nach Weise gezogen, und nicht migrierte Zellen wurden zweimal an einem Küchenschaber abgeschabt. Nachdem die Membran getrocknet war, wurde die glänzende Membranseite für eine Minute in kaltem Ethanol fixiert und die Membran erneut getrocknet. Anschließend erfolgte eine Färbung der migrierten Zellen mittels der *Rapid Staining* Färbekits *Hemacolor*® 2 und 3. Dafür wurde die glänzende Membranseite zuerst dreimal durch die rot-orangene und danach sechs Mal durch die blaue Färbelösung gezogen. Überschüssige Farbe wurde durch das Ziehen der Membran durch den Puffer nach Weise abgewaschen und die Membran getrocknet. Dann wurde die getrocknete Membran mit der glänzenden Seite nach unten auf einen entsprechend beschrifteten Objektträger gelegt, Immersionsöl darauf verteilt, ein Deckglas aufgesetzt, und eventuell entstandene Luftblasen wurden

ausgestrichen. Abschließend wurden die Ränder des Deckglases mit Nagellack fixiert, und der Objektträger wurde zum Trocknen an der Raumluft belassen.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch. Bei 400-facher Vergrößerung wurden die angefärbten, migrierten Zellen mit Hilfe eines Rasterokulars (10 x 10 mm) ausgezählt. Dabei wurden pro Well 10 Raster ausgezählt, welche summiert eine Fläche von insgesamt 2,5 mm² abdeckten. Gezählt wurden nur angefärbte, migrierte Zellen, die vollständig im Raster lagen oder den unteren bzw. rechten Rand des Rasters berührten. Aus den pro Quadratmillimeter gezählten Zellen der vierfach-Ansätze wurde abschließend der arithmetische Mittelwert bestimmt.

Nach Abschluss des Versuches wurden die verwendeten Kammerbestandteile mit VE-Wasser gespült und über Nacht in einer Reinigungslösung mit Terg-a-zyne belassen.

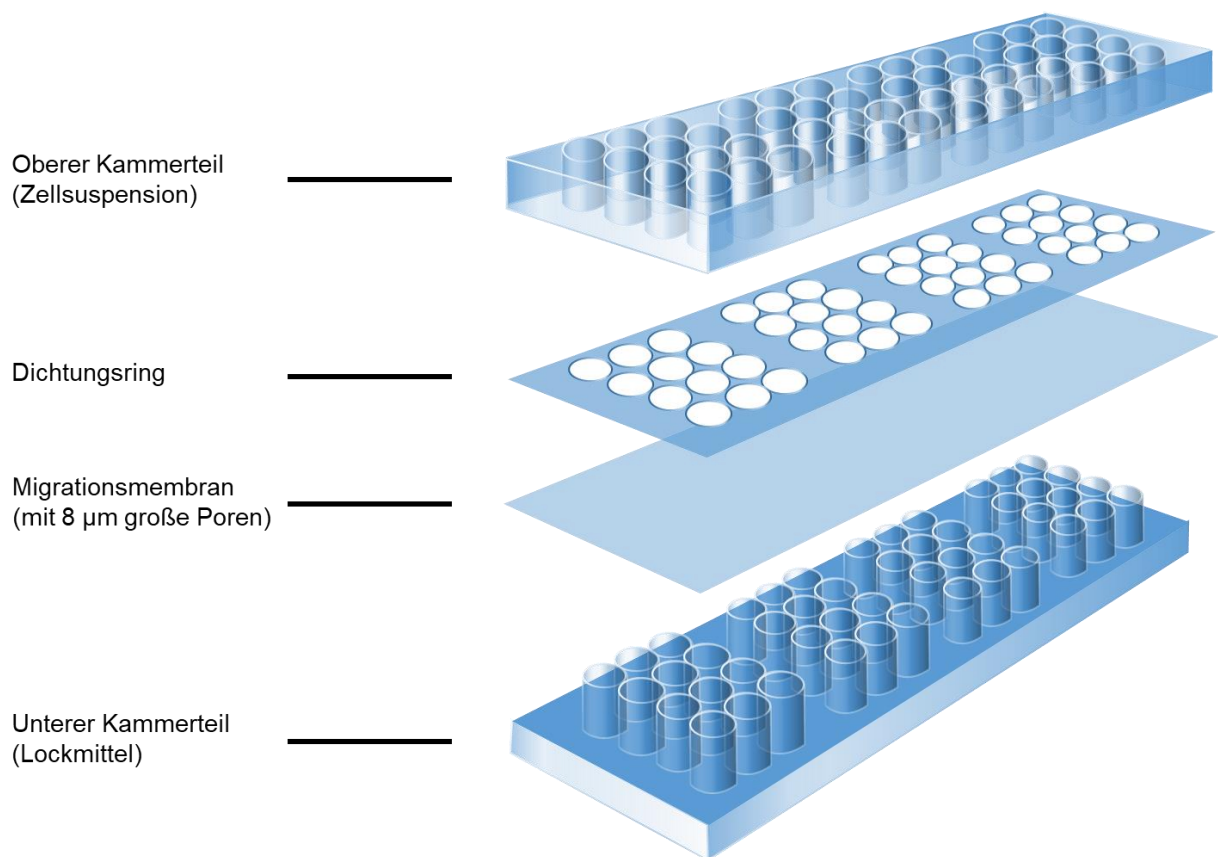


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Boydenkammer. Diese besteht aus einem oberen Kammerteil, einem Dichtungsring, einer Migrationsmembran mit einem Porendurchmesser von 8 µm, sowie einem unteren Kammerteil.

3.6.2 Zelladhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix

Eine quantitative Einschätzung über die Stärke der Bindung von Zellen an Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM) erfolgt über die Bestimmung der

Absorption eines aus adhärenierten Zellen herausgelösten Farbstoffes in einem ELISA-Reader.

Am Tag vor Start des Versuchs wurde eine 96-Well-Zellkulturplatte pro Well mit 100 µl der gewünschten EZM-Komponente in einer Konzentration von 20 µg/ml in DPBS beschichtet. Als Negativkontrolle wurde BSA, ebenfalls in einer Konzentration von 20 µg/ml, mitgeführt. Die so beschichtete 96-Well-Platte wurde über Nacht auf einem Inkubationsschüttler bei Raumtemperatur unter Alufolie bei ca. 300 rpm inkubiert.

Am Versuchstag wurde die vorbereitete 96-Well-Platte zuerst zweimal mit 100 µl Waschpuffer pro Well gewaschen, und unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 µl Blockpuffer pro Well für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % blockiert. Währenddessen wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in serumfreien Medium resuspendiert. Als Hungermedium wurde je nach Versuch RPMI 1640 oder Opti-MEM ohne weitere Zusätze verwendet. Pro Well wurden 20 000 Zellen in 50 µl serumfreien Medium, welches einer Zellkonzentration von 4×10^5 /ml entspricht, auf eine 96-Well-Platte ausgesät und für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert. In dieser Stunde hatten die ausgesäten Zellen die Möglichkeit, in den mit EZM-Komponenten oder BSA beschichteten Wells zu adhären. Danach wurden die nicht-adhärenenten Zellen zweimal mit jeweils 100 µl Waschpuffer pro Well abgewaschen und die verbliebenen, adhärenierten Zellen mit je 100 µl 4,5 % Roti®-Histofix pro Well für 15 Minuten fixiert (Tabelle 20). Anschließend wurden die Wells mit 100 µl/Well Waschpuffer ausgewaschen und die nun fixierten Zellen mit 100 µl Kristallviolettlösung pro Well für 10 Minuten gefärbt. Um Farbkumpen zu vermeiden, wurde die Kristallviolettlösung unmittelbar vor Gebrauch gefiltert. Nach abgeschlossener Färbung wurde die Kristallviolettlösung dreimal mit 100 µl Waschpuffer pro Well ausgewaschen. Nachdem die 96-Well-Platte daraufhin getrocknet war, wurden die gefärbten Zellen für 30 Minuten mit 100 µl 2 % SDS-Lösung pro Well bei Raumtemperatur inkubiert, um den Farbstoff herauszulösen. Zuletzt wurde die Absorption des herausgelösten Farbstoffes, als quantitatives Maß für die Adhäsion der Zellen, im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Die Messung des Hintergrundes erfolgte bei einer Referenzwellenlänge von 750 nm. Zur Minimierung von Fehlern wurde die Absorption des Hintergrundes von der

gemessenen Absorption subtrahiert und aus vierfachen Ansätzen der arithmetische Mittelwert bestimmt.

Tabelle 20: Zusammensetzung der im Adhäsions-Assay verwendeten Puffer.

Puffer	Inhalt
Waschpuffer	DPBS + 0,05 % Tween20
Blockpuffer	DPBS + 0,5 % BSA

3.6.3 Zellproliferationsassay (ELISA BrdU-Kit)

Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte mit Hilfe eines BrdU-Proliferationsassays (Tabelle 21). Dieser nutzt die DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus proliferierender Zellen und bietet diesen 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) an, welches an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Durch anschließende Fixierung und Denaturierung liegt die DNA einzelsträngig vor, wodurch das eingebaute BrdU für einen Anti-BrdU-Antikörper zugänglich wird. Dieser Antikörper ist mit einer Peroxidase konjugiert, welche im Anschluss die enzymatische Umwandlung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu ox-TMB katalysiert. Das entstandene Produkt kann nun durch Messung der Absorption quantifiziert werden. Bei Bedarf kann die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt werden (Abbildung 11).

Abhängig vom Versuchsaufbau wurden 24 oder 48 Stunden vor Versuchsbeginn pro Well 2 000 – 5 000 Zellen in 100 µl Vollmedium auf eine 96-Well-Platte ausgesät und dort für mindestens 24 Stunden anwachsen gelassen. Erfolgte nach 24 Stunden kein Versuch, wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Alle Komponenten des Kits wurden über einen kurzen Zeitraum bei 2 bis 8 °C bzw. *BrdU-Labeling Solution* und *Substrate Solution* zusätzlich lichtgeschützt gelagert.

Am Versuchstag wurden zuerst pro Well 10 µl der zuvor 1:100 in DPBS verdünnten *BrdU-Labeling Solution* in die 100 µl Medium gegeben, dort mit dem Medium vermischt und für zwei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert. In diesen zwei Stunden erfolgte die Inkorporation von BrdU anstelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Zellen in 200 µl *Fix-Denat* pro Well für 30 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Dies führte zu einer Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA. Danach wurde die Fixierlösung abgegossen, pro Well 100 µl der *Anti-BrdU-peroxidase antibody Working Solution* hinzugegeben und der Ansatz über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die *Anti-BrdU-peroxidase antibody Working Solution* wurde jeweils erst kurz vor Gebrauch hergestellt, indem die *Anti-BrdU-peroxidase antibody* Stammlösung 1:100 mit der *Antibody Dilution Solution* verdünnt wurde. Die *Anti-BrdU-peroxidase antibody* Stammlösung wiederum entstand durch Lösen des *Anti-BrdU-peroxidase antibody* in 1,1 ml destilliertem H₂O. In dieser Stunde wurden die Anti-BrdU-Peroxidase-Antikörper an das freiliegende, in die DNA eingebaute BrdU gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells dreimal mit jeweils 200 µl *Washing Solution*, einer 1:10 Verdünnung des *Washing Buffers* in sterilem H₂O, gewaschen. Daraufhin wurden pro Well 100 µl *Substrate Solution* zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Zeitraum wurde das in der *Substrate Solution* enthaltene TMB mit Hilfe der Peroxidase der Anti-BrdU-Antikörper oxidiert. Die oxidierte Form des TMB führt zu einer blauen Färbung der Lösung. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 25 µl ein Molarer Schwefelsäure pro Well abgestoppt und die Platte zur vollständigen Homogenisierung für 1 Minute bei 300 rpm geschüttelt, wodurch sich die Lösung gelb färbt. Dann erfolgte die Messung der Absorption in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Messung des Hintergrundes erfolgte bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Der Hintergrund wurde daraufhin von der gemessenen Absorption abgezogen und aus Mehrfachansätzen der arithmetische Mittelwert bestimmt.

Tabelle 21: Inhalt des Zellproliferation-ELISA-BrdU-Kits.

Inhalt des Zellproliferation-ELISA-BrdU-Kits
Antibody Dilution Solution
Anti-BrdU-peroxidase antibody
BrdU Labeling Reagent
FixDenat
Substrate Solution TMB
Washing Buffer PBS 10x concentrated

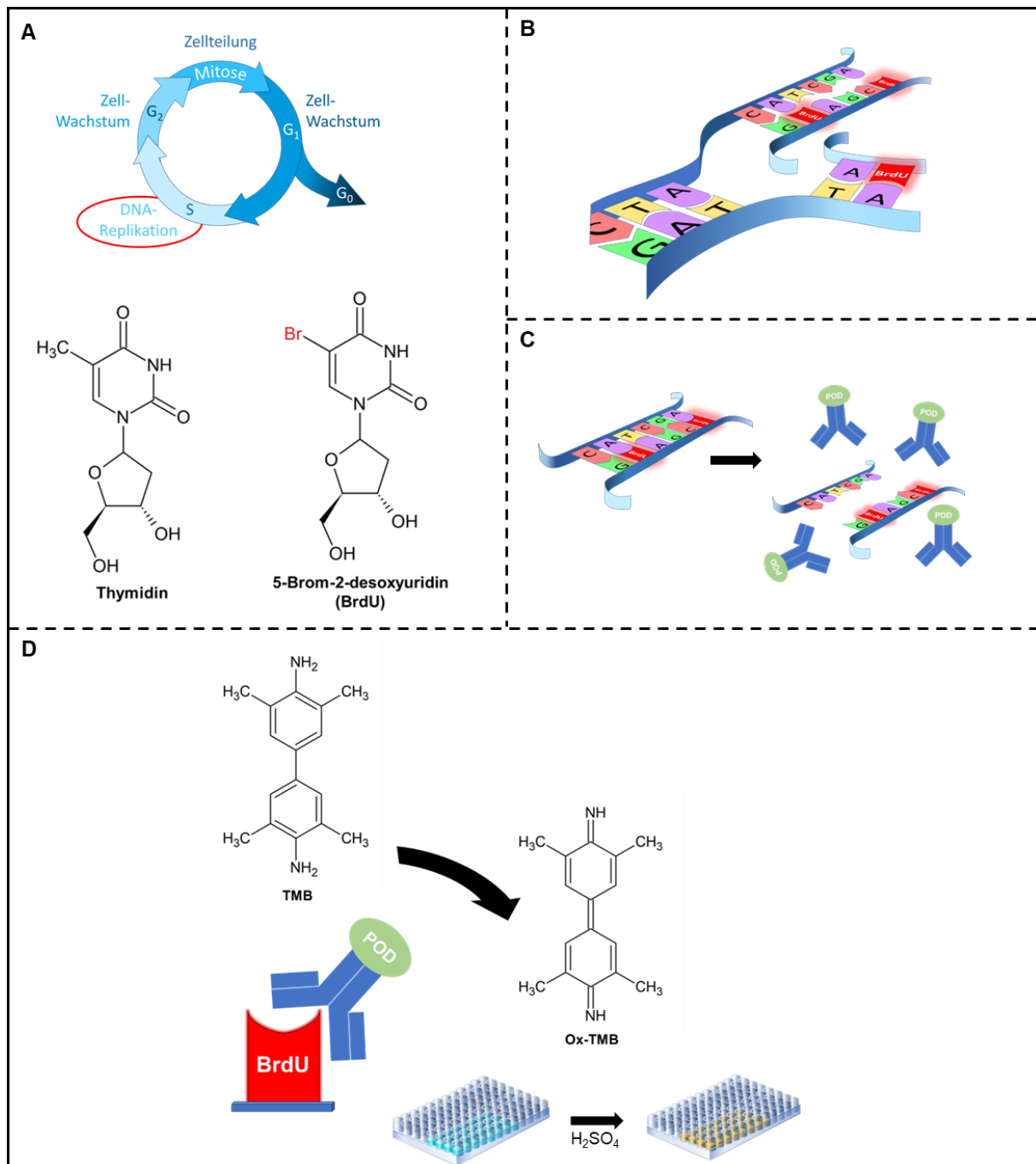


Abbildung 11: Skizzierte Darstellung der Funktionsweise des ELISA-BrdU-Assays zur Analyse der Zellproliferation. A und B) Einbau von BrdU an Stelle von Thymidin in die DNA in der S-Phase des Zellzyklus. C) Denaturierung der DNA, welche im einzelsträngigen Zustand zugänglich wird für Anti-BrdU-Antikörper mit konjugierten Peroxidasen. D) Anti-BrdU-Antikörper binden an BrdU und die konjugierten Peroxidasen katalysieren die Umwandlung von TMB zu Ox-TMB. Bei Bedarf kann diese Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt werden, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führt.

3.6.4 Alamar Blue Viabilitäts-Assay

Die Zellviabilität wurde in einem *Alamar Blue*-Assay bestimmt. Bei *Alamar Blue* handelt es sich um den blauen, wasserlöslichen Redox-Farbstoff Resazurin. Dieser wird von metabolisch aktiven Zellen zum pink-violetten, fluoreszierenden Resorufin reduziert (Abbildung 12). Durch Detektion des Fluoreszenzsignales nach einem festgelegten Intervall, welches sich proportional zu der Anzahl metabolisch aktiver Zellen verhält, lässt sich schlussendlich eine quantitative Aussage über die Zellviabilität treffen.

Die Aussaat der Zellen erfolgte, abhängig vom Versuchsaufbau, 24 oder 48 Stunden vor Versuchsbeginn. Dabei wurden 2 500 – 3 500 Zellen pro Well in 100 µl Vollmedium auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Dort ließ man sie für mindestens 24 Stunden anwachsen, bevor der Versuch durchgeführt wurde. Erfolgte nach 24 Stunden kein Versuch, wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Die Lagerung der *Alamar Blue* Stammlösung erfolgte lichtgeschützt bei 2 bis 8 °C.

Am Versuchstag wurde das Zellkulturmedium durch jeweils 100 µl einer 10 %igen *Alamar-Blue*-Vollmedium-Lösung ersetzt, welche stets frisch angesetzt wurde. Daraufhin wurde die 96-Well-Platte mit Alufolie umwickelt, und die Zellen wurden für 7 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 90 % inkubiert. Anschließend erfolgten die Detektion des Fluoreszenzsignales bei 590 nm und die Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes aus Mehrfachansätzen.

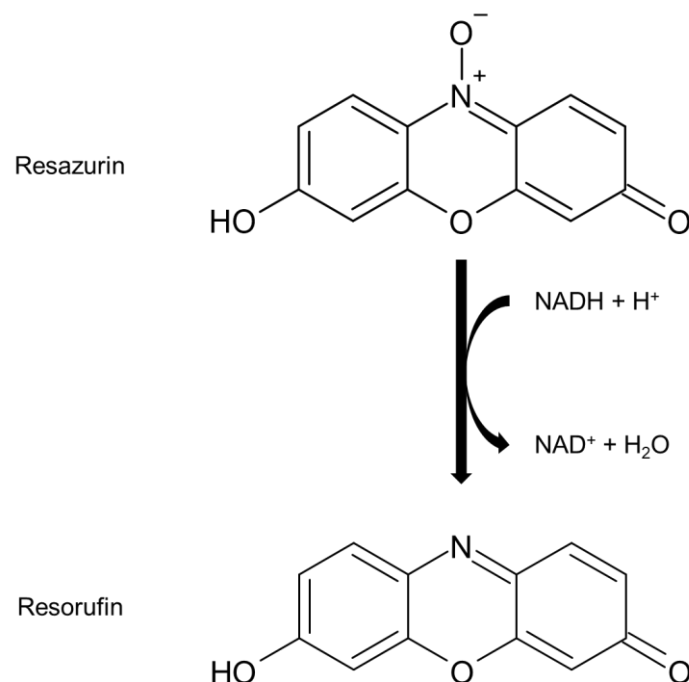


Abbildung 12: Reduktion von Resazurin zu Resorufin.

3.7 Integration von siRNA-Knockdown und Zellfunktionsversuchen

Die Analyse der Funktionalität von CBX5 und KDM5B in Zellen des triple-negativen Mammakarzinoms erfolgte in einem mehrstufigen Versuch (Abbildung 13). Dafür wurden zu Beginn Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Um die Funktion von CBX5 und KDM5B in den Zellen nachvollziehen zu können, wurde geplant am zweiten Versuchstag durch siRNA-Transfektion mit *CBX5*- bzw. *KDM5B*-siRNA, die Expression von CBX5 bzw. KDM5B in den Zellen temporär zu reduzieren. Zum Vergleich für die darauffolgenden Versuche dienten zeitgleich mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen, welche eine unveränderte Expression von CBX5 und KDM5B aufweisen sollten. Am vierten Versuchstag, also 48 Stunden nach Transfektion, variierte dann je nach durchzuführendem Zellfunktionsversuch der Versuchsaufbau.

Für die Versuche zur Untersuchung der Zellviabilität und Zellproliferation erfolgte an diesem Tag die Aussaat der transfizierten Zellen auf 96-Well-Platten. 72 und 96 Stunden nach Transfektion schloss sich die Durchführung von BrdU- und Alamar-Blue-Assays an.

Um den Einfluss der Proteine auf die Zelladhäsion zu prüfen, wurden mit den transfizierten Zellen 48 und 72 Stunden nach Transfektion Adhäsions-Assays durchgeführt.

Für die Analyse der Zellmigration wurde 48 Stunden nach Transfektion das Zellkulturmedium der transfizierten Zellen auf serumfreies Medium gewechselt. 72 Stunden nach Transfektion begann dann ein Migrations-Assay, der nach 16 Stunden beendet wurde.

Es wurden darüber hinaus bei allen durchgeführten Versuchen zeitgleich transfizierte Zellen weiter in Kultur gehalten und zu allen Versuchszeitpunkten daraus RNA-Proben entnommen, welche im Anschluss stichprobenartig mittels qPCR auf die Effizienz des siRNA-Knockdowns untersucht wurden. So konnte auch für Versuche, die 96 Stunden nach Transfektion stattfanden, festgestellt werden, ob eine ausreichende Knockdowneffektivität vorhanden war.

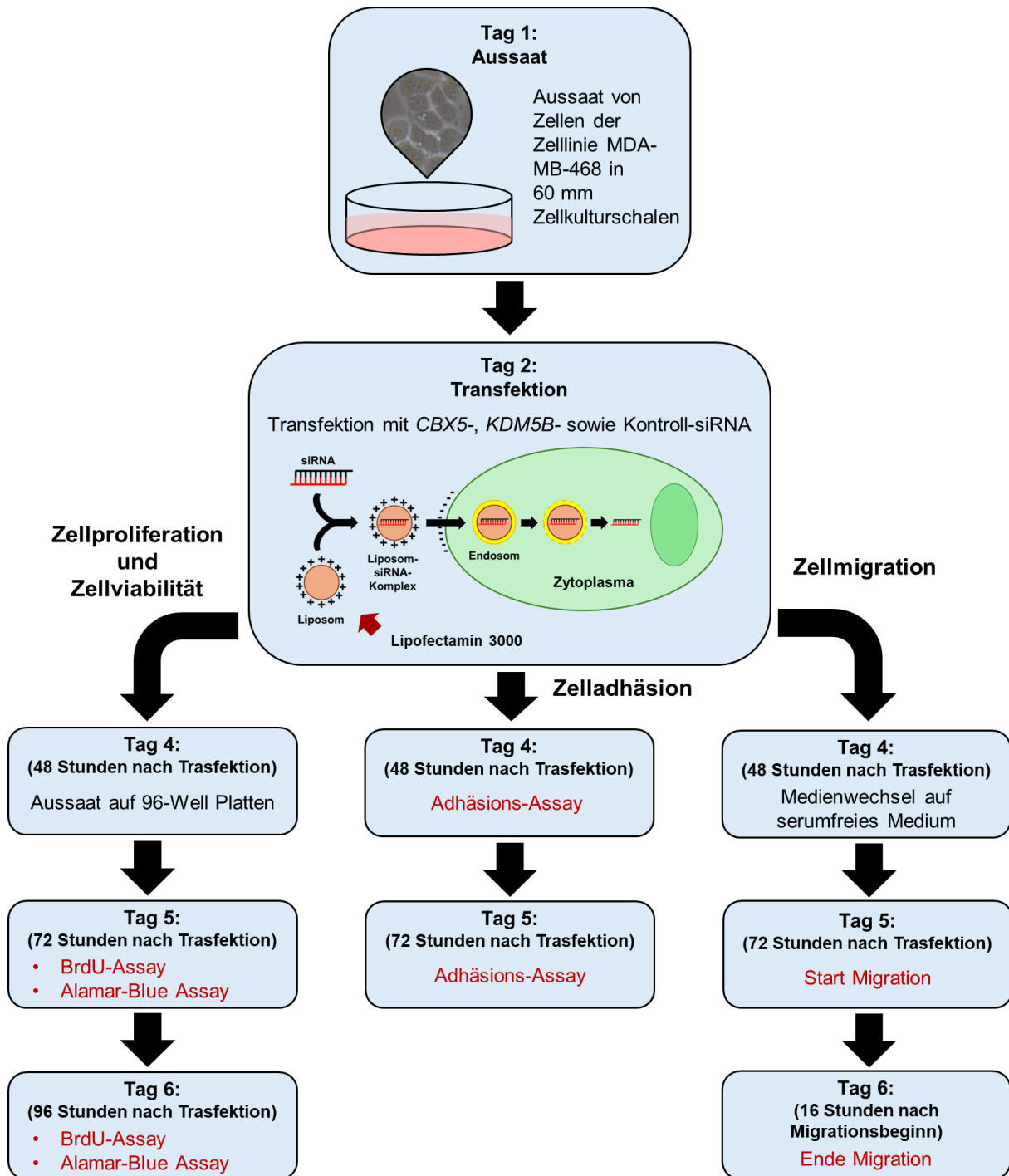


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Zellfunktionsversuche. Es erfolgte eine gemeinsame Zellaussaat und siRNA-Transfektion sowie Variationen des Versuchsaufbaus je nach Zellfunktionsversuchen an Tag vier. Teile der Abbildung wurden verändert nach (296) dargestellt.

3.8 Daten-Management und Statistik

Die Auswertung von Daten und statistische Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel. Bei mehreren Versuchsdurchläufen oder Mehrfachansätzen innerhalb eines Versuchsdurchlaufs wurden, falls nicht anders angegeben, der arithmetische

Mittelwert und zugehörige Standardabweichungen bestimmt. Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe eines studentischen t-Tests ermittelt. Signifikante Ergebnisse wurden bei $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Expression von CBX5 und KDM5B mit Immuncytochemie

4.1.1 Etablierung immuncytochemischer Färbungen von CBX5 und KDM5B

Zur Etablierung von immuncytochemischen Färbungen mit einem Anti-CBX5- sowie einem Anti-KDM5B-Antikörper wurden zuerst einige Vorversuche unternommen. Dafür wurden Zellen der Zelllinien MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor mittels Cytospin auf Objektträger aufgetragen oder auf 8-Kammer-Objektträgern kultiviert worden waren, unter Verwendung der entsprechenden Primärantikörper angefärbt (Abbildung 14). Die Färbungen mit dem Anti-CBX5-Primärantikörper zeigten bei beiden Zelllinien eine zuverlässige und deutliche Anfärbung der Zellkerne im Vergleich zu der technischen Negativkontrolle. Bei den Färbungen mit dem Anti-KDM5B-Primärantikörper hingegen zeigten sich keine spezifisch angefärbten Zellareale, sondern vielmehr eine zarte, zellübergreifende Färbung. Außerdem gelang bei mit Cytospin aufgetragenen Zellen die Färbung nicht immer zuverlässig.

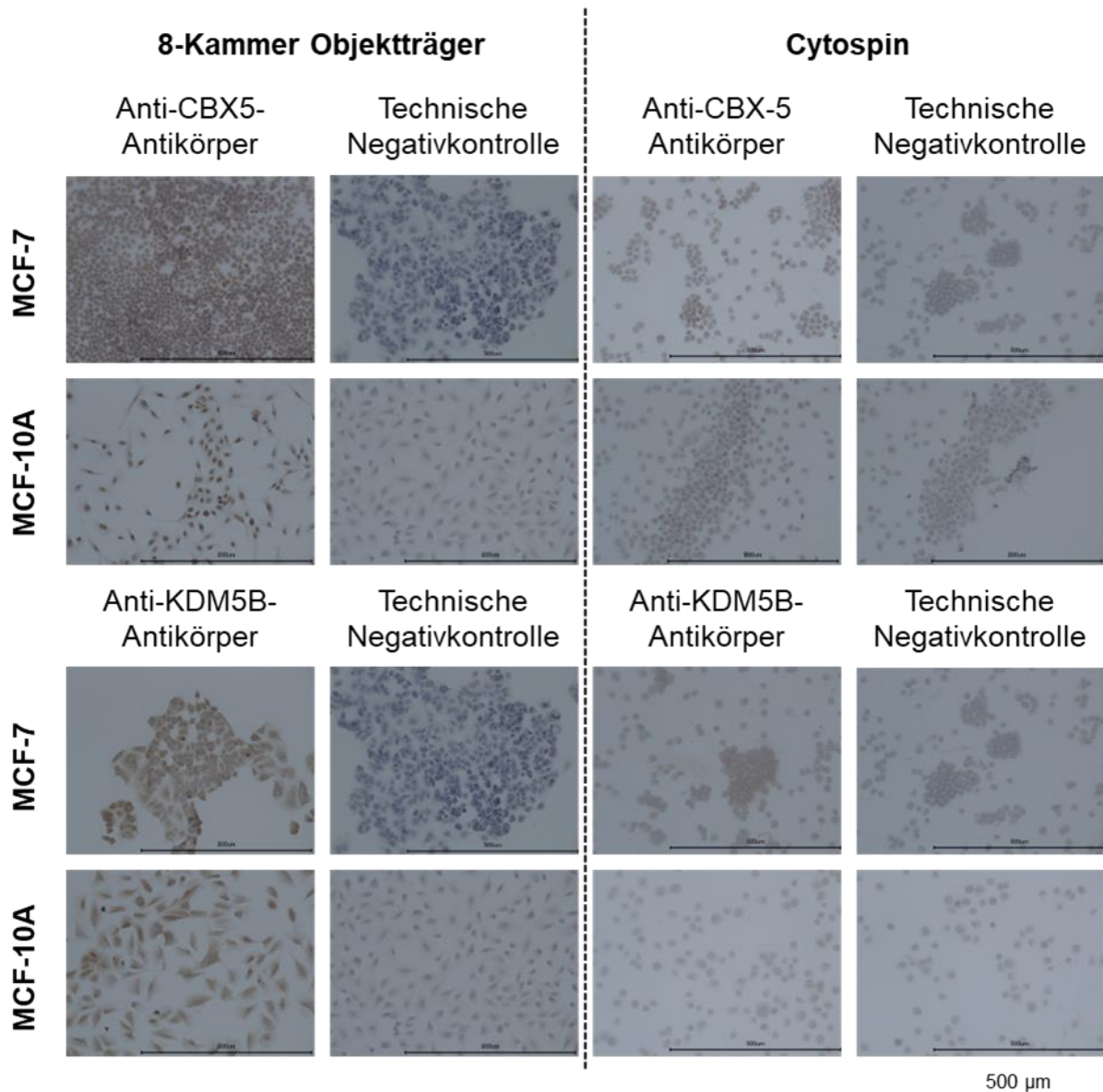


Abbildung 14: Auswahl immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5- oder Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht worden waren. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Um die Färbung der Zellen zu optimieren, wurden die im Färbeprotokoll verwendeten *Puffer Dako Target Retrieval Solutions* mit einem pH-Wert von 6 und 9 miteinander verglichen. Dazu wurden Zellen der Zelllinie MCF-10A unter Verwendung der *Puffer Dako Target Retrieval Solution* mit einem pH-Wert von 6 beziehungsweise 9 mit einem Anti-CBX5- sowie einem Anti-KDM5B-Primärantikörper angefärbt und verglichen (Abbildung 15). Dabei kamen in Bezug auf die Zellfärbung keine relevanten

4 Ergebnisse

Unterschiede zur Darstellung, weshalb die etablierten Protokolle beibehalten wurden (303). Bei Färbungen mit Anti-CBX5-Antikörper wurde ein pH-Wert von 6 verwendet und bei Färbungen mit Anti-KDM5B-Antikörper ein pH-Wert von 9.

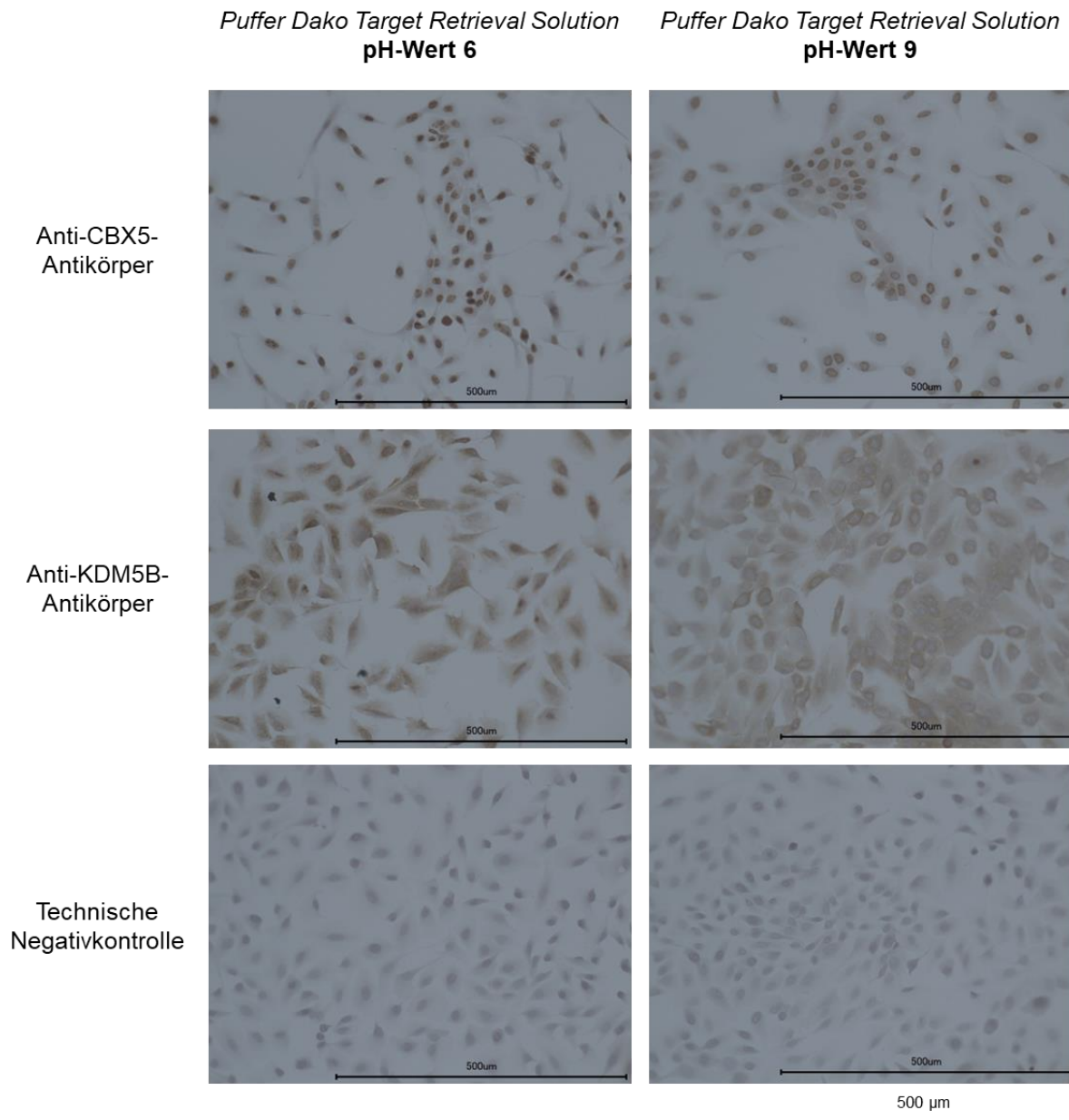


Abbildung 15: Vergleich immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5- oder Anti-KDM5B-Primärantikörper und unterschiedlicher Pufferlösungen. Verglichen wurde eine Puffer Dako Target Retrieval Solution mit einem pH-Wert von 6 mit einer solchen mit einem pH-Wert von 9. Dargestellt sind außerdem die zugehörigen technischen Negativkontrollen. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Zum Erreichen einer zuverlässigen Färbung mit dem Anti-KDM5B-Primärantikörper wurde die Inkubationszeit des Primärantikörpers verändert. Statt einer Inkubation über Nacht bei 4 °C erfolgte die Inkubation nun über 90 Minuten bei Raumtemperatur (Abbildung 16). Damit gelang eine zuverlässige Anfärbung der Zelllinien MCF-7 und MCF-10A. Es färbten sich nun sowohl einige Areale des Zellkerns als auch das Zytoplasma an. Im Folgenden erfolgte die Inkubation des Anti-KDM5B-Primärantikörpers immer für 90 Minuten bei Raumtemperatur.

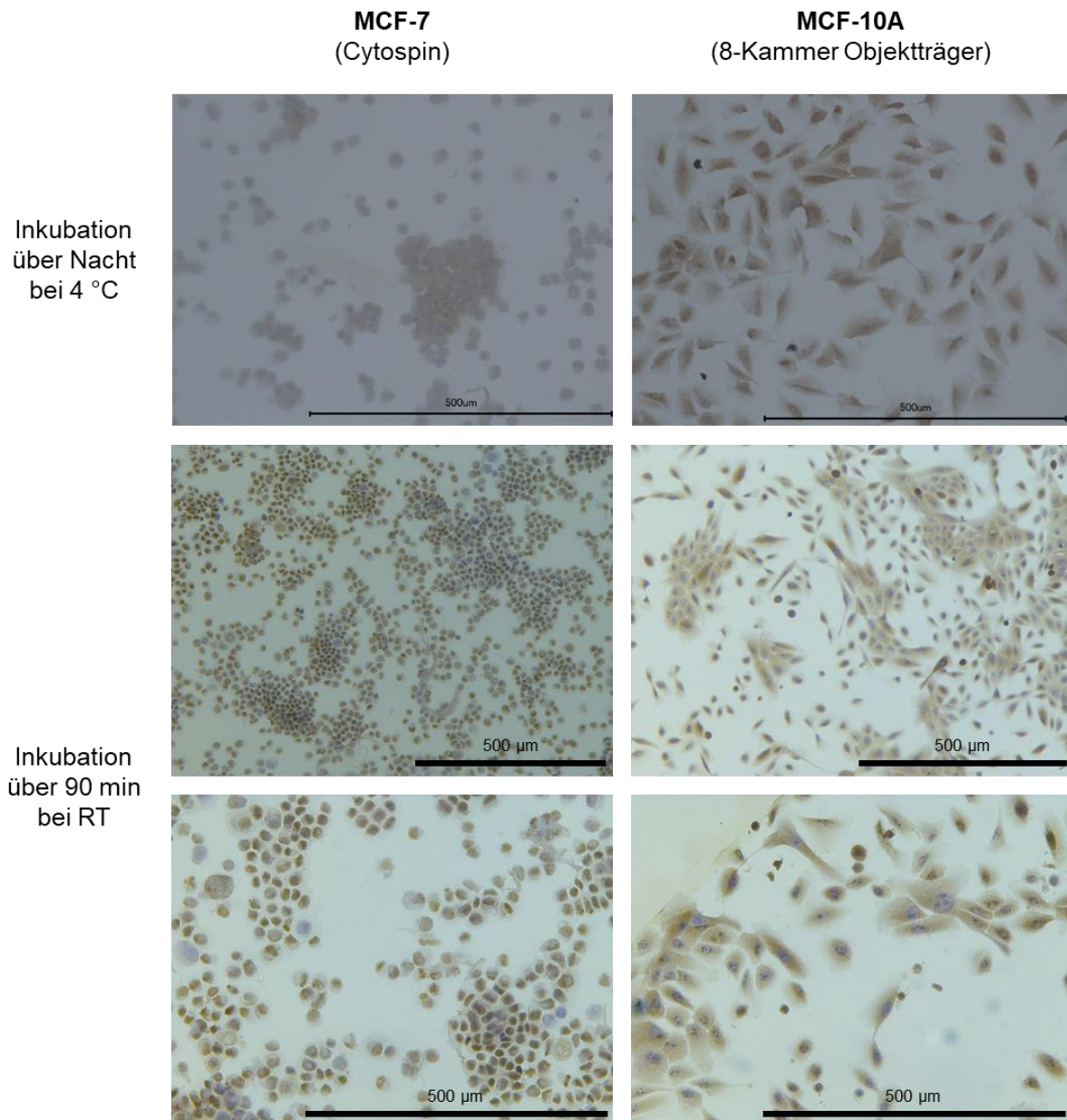


Abbildung 16: Vergleich immunocytochemischer Färbungen nach unterschiedlicher Inkubation mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C oder für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinie MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert worden waren, sowie Zellen der Zelllinie MCF-7, welche mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht worden waren. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

4.1.2 Expression von CBX5

Um die Expression sowie die Lokalisation von CBX5 in verschiedenen Zelllinien des triple-negativen Mammakarzinoms zu untersuchen, wurden an den triple-negativen Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T sowie BT-549 immunocytochemische

Färbungen mit einem Anti-CBX5-Antikörper durchgeführt. Diese wurden mit der im selben Versuchsdurchlauf mitgeführten immunocytochemisch gefärbten östrogensensitiven Zelllinie MCF-7 und der epithelialen Zelllinie MCF-10A verglichen, welche beide in den Vorversuchen eine entsprechende Expression und nukleäre Lokalisation von CBX5 gezeigt hatten. Die Zellen wurden vor der immunocytochemischen Färbung auf 8-Kammer-Objektträgern kultiviert oder mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht. In allen Versuchsdurchläufen wurden immer beide Aufbringungsmethoden verwendet und die Resultate miteinander verglichen. Für jeden immunocytochemisch gefärbten Objektträger wurde eine technische Negativkontrolle mitgeführt. Insgesamt wurden vier Versuchsdurchläufe durchgeführt.

In allen Versuchsdurchläufen zeigten sich bei allen vier triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien sowie bei den Zelllinien MCF-7 und MCF-10A im Vergleich zur technischen Negativkontrolle sowohl bei den auf 8-Kammer-Objektträgern kultivierten als auch bei den mittels Cytospin auf Objektträger aufgebrachten Zellen deutliche Färbungen (Abbildung 17). Dies spricht für eine vorhandene Expression von CBX5 in allen verwendeten Zelllinien.

Die Lokalisation der Färbungen beschränkte sich in allen Zelllinien spezifisch auf den Zellkern. Bei genauerer Ansicht können innerhalb des gefärbten Zellkerns kleinere, teilweise punktförmig diffus verteilte, teilweise komprimiert zusammengelagerte, intensiver gefärbte Areale beobachtet werden (Abbildung 18). Einige Zellen ließen sich beim Durchlaufen verschiedener Mitosestadien wie beispielsweise der Anaphase, Metaphase oder Telophase darstellen. In diesen Zellen färbten sich im Zellkern spezifisch die Areale, in denen sich kondensierte DNA vermuten lässt, sehr intensiv an (Abbildung 19). Somit kann von einer Lokalisation von CBX5 im Zellkern aller verwendeten Zelllinien beziehungsweise sogar einer spezifischen Lokalisation von CBX5 im Bereich von Heterochromatinelementen ausgegangen werden.

In der Beurteilung der Expressionslokalisation waren die 8-Kammer-Objektträger von Vorteil, da dort die Zellmorphologie intakt blieb, wodurch die Färbungen differenzierter betrachtet und sogar unterschiedliche Phasen des Zellzyklus abgebildet werden konnten.

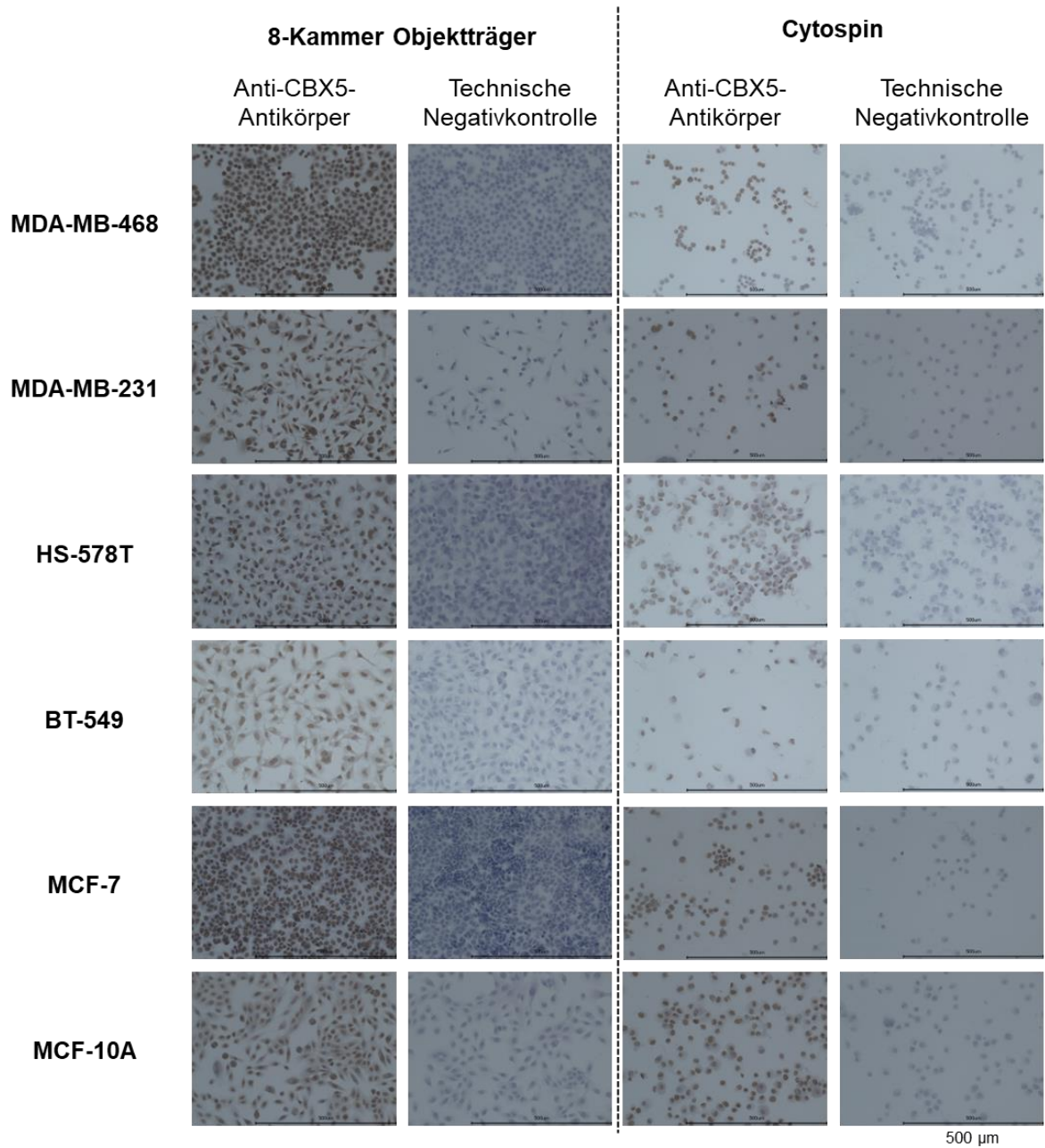


Abbildung 17: Auswahl immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper aus vier Versuchsdurchläufen sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

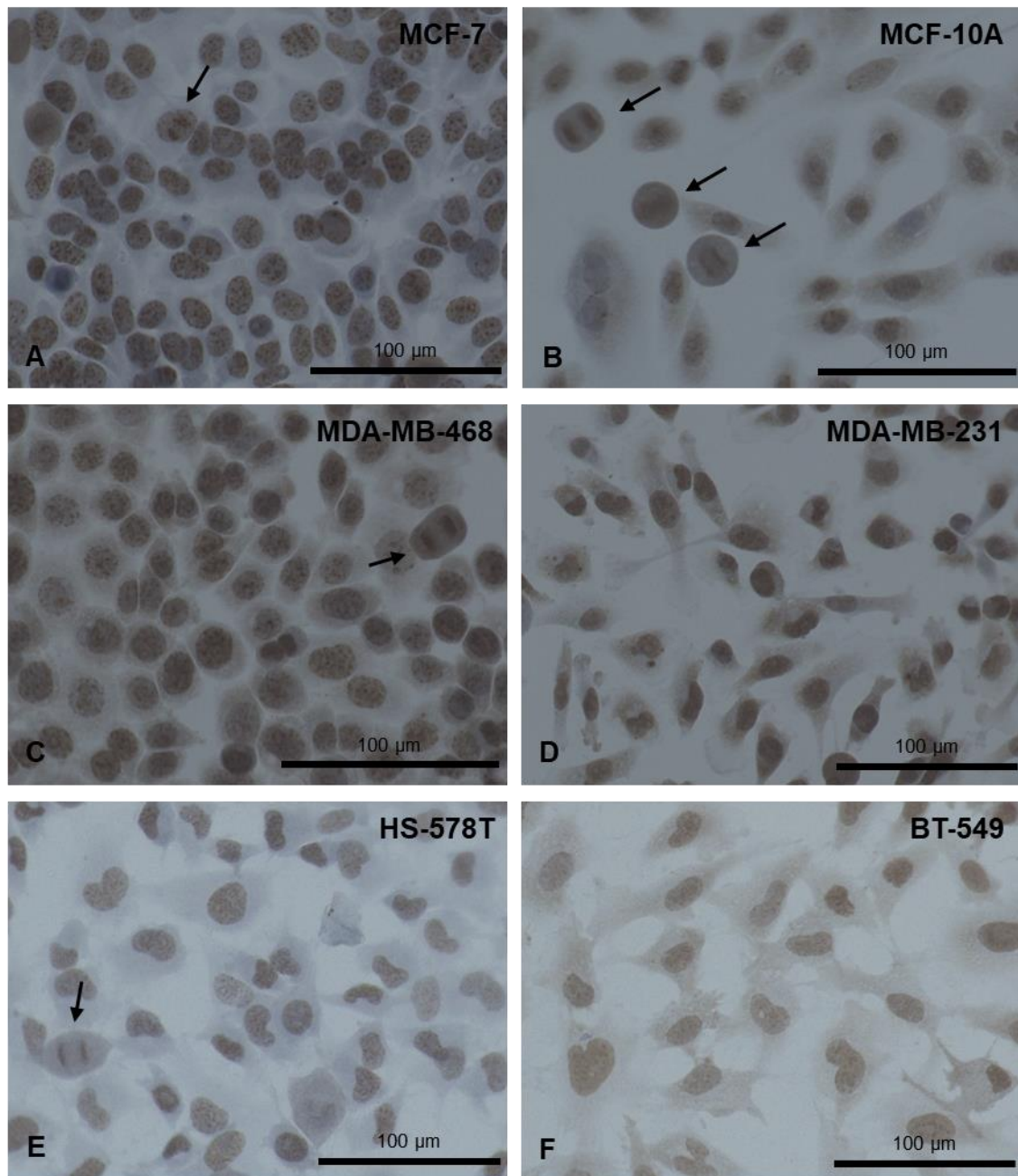


Abbildung 18: Vergrößerte Darstellung immuncytochemischer Färbungen verschiedener Zelllinien mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper auf 8-Kammer-Objektträgern. Es sind Färbungen der Zelllinien MCF-7 (A), MCF-10A (B), MDA-MB-468 (C), MDA-MB-231 (D), HS-578T (E) und BT-549 (F) abgebildet. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

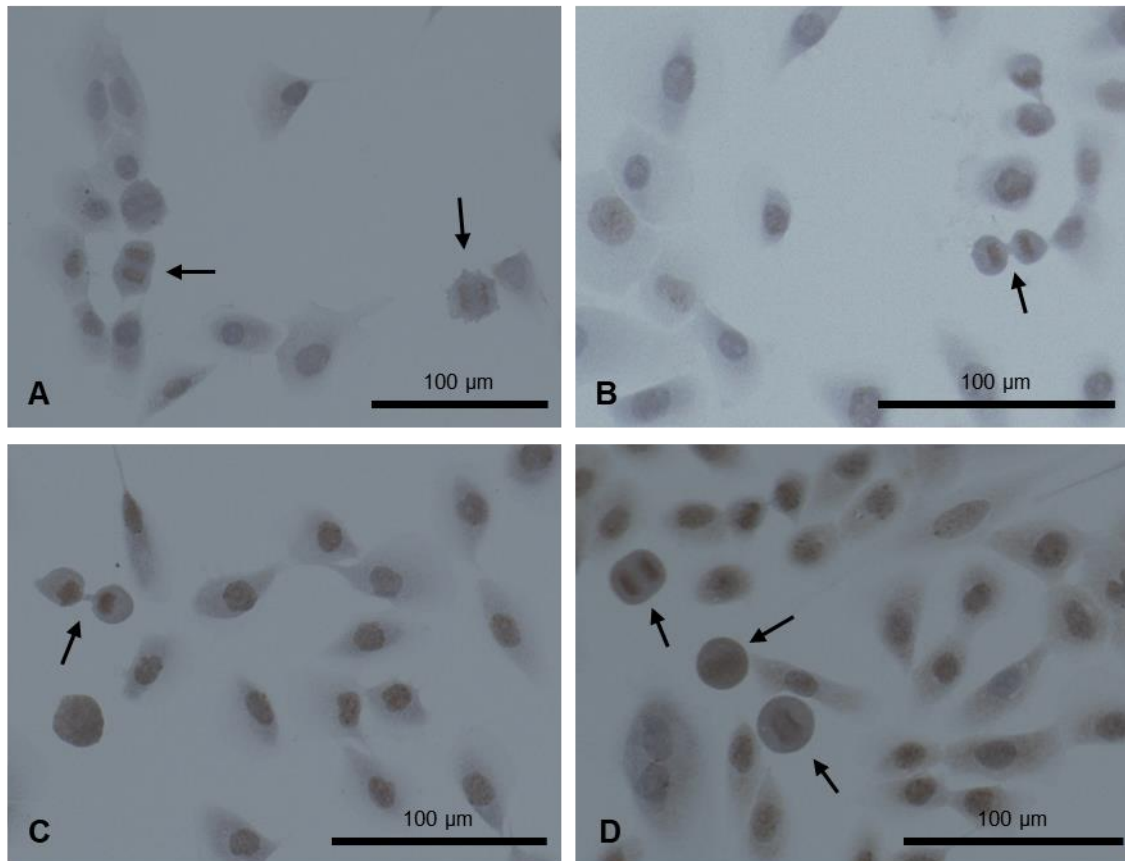


Abbildung 19: Vergrößerte Darstellung verschiedener Mitosestadien. Vergrößerte Darstellung immunzytochemischer Färbungen von sich in unterschiedlichen Phasen der Mitose befindlichen Zellen der Zelllinie MCF-10A mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper auf 8-Kammer-Objektträgern. A) Darstellung zweier Zellen in der Anaphase. B und C) Jeweils Darstellung einer Zelle in der Telophase. D) Darstellung einer Zelle in der Metaphase sowie zweier Zellen in der Anaphase. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

4.1.3 Expression von KDM5B

Analog erfolgte die Analyse der Expression von KDM5B in den Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A mittels immunzytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Antikörper. Erneut wurden alle Zelllinien untereinander sowie auf 8-Kammer-Objektträgern kultivierte mit mittels Cytospin auf Objektträger aufgebrachte Zellen verglichen. Für jeden immunzytochemisch gefärbten Objektträger wurde wie zuvor eine technische Negativkontrolle mitgeführt und wieder wurden insgesamt vier Versuchsdurchläufe durchgeführt.

Verglichen mit den technischen Negativkontrollen zeigten sich bei allen verwendeten Zelllinien unabhängig von der Auftragungsmethode deutliche Färbungen, was auf eine in allen Zelllinien vorhandene Expression von KDM5B schließen lässt (Abbildung 20).

Eine spezifische Lokalisation von KDM5B ließ sich nicht zweifelsfrei feststellen. Stattdessen zeigten sich sowohl eine Färbung des Zellkerns als auch des Zytoplasmas. In einer vergrößerten Ansicht stellten sich teilweise außerdem kleinere, rundliche und intensiver gefärbte Areale im Bereich des Zellkerns dar (Abbildung 21). Im Allgemeinen zeigte sich eine gewisse Heterogenität der Färbungen mit stellenweise deutlichen Zellkernfärbungen, stellenweise betonten Färbungen spezifischer Kernareale mit im Übrigen ungefärbtem Zellkern sowie stellenweiser unspezifischer Färbung von Zellkern und Zytoplasma (Abbildung 22). Zusammenfassend legen die Beobachtungen eine Lokalisation von KDM5B im Zytoplasma und im Zellkern, mit Betonung einiger Kernareale nahe.

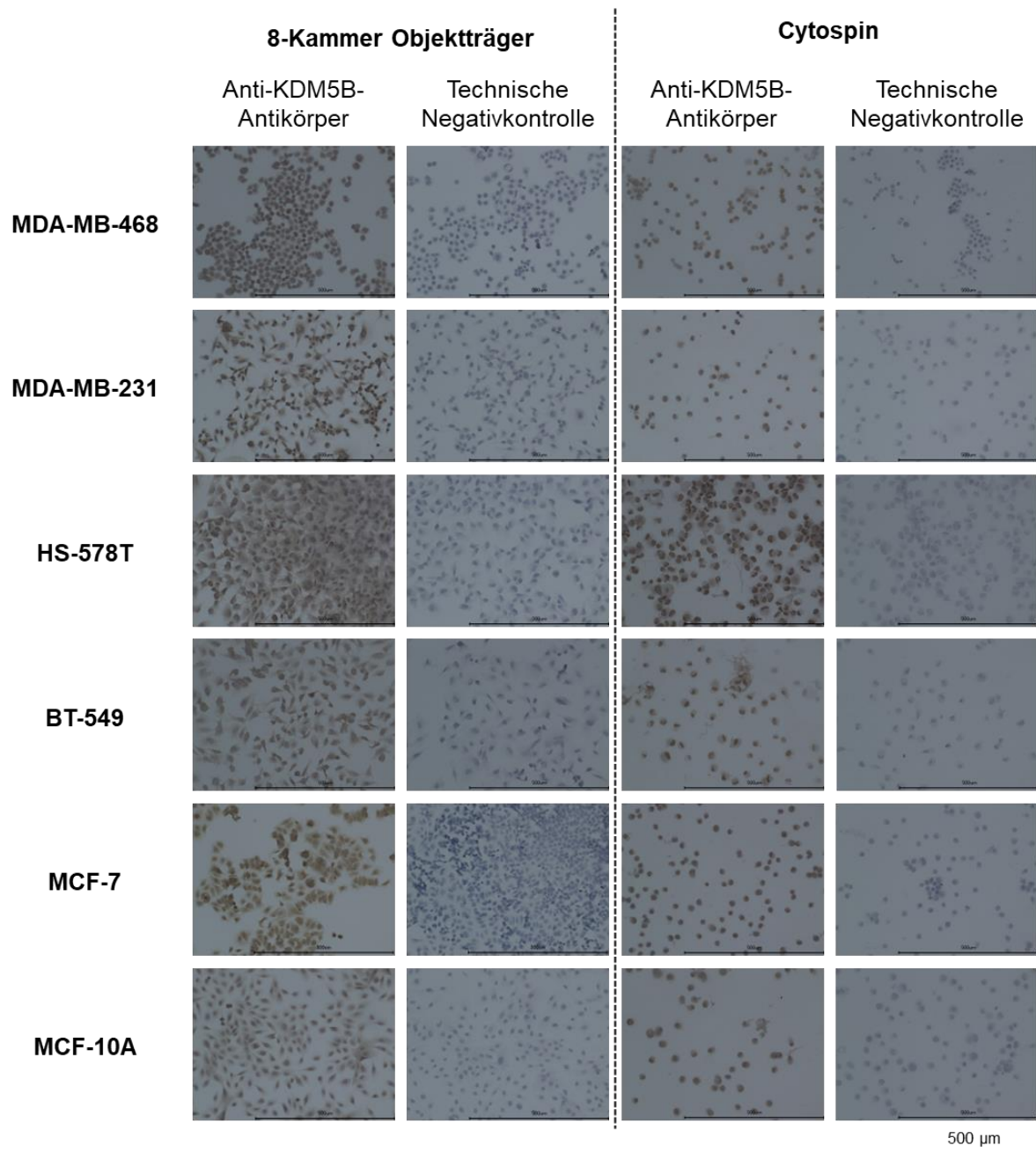


Abbildung 20: Auswahl immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper aus vier Versuchsdurchläufen sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor entweder auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht worden waren. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

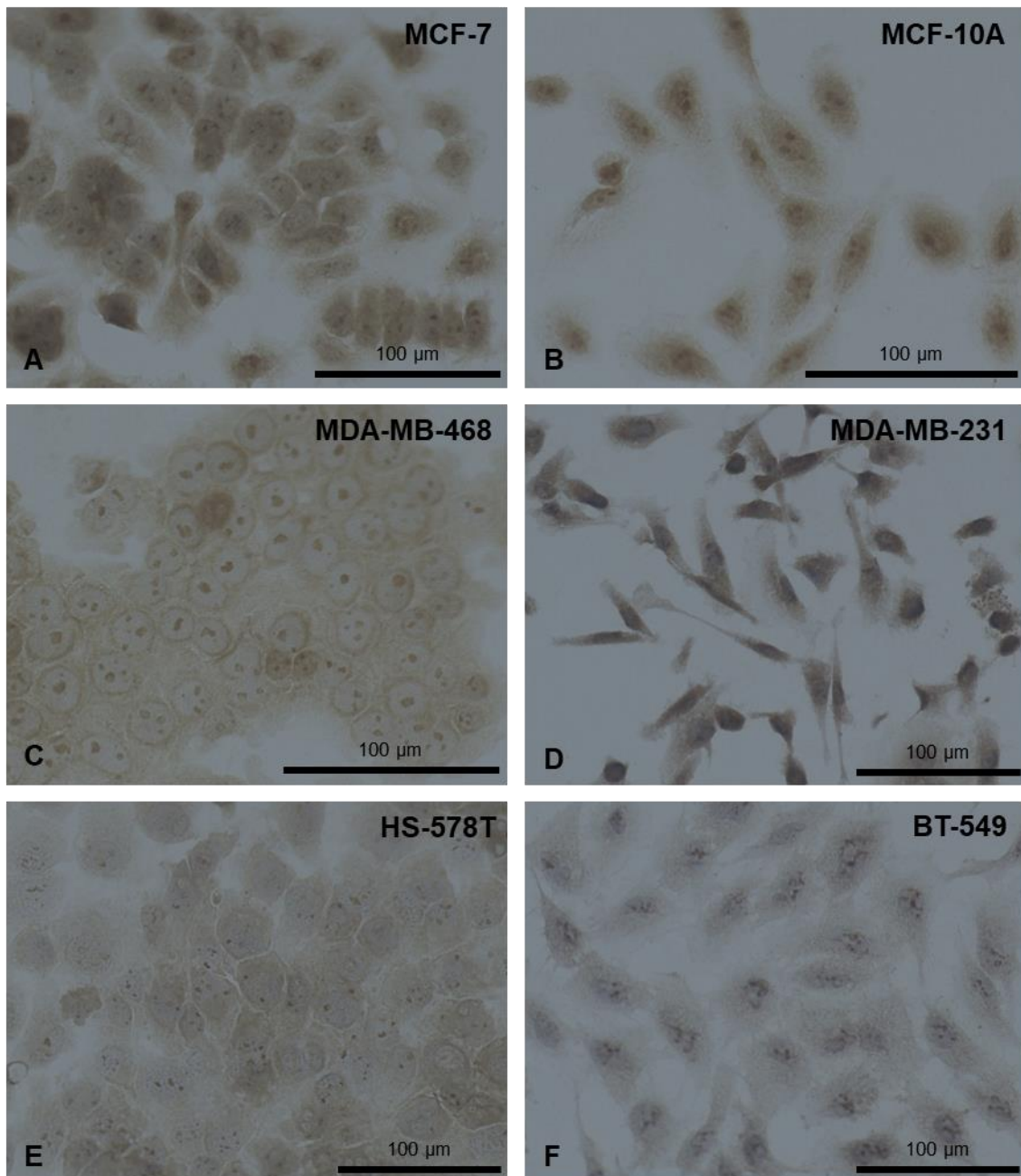


Abbildung 21: Vergrößerte Darstellung immunocytochemischer Färbungen verschiedener Zelllinien mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper auf 8-Kammer-Objektträgern. Es sind Färbungen der Zelllinien MCF-7 (A), MCF-10A (B), MDA-MB-468 (C), MDA-MB-231 (D), HS-578T (E), und BT-549 (F) abgebildet. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

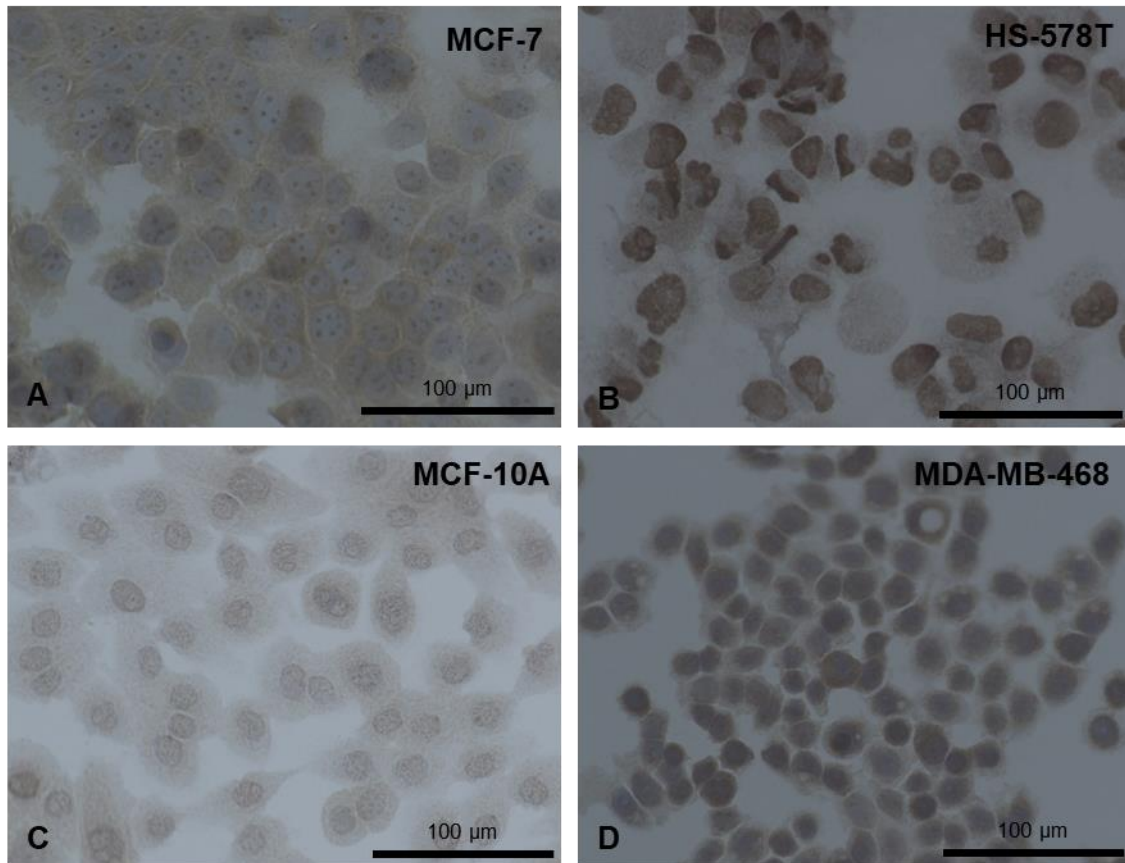


Abbildung 22: Vergrößerte Darstellung einer Auswahl immuncytochemischer Färbungen verschiedener Zelllinien mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper. A) Auf 8-Kammer-Objektträgern kultivierte Zellen der Zelllinie MCF-7. B) Mit Cytospin aufgetragene Zellen der Zelllinie HS-578T. C) Auf 8-Kammer-Objektträgern kultivierte Zellen der Zelllinie MCF-10A. D) Auf 8-Kammer-Objektträgern kultivierte Zellen der Zelllinie MDA-MB-468. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

4.2 Etablierung eines siRNA-Knockdowns von *CBX5* und *KDM5B*

4.2.1 Auswahl der Referenzgene und Bestimmung der Knockdowneffektivität

Bevor eine Analyse der Funktionalität von *CBX5* und *KDM5B* im Zellkulturmodell erfolgen konnte, galt es zuerst, für einen sinnvollen Vergleich, einen siRNA-Knockdown mit *CBX5*- sowie *KDM5B*-siRNA mit ausreichender Knockdowneffektivität zu etablieren.

Dafür wurden in einem Vorversuch Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 in verschiedenen Konzentrationen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit *CBX5*-, *KDM5B*- sowie Kontroll-siRNA transfiziert. 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion erfolgten jeweils die Zell-Lyse und Extraktion der Nukleinsäuren mit anschließender RNA-Isolation und cDNA-Synthese. Mit Hilfe von qPCR konnte damit die Restaktivität von *CBX5* und *KDM5B* zu den drei untersuchten Zeitpunkten

bestimmt werden. Um eine zu hohe Konfluenz der Zellen in den 60 mm Zellkulturschalen zu vermeiden, wurden für die unterschiedlichen Zeiträume von Transfektion bis Probeentnahme unterschiedliche Zellkonzentrationen ausgesät. Für 24 Stunden wurden 5×10^5 Zellen, für 48 Stunden 4×10^5 Zellen und für 72 Stunden 2×10^5 Zellen auf die Zellkulturschalen aufgebracht.

Die Bestimmung der Restaktivität von *CBX5* und *KDM5B* erfolgte in Form einer relativen Genexpressionsanalyse mittels qPCR. Zur besseren Einordnung der verbliebenen Expression von *CBX5* und *KDM5B* wurden diese auf die Expression verschiedener sogenannter Referenzgene normiert.

Um herauszufinden, welche Referenzgene in diesem Fall am besten geeignet sind, wurde zuerst in einem weiteren Vorversuch die relative Expression der sechs etablierten Referenzgene *Beta-Actin (ACTB)*, *ATP-Synthase Untereinheit F6 (ATP5J)*, *Hydroxymethylbilane-Synthase (HMBS)*, *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)*, *Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA)* und *TATA-binding protein (TBP)* in Zellen der Zelllinien MDA-MB-468 und MCF-7 analysiert. Danach wurde, im Zuge des bereits beschriebenen Vorversuchs zur Untersuchung der Restaktivität von *CBX5* und *KDM5B* zu drei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, ebenfalls die relative Expression der Referenzgene *ACTB*, *ATP5J*, *HMBS*, *HPRT* und *PPIA* in Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 zu den Versuchszeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach siRNA-Transfektion untersucht und miteinander verglichen, um herauszufinden, ob die untersuchten Referenzgene in diesem Versuch vom siRNA-Knockdown beeinflusst werden.

Dabei fiel auf, dass sich die relative Expression von *ACTB*, *HMBS* und *HPRT* bei beiden untersuchten Zelllinien ähnelte und auch die Verhältnisse der relativen Expression dieser drei Haushaltsgenen zueinander weitestgehend übereinstimmten (Abbildung 23). So zeigte sich beispielsweise in beiden Zelllinien die relative Expression von *ACTB* niedriger als die von *HMBS*, aber wiederum höher als die von *HPRT*. Die relative Expression von *ATP5J*, *PPIA* und *TBP* hingegen war in den Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 deutlich höher ausgeprägt als in den Zellen der Zelllinie MCF-7 und auch die Verhältnisse zu den anderen Haushaltsgenen unterschieden sich zwischen den beiden Zelllinien. Bei den MDA-MB-468-Zellen zeigte sich beispielsweise die relative Expression von *ATP5J* und *PPIA* deutlich höher als die von *HMBS* sowie die relative Expression von *TBP* auf einem ähnlichen Niveau wie die von

HMBS. In den MCF-7-Zellen wiederum lag die relative Expression von *ATP5J*, *PPIA* und *TBP* niedriger als die von *HMBS*.

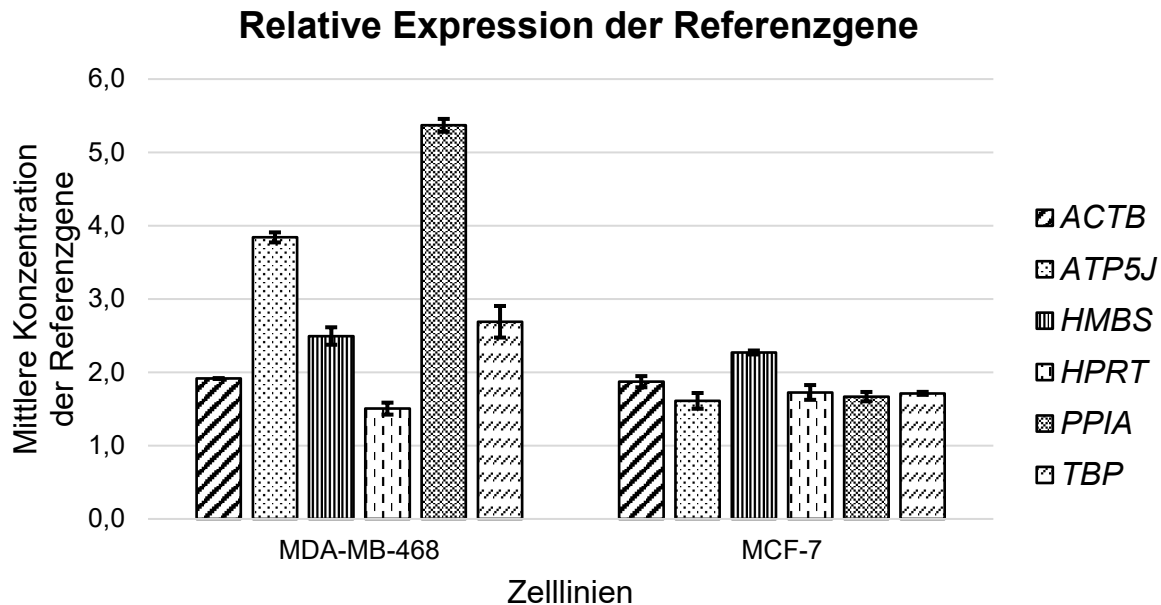


Abbildung 23: Relative Expression der Referenzgene *ACTB*, *ATP5J*, *HMBS*, *HPRT*, *PPIA* und *TBP* in den Zelllinien MDA-MB-468 und MCF-7. Darstellung des arithmetischen Mittelwertes inklusive Standardabweichung der analysierten Duplikate.

Beim Vergleich der relativen Expression der Referenzgene 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- und Kontroll-siRNA zeichnete sich ein heterogeneres Bild (Abbildung 24). Alle Referenzgene hatten gemeinsam, dass ihre relative Expression im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach Transfektion leicht anstieg und dann im Zeitraum von 48 bis 72 Stunden nach Transfektion wieder absank. Nach Transfektion lag bei allen verwendeten siRNAs die relative Expression von *PPIA* höher als die der anderen Referenzgene, wohingegen *HMBS* und *HPRT* die niedrigste relative Expression unter den Referenzgenen zeigten. Dabei lag die relative Expression von *HMBS* und *HPRT* entweder ungefähr gleich oder *HMBS* war geringfügig höher exprimiert, wie beispielsweise nach Transfektion mit *KDM5B*-siRNA. Nur 72 Stunden nach Transfektion mit *CBX5*-siRNA und 24 Stunden nach Transfektion mit Kontroll-siRNA war *HPRT* geringfügig höher exprimiert. Die relative Expression von *ACTB* und *ATP5J* lag in den meisten Fällen zwischen der relativen Expression von *HMBS*, *HPRT* und *PPIA*. Lediglich 24 Stunden nach Transfektion mit *KDM5B*-siRNA war *ACTB* geringer exprimiert als *HMBS*. Die relative Expression von *ACTB* und *ATP5J* hingegen stand in wechselndem Verhältnis zueinander.

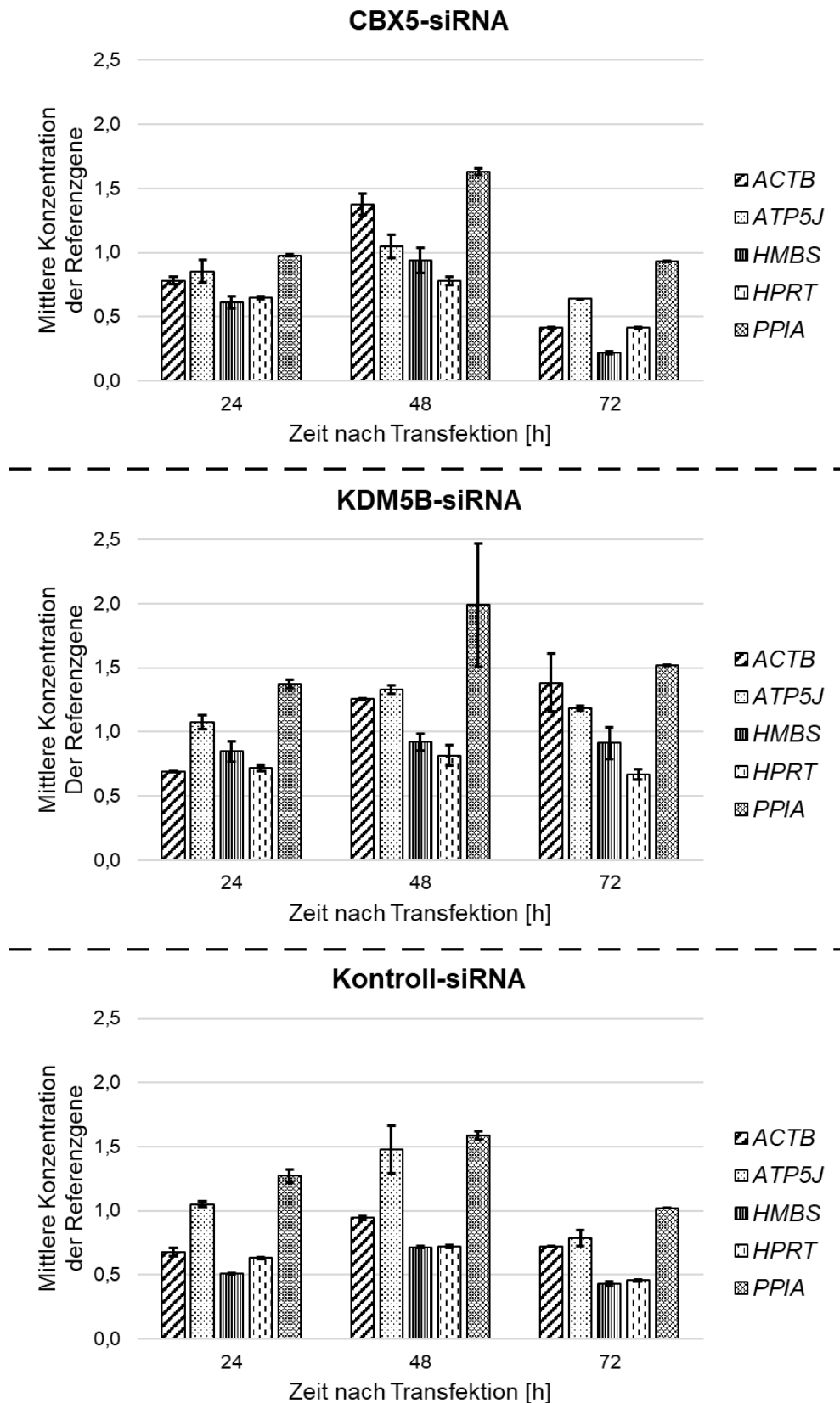


Abbildung 24: Relative Expression der Referenzgene *ACTB*, *ATP5J*, *HMBS*, *HPRT* und *PPIA* in der Zelllinie MDA-MB-468. Die Erhebung der Daten erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit CBX5-, KDM5B- und Kontroll-siRNA.

Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurde entschieden, die verbliebene Expression von *CBX5* und *KDM5B* in allen Genexpressionsanalysen auf die relative Expression der Referenzgene *ACTB*, *HMBS* und *HPRT* zu normieren. Dies geschah durch die Bildung eines Quotienten mit dem Mittelwert der relativen Genexpression von *CBX5* oder *KDM5B* und dem geometrischen Mittelwert der Mittelwerte der relativen Genexpression der Referenzgene *ACTB*, *HMBS* und *HPRT*.

Bezogen auf die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zeigten sich in diesem Vorversuch sowohl bei *CBX5* als auch bei *KDM5B* eine deutlich signifikante Reduktion der Genexpression zu allen drei Messzeitpunkten. Die Expression von *CBX5* sank 24 und 48 Stunden nach siRNA-Transfektion auf ca. 10 % der Kontrolle und verringerte sich 72 Stunden nach Transfektion auf ca. 7 % (Abbildung 25). Auch die Genexpression von *KDM5B* reduzierte sich 24 Stunden nach Transfektion auf ca. 13 % der Kontrolle, stieg 48 Stunden nach Transfektion geringfügig auf ca. 18 % an, lag allerdings 72 Stunden nach Transfektion wieder bei ca. 13 % (Abbildung 26).

Zusammenfassend gelang der Beweis eines siRNA-Knockdowns von *CBX5* und *KDM5B* mit jeweils einer ausreichenden Knockdowneffizienz und nur noch geringer Restaktivität von *CBX5* bzw. *KDM5B* zu allen drei untersuchten Messzeitpunkten.

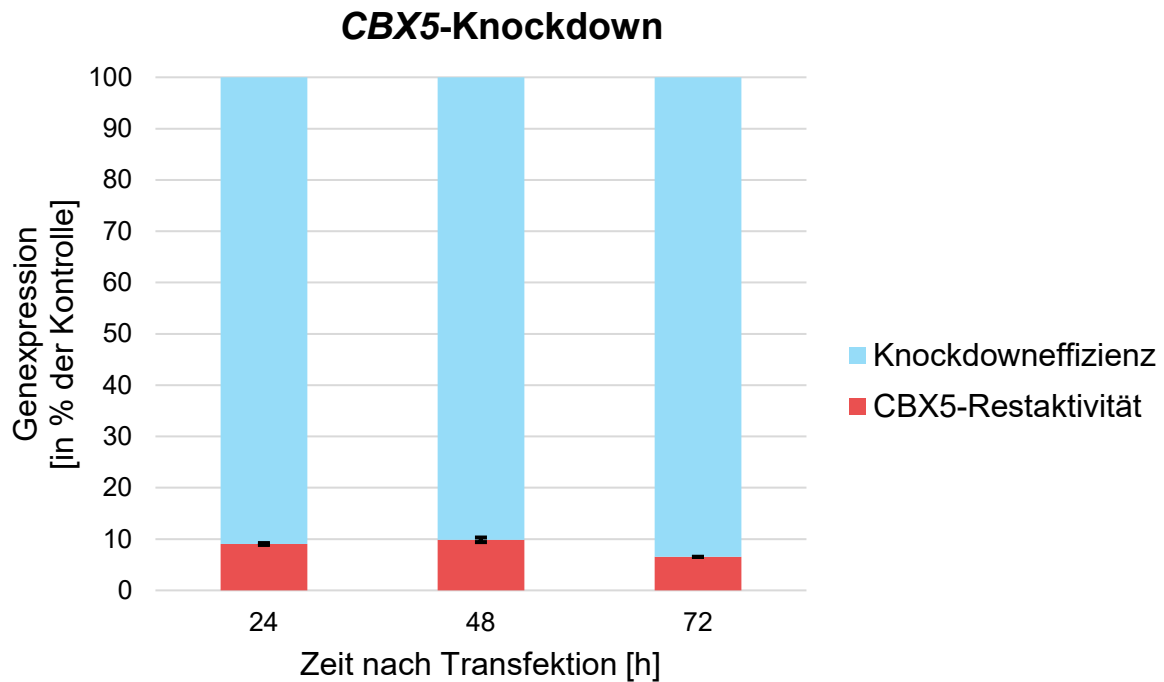


Abbildung 25: Knockdowneffizienz und Restexpression von *CBX5* in Zellen der Zelllinie MDA-MB-468. Diese wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit *CBX5*-siRNA erhoben und auf die Genexpression der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normiert. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardabweichung der analysierten Duplikate.

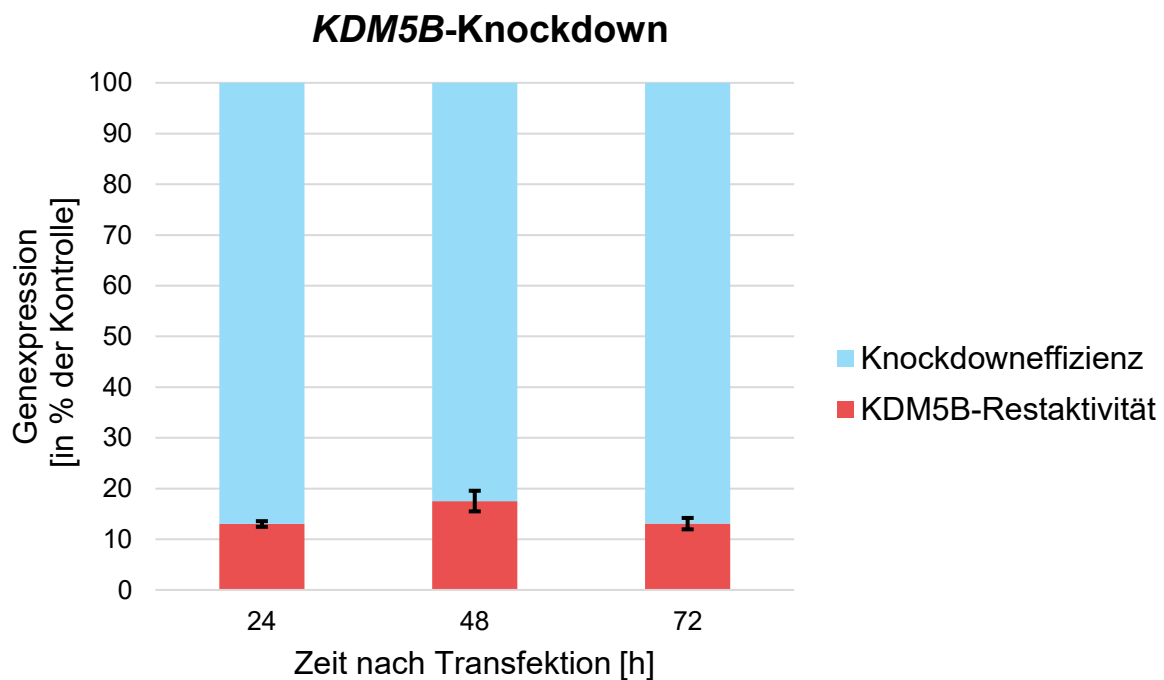


Abbildung 26: Knockdowneffizienz und Restexpression von *KDM5B* in Zellen der Zelllinie MDA-MB-468. Diese wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion

mit *KDM5B*-siRNA erhoben und auf die Genexpression der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normiert. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardabweichung der analysierten Duplikate.

4.2.2 Qualitätsüberprüfung der qPCR

4.2.2.1 Nachweis der Amplifikationsprodukte

Zur Etablierung der neuen Primer für *CBX5* und *KDM5B* wurde eine Gelelektrophorese mit Amplifikationsprodukten der beiden Primer in einem 2 % Agarose-Gel durchgeführt. Es kam zur eindeutigen Darstellung der gewünschten Produkte im Fall von *CBX5* auf einer Höhe von 101 bp sowie im Fall von *KDM5B* in Höhe von 140 bp. Eine Bildung von unerwünschten Nebenprodukten konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Abbildung 27).

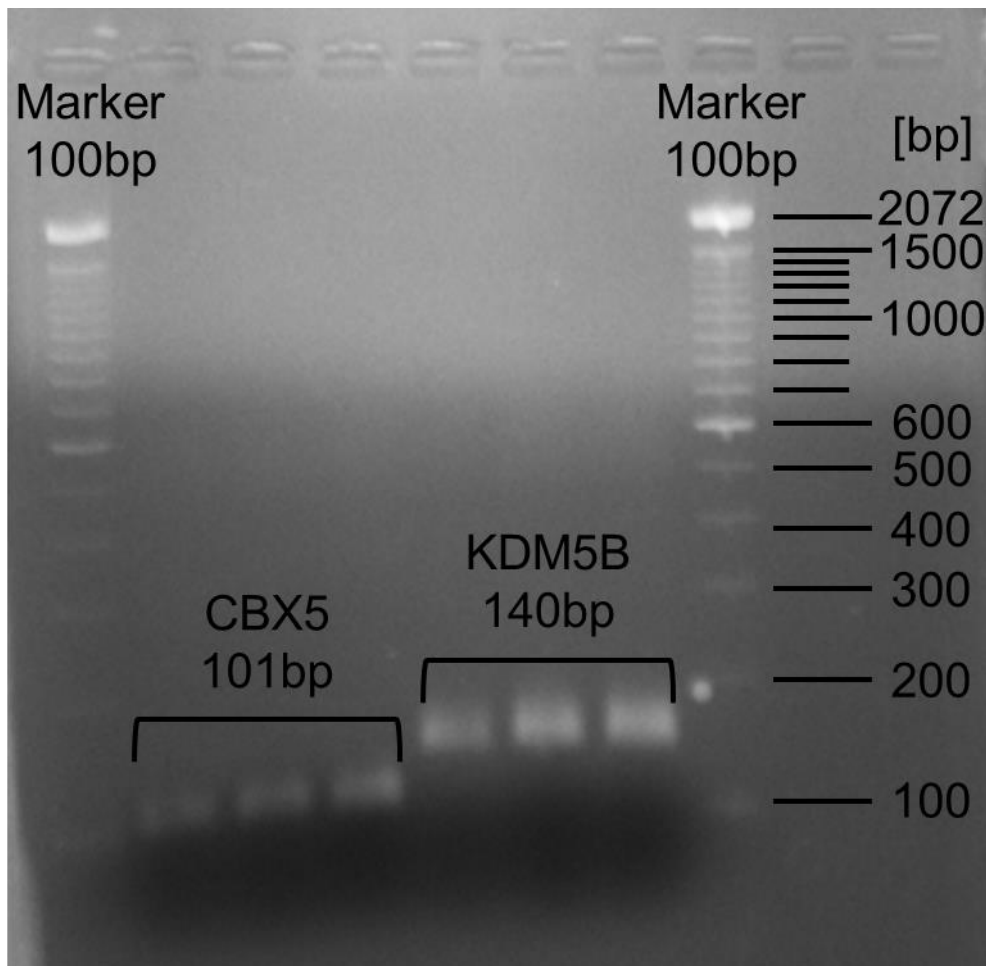


Abbildung 27: Nachweis der Amplifikationsprodukte der Primer für *CBX5* und *KDM5B*. In der dargestellten Gelelektrophorese wurden für jeden der beiden Primer jeweils drei mit qPCR amplifizierte, ursprünglich aus Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 gewonnene cDNA-Proben aufgetragen. In den beiden äußeren Taschen befanden sich jeweils ein Marker mit einer detaillierten Auflösung im Bereich von 100 bis 600 Basenpaaren, welcher in Abständen von 100 bp markiert ist.

4.2.2.2 Überprüfung von Schmelzkurve und Schmelzpunkt

Um eine Verunreinigung der qPCR und die damit verbundene Bildung von unerwünschten Nebenprodukten auszuschließen, erfolgten im Anschluss an jede durchgeführte PCR eine Überprüfung der Schmelzpunkte der entstandenen PCR-Produkte sowie eine Analyse derer Schmelzkurven. Zu jedem PCR-Produkt gehört dabei eine produktspezifische Schmelzkurve mit zugehörigem Schmelzpunkt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Zuordnung von qPCR-Produkten und ihren zugehörigen Schmelzpunkten. Aufgeführt ist das arithmetische Mittel der Schmelzpunkte der Produkte aus Standardreihe und Proben, welche mit den jeweiligen Primern erzeugt wurden. Die Daten für die Schmelzpunkte entstammen dem Vorversuch zum Vergleich der Referenzgene in den Zelllinien MDA-MB-468 und MCF-7. Ausreißer wurden nicht berücksichtigt.

qPCR-Produkt	Schmelzpunkt [°C]
<i>ACTB</i>	86,6
<i>HMBS</i>	88,1
<i>HPRT</i>	81,5
<i>PPIA</i>	86,8
<i>ATP5J</i>	79,9
<i>TBP</i>	81,8
<i>KDM5B</i>	82,2
<i>CBX5</i>	82,5

Analysiert wurden jeweils die Duplikate der Standardreihe, die Duplikate der zu untersuchenden Proben, der Leerkontrolle sowie der RT- Kontrolle. Die exemplarische Darstellung der Schmelzpunkte und Schmelzkurven von *KDM5B* aus Proben zur Kontrolle der Knockdowneffektivität nach Zellfunktionsversuchen mit Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 zeigte keine abweichenden Schmelzpunkte oder Schmelzkurven. Die RT- und H₂O-Leerkontrollen zeigten keine Schmelzpunkte. Eine Bildung von unerwünschten Nebenprodukten und/oder Verunreinigungen konnte somit ausgeschlossen und das Ergebnis der qPCR validiert werden (Abbildung 28).

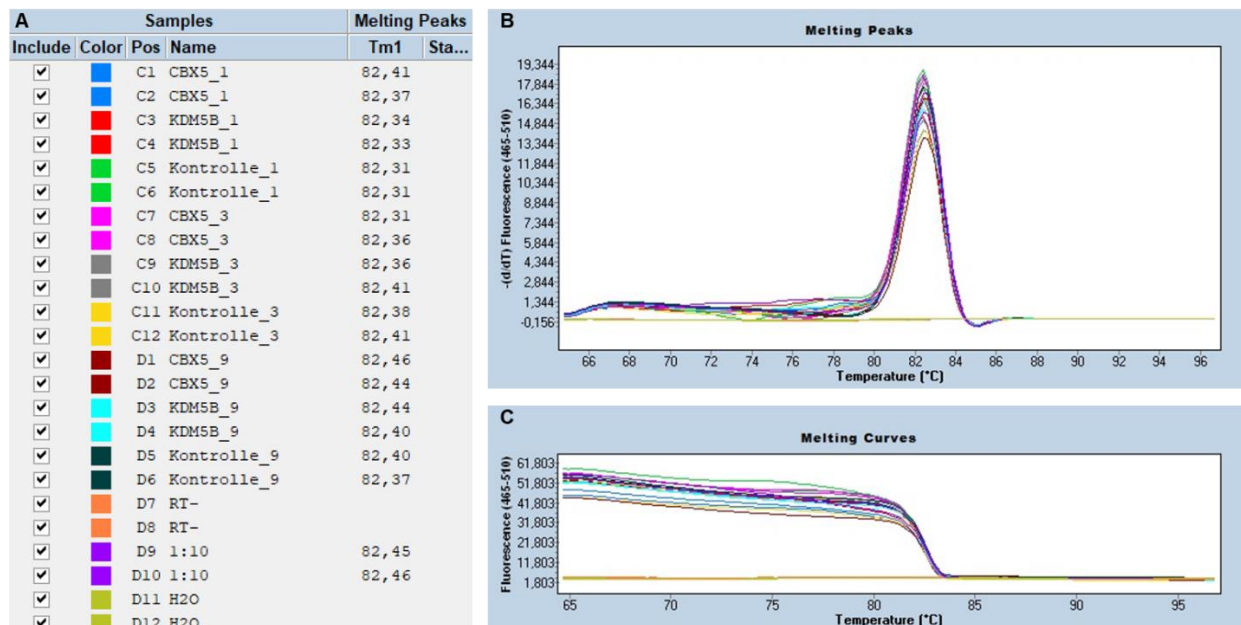


Abbildung 28: Darstellung der Schmelzpunkte und Schmelzkurven von *KDM5B*-qPCR-Produkten zur Qualitätskontrolle der qPCR. Auswahl an Proben zur Kontrolle der Knockdowneffektivität nach Zellfunktionsversuchen mit Zellen der Zelllinie MDA-MB-468, welche zuvor mit CBX5-, KDM5B- oder Kontroll-siRNA transfiziert wurden. A) Auflistung der untersuchten Proben sowie des 1:10-Ankers aus der Verdünnungsreihe und der RT- und H₂O-Leerkontrollen mit zugehöriger Farbkodierung und gemessenem Schmelzpunkt. B) Graphische Darstellung der Schmelzpunkte. C) Graphische Darstellung der Schmelzkurven.

4.3 Funktionalität von CBX5 und KDM5B im TNBC-Zellmodell

4.3.1 Etablierung von Zellmigrations- und Zelladhäsionsassays

Vor der Durchführung von Zellmigrations- oder Zelladhäsionsassays, in denen die Aktivität von CBX5 beziehungsweise von KDM5B mittels siRNA-Knockdown herunterreguliert wurde, wurde die Eignung von verschiedenen Lockstoffen für beide Zellfunktionsassays an unbehandelten Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 untersucht. Getestet wurden jeweils die Lockstoffe Fibronectin, Kollagen I und Kollagen IV. Dabei zeigte sich im Zellmigrationsassay eine signifikant vermehrte Zellmigration in Richtung von Kollagen I und Kollagen IV, wohingegen für Fibronectin kein Nachweis eines Zellmigration-fördernden Effektes gelang (Abbildung 29). Im Zelladhäsionsassay hingegen verbesserte sich die Zelladhäsion mit dem Einsatz von Fibronectin deutlich. Auch Kollagen I und Kollagen IV zeigten einen merklichen Effekt auf die Zelladhäsion (Abbildung 30). Zur Vereinheitlichung und Vergleichbarkeit des Versuchsaufbaus wurden, auf Grundlage dieser Erkenntnisse, im Folgenden beide Zellfunktionsassays mit Kollagen I durchgeführt.

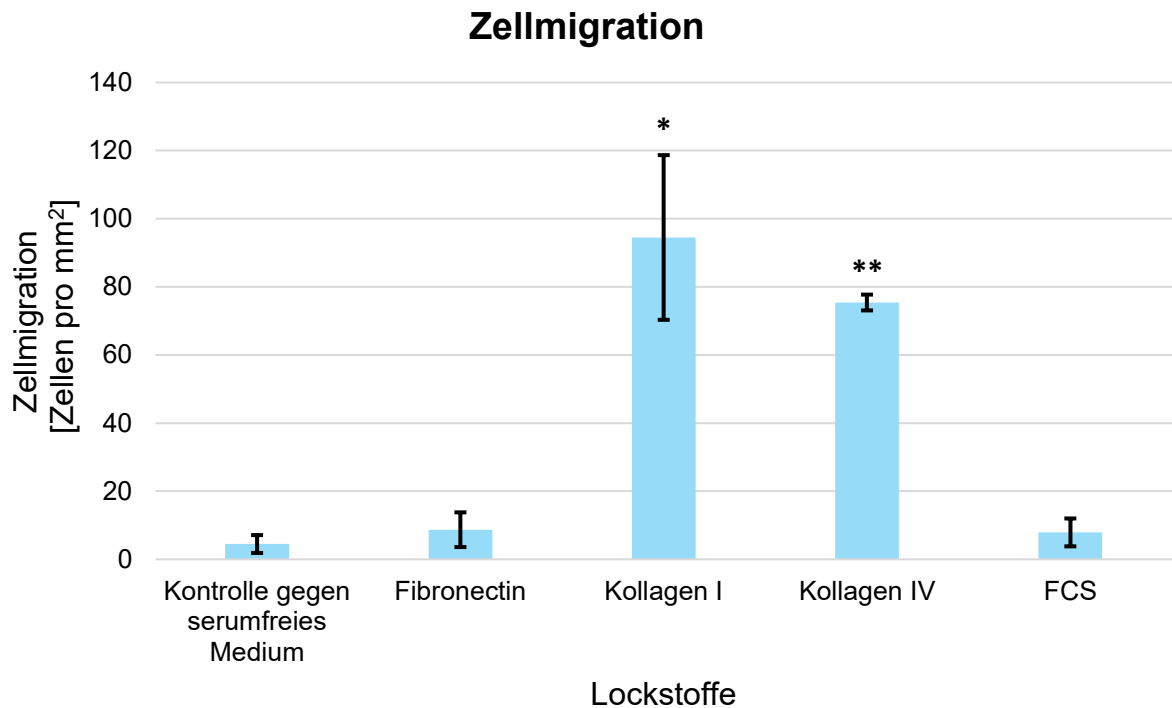


Abbildung 29: Mittelwerte von migrierten Zellen pro mm² der Zelllinie MDA-MB-468 unter Verwendung der Lockstoffe Fibronectin, Kollagen I und Kollagen IV in einer Boydenkammer. Zur Kontrolle diente serumfreies Medium sowie FCS-haltiges Medium. Abgebildet sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Tests ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

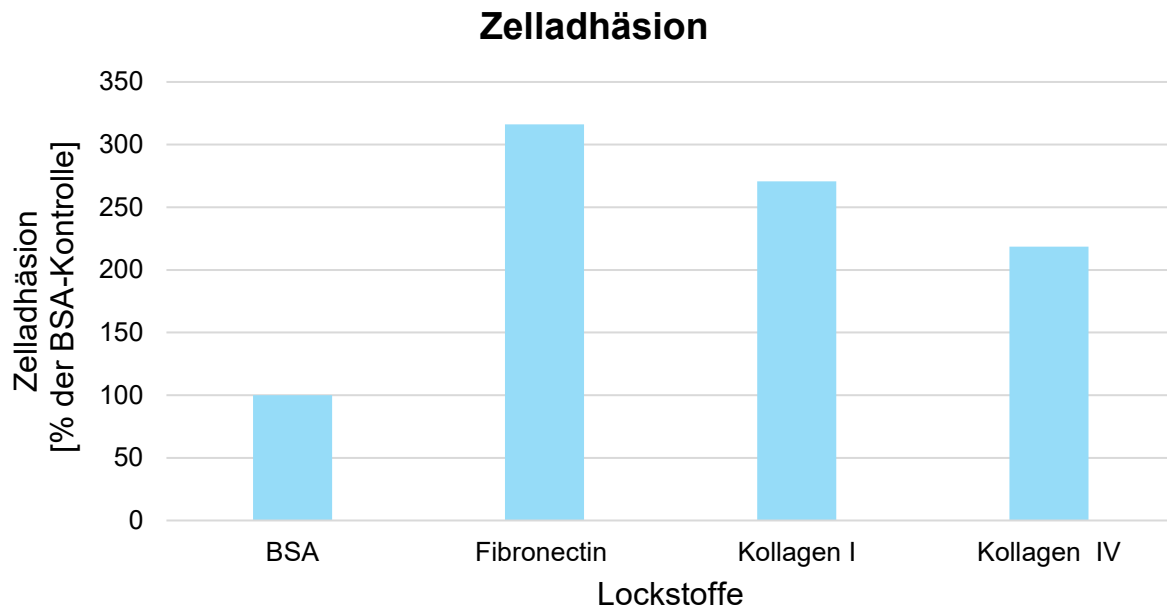


Abbildung 30: Adhäsion von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 an die EZM-Komponenten Fibronectin, Kollagen I sowie Kollagen IV. Angabe der Zelladhäsion bezogen auf eine BSA-Kontrolle in Prozent.

4.3.2 Zellproliferation nach CBX5- und KDM5B-Knockdown

Der Einfluss von CBX5 und KDM5B auf die Zellproliferation wurde an Zellen der triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 untersucht, in denen die Expression von CBX5 oder KDM5B zuvor temporär durch einen siRNA-Knockdown reduziert worden war. Dafür wurden die Zellen, einen Tag, nachdem sie in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät worden waren, mit CBX5-, KDM5B- oder Kontroll-siRNA transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion auf 96-Well-Platten ausgesät. Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte jeweils 72 und 96 Stunden nach Transfektion mit Hilfe eines BrdU-Assays. Insgesamt wurden drei Versuchsdurchläufe durchgeführt und die Mittelwerte gebildet.

Bezogen auf die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurde bei den mit *CBX5*-siRNA transfizierten Zellen sowohl 72 als auch 96 Stunden nach Transfektion ein signifikanter Rückgang der Zellproliferation um ca. 19 % bzw. ca. 22 % beobachtet (Abbildung 31 und Abbildung 32). Dies legt nahe, dass bei Verringerung der CBX5-Expression ein negativer Effekt auf die Zellproliferation besteht. Bei mit *KDM5B*-siRNA-transfizierten Zellen ließ sich hingegen keine signifikante Veränderung der Zellproliferation nachweisen.

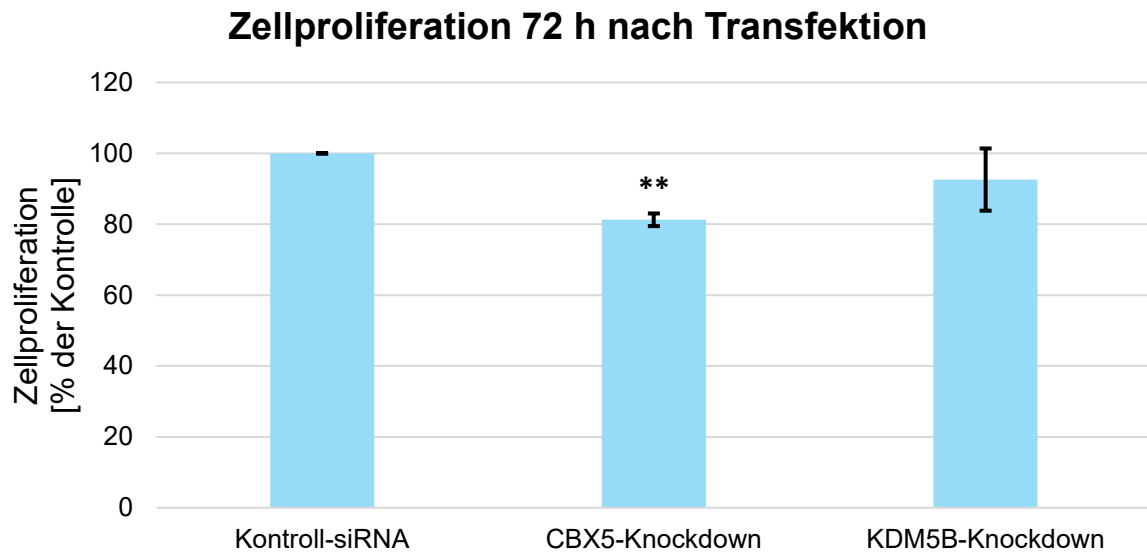


Abbildung 31: Zellproliferation von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit *CBX5*- bzw. *KDM5B*-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Die Zellproliferation ist angegeben in Prozent der Kontrolle. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchsdurchläufen sowie die entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Tests ermittelt, ** $p < 0,01$. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

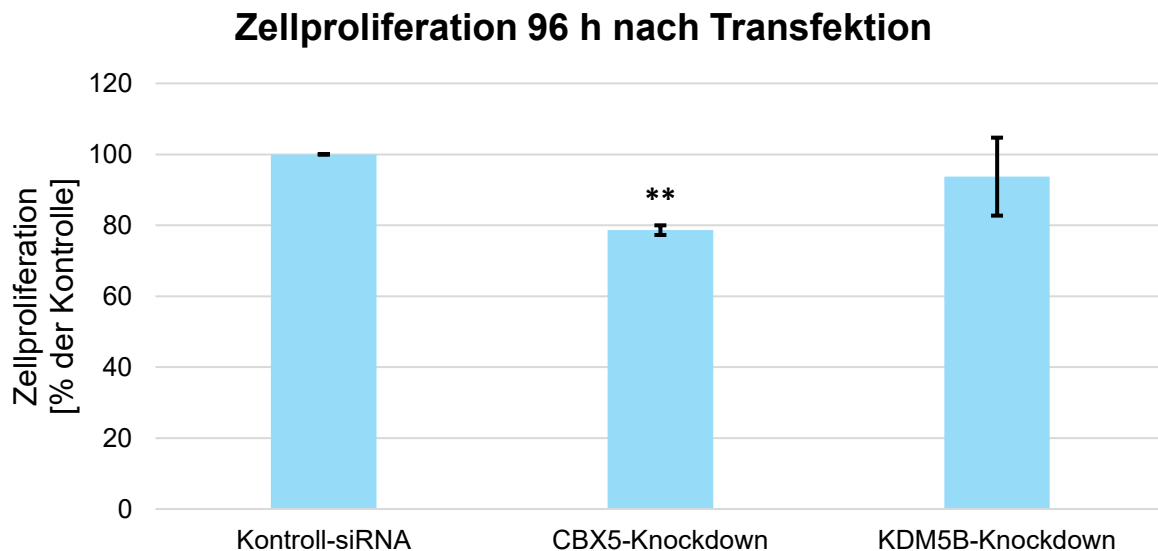


Abbildung 32: Zellproliferation von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 96 Stunden nach siRNA-Transfektion mit *CBX5*- bzw. *KDM5B*-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Die Zellproliferation ist angegeben in Prozent der Kontrolle. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchsdurchläufen sowie die entsprechenden Standardabweichungen.

Signifikanzen wurden mittels t-Tests ermittelt, ** $p < 0,01$. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

4.3.3 Zellviabilität nach CBX5- und KDM5B-Knockdown

Analog zur Untersuchung der Zellproliferation wurde der Einfluss von CBX5 und KDM5B auf die Zellviabilität an Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 mit durch siRNA-Knockdown reduzierter CBX5 bzw. KDM5B-Expression analysiert. Der Versuchsaufbau glich dem der Bestimmung der Zellproliferation. Allerdings wurden nun jeweils 72 und 96 Stunden nach Transfektion die Zellviabilität mit einem *Alamar Blue* Assay gemessen. Auch hier wurden jeweils drei Versuchsdurchläufe durchgeführt und die Mittelwerte gebildet.

Bei der Zellviabilität zeigte sich, bezogen auf die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen, bei den mit *CBX5*-siRNA transfizierten Zellen zu beiden Messzeitpunkten ein statistisch jedoch nicht signifikanter Trend in Richtung Verminderung der Zellviabilität, Diese blieb hingegen bei den mit *KDM5B*-siRNA transfizierten Zellen weitestgehend unverändert (Abbildung 33 und Abbildung 34).

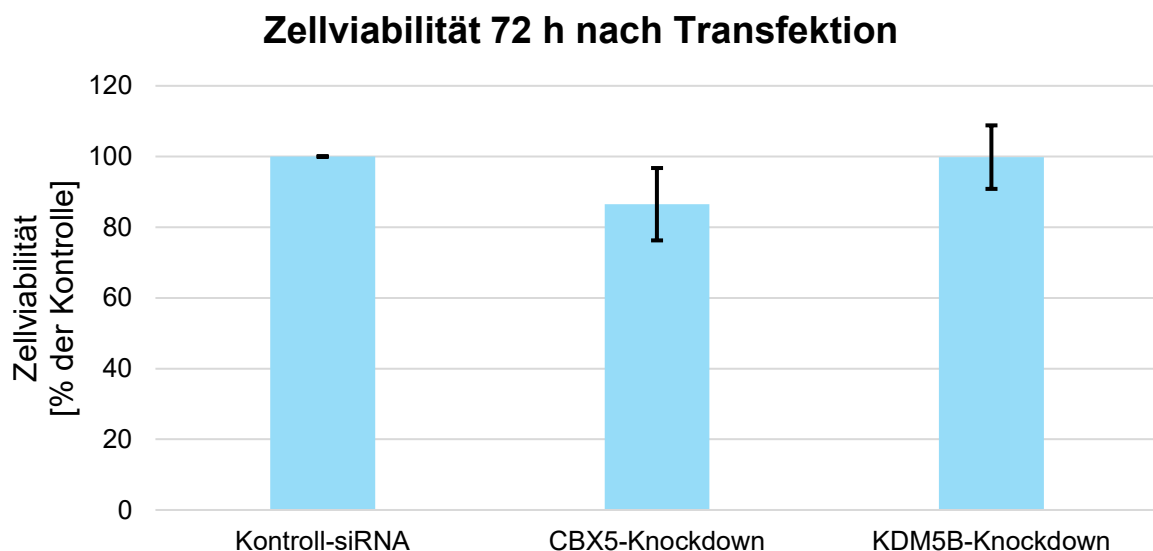


Abbildung 33: Viabilität von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit *CBX5*- bzw. *KDM5B*-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Die Zellviabilität ist angegeben in Prozent der Kontrolle. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchsdurchläufen sowie die entsprechenden Standardabweichungen.

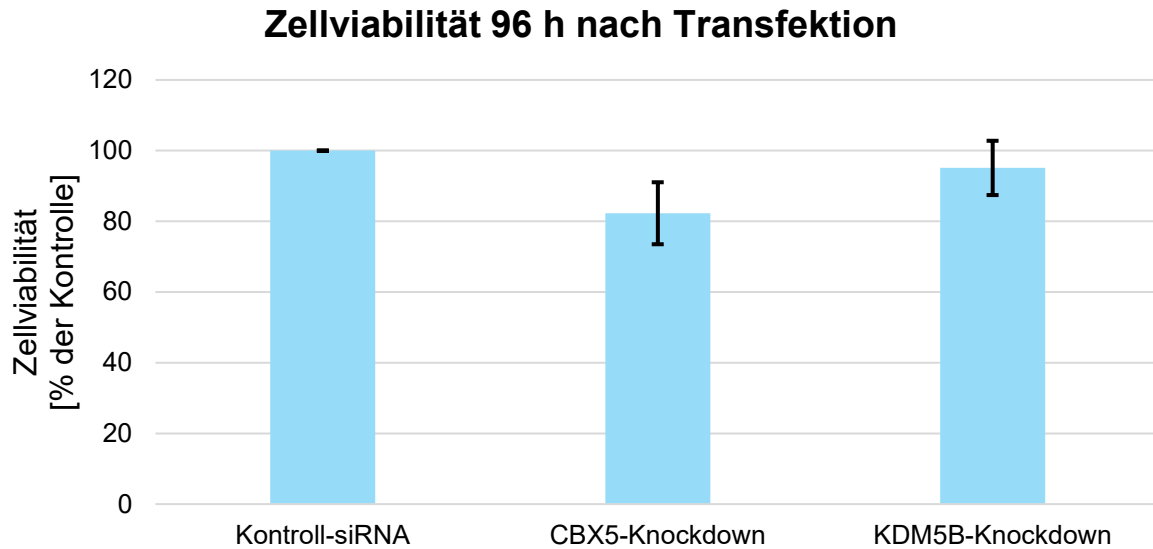


Abbildung 34: Viabilität von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 96 Stunden nach siRNA-Transfektion mit *CBX5*- bzw. *KDM5B*-siRNA, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Die Zellviabilität ist angegeben in Prozent der Kontrolle. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchsdurchläufen sowie die entsprechenden Standardabweichungen.

4.3.4 Zelladhäsion nach *CBX5*- und *KDM5B*-Knockdown

Auch die Analyse des Einflusses von *CBX5* und *KDM5B* auf die Zelladhäsion erfolgte mit Zellen der Zelllinie MDA-MB-468, in denen die Expression von *CBX5* oder *KDM5B* durch siRNA-Knockdown reduziert war. Der Adhäsions-Assay wurde jeweils 48 und 72 Stunden nach Transfektion der Zellen mit *CBX5*-, *KDM5B*- bzw. Kontroll-siRNA durchgeführt. Dabei wurde die Adhäsion der transfizierten Zellen auf mit Kollagen I beschichteten Wellplatten gemessen und mit einer BSA-Kontrolle mit unbehandelten Zellen verglichen. Es erfolgten jeweils drei bzw. vier Versuchsdurchläufe und die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Während sich 48 Stunden nach Transfektion bei den mit *KDM5B*-siRNA transfizierten Zellen, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen, bereits ein leichter, statistisch nicht signifikanter Trend zu einer vermehrten Zelladhäsion erkennen ließ, war die Zelladhäsion 72 Stunden nach Transfektion signifikant um ca. 25 % erhöht (Abbildung 35 und Abbildung 36). Hier lässt sich bei verminderter *KDM5B*-Expression ein positiver Effekt auf die Zelladhäsion vermuten. Auch bei den mit *CBX5*-siRNA-transfizierten Zellen ließ sich ein statistisch nicht signifikanter Trend zu einer erhöhten Zelladhäsion erkennen. Im Vergleich zur BSA-Kontrolle war in allen Fällen eine deutliche Zelladhäsion erkennbar.

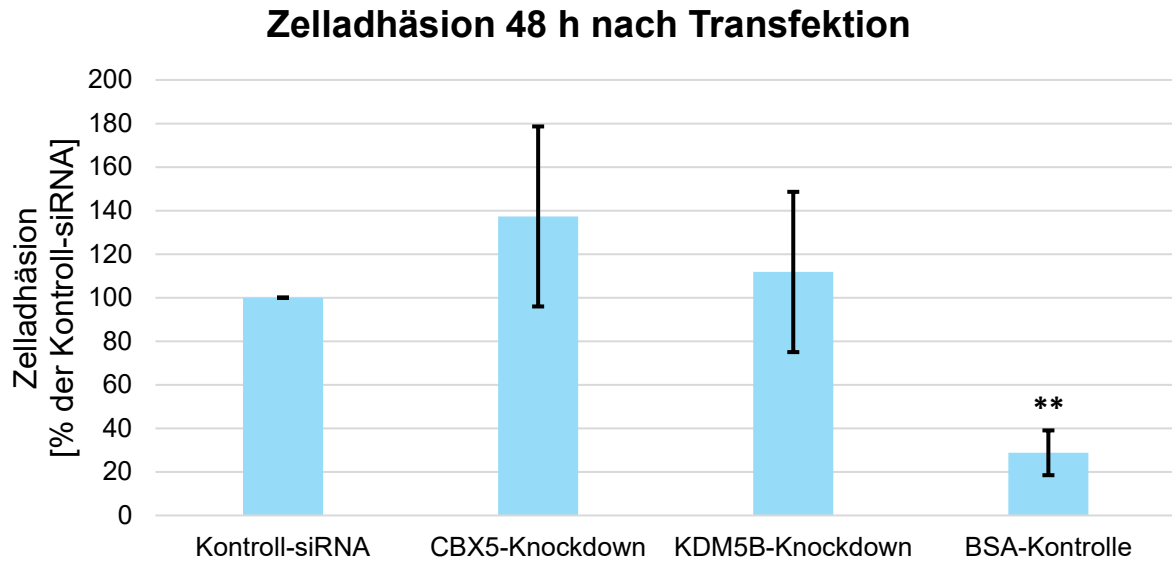


Abbildung 35: Adhäsion von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 an mit Kollagen I beschichteten Wellplatten. 48 Stunden nach siRNA-Transfektion mit *CBX5*- bzw. *KDM5B*-siRNA sowie eine BSA-Kontrolle mit unbehandelten Zellen, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Die Zelladhäsion ist angegeben in Prozent der Kontrolle mit Kontroll-siRNA. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchsdurchläufen sowie die entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Tests ermittelt, ** $p < 0,01$. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

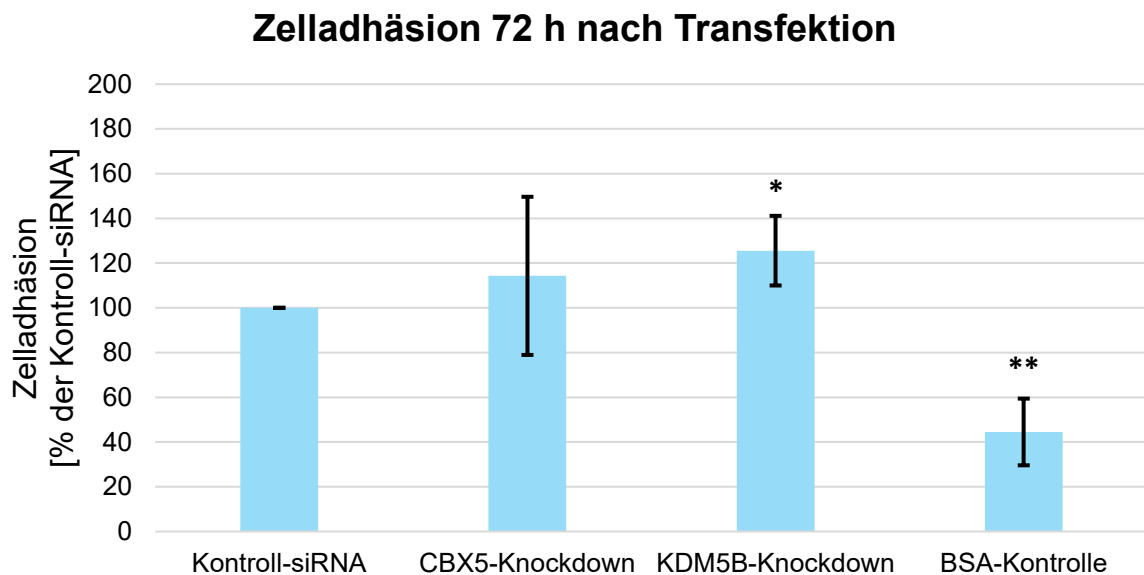


Abbildung 36: Adhäsion von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 an mit Kollagen I beschichteten Wellplatten. 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit *CBX5*- bzw. *KDM5B*-siRNA sowie eine BSA-Kontrolle mit unbehandelten Zellen, bezogen auf mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Die Zelladhäsion ist angegeben in Prozent der Kontrolle mit Kontroll-siRNA. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte aus vier Versuchsdurchläufen sowie die entsprechenden Standardabweichungen.

Signifikanzen wurden mittels t-Tests ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

4.3.5 Zellmigration nach CBX5- und KDM5B-Knockdown

Der Einfluss von CBX5 und KDM5B auf die Zellmigration wurde ebenfalls an Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 mit reduzierter Expression von CBX5 oder KDM5B durch siRNA-Knockdown untersucht. Hierfür erfolgten 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit *CBX5*-, *KDM5B*- bzw. Kontroll-siRNA ein Medienwechsel auf serumfreies Medium. 72 Stunden nach Transfektion wurde dann ein 16-stündiger Zellmigrationsassay begonnen. Dabei migrierten die transfizierten Zellen in Richtung des Lockstoffes Kollagen I, während unbehandelte Zellen in Richtung einer Kontrolle mit serumfreiem Medium migrierten. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, und die Mittelwerte wurden bestimmt.

Es zeigte sich, verglichen mit den mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen, sowohl bei den mit *CBX5*- als auch bei den mit *KDM5B*-siRNA-transfizierten Zellen der deutliche Trend einer gesteigerten Zellmigration (Abbildung 37). Im Vergleich zur Kontrolle in Richtung serumfreien Medium war überall eine klare Zellmigration erkennbar.

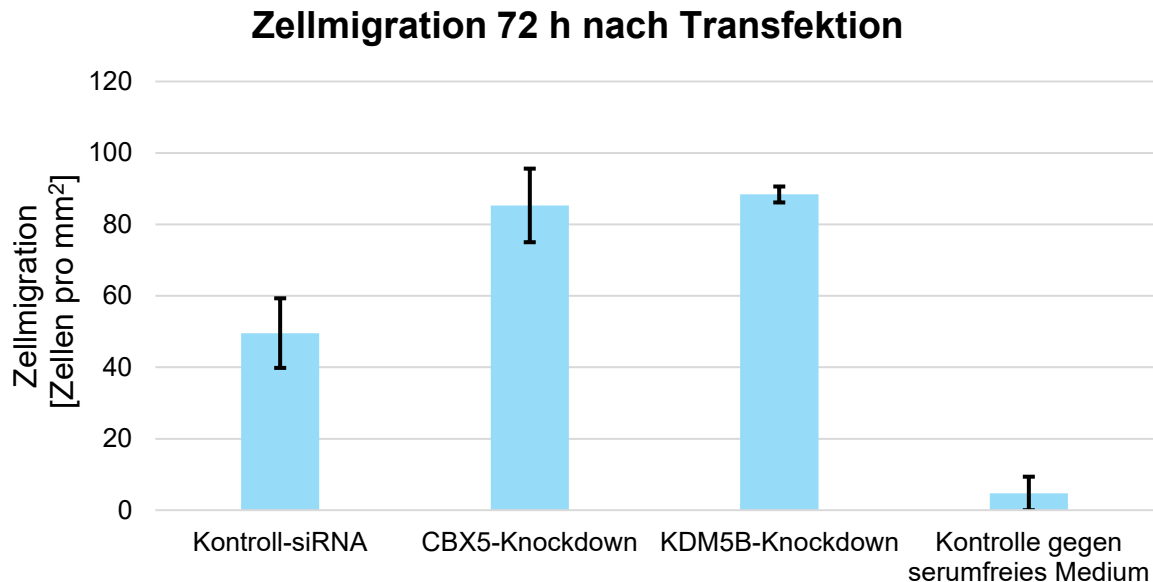


Abbildung 37: Migration von Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- bzw. Kontroll-siRNA bei Verwendung des Lockstoffs Kollagen I in einer Boydenkammer. Als Kontrolle diente serumfreies Medium. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte aus zwei Versuchsdurchläufen sowie die entsprechenden Standardabweichungen.

5 Diskussion

5.1 CBX5-Expression

In allen verwendeten Zelllinien konnte eine deutliche Expression von CBX5 nachgewiesen werden (Abbildung 17). Da CBX5 demnach nicht nur in den vier untersuchten TNBC-Zelllinien MDA-MB231, MDA-MB-468, HS-578T und BT-549, sondern ebenfalls in der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 sowie der normalen Brustepithelzelllinie MCF-10A exprimiert wird, ist CBX5 kein Protein, das TNBC-spezifisch oder tumorspezifisch exprimiert wird. Stattdessen sprechen die Ergebnisse dafür, dass CBX5 in allen Zellen vorkommt.

Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Untersuchungen, die von einer CBX5-Expression in den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, HS-578T und BT-549 berichten. Während CBX5 in den MCF-7-Zellen stark exprimiert wird, ist die CBX5-Expression in den invasiven TNBC-Zelllinien im Vergleich zu MCF-7 geringer exprimiert (210, 211). Trotzdem wird CBX5 auch in diesen Zellen stärker exprimiert als in nicht-tumorösen Zellen und wird somit im Mamakarzinom insgesamt stärker exprimiert (207).

Die Expression von CBX5 zeigt sich in allen Zelllinien primär auf den Zellkern beschränkt und CBX5 lässt sich teilweise spezifisch in Heterochromatinarealen lokalisieren. Dies wird besonders in Zellen deutlich, die beim Durchlaufen der Zellteilung in unterschiedlichen Mitosestadien dargestellt wurden, in denen die DNA kondensiert vorlag (Abbildung 19). Die hier nachgewiesene Lokalisation der CBX5-Expression ist somit vereinbar mit der Funktion von CBX5 als Komponente der Heterochromatinorganisation (166). Auch die Rolle von CBX5 beim Zellzyklus und in der Mitose lässt sich mit der beschriebenen Lokalisation der CBX5-Expression in Einklang bringen. Obwohl im Laufe der Mitose ein Großteil von CBX5 vom Chromatin dissoziiert, kann auch während der Mitose CBX5, vor allem in den perizentrischen Regionen der kondensierten Chromosomen, detektiert werden (304). Auch neuere Untersuchungen bestätigen eine Präsenz von CBX5 an Chromosomen während der Mitose. Neben der fokalen Lokalisation in den perizentrischen Regionen wird zusätzlich auch eine CBX5-Präsenz an Chromosomenarmen beschrieben (305).

Sowohl seine regulatorische Funktion bei der Kontrolle der Genexpression durch Chromatinorganisation als auch seine für das Voranschreiten des Zellzyklus und der Mitose wichtige Rolle demonstrieren die besondere Relevanz von CBX5 für die

Zellfunktion. Dazu passt der Nachweis einer CBX5-Expression in allen untersuchten Zelllinien, insbesondere in der normalen Brustepithelzelllinie MCF-10A.

5.2 KDM5B-Expression

5.2.1 KDM5B-Expression in Zelllinien und Gewebe

Ähnlich wie für CBX5 konnte auch eine Expression von KDM5B in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 20). Da KDM5B sowohl in den vier TNBC-Zelllinien als auch in der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 sowie der normalen Brustepithelzelllinie MCF-10A exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass KDM5B nicht TNBC-spezifisch oder tumorspezifisch exprimiert wird und auch in gesunden Zellen vorkommt.

Allerdings geht man davon aus, dass die KDM5B-Expression in Mammakarzinomgewebe hochreguliert und mit steigender Invasivität stärker ausgeprägt ist (249). Die hier gewonnenen Erkenntnisse decken sich außerdem mit Untersuchungen, die ebenfalls eine KDM5B-Expression in den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 beschreiben. Dabei wird interessanterweise berichtet, dass die KDM5B-Expression in der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 am stärksten ausgeprägt ist (250). Andere Quellen wiederum berichten gegenteilig von einer höheren KDM5B-Expression in MDA-MB-231 (267). Auch in der Zelllinie MCF-10A konnte bereits eine KDM5B-Expression nachgewiesen werden, auch wenn diese deutlich geringer ausfiel als in der MCF-7-Zelllinie (271).

In normalem adultem Gewebe wird KDM5B am stärksten im Hoden exprimiert (306). Dies lässt sich wiederum durch die Betrachtung der Bedeutung von KDM5B in der Embryonalentwicklung und Pubertät erklären. Dort spielt KDM5B eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Milchdrüsen, bei denen im Knospenstadium eine hohe KDM5B-Expression nachgewiesen werden konnte (246). Außerdem scheint KDM5B eng mit dem Östrogenhaushalt verknüpft zu sein und wird zusätzlich mit mesenchymal/epithelialen Wechselwirkungen in Verbindung gebracht (248).

Vor diesem Hintergrund erscheint die hier nachgewiesene KDM5B-Expression in den TNBC-Zelllinien, der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 sowie den normalen, aber sich häufig und schnell teilenden Brustepithelzellen der Zelllinie MCF-10A realistisch. Auch die beschriebene hochregulierte KDM5B-Expression im

Mammakarzinomgewebe und die starke Ausprägung der KDM5B-Expression in der Zelllinie MCF-7 lassen sich damit in Einklang bringen.

KDM5B wird auch in einer Vielzahl anderer Tumorentitäten überexprimiert (307). So ist KDM5B beispielsweise im Prostatakarzinom an der Regulation der Androgenrezeptor-Expression beteiligt (308). Dies unterstreicht den vermuteten Einfluss von KDM5B auf den Hormonhaushalt und die Relevanz von KDM5B in hormonabhängigen Tumoren.

5.2.2 Lokalisation der KDM5B-Expression

Eine häufig beschriebene spezifische nukleare Lokalisation der KDM5B-Expression (236, 243, 254, 255, 326) ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig nachweisen. Stattdessen legen die hier gemachten Beobachtungen eine sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorhandene Expression von KDM5B nahe (Abbildung 22).

Während eine nukleare KDM5B-Lokalisation und auch die beobachtete Betonung einiger Kernareale mit der Funktion von KDM5B als Histon-Demethylase kongruent sind und sich so erklären lassen, wirft die zytoplasmatische KDM5B-Lokalisation Fragen auf. Zwar ist bereits bekannt, dass KDM5B neben seinem regulatorischen Einfluss auf die Genexpression zusätzlich an einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen beteiligt ist (Abbildung 6), doch über seine zytoplasmatische Funktion oder dahinterstehende Mechanismen ist, trotz einiger Berichte über eine zusätzliche zytoplasmatische KDM5B-Expression, wie beispielsweise in ösophagealem Plattenepithelkarzinomgewebe (309), Prostatakarzinomgewebe oder normalem Prostatagewebe (308), wenig bekannt.

Propagiert wird beispielsweise eine Abhängigkeit der KDM5B-Lokalisation von der Zellzyklusphase. Demnach kommt es durch eine CDK1-vermittelte Phosphorylierung von KDM5B zu einer Verschiebung von KDM5B in den Zellkern. Die Aktivität der CDK1 ist während der G2/M-Phase des Zellzyklus am stärksten ausgeprägt. Auf der anderen Seite kommt es bei einem Knockdown von CDK1 zu einer Verschiebung eines geringen nuklearen KDM5B-Anteils in das Zytoplasma (262).

Eine zytoplasmatische KDM5B-Lokalisation in einigen Zellzyklusphasen wurde beispielsweise bereits in Lungenkarzinomzelllinien beschrieben (253). Diese Beobachtung passt dazu, dass die in dieser Arbeit untersuchten, sich schnell teilenden

Zelllinien vor der Fixierung in einem dynamischen Umfeld einer stetigen Proliferation unterlagen und so Zellen in unterschiedlichen Abschnitten des Zellzyklus angetroffen wurden. Eine erhöhte zytoplasmatische Expression von KDM5B wurde außerdem insbesondere in metastatischen Tumoren festgestellt (308).

Denkbar wäre auch eine Abhängigkeit der KDM5B-Lokalisation von einer AKT-vermittelten Phosphorylierung, ähnlich wie es bei KDM5A der Fall ist. Während KDM5A unter normalen Wachstumsbedingungen sowohl nuklear als auch zytoplasmatisch lokalisiert ist, kommt es bei einer Inhibition von AKT zu einer Verschiebung von KDM5A in den Zellkern. Auch eine AKT-Inaktivierung durch Serumentzug erhöht den nuklearen KDM5A-Anteil, wohingegen eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu einer Verlagerung von KDM5A in das Zytoplasma führt. In Tumoren mit aktiviertem PI3K-Signalweg kommt es dementsprechend zu einer starken zytoplasmatischen Lokalisation von KDM5A (310).

Diese Wechselwirkung ist besonders interessant, da KDM5B im Zellkern durch Modulation der H3K4me3-Markierung am *PTEN*-Promotor die Expression von PTEN unterdrückt und somit dem PI3K-Signalweg die negative Regulation nimmt (268). Bei geringer AKT-Aktivität könnte sich dann beispielsweise KDM5B im Zellkern anreichern und durch die Unterdrückung von PTEN den PI3K-Signalweg und somit die AKT-Aktivität verstärken. Zusätzlich dazu führt KDM5B auch zu einer direkten Verstärkung des PI3K/AKT-Signalwegs, was eine erhöhte Zellproliferation zur Folge hat (269). Von den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien verfügen die Zelllinien MCF-7 und HS-578T über Mutationen im *PIK3CA*-Gen und die Zelllinien MDA-MB-468 und BT-549 über Mutationen im *PTEN*-Gen (36, 279). Anhand der in dieser Arbeit verwendeten qualitativen Auswertung der immunocytochemischen Färbungen konnten allerdings keine relevanten Zusammenhänge zwischen der KDM5B-Expression und *PIK3CA*- oder *PTEN*-Mutationen festgestellt werden.

Eine andere Theorie geht wiederum davon aus, dass die Lokalisierung und Funktion von KDM5B stark durch Ubiquitinierung beeinflusst und reguliert werden. So konnte gezeigt werden, dass ein Skp2-Mangel zu einer Zunahme der K63-verknüpften Ubiquitinierung von KDM5B durch die E3-Ubiquitin-Ligase TRAF6 führt, was die Demethylase-Aktivität verstärkt und mit einer Anreicherung von KDM5B in den Nukleoli von Prostatakarzinomzellen einhergeht (311). Eine Anreicherung von KDM5B

in den Nukleoli passt zu den teilweise beobachteten Betonungen einiger Kernareale in der immunocytochemischen Färbung (Abbildung 21).

5.3 Einflüsse der siRNA-Transfektion auf die Ergebnisse der Zellfunktionsversuche

Eine siRNA-Transfektion ist für Zellen ein herausfordernder Prozess, dessen Auswirkungen auf die Zellen die Ergebnisse der darauffolgenden Zellfunktionsversuche beeinflussen können. Dementsprechend besteht die Gefahr, auf die Transfektion zurückzuführende Veränderungen fälschlicherweise als durch den Knockdown von *CBX5* oder *KDM5B* verursachte Ereignisse zu bewerten.

Zum einen gilt es, den Einfluss der Transfektion auf die Zellen möglichst gering zu halten. Dies gelingt beispielsweise durch Reduktion der Konzentration des eingesetzten zytotoxischen Transfektionsreagenz, wobei die Transfektionseffizienz nicht durch eine zu geringe Konzentration gefährdet werden darf (312, 313). In dieser Arbeit wurde zwar eine gute Knockdowneffizienz bestätigt, allerdings besteht durchaus noch Potenzial, mögliche zytotoxische Effekte durch Reduktion der Konzentration des Transfektionsreagenz zu minimieren.

Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, potenzielle Einflüsse der Transfektion zu negieren, indem alle Ergebnisse in Bezug auf eine mitgeführte, mit Kontroll-siRNA transfizierte Kontrolle bewertet werden. Auch in dieser Arbeit erfolgte eine Normierung aller Ergebnisse auf eine solche Kontrolle.

Allerdings können nicht alle durch Transfektion oder Knockdown verursachten Effekte so herausgefiltert werden. Beim Einsatz von siRNAs kommt es beispielsweise häufig zu Off-Target-Effekten (314). Deshalb ist es wichtig, die siRNA-Konzentration so niedrig wie möglich zu halten. Auch hier besteht noch Potenzial für Optimierungen. Gleichzeitig darf die siRNA-Konzentration auch nicht zu gering sein, da es bei der Proliferation von transfizierten Zellen zu einer Verdünnung der siRNA kommt, wodurch die Knockdowneffizienz gefährdet werden kann (315).

Außerdem ist es möglich, dass Varianzen in der Knockdowneffizienz die Versuchsergebnisse beeinflussen. Zwar wurde die Knockdowneffizienz zu Beginn über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach Transfektion mittels qPCR analysiert, bei Durchführung der Zellfunktionsversuche allerdings nur noch stichprobenartig ermittelt. Zusätzlich dazu lagen einige der Versuchszeitpunkte bis zu 96 Stunden nach

Transfektion und somit außerhalb des zuvor untersuchten Zeitraums. Jedoch zeigten die durchgeführten Stichproben hier weiterhin eine ausreichende Knockdowneffizienz.

Die langen Versuchszeiträume mit 72 bzw. 96 Stunden nach Transfektion wurden gewählt, um sicherzustellen, dass der Knockdown auch auf Proteinebene realisiert war. In dieser Arbeit wurde die Knockdowneffizienz nur auf mRNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene überprüft.

Eine weitere Möglichkeit, um Versuchsergebnisse nach Knockdown zu verifizieren, sind sogenannte Rescue-Versuche. In diesem Fall könnte beispielsweise zusätzlich untersucht werden, ob eine Überexpression von CBX5 oder KDM5B die durch den Knockdown beobachteten Effekte wieder aufhebt.

5.4 Einfluss der CBX5-Expression auf die Zellfunktion

In den nach CBX5-Knockdown durchgeführten Zellfunktionsversuchen wurden eine verstärkte Zellmigration, eine signifikant reduzierte Zellproliferation sowie eine tendenziell erhöhte Zelladhäsion und tendenziell reduzierte Zellviabilität in Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 beobachtet.

Eine Verstärkung der Zellmigration bei CBX5-Verlust deckt sich mit einer Vielzahl von ähnlichen Berichten aus der Literatur. Beispielsweise wurde in invasiven TNBC-Zelllinien im Vergleich zur Zelllinie MCF-7 eine Downregulation von CBX5 festgestellt (210, 211). Auch in Mammakarzinom-Metastasen wurde im Vergleich zum Primärtumor eine reduzierte CBX5-Expression beobachtet (211). Während eine CBX5-Überexpression in der invasiven MDA-MB-231-Zelllinie in einer Reduktion der Invasivität resultierte, kam es bei einem CBX5-Knockdown in MCF-7-Zellen zu einer Verstärkung der Invasivität (212). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird CBX5 auch als Metastasensuppressor bezeichnet (175).

Obwohl CBX5 in Zellen mit erhöhter Zellproliferation verstärkt exprimiert wird, wurde bisher bei Downregulation von CBX5 kein Effekt auf die Zellproliferation nachgewiesen (207, 212). Allerdings wurde bei CBX5-Downregulation ein vermehrtes Auftreten von fehlerhaften Mitosevorgängen beobachtet. Daraus entstand die Theorie, dass die CBX5-Expression in Tumorzellen mit verstärkter Zellproliferation reflektorisch erhöht ist, um eine fehlerfreie Mitose mit korrekter Chromosomenteilung zu gewährleisten (207). Unterstützt wird diese Theorie durch neuere Erkenntnisse, nach denen der Verlust von CBX5 kurzfristig keinen relevanten Einfluss auf die Transkription oder

Histonmethylierung hat. Stattdessen kommt es ohne CBX5 zu fehlerhafter Chromosomenanordnung und -segregation, resultierend in unzureichenden Mitoseereignissen (305).

Diese oben beschriebenen Beobachtungen stehen im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine Reduktion der Zellproliferation nach *CBX5*-Knockdown zeigen. Dabei lässt sich eigentlich insbesondere eine Reduktion der Zellproliferation mit der postulierten Theorie der fehlerhaften Mitosevorgänge in Einklang bringen. Demnach könnte es durch den Verlust von CBX5 zu einer Vielzahl von fehlerhaften Mitosevorgängen in der untersuchten Zellpopulation kommen, die in Zellzyklus-arresten resultieren. Denkbar wären insbesondere Zellzyklusarreste am Spindel-Assembly-Checkpoint oder nach fehlerhafter Chromosomensegregation in der Anaphase, p53-vermittelt am G1-Checkpoint (316, 317). Außerdem kommt es ohne die mitosespezifische Phosphorylierung an der Hinge-Domain von CBX5 zu keiner Bindung von SGO1 an mitotische Zentromere und somit zum Zellzyklusarrest in der Prometaphase (197, 198).

Interessanterweise führt unabhängig davon das Silencing der lncRNA *SNHG11* zu einer Unterdrückung der CBX5-Expression, was mit einer Reduktion der Zellproliferation, der Zellviabilität und der verstärkten Expression von E-Cadherin, die mit erhöhter Zelladhäsion assoziiert wird, einhergeht. Dies unterstreicht die wichtige Rolle von regulatorischen Mechanismen, die auf die CBX5-Expression einwirken (214).

5.5 Einfluss der KDM5B-Expression auf die Zellfunktion

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Zellfunktionsversuchen mit Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 nach *KDM5B*-Knockdown wurde eine Verstärkung der Zellmigration und der Zelladhäsion festgestellt. Letztere war 72 Stunden nach Knockdown signifikant erhöht. Die Zellproliferation und die Zellviabilität hingegen blieben weitestgehend unverändert.

Diese Ergebnisse stehen in starkem Gegensatz zu der gängigen Literatur. Dort wird beispielsweise eine verringerte Zellproliferation von MCF-7-Zellen in Kombination mit einem G1-Zellzyklusarrest nach *KDM5B*-Knockdown beschrieben (251). Neben einer Verringerung der Zellproliferation gibt es auch Hinweise auf eine Reduktion der Zellmigration nach Knockdown von *KDM5B*. Dabei werden diese Beobachtungen mit

einer nach *KDM5B*-Knockdown verstärkten Aktivierung des AMPK-Signalwegs in Verbindung gebracht, die eine Unterdrückung der Zellproliferation und Zellmigration in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zur Folge hat (267). Ähnliche Erkenntnisse wurden ebenfalls bei der Untersuchung anderer Tumorentitäten erlangt (253, 318). Dies passt dazu, dass eine *KDM5B*-Hochregulation im Mammakarzinom mit einer erhöhten Invasivität korreliert (249). Auch eine Überexpression von *KDM5B* in MCF-10A-Zellen führte zu einer gesteigerten Invasivität und wurde mit einer *KDM5B*-vermittelten Reduktion der *KAT5*-Expression verknüpft (319). Zusätzlich gibt es Berichte über eine Abnahme der Zellviabilität und Zunahme von Apoptose nach *KDM5B*-Verlust, die mit einer Inhibierung von Cyclin D1 oder einer Erhöhung der p53-Expression einhergehen (271, 320). Auch der Einsatz des *KDM5B*-Inhibitors AS-8351 bestätigte diese Ergebnisse (267).

Eine mögliche Erklärung für diese Gegensätze liegt in der Zelllinie MDA-MB-468, die in dieser Arbeit für die Zellfunktionsversuche verwendet wurde. Sie verfügt sowohl über eine *PTEN*- als auch eine *TP53*-Mutation (36). Ein *KDM5B*-Knockdown sorgt beispielsweise im HCC für eine verstärkte *PTEN*-Expression, was zu einer Reduktion der Zellproliferation und Metastasierung führt (268). In Zellen ohne oder mit lediglich reduzierter *PTEN*-Expression kann dieser Effekt demnach nicht, bzw. nur abgeschwächt beobachtet werden. Auch eine durch *KDM5B*-Verlust ausgelöste Verstärkung der p53-Expression und eine darauffolgende Zunahme der Apoptose kann in Zellen ohne oder mit reduzierter p53-Funktion nicht, bzw. nur abgeschwächt beobachtet werden (271). Die in der Literatur häufig verwendeten Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 hingegen verfügen beide nicht über eine *PTEN*-Mutation und lediglich MDA-MB-231 ist *TP53* mutiert (36, 279). Zusammengenommen können diese Theorien erklären, warum in dieser Arbeit keine relevanten Unterschiede in der Zellproliferation und Zellviabilität festgestellt werden konnten. Warum sich eine Verstärkung der Zellmigration darstellte, bleibt jedoch offen.

Lediglich hinsichtlich der Zelladhäsion decken sich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit bereits gemachten Beobachtungen. So wird eine verstärkte Expression von E-Cadherin nach *KDM5B*-Verlust beschrieben, die mit erhöhter Zell-Zell-Adhäsion assoziiert ist. Dies wird darauf zurückgeführt, dass ein Verlust von *KDM5B* in Mammakarzinomzellen zu einer Umkehrung der EMT beiträgt (267, 321). Diese EMT-Umkehr kann wiederum die Verstärkung der EZM-Adhäsion erklären.

Interessanterweise zeigt sich die Zelladhäsion in dieser Arbeit erst 72 Stunden nach dem siRNA-Knockdown signifikant erhöht, was daran liegen könnte, dass die Umkehrung der EMT etwas Zeit benötigt, um auf translationaler Ebene signifikant realisiert zu werden.

5.6 Die Rolle von CBX5 und KDM5B in der Tumorthherapie

5.6.1 Bedeutung der Lokalisation der CBX5- und KDM5B-Expression für die Immuntherapie

Durch die intrazelluläre bzw. primär intranukleare Lage von CBX5 und KDM5B kommt es, trotz Veränderung und Verschiebungen der Proteinlokalisierung in verschiedenen Zellzyklusphasen, zu keiner Expression der beiden Proteine auf der Zelloberfläche. Dementsprechend können beide Proteine nicht als Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen vom Immunsystem erkannt werden.

Dies steht in Diskrepanz zu den in vorausgehenden Projekten erlangten Erkenntnissen, denen zufolge CBX5 und KDM5B Zielstrukturen für die humorale, antikörpervermittelte Immunantwort von tumorinfiltrierenden Plasmazellen sind (155). Demnach müssen CBX5 und KDM5B in bestimmten Situationen für die Immunzellen zugänglich vorliegen, damit beispielsweise B-Zellen diese als Antigene binden, aufnehmen und dann über MHC-II-Moleküle präsentieren können, um nach Kontakt mit CD4+ T-Zellen weiter zu Plasmazellen zu differenzieren (322).

Eine mögliche Erklärung ist, dass CBX5 und KDM5B nach Zelluntergang, beispielsweise in Form von kleineren Nekrosen im Tumorgewebe, frei außerhalb der Zelle vorliegen und so für das Immunsystem zugänglich werden. Im Zuge eines schnellen Tumorwachstums, wie er in hochaggressiven TNBC-Tumoren vorkommt, kommt es durch eine mangelhafte Vaskularisierung regelhaft zu Hypoxie im Tumorgewebe, die im Zelluntergang einiger Tumorzellen resultiert (323, 324). Diese These unterstützend gibt es beispielsweise Berichte über ein erhöhtes Niveau von Anti-CBX5-Antikörpern bei Patienten nach Schlaganfall oder transienter ischämischer Attacke (325). Hypoxie wiederum stimuliert die Neovaskularisierung, an der beispielsweise KDM5B beteiligt ist (252). Passend dazu wird KDM5B bei Hypoxie hochreguliert (326).

Da CBX5 und KDM5B nicht auf der Zelloberfläche exprimiert werden, eignen sich beide Proteine nicht als direkte Targets für eine Immuntherapie, deren Ziel es ist, die Tumorzellen direkt mit tumorspezifischen Antikörpern oder CD8⁺ T-Zellen zu attackieren. Allerdings könnten beide Proteine, unter der Voraussetzung, dass sie beispielsweise nur in hypoxischem Tumorgewebe und nicht in gesundem Gewebe frei vorliegen, als eine Art Leitsystem fungieren, um mit Chemotherapeutika oder radioaktivem Material konjugierte Antikörper zielgerichtet ins Tumorgewebe zu navigieren und dort therapeutisch zu wirken oder das Tumorgewebe für diagnostische Zwecke zu markieren (327).

5.6.2 Bedeutung von CBX5 und KDM5B als Targets für andere Therapieformen

Aufgrund seines inversen Einflusses auf Zellproliferation und Zellmigration scheint CBX5 kein geeignetes Target für eine Anti-Tumorthherapie zu sein. Zwar könnte man durch eine CBX5-Überexpression die Metastasierung reduzieren, würde dafür jedoch das Tumorwachstum befeuern und umgekehrt. Allerdings hat CBX5 Potenzial als prognostischer Faktor für Metastasierung in der Diagnostik eingesetzt zu werden und könnte so Therapieentscheidungen beeinflussen (175).

Im Gegensatz dazu ist KDM5B ein vielversprechendes Therapieziel (277). Beispielsweise könnte ein KDM5B-Verlust zu einer Umkehr der EMT beitragen, wodurch beispielsweise, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Zelladhäsion verbessert und somit Metastasierung vermindert werden könnte (321).

5.7 Ausblick

Im weiteren Verlauf wäre es sinnvoll die Knockdowneffizienz des *CBX5*- bzw. *KDM5B*-Knockdowns zusätzlich auf Proteinebene zu validieren. Dies kann sowohl quantitativ mittels Western Blot als auch qualitativ mittels Immuncytochemie erfolgen. Immuncytochemische Färbungen von Knockdown-Zellen könnte man außerdem mit den bereits angefertigten immuncytochemischen Färbungen vergleichen und als Negativkontrolle etablieren. Außerdem ergibt es Sinn, den Knockdown auch in den anderen TNBC-Zelllinien sowie in den Zelllinien MCF-7 und MCF-10A zu etablieren und mit diesen ebenfalls die Zellfunktionsversuche durchzuführen, um herauszufinden, ob es zwischen den Zelllinien Unterschiede gibt. Besonders gewinnbringend wäre der Vergleich zwischen der Zelllinie MCF-7, die sowohl eine starke CBX5- als auch KDM5B-Expression aufweist, und den TNBC-Zelllinien. Interessant wäre zusätzlich auch zu sehen, wie die nicht-tumoröse Zelllinie MCF-10A

auf den Verlust von CBX5 oder KDM5B reagiert. Im Hinblick auf die Rolle von CBX5 oder KDM5B bei einer möglichen Immuntherapie sollte auch eine mögliche Expression der beiden Proteine auf der Zelloberfläche mittels FACS weiter untersucht werden.

Im Speziellen wäre außerdem interessant herauszufinden, ob KDM5B ähnlich wie KDM5A von AKT phosphoryliert werden kann. Dies könnte zum Verständnis der intrazellulären Verschiebung der KDM5B-Lokalisation und der Bedeutung von KDM5B für den PI3K-Signalweg beitragen. Darüber hinaus ist es auch sinnvoll, die Hormonabhängigkeit von KDM5B und den Einfluss von KDM5B in Östrogenrezeptor-positiven Tumoren näher zu analysieren.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte mittels Immuncytochemie eine Expression von CBX5 und KDM5B in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Demnach werden die beiden Proteine sowohl in allen vier TNBC-Zelllinien als auch in den Zelllinien MCF-7 und MCF-10A exprimiert. Dabei zeigte sich die Lokalisation von CBX5 primär auf den Zellkern und dortige Heterochromatinelemente beschränkt, wohingegen KDM5B sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma exprimiert wurde.

Außerdem wurde ein erfolgreicher siRNA-Knockdown von *CBX5* und *KDM5B* in Zellen der TNBC-Zelllinie MDA-MB-468 etabliert. Der siRNA-Knockdown von *CBX5* resultierte in einer verstärkten Zellmigration, einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation und einer tendenziell reduzierten Zellviabilität sowie einer tendenziell erhöhten Zelladhäsion. Ein siRNA-Knockdown von *KDM5B* hingegen führte zu einer Verstärkung der Zellmigration und Zelladhäsion, während Zellviabilität und Zellproliferation weitestgehend unverändert blieben.

Im Hinblick auf eine mögliche Immuntherapie muss im weiteren Verlauf geklärt werden, wie CBX5 und KDM5B dem Immunsystem zugänglich werden. Auch gilt es, die Beteiligung von CBX5 und insbesondere von KDM5B an einer Vielzahl von zellulären Mechanismen besser zu verstehen und die Rolle der beiden Proteine in Tumorzellen näher zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

1. Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *International journal of oncology*. 2020;57(6):1245-61.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2024;74(3):229-63.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-86.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
5. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2016;25(1):16-27.
6. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2017;26(4):444-57.
7. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015;72(2):333-8.
8. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *International journal of epidemiology*. 2005;34(2):405-12.
9. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast cancer research : BCR*. 2004;6(6):229-39.
10. Wojtyla C, Bertuccio P, Wojtyla A, La Vecchia C. European trends in breast cancer mortality, 1980-2017 and predictions to 2025. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2021;152:4-17.
11. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
12. Ghasemi-Kebria F, Fazel A, Semnani S, Etemadi A, Naeimi-Tabiei M, Hasanpour-Heidari S, et al. Breast cancer incidence trends in Golestan, Iran: An age-period-cohort analysis by ethnic region, 2004-2018. *Cancer epidemiology*. 2024;89:102525.
13. 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.
14. Joko-Fru WY, Jedy-Agba E, Korir A, Ogunbiyi O, Dzamalala CP, Chokunonga E, et al. The evolving epidemic of breast cancer in sub-Saharan Africa: Results from the African Cancer Registry Network. *International journal of cancer*. 2020;147(8):2131-41.
15. Sathishkumar K, N V, Badwe RA, Deo SVS, Manoharan N, Malik R, et al. Trends in breast and cervical cancer in India under National Cancer Registry Programme: An Age-Period-Cohort analysis. *Cancer epidemiology*. 2021;74:101982.
16. Sun K, Lei L, Zheng R, Zhang S, Zeng H, Wang S, et al. Trends in Incidence Rates, Mortality Rates, and Age-Period-Cohort Effects of Female Breast Cancer - China, 2003-2017. *China CDC weekly*. 2023;5(15):340-6.
17. Arnold M, Morgan E, Rumgay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2022;66:15-23.
18. Ronckers C, Spix C, Trübenbach C, Katalinic A, Christ M, Cicero A, et al. Krebs in Deutschland für 2019/2020. 14. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin. 2023.

19. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *The British journal of radiology*. 2022;95(1130):20211033.
20. Turashvili G, Brogi E. Tumor heterogeneity in breast cancer. *Frontiers in medicine*. 2017;4:227.
21. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3786-8.
22. Tsuda H. Histological classification of breast tumors in the General Rules for Clinical and Pathological Recording of Breast Cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*. 2020;27(3):309-21.
23. Schnitt SJ. Will molecular classification replace traditional breast pathology? *International journal of surgical pathology*. 2010;18(3 Suppl):162s-6s.
24. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET clinics*. 2018;13(3):325-38.
25. Cummings MC, Chambers R, Simpson PT, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer: is it time to pack up our microscopes? *Pathology*. 2011;43(1):1-8.
26. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(36):5652-7.
27. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
28. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74.
29. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418-23.
30. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(18):10393-8.
31. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(15):1879-87.
32. Asleh K, Riaz N, Nielsen TO. Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2022;41(1):265.
33. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*. 2017;8(16):3131-41.
34. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *International journal of cancer*. 2008;123(1):236-40.
35. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24(2):157-67.
36. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(7):2750-67.
37. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The oncologist*. 2013;18(2):123-33.
38. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS one*. 2016;11(6):e0157368.

39. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(7):1688-98.
40. He Y, Jiang Z, Chen C, Wang X. Classification of triple-negative breast cancers based on Immunogenomic profiling. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2018;37(1):327.
41. Liu Q, Wang X. Classification of triple-negative breast cancer based on pathway enrichment levels. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2023;40(6):157.
42. Stecklein SR, Barlow W, Pusztai L, Timms K, Kennedy R, Logan GE, et al. Dual Prognostic Classification of Triple-Negative Breast Cancer by DNA Damage Immune Response and Homologous Recombination Deficiency. *JCO precision oncology*. 2023;7:e2300197.
43. Yang X, Tang W, He Y, An H, Wang J. A novel fatty-acid metabolism-based classification for triple negative breast cancer. *Aging*. 2023;15(4):1177-98.
44. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(5):R68.
45. Prado-Vázquez G, Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Arevalillo JM, Zapater-Moros A, Ferrer-Gómez M, et al. A novel approach to triple-negative breast cancer molecular classification reveals a luminal immune-positive subgroup with good prognoses. *Scientific reports*. 2019;9(1):1538.
46. Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, Sørbye T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nature communications*. 2020;11(1):1787.
47. Tarantino P, Hamilton E, Tolane SM, Cortes J, Morganti S, Ferraro E, et al. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(17):1951-62.
48. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Seminars in cancer biology*. 2021;72:123-35.
49. Agostinetto E, Rediti M, Fimereli D, Debien V, Piccart M, Aftimos P, et al. HER2-Low Breast Cancer: Molecular Characteristics and Prognosis. *Cancers*. 2021;13(11).
50. Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, Paré L, Pascual T, Conte B, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *NPJ breast cancer*. 2021;7(1):1.
51. Hu XE, Yang P, Chen S, Wei G, Yuan L, Yang Z, et al. Clinical and biological heterogeneities in triple-negative breast cancer reveals a non-negligible role of HER2-low. *Breast cancer research : BCR*. 2023;25(1):34.
52. Modi S, Park H, Murthy RK, Iwata H, Tamura K, Tsurutani J, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(17):1887-96.
53. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
54. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer discovery*. 2019;9(2):176-98.
55. Andre F, Pusztai L. Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nature clinical practice Oncology*. 2006;3(11):621-32.
56. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
57. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1160-7.
58. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2012;5(7):887-900.

59. Cavallaro S, Paratore S, de Snoo F, Salomone E, Villari L, Buscarino C, et al. Genomic analysis: toward a new approach in breast cancer management. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2012;81(3):207-23.
60. Russnes HG, Navin N, Hicks J, Borresen-Dale AL. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3810-8.
61. Kim C, Gao R, Sei E, Brandt R, Hartman J, Hatschek T, et al. Chemoresistance evolution in triple-negative breast cancer delineated by single-cell sequencing. *Cell*. 2018;173(4):879-93. e13.
62. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Science translational medicine*. 2015;7(313):313ra182-313ra182.
63. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*. 2010;464(7291):999-1005.
64. Trayes KP, Cokenakes SEH. Breast Cancer Treatment. *American family physician*. 2021;104(2):171-8.
65. Tosello G, Torloni MR, Mota BS, Neeman T, Riera R. Breast surgery for metastatic breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018;3(3):Cd011276.
66. Caparica R, Lambertini M, de Azambuja E. How I treat metastatic triple-negative breast cancer. *ESMO open*. 2019;4(Suppl 2):e000504.
67. Apantaku LM. Breast-conserving surgery for breast cancer. *American family physician*. 2002;66(12):2271-8.
68. Wu T, Long Q, Zeng L, Zhu J, Gao H, Deng Y, et al. Axillary lymph node metastasis in breast cancer: from historical axillary surgery to updated advances in the preoperative diagnosis and axillary management. *BMC surgery*. 2025;25(1):81.
69. Kerr AJ, Dodwell D, McGale P, Holt F, Duane F, Mannu G, et al. Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality. *Cancer treatment reviews*. 2022;105:102375.
70. Ward HW. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *British medical journal*. 1973;1(5844):13-4.
71. Kharb R, Haider K, Neha K, Yar MS. Aromatase inhibitors: Role in postmenopausal breast cancer. *Archiv der Pharmazie*. 2020;353(8):e2000081.
72. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2015;386(10001):1341-52.
73. Bui KT, Willson ML, Goel S, Beith J, Goodwin A. Ovarian suppression for adjuvant treatment of hormone receptor-positive early breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2020;3(3):Cd013538.
74. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine*. 2001;344(11):783-92.
75. Hortobagyi GN. Overview of treatment results with trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer. *Seminars in oncology*. 2001;28(6 Suppl 18):43-7.
76. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The oncologist*. 2009;14(4):320-68.
77. Swain SM, Miles D, Kim SB, Im YH, Im SA, Semiglazov V, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2020;21(4):519-30.
78. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2022;387(1):9-20.

79. Hurvitz SA, Hegg R, Chung WP, Im SA, Jacot W, Ganju V, et al. Trastuzumab deruxtecan versus trastuzumab emtansine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: updated results from DESTINY-Breast03, a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* (London, England). 2023;401(10371):105-17.
80. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(6):djv048.
81. Bonotto M, Gerratana L, Poletto E, Driol P, Giangreco M, Russo S, et al. Measures of outcome in metastatic breast cancer: insights from a real-world scenario. *The oncologist*. 2014;19(6):608-15.
82. Biswas T, Efird JT, Prasad S, Jindal C, Walker PR. The survival benefit of neoadjuvant chemotherapy and pCR among patients with advanced stage triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(68):112712-9.
83. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(1):13-21.
84. Jiang YZ, Liu Y, Xiao Y, Hu X, Jiang L, Zuo WJ, et al. Molecular subtyping and genomic profiling expand precision medicine in refractory metastatic triple-negative breast cancer: the FUTURE trial. *Cell research*. 2021;31(2):178-86.
85. Lu B, Natarajan E, Balaji Raghavendran HR, Markandan UD. Molecular Classification, Treatment, and Genetic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Review. *Technology in cancer research & treatment*. 2023;22:15330338221145246.
86. Geenen JJ, Linn SC, Beijnen JH, Schellens JHM. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical pharmacokinetics*. 2018;57(4):427-37.
87. Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes & development*. 2020;34(5-6):360-94.
88. Khan MA, Jain VK, Rizwanullah M, Ahmad J, Jain K. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. *Drug discovery today*. 2019;24(11):2181-91.
89. Chai C, Wu HH, Abuetabh Y, Sergi C, Leng R. Regulation of the tumor suppressor PTEN in triple-negative breast cancer. *Cancer letters*. 2022;527:41-8.
90. Kim SB, Dent R, Im SA, Espié M, Blau S, Tan AR, et al. Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(10):1360-72.
91. Dvir K, Giordano S, Leone JP. Immunotherapy in Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2024;25(14).
92. Block MS, Markovic SN. The tumor/immune interface: clinical evidence of cancer immunosurveillance, immunoediting and immunosubversion. *American Journal of Immunology*. 2009;5(1):29-49.
93. Gasparri ML, Ruscito I, Taghavi K, Farooqi AA, Papadia A, Focaccetti C, et al. The immunobiology of cancer: from tumor escape to cancer immunoediting towards immunotherapy in gynecologic oncology. *Molecular oncology: underlying mechanisms and translational advancements*. 2017:193-204.
94. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
95. Pardoll D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Seminars in oncology*. 2015;42(4):523-38.
96. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of cancer metastasis and treatment*. 2017;3:250-61.

97. Rui R, Zhou L, He S. Cancer immunotherapies: advances and bottlenecks. *Frontiers in immunology*. 2023;14:1212476.
98. Gaynor N, Crown J, Collins DM. Immune checkpoint inhibitors: Key trials and an emerging role in breast cancer. *Seminars in cancer biology*. 2022;79:44-57.
99. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Seminars in oncology nursing*. 2019;35(5):150923.
100. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2019;18(3):175-96.
101. Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*. 2017;168(4):724-40.
102. Ravelli A, Roviello G, Cretella D, Cavazzoni A, Biondi A, Cappelletti MR, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(4):1010428317695023.
103. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology*. 2018;19(1):40-50.
104. Li R, Cao L. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer and the research progress of adoptive cell therapy. *Frontiers in immunology*. 2023;14:1194020.
105. Cai B, Ma P, Ding P, Sun DW, Bu Q, Zhang J. Composition and plasticity of triple-negative breast carcinoma-infiltrating regulatory T cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2020;128(3):260-9.
106. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC medicine*. 2015;13:202.
107. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2016;4:59.
108. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(27):2959-66.
109. Blackley EF, Loi S. Targeting immune pathways in breast cancer: review of the prognostic utility of TILs in early stage triple negative breast cancer (TNBC). *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2019;48 Suppl 1:S44-s8.
110. Heimes A-S, Schmidt M. Immuno-oncology in triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2021;7:N/A-N/A.
111. Abdou Y, Goudarzi A, Yu JX, Upadhaya S, Vincent B, Carey LA. Immunotherapy in triple negative breast cancer: beyond checkpoint inhibitors. *NPJ breast cancer*. 2022;8(1):121.
112. Karim AM, Eun Kwon J, Ali T, Jang J, Ullah I, Lee YG, et al. Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. *Biochemical pharmacology*. 2023;212:115545.
113. Domchek SM, Recio A, Mick R, Clark CE, Carpenter EL, Fox KR, et al. Telomerase-specific T-cell immunity in breast cancer: effect of vaccination on tumor immunosurveillance. *Cancer research*. 2007;67(21):10546-55.
114. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*. 2015;520(7549):692-6.
115. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (New York, NY)*. 2015;348(6230):69-74.
116. Pan RY, Chung WH, Chu MT, Chen SJ, Chen HC, Zheng L, et al. Recent Development and Clinical Application of Cancer Vaccine: Targeting Neoantigens. *Journal of immunology research*. 2018;2018:4325874.
117. Berinstein NL, Karkada M, Morse MA, Nemunaitis JJ, Chatta G, Kaufman H, et al. First-in-man application of a novel therapeutic cancer vaccine formulation with the capacity to induce multi-

- functional T cell responses in ovarian, breast and prostate cancer patients. *Journal of translational medicine*. 2012;10:156.
118. Takahashi R, Toh U, Iwakuma N, Takenaka M, Otsuka H, Furukawa M, et al. Feasibility study of personalized peptide vaccination for metastatic recurrent triple-negative breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2014;16(4):R70.
 119. Nelde A, Rammensee HG, Walz JS. The Peptide Vaccine of the Future. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2021;20:100022.
 120. Munkley J. The Role of Sialyl-Tn in Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(3):275.
 121. Julien S, Picco G, Sewell R, Vercoutter-Edouart AS, Tarp M, Miles D, et al. Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *British journal of cancer*. 2009;100(11):1746-54.
 122. Miles D, Roché H, Martin M, Perren TJ, Cameron DA, Glaspy J, et al. Phase III multicenter clinical trial of the sialyl-TN (STn)-keyhole limpet hemocyanin (KLH) vaccine for metastatic breast cancer. *The oncologist*. 2011;16(8):1092-100.
 123. Ibrahim NK, Murray JL, Zhou D, Mittendorf EA, Sample D, Tautchin M, et al. Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial. *Journal of Cancer*. 2013;4(7):577-84.
 124. Yang B, Jeang J, Yang A, Wu TC, Hung CF. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014;10(11):3153-64.
 125. Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Molecular cancer*. 2021;20(1):41.
 126. Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, et al. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(5):2850-8.
 127. Chattergoon MA, Robinson TM, Boyer JD, Weiner DB. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;160(12):5707-18.
 128. Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(9):1481-6.
 129. Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, Jabulowsky RA, Vormehr M, Gold M, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*. 2020;585(7823):107-12.
 130. Türeci Ö, Vormehr M, Diken M, Kreiter S, Huber C, Sahin U. Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neoepitope Vaccines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(8):1885-96.
 131. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloeke BP, Simon P, Löwer M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. 2017;547(7662):222-6.
 132. Zhang X, Sharma PK, Peter Goedegebuure S, Gillanders WE. Personalized cancer vaccines: Targeting the cancer mutanome. *Vaccine*. 2017;35(7):1094-100.
 133. Schmidt M, Bolte S, Frenzel K, Heesen L, Derhovanessian E, Bukur V, et al. Abstract OT2-06-01: Highly innovative personalized RNA-immunotherapy for patients with triple negative breast cancer. *Cancer research*. 2019;79(4_Supplement):OT2-06-1-OT2--1.
 134. Schmidt M, Vogler I, Derhovanessian E, Omokoko T, Godehardt E, Attig S, et al. 88MO T-cell responses induced by an individualized neoantigen specific immune therapy in post (neo) adjuvant patients with triple negative breast cancer. *Annals of Oncology*. 2020;31:S276.
 135. Heimes AS, Schmidt M. Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer. *Expert opinion on investigational drugs*. 2019;28(1):1-5.
 136. Farshbafnadi M, Pastaki Khoshbin A, Rezaei N. Immune checkpoint inhibitors for triple-negative breast cancer: From immunological mechanisms to clinical evidence. *International immunopharmacology*. 2021;98:107876.

137. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(21):2460-7.
138. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(3):397-404.
139. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2018;379(22):2108-21.
140. Emens LA, Cruz C, Eder JP, Braiteh F, Chung C, Tolaney SM, et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA oncology*. 2019;5(1):74-82.
141. Dees S, Ganesan R, Singh S, Grewal IS. Emerging CAR-T Cell Therapy for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2020;19(12):2409-21.
142. Xie Y, Hu Y, Zhou N, Yao C, Wu L, Liu L, et al. CAR T-cell therapy for triple-negative breast cancer: Where we are. *Cancer letters*. 2020;491:121-31.
143. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(7):e25443.
144. Dang VD, Hilgenberg E, Ries S, Shen P, Fillatreau S. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Current opinion in immunology*. 2014;28:77-83.
145. Yeong J, Lim JCT, Lee B, Li H, Chia N, Ong CCH, et al. High densities of tumor-associated plasma cells predict improved prognosis in triple negative breast cancer. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1209.
146. Garaud S, Buisseret L, Solinas C, Gu-Trantien C, de Wind A, Van den Eynden G, et al. Tumor-infiltrating B cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI insight*. 2019;4(18):e129641.
147. Schmidt M, Böhm D, von Törne C, Steiner E, Puhl A, Pilch H, et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer research*. 2008;68(13):5405-13.
148. Schmidt M, Hellwig B, Hammad S, Othman A, Lohr M, Chen Z, et al. A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin κ C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(9):2695-703.
149. Heimes AS, Madjar K, Edlund K, Battista MJ, Almstedt K, Elger T, et al. Subtype-specific prognostic impact of different immune signatures in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2017;165(2):293-300.
150. Heimes AS, Krämer H, Härtner F, Almstedt K, Krajnak S, Battista MJ, et al. Prognostic Impact of Immunoglobulin Kappa C in Breast Cancer Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy. *Breast care (Basel, Switzerland)*. 2021;16(5):444-51.
151. Schmidt M, Edlund K, Hengstler JG, Heimes AS, Almstedt K, Lebrecht A, et al. Prognostic Impact of Immunoglobulin Kappa C (IGKC) in Early Breast Cancer. *Cancers*. 2021;13(14).
152. Schmidt M, Weyer-Elberich V, Hengstler JG, Heimes AS, Almstedt K, Gerhold-Ay A, et al. Prognostic impact of CD4-positive T cell subsets in early breast cancer: a study based on the FinHer trial patient population. *Breast cancer research : BCR*. 2018;20(1):15.
153. Riedel N. Prognostische Relevanz von tumorinfiltrierenden Plasmazellen beim triple-negativem Mammakarzinom [Dissertation]. Mainz2023.
154. Heimes AS, Riedel N, Almstedt K, Krajnak S, Schwab R, Stewen K, et al. Prognostic Impact of CD38- and IgκC-Positive Tumor-Infiltrating Plasma Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2023;24(20).

155. Heimes A, Istengir L, Brenner W, Hasenburg A, Rothermel A, Schmidt M. KDM5B and CBX5 as potential tumor-associated immunogenic antigens in triple-negative breast cancer (TNBC). *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und-therapie*. 2021;18(02):39.
156. Hwang KK, Eissenberg JC, Worman HJ. Transcriptional repression of euchromatic genes by Drosophila heterochromatin protein 1 and histone modifiers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(20):11423-7.
157. Hiragami K, Festenstein R. Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005;62(23):2711-26.
158. Ma J, Hwang KK, Worman HJ, Courvalin JC, Eissenberg JC. Expression and functional analysis of three isoforms of human heterochromatin-associated protein HP1 in Drosophila. *Chromosoma*. 2001;109(8):536-44.
159. Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome biology*. 2006;7(7):228.
160. Paro R, Hogness DS. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(1):263-7.
161. Aasland R, Stewart AF. The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic acids research*. 1995;23(16):3168-73.
162. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. 2001;410(6824):120-4.
163. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001;410(6824):116-20.
164. Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science (New York, NY)*. 2002;295(5562):2080-3.
165. Nishibuchi G, Machida S, Osakabe A, Murakoshi H, Hiragami-Hamada K, Nakagawa R, et al. N-terminal phosphorylation of HP1 α increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic acids research*. 2014;42(20):12498-511.
166. Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Molecular cell*. 2001;7(4):729-39.
167. Daujat S, Zeissler U, Waldmann T, Happel N, Schneider R. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(45):38090-5.
168. Cowieson NP, Partridge JF, Allshire RC, McLaughlin PJ. Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Current biology : CB*. 2000;10(9):517-25.
169. Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, et al. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *The EMBO journal*. 2000;19(7):1587-97.
170. Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, et al. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *The EMBO journal*. 2004;23(3):489-99.
171. Lechner MS, Schultz DC, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;331(4):929-37.
172. Rosnoblet C, Vandamme J, Völkel P, Angrand PO. Analysis of the human HP1 interactome reveals novel binding partners. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;413(2):206-11.
173. Liu Y, Qin S, Lei M, Tempel W, Zhang Y, Loppnau P, et al. Peptide recognition by heterochromatin protein 1 (HP1) chromoshadow domains revisited: Plasticity in the

- pseudosymmetric histone binding site of human HP1.
- The Journal of biological chemistry*
- . 2017;292(14):5655-64.
174. Lou J, Deng Q, Zhang X, Bell CC, Das AB, Bediaga NG, et al. Heterochromatin protein 1 alpha (HP1 α) undergoes a monomer to dimer transition that opens and compacts live cell genome architecture. *Nucleic acids research*. 2024;52(18):10918-33.
 175. Vad-Nielsen J, Nielsen AL. Beyond the histone tale: HP1 α deregulation in breast cancer epigenetics. *Cancer biology & therapy*. 2015;16(2):189-200.
 176. Yamamoto K, Sonoda M. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;301(2):287-92.
 177. Wallrath LL. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Current opinion in genetics & development*. 1998;8(2):147-53.
 178. Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(24):9923-7.
 179. Eissenberg JC, Morris GD, Reuter G, Hartnett T. The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics*. 1992;131(2):345-52.
 180. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic acids research*. 2003;31(9):2305-12.
 181. Nielsen AL, Sanchez C, Ichinose H, Cerviño M, Lerouge T, Chambon P, et al. Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *The EMBO journal*. 2002;21(21):5797-806.
 182. Nozawa RS, Nagao K, Masuda HT, Iwasaki O, Hirota T, Nozaki N, et al. Human POGZ modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nature cell biology*. 2010;12(7):719-27.
 183. Richart AN, Brunner CI, Stott K, Murzina NV, Thomas JO. Characterization of chromoshadow domain-mediated binding of heterochromatin protein 1 α (HP1 α) to histone H3. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(22):18730-7.
 184. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009;461(7265):819-22.
 185. Jang SM, Azebi S, Soubigou G, Muchardt C. DYRK1A phosphorylates histone H3 to differentially regulate the binding of HP1 isoforms and antagonize HP1-mediated transcriptional repression. *EMBO reports*. 2014;15(6):686-94.
 186. Lavigne M, Eskeland R, Azebi S, Saint-André V, Jang SM, Batsché E, et al. Interaction of HP1 and Brg1/Brm with the globular domain of histone H3 is required for HP1-mediated repression. *PLoS genetics*. 2009;5(12):e1000769.
 187. Keenen MM, Brown D, Brennan LD, Renger R, Khoo H, Carlson CR, et al. HP1 proteins compact DNA into mechanically and positionally stable phase separated domains. *eLife*. 2021;10.
 188. Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO reports*. 2002;3(10):975-81.
 189. Ameyar-Zazoua M, Rachez C, Souidi M, Robin P, Fritsch L, Young R, et al. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature structural & molecular biology*. 2012;19(10):998-1004.
 190. Alló M, Buggiano V, Fededa JP, Petrillo E, Schor I, de la Mata M, et al. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nature structural & molecular biology*. 2009;16(7):717-24.
 191. Saint-André V, Batsché E, Rachez C, Muchardt C. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 γ favor inclusion of alternative exons. *Nature structural & molecular biology*. 2011;18(3):337-44.

192. Nishibuchi G, Nakayama J. Biochemical and structural properties of heterochromatin protein 1: understanding its role in chromatin assembly. *Journal of biochemistry*. 2014;156(1):11-20.
193. Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*. 2005;438(7071):1176-80.
194. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, et al. Regulation of HP1–chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*. 2005;438(7071):1116-22.
195. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*. 2011;21(3):381-95.
196. Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Molecular cell*. 1999;4(4):529-40.
197. Chakraborty A, Prasanth KV, Prasanth SG. Dynamic phosphorylation of HP1 α regulates mitotic progression in human cells. *Nature communications*. 2014;5:3445.
198. Chakraborty A, Prasanth SG. Phosphorylation-dephosphorylation cycle of HP1 α governs accurate mitotic progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2014;13(11):1663-70.
199. Quivy JP, Roche D, Kirschner D, Tagami H, Nakatani Y, Almouzni G. A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *The EMBO journal*. 2004;23(17):3516-26.
200. Quivy JP, Gérard A, Cook AJ, Roche D, Almouzni G. The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(9):972-9.
201. Zhang S, Li H, Shen C, Cao F, Kang S. HP1 α promotes the progression of prostate cancer. *Molecular biology reports*. 2023;50(5):4459-68.
202. Xiong F, Wang D, Xiong W, Wang X, Huang WH, Wu GH, et al. Unveiling the role of HP1 α -HDAC1-STAT1 axis as a therapeutic target for HP1 α -positive intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2024;43(1):152.
203. Cheng W, Tian L, Wang B, Qi Y, Huang W, Li H, et al. Downregulation of HP1 α suppresses proliferation of cholangiocarcinoma by restoring SFRP1 expression. *Oncotarget*. 2016;7(30):48107-19.
204. Meng X, Cao R, Liu X, Fu B, Luo L, Jiang M, et al. Comprehensive analysis reveals the value of the expression of chromobox family members for bladder urothelial carcinoma prognosis. *Oncology letters*. 2023;25(4):172.
205. Bugide S, Edwards YJK, Gupta R, Green MR, Wajapeyee N. CBX5 loss drives EGFR inhibitor resistance and results in therapeutically actionable vulnerabilities in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023;120(4):e2218118120.
206. Zhu Y, Pu Z, Li Z, Lin Y, Li N, Peng F. Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis Value of Chromobox Family Members in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology*. 2021;11:700528.
207. De Koning L, Savignoni A, Boumendil C, Rehman H, Asselain B, Sastre-Garau X, et al. Heterochromatin protein 1 α : a hallmark of cell proliferation relevant to clinical oncology. *EMBO molecular medicine*. 2009;1(3):178-91.
208. Ge X, Lei S, Wang P, Wang W, Deng M, Niu G, et al. Integrated bioinformatics investigation and experimental validation reveals the clinical and biological significance of chromobox family in breast cancer. *Scientific reports*. 2025;15(1):6442.
209. Liang YK, Lin HY, Chen CF, Zeng D. Prognostic values of distinct CBX family members in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(54):92375-87.
210. Kirschmann DA, Seftor EA, Nieva DR, Mariano EA, Hendrix MJ. Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1999;55(2):127-36.
211. Kirschmann DA, Lininger RA, Gardner LM, Seftor EA, Odero VA, Ainsztein AM, et al. Down-regulation of HP1Hs α expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer research*. 2000;60(13):3359-63.

212. Norwood LE, Moss TJ, Margaryan NV, Cook SL, Wright L, Seftor EA, et al. A requirement for dimerization of HP1Hsalpha in suppression of breast cancer invasion. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(27):18668-76.
213. Wang Z, Zhang C, Guo J, Wang W, Si Q, Chen C, et al. Exosomal miRNA-223-3p derived from tumor associated macrophages promotes pulmonary metastasis of breast cancer 4T1 cells. *Translational oncology*. 2023;35:101715.
214. Yu L, Zhang W, Wang P, Zhang Q, Cong A, Yang X, et al. LncRNA SNHG11 aggravates cell proliferation and migration in triple-negative breast cancer via sponging miR-2355-5p and targeting CBX5. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021;22(2):892.
215. Lee YH, Kuo CY, Stark JM, Shih HM, Ann DK. HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response. *Nucleic acids research*. 2013;41(11):5784-98.
216. Sulli G, Di Micco R, d'Adda di Fagagna F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(10):709-20.
217. Bártoová E, Malýšková B, Komůrková D, Legartová S, Suchánková J, Krejčí J, et al. Function of heterochromatin protein 1 during DNA repair. *Protoplasma*. 2017;254(3):1233-40.
218. Pongas G, Kim MK, Min DJ, House CD, Jordan E, Caplen N, et al. BRD4 facilitates DNA damage response and represses CBX5/Heterochromatin protein 1 (HP1). *Oncotarget*. 2017;8(31):51402-15.
219. Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, et al. The TIF1β-HP1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. *Stem cell reports*. 2014;2(2):145-52.
220. Yu YH, Chiou GY, Huang PI, Lo WL, Wang CY, Lu KH, et al. Network biology of tumor stem-like cells identified a regulatory role of CBX5 in lung cancer. *Scientific reports*. 2012;2:584.
221. Maeng YS, Kwon JY, Kim EK, Kwon YG. Heterochromatin Protein 1 Alpha (HP1α: CBX5) is a Key Regulator in Differentiation of Endothelial Progenitor Cells to Endothelial Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2015;33(5):1512-22.
222. Millanes-Romero A, Herranz N, Perrera V, Iturbide A, Loubat-Casanovas J, Gil J, et al. Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular cell*. 2013;52(5):746-57.
223. Maison C, Romeo K, Bailly D, Dubarry M, Quivy JP, Almouzni G. The SUMO protease SENP7 is a critical component to ensure HP1 enrichment at pericentric heterochromatin. *Nature structural & molecular biology*. 2012;19(4):458-60.
224. Bawa-Khalfe T, Lu LS, Zuo Y, Huang C, Dere R, Lin FM, et al. Differential expression of SUMO-specific protease 7 variants regulates epithelial-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(43):17466-71.
225. Lin FM, Kumar S, Ren J, Karami S, Bahnassy S, Li Y, et al. SUMOylation of HP1α supports association with ncRNA to define responsiveness of breast cancer cells to chemotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(21):30336-49.
226. Christensen J, Agger K, Cloos PA, Pasini D, Rose S, Sennels L, et al. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*. 2007;128(6):1063-76.
227. Kristensen LH, Nielsen AL, Helgstrand C, Lees M, Cloos P, Kastrup JS, et al. Studies of H3K4me3 demethylation by KDM5B/Jarid1B/PLU1 reveals strong substrate recognition in vitro and identifies 2,4-pyridine-dicarboxylic acid as an in vitro and in cell inhibitor. *The FEBS journal*. 2012;279(11):1905-14.
228. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129(4):823-37.
229. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007;448(7153):553-60.
230. Dey BK, Stalker L, Schnerch A, Bhatia M, Taylor-Papadimitriou J, Wynder C. The histone demethylase KDM5b/JARID1b plays a role in cell fate decisions by blocking terminal differentiation. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(17):5312-27.
231. Barrett A, Santangelo S, Tan K, Catchpole S, Roberts K, Spencer-Dene B, et al. Breast cancer associated transcriptional repressor PLU-1/JARID1B interacts directly with histone deacetylases. *International journal of cancer*. 2007;121(2):265-75.

232. Johansson C, Velupillai S, Tumber A, Szykowska A, Hookway ES, Nowak RP, et al. Structural analysis of human KDM5B guides histone demethylase inhibitor development. *Nature chemical biology*. 2016;12(7):539-45.
233. Xiang Y, Zhu Z, Han G, Ye X, Xu B, Peng Z, et al. JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(49):19226-31.
234. Seward DJ, Cubberley G, Kim S, Schonewald M, Zhang L, Tripet B, et al. Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 in vivo by JARID1 JmjC proteins. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(3):240-2.
235. Pilka ES, James T, Lisztwan JH. Structural definitions of Jumonji family demethylase selectivity. *Drug discovery today*. 2015;20(6):743-9.
236. Horton JR, Engstrom A, Zoeller EL, Liu X, Shanks JR, Zhang X, et al. Characterization of a Linked Jumonji Domain of the KDM5/JARID1 Family of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(6):2631-46.
237. Tu S, Teng YC, Yuan C, Wu YT, Chan MY, Cheng AN, et al. The ARID domain of the H3K4 demethylase RBP2 binds to a DNA CCGCCC motif. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(4):419-21.
238. Scibetta AG, Santangelo S, Coleman J, Hall D, Chaplin T, Copier J, et al. Functional analysis of the transcription repressor PLU-1/JARID1B. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(20):7220-35.
239. Patsialou A, Wilsker D, Moran E. DNA-binding properties of ARID family proteins. *Nucleic acids research*. 2005;33(1):66-80.
240. Sanchez R, Zhou MM. The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(7):364-72.
241. Klein BJ, Piao L, Xi Y, Rincon-Arango H, Rothbart SB, Peng D, et al. The histone-H3K4-specific demethylase KDM5B binds to its substrate and product through distinct PHD fingers. *Cell reports*. 2014;6(2):325-35.
242. Zhang Y, Yang H, Guo X, Rong N, Song Y, Xu Y, et al. The PHD1 finger of KDM5B recognizes unmodified H3K4 during the demethylation of histone H3K4me2/3 by KDM5B. *Protein & cell*. 2014;5(11):837-50.
243. Dorosz J, Kristensen LH, Aduri NG, Mirza O, Lousen R, Bucciarelli S, et al. Molecular architecture of the Jumonji C family histone demethylase KDM5B. *Scientific reports*. 2019;9(1):4019.
244. Di Nisio E, Licursi V, Mannironi C, Buglioni V, Paiardini A, Robusti G, et al. A truncated and catalytically inactive isoform of KDM5B histone demethylase accumulates in breast cancer cells and regulates H3K4 tri-methylation and gene expression. *Cancer gene therapy*. 2023;30(6):822-32.
245. Zheng YC, Chang J, Wang LC, Ren HM, Pang JR, Liu HM. Lysine demethylase 5B (KDM5B): A potential anti-cancer drug target. *European journal of medicinal chemistry*. 2019;161:131-40.
246. Madsen B, Spencer-Dene B, Poulson R, Hall D, Lu PJ, Scott K, et al. Characterisation and developmental expression of mouse Plu-1, a homologue of a human nuclear protein (PLU-1) which is specifically up-regulated in breast cancer. *Mechanisms of development*. 2002;119 Suppl 1:S239-46.
247. Catchpole S, Spencer-Dene B, Hall D, Santangelo S, Rosewell I, Guenatri M, et al. PLU-1/JARID1B/KDM5B is required for embryonic survival and contributes to cell proliferation in the mammary gland and in ER+ breast cancer cells. *International journal of oncology*. 2011;38(5):1267-77.
248. Zou MR, Cao J, Liu Z, Huh SJ, Polyak K, Yan Q. Histone demethylase jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) controls mammary gland development by regulating key developmental and lineage specification genes. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(25):17620-33.
249. Lu PJ, Sundquist K, Baekstrom D, Poulson R, Hanby A, Meier-Ewert S, et al. A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(22):15633-45.

250. Barrett A, Madsen B, Copier J, Lu PJ, Cooper L, Scibetta AG, et al. PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *International journal of cancer*. 2002;101(6):581-8.
251. Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, et al. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Molecular cell*. 2007;25(6):801-12.
252. Fork C, Gu L, Hitzel J, Josipovic I, Hu J, SzeKa Wong M, et al. Epigenetic Regulation of Angiogenesis by JARID1B-Induced Repression of HOXA5. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(7):1645-52.
253. Hayami S, Yoshimatsu M, Veerakumarasivam A, Unoki M, Iwai Y, Tsunoda T, et al. Overexpression of the JmJc histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Molecular cancer*. 2010;9:59.
254. Mitra D, Das PM, Huynh FC, Jones FE. Jumonji/ARID1 B (JARID1B) protein promotes breast tumor cell cycle progression through epigenetic repression of microRNA let-7e. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(47):40531-5.
255. Viré E, Curtis C, Davalos V, Git A, Robson S, Villanueva A, et al. The breast cancer oncogene EMSY represses transcription of antimetastatic microRNA miR-31. *Molecular cell*. 2014;53(5):806-18.
256. Liu CC, Chen L, Cai YW, Chen YF, Liu YM, Zhou YJ, et al. Targeting EMSY-mediated methionine metabolism is a potential therapeutic strategy for triple-negative breast cancer. *Cell reports Medicine*. 2024;5(2):101396.
257. Bamodu OA, Huang WC, Lee WH, Wu A, Wang LS, Hsiao M, et al. Aberrant KDM5B expression promotes aggressive breast cancer through MALAT1 overexpression and downregulation of hsa-miR-448. *BMC cancer*. 2016;16:160.
258. Denis H, Van Grembergen O, Delatte B, Dedeurwaerder S, Putmans P, Calonne E, et al. MicroRNAs regulate KDM5 histone demethylases in breast cancer cells. *Molecular bioSystems*. 2016;12(2):404-13.
259. Zhang L, Sokolowski N, Atmadibrata B, Liu T. Histone demethylase JARID1B promotes cell proliferation but is downregulated by N-Myc oncoprotein. *Oncology reports*. 2014;31(4):1935-9.
260. Kim J, Shin S, Subramaniam M, Bruinsma E, Kim TD, Hawse JR, et al. Histone demethylase JARID1B/KDM5B is a corepressor of TIEG1/KLF10. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;401(3):412-6.
261. Li Q, Shi L, Gui B, Yu W, Wang J, Zhang D, et al. Binding of the JmJc demethylase JARID1B to LSD1/NuRD suppresses angiogenesis and metastasis in breast cancer cells by repressing chemokine CCL14. *Cancer research*. 2011;71(21):6899-908.
262. Yeh IJ, Esakov E, Lathia JD, Miyagi M, Reizes O, Montano MM. Phosphorylation of the histone demethylase KDM5B and regulation of the phenotype of triple negative breast cancer. *Scientific reports*. 2019;9(1):17663.
263. Yamamoto S, Wu Z, Russnes HG, Takagi S, Peluffo G, Vaske C, et al. JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *Cancer cell*. 2014;25(6):762-77.
264. Hinohara K, Wu HJ, Vigneau S, McDonald TO, Igarashi KJ, Yamamoto KN, et al. KDM5 Histone Demethylase Activity Links Cellular Transcriptomic Heterogeneity to Therapeutic Resistance. *Cancer cell*. 2018;34(6):939-53.e9.
265. Fu YD, Huang MJ, Guo JW, You YZ, Liu HM, Huang LH, et al. Targeting histone demethylase KDM5B for cancer treatment. *European journal of medicinal chemistry*. 2020;208:112760.
266. Montano MM, Yeh IJ, Chen Y, Hernandez C, Kiselar JG, de la Fuente M, et al. Inhibition of the histone demethylase, KDM5B, directly induces re-expression of tumor suppressor protein HEXIM1 in cancer cells. *Breast cancer research : BCR*. 2019;21(1):138.
267. Zhang ZG, Zhang HS, Sun HL, Liu HY, Liu MY, Zhou Z. KDM5B promotes breast cancer cell proliferation and migration via AMPK-mediated lipid metabolism reprogramming. *Experimental cell research*. 2019;379(2):182-90.

268. Tang B, Qi G, Tang F, Yuan S, Wang Z, Liang X, et al. JARID1B promotes metastasis and epithelial-mesenchymal transition via PTEN/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*. 2015;6(14):12723-39.
269. Li G, Kanagasabai T, Lu W, Zou MR, Zhang SM, Celada SI, et al. KDM5B Is Essential for the Hyperactivation of PI3K/AKT Signaling in Prostate Tumorigenesis. *Cancer research*. 2020;80(21):4633-43.
270. Li L, Zhu G, Tan K, Jiang L, Li Y, Zhu X, et al. CUX2/KDM5B/SOX17 Axis Affects the Occurrence and Development of Breast Cancer. *Endocrinology*. 2022;163(9).
271. Wang J, Wu X, Wang J, Shan L. JARID1B modulates breast cancer cell apoptosis by regulating p53 expression. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2018;11(9):4529-36.
272. Li X, Liu L, Yang S, Song N, Zhou X, Gao J, et al. Histone demethylase KDM5B is a key regulator of genome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(19):7096-101.
273. Xu W, Zhou B, Zhao X, Zhu L, Xu J, Jiang Z, et al. KDM5B demethylates H3K4 to recruit XRCC1 and promote chemoresistance. *International journal of biological sciences*. 2018;14(9):1122-32.
274. Mocavini I, Pippa S, Licursi V, Paci P, Trisciuglio D, Mannironi C, et al. JARID1B expression and its function in DNA damage repair are tightly regulated by miRNAs in breast cancer. *Cancer science*. 2019;110(4):1232-43.
275. Pippa S, Mannironi C, Licursi V, Bombardi L, Colotti G, Cundari E, et al. Small Molecule Inhibitors of KDM5 Histone Demethylases Increase the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells Overexpressing JARID1B. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019;24(9).
276. Zhang J, Hou S, You Z, Li G, Xu S, Li X, et al. Expression and prognostic values of ARID family members in breast cancer. *Aging*. 2021;13(4):5621-37.
277. Jose A, Shenoy GG, Sunil Rodrigues G, Kumar NAN, Munisamy M, Thomas L, et al. Histone Demethylase KDM5B as a Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Cancers*. 2020;12(8).
278. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*. 1978;14(11):911-5.
279. Witt BL, Tollefsbol TO. *Molecular, Cellular, and Technical Aspects of Breast Cancer Cell Lines as a Foundational Tool in Cancer Research*. Life (Basel, Switzerland). 2023;13(12).
280. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast cancer : basic and clinical research*. 2010;4:35-41.
281. Heiser LM, Sadanandam A, Kuo WL, Benz SC, Goldstein TC, Ng S, et al. Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(8):2724-9.
282. Pommerenke C, Nagel S, Haake J, Koelz AL, Christgen M, Steenpass L, et al. Molecular Characterization and Subtyping of Breast Cancer Cell Lines Provide Novel Insights into Cancer Relevant Genes. *Cells*. 2024;13(4).
283. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular oncology*. 2007;1(1):84-96.
284. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease*. 2010;32(1-2):35-48.
285. Mackay A, Tamber N, Fenwick K, Iravani M, Grigoriadis A, Dexter T, et al. A high-resolution integrated analysis of genetic and expression profiles of breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment*. 2009;118(3):481-98.
286. Hackett AJ, Smith HS, Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, Riggs JL, et al. Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977;58(6):1795-806.
287. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS one*. 2009;4(7):e6146.

288. 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.
289. Riaz M, van Jaarsveld MT, Hollestelle A, Prager-van der Smitten WJ, Heine AA, Boersma AW, et al. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast cancer research : BCR*. 2013;15(2):R33.
290. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973;51(5):1409-16.
291. Leroy B, Girard L, Hollestelle A, Minna JD, Gazdar AF, Soussi T. Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: a reassessment. *Human mutation*. 2014;35(6):756-65.
292. Puleo J, Polyak K. The MCF10 Model of Breast Tumor Progression. *Cancer research*. 2021;81(16):4183-5.
293. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Jr., Brenz R, McGrath CM, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer research*. 1990;50(18):6075-86.
294. Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PloS one*. 2015;10(7):e0131285.
295. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(21):7413-7.
296. Denieva ZG, Budanova UA, Sebyakin YL. Vesicle Delivery Systems of Biologically Active Compounds: From Liposomes to Cerasomes. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2021;15(1):21-35.
297. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
298. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(17):9742-7.
299. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411(6836):494-8.
300. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International journal of biomedical science : IJBS*. 2017;13(2):48-57.
301. National Library of Medicine - Primer-BLAST [Internet]. [cited 22.01.2025]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome.
302. Ensembl.org - Homo sapiens Gene Database [Internet]. [cited 22.01.2025]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index.
303. Istengir LC. Einfluss der KDM5B- und CBX5-Expression auf die Progression des triple-negativen Mammakarzinoms [Dissertation]. Mainz: Universitätsbibliothek der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2024.
304. Serrano A, Rodríguez-Corsino M, Losada A. Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins do not drive pericentromeric cohesin enrichment in human cells. *PloS one*. 2009;4(4):e5118.
305. Strom AR, Biggs RJ, Banigan EJ, Wang X, Chiu K, Herman C, et al. HP1α is a chromatin crosslinker that controls nuclear and mitotic chromosome mechanics. *eLife*. 2021;10.
306. Tissue-based map of the human proteome. [Internet]. 2015 [cited 15.03.2026]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000117139-KDM5B>.
307. Xhabija B, Kidder BL. KDM5B is a master regulator of the H3K4-methylome in stem cells, development and cancer. *Seminars in cancer biology*. 2019;57:79-85.
308. Metzler VM, de Brot S, Haigh DB, Woodcock CL, Lothion-Roy J, Harris AE, et al. The KDM5B and KDM1A lysine demethylases cooperate in regulating androgen receptor expression and signalling in prostate cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2023;11:1116424.

309. Sun L-L, Sun X-X, Xu X-E, Zhu M-X, Wu Z-Y, Shen J-H, et al. Overexpression of Jumonji AT-rich interactive domain 1B and PHD finger protein 2 is involved in the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Acta histochemica*. 2013;115(1):56-62.
310. Spangle Jennifer M, Dreijerink Koen M, Groner Anna C, Cheng H, Ohlson Carolyn E, Reyes J, et al. PI3K/AKT Signaling Regulates H3K4 Methylation in Breast Cancer. *Cell reports*. 2016;15(12):2692-704.
311. Lu W, Liu S, Li B, Xie Y, Adhiambo C, Yang Q, et al. SKP2 inactivation suppresses prostate tumorigenesis by mediating JARID1B ubiquitination. *Oncotarget*. 2015;6(2):771-88.
312. Guo TJF, Liang WY, Singhera GK, Memar Vaghri J, Leung JM, Dorscheid DR. Optimization of chemical transfection in airway epithelial cell lines. *BMC Biotechnology*. 2025;25(1):10.
313. Mahmoudian RA, Farshchian M, Abbaszadegan MR. Evaluation and Optimization of Lipofectamine 3000 Reagents for Transient Gene Expression in KYSE-30 Esophagus Cancer Cell Line. *Archives of Medical Laboratory Sciences*. 2020;6(1):1-9 (e8).
314. Snøve O, Jr., Holen T. Many commonly used siRNAs risk off-target activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;319(1):256-63.
315. Bramsen JB, Kjems J. Development of Therapeutic-Grade Small Interfering RNAs by Chemical Engineering. *Frontiers in genetics*. 2012;Volume 3 - 2012.
316. Musacchio A. Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011;366(1584):3595-604.
317. Hinchcliffe EH, Day CA, Karanjeet KB, Fadness S, Langfald A, Vaughan KT, et al. Chromosome missegregation during anaphase triggers p53 cell cycle arrest through histone H3.3 Ser31 phosphorylation. *Nature cell biology*. 2016;18(6):668-75.
318. Shen X, Zhuang Z, Zhang Y, Chen Z, Shen L, Pu W, et al. JARID1B modulates lung cancer cell proliferation and invasion by regulating p53 expression. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(9):7133-42.
319. Yoshida M, Ishimura A, Terashima M, Enkhbaatar Z, Nozaki N, Satou K, et al. PLU1 histone demethylase decreases the expression of KAT5 and enhances the invasive activity of the cells. *The Biochemical journal*. 2011;437(3):555-64.
320. Su H, Ma X, Huang Y, Han H, Zou Y, Huang W. JARID1B deletion induced apoptosis in Jeko-1 and HL-60 cell lines. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(1):171-83.
321. Enkhbaatar Z, Terashima M, Oktyabri D, Tange S, Ishimura A, Yano S, et al. KDM5B histone demethylase controls epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by regulating the expression of the microRNA-200 family. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2013;12(13):2100-12.
322. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung SC, et al. The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. *Frontiers in immunology*. 2017;8:319.
323. Tomes L, Emberley E, Niu Y, Troup S, Pastorek J, Strange K, et al. Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*. 2003;81(1):61-9.
324. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, NZ)*. 2015;3:83-92.
325. Wang H, Zhang XM, Tomiyoshi G, Nakamura R, Shinmen N, Kuroda H, et al. Association of serum levels of antibodies against MMP1, CBX1, and CBX5 with transient ischemic attack and cerebral infarction. *Oncotarget*. 2018;9(5):5600-13.
326. Zhou B, Zhu Y, Xu W, Zhou Q, Tan L, Zhu L, et al. Hypoxia Stimulates SUMOylation-Dependent Stabilization of KDM5B. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:741736.
327. Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein & cell*. 2018;9(1):33-46.

8 Anhang

8.1 Immuncytochemische Färbungen

8.1.1 Färbungen mit Anti-CBX5-Antikörper

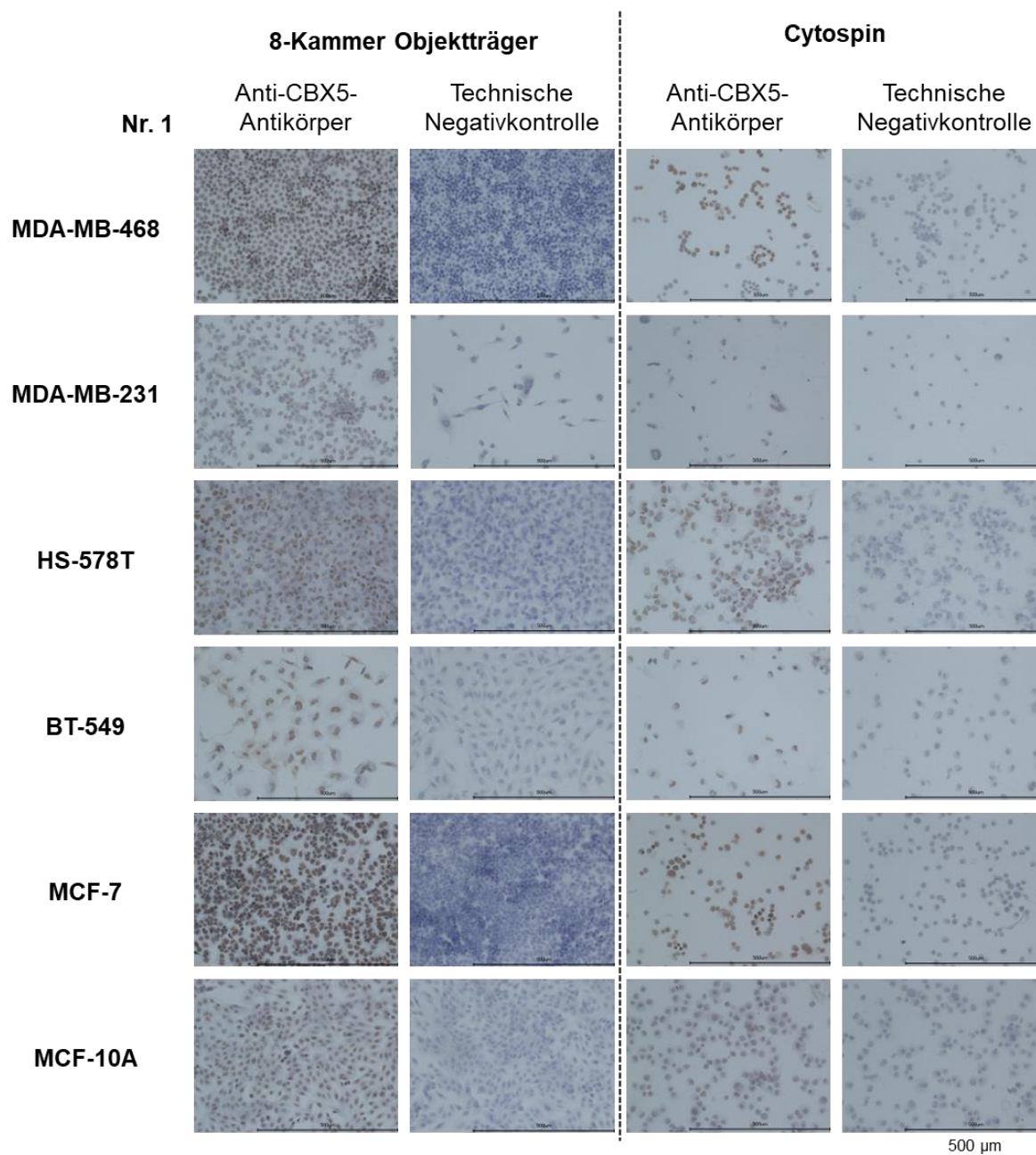


Abbildung 38: Erster Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

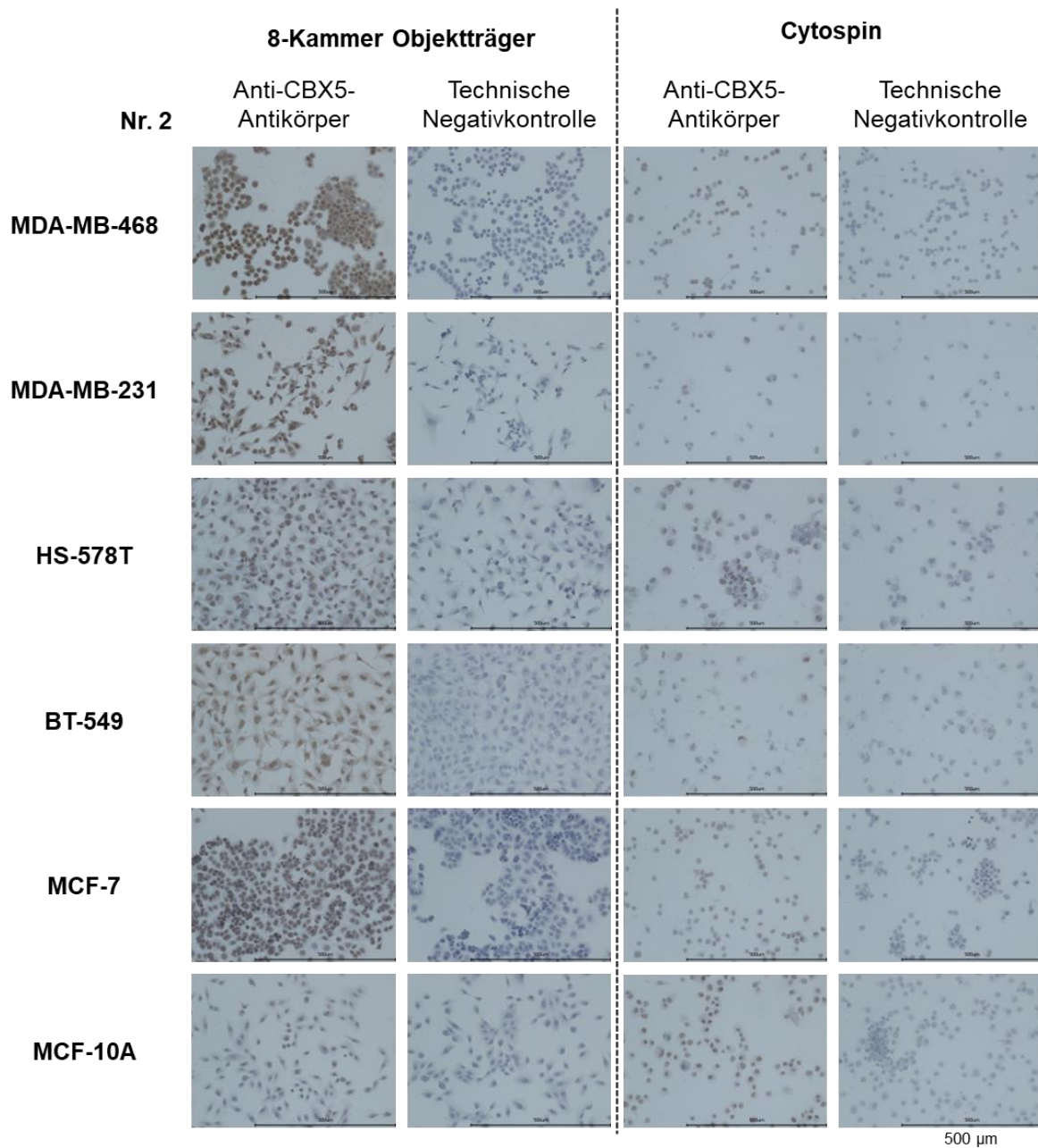


Abbildung 39: Zweiter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

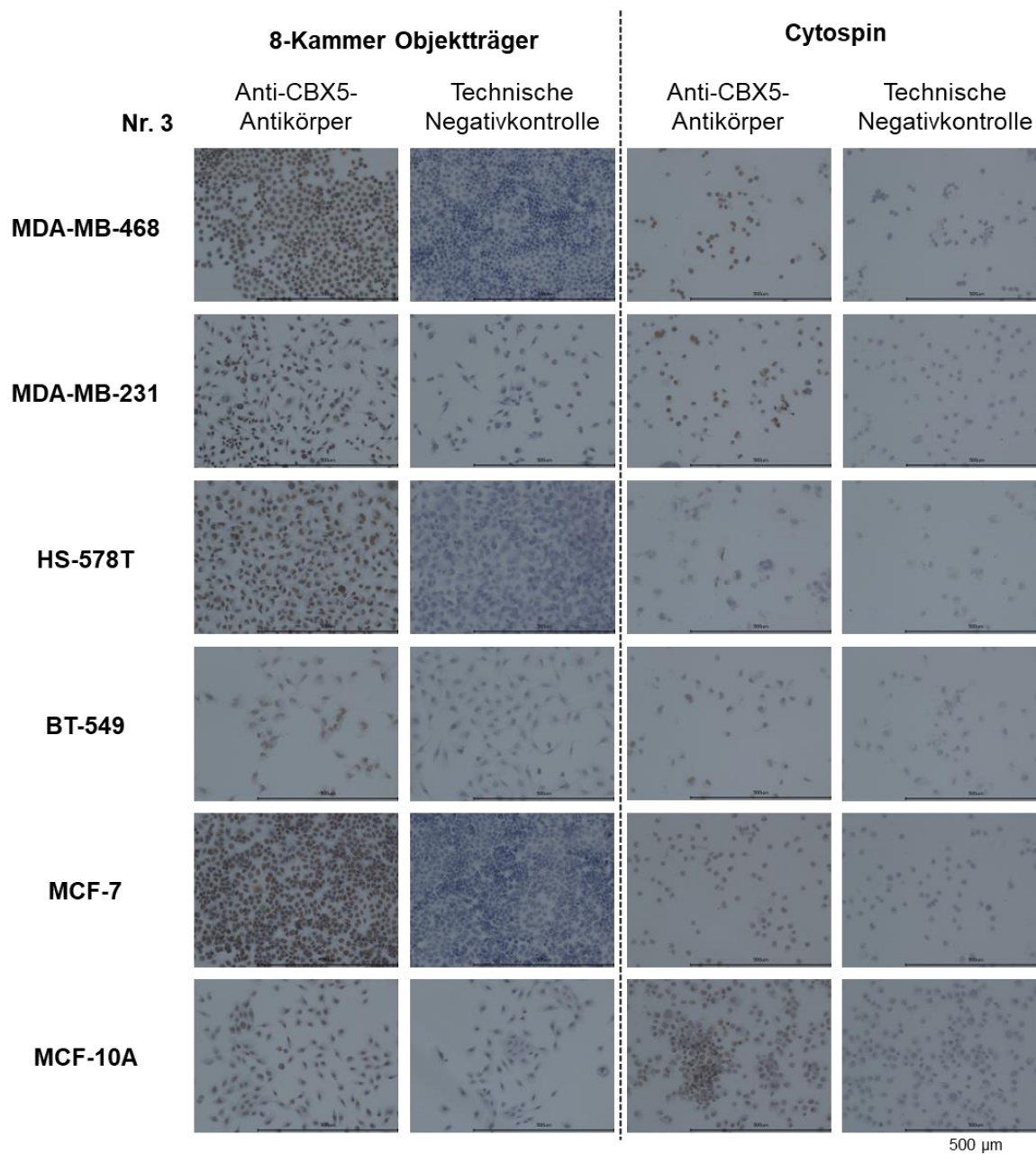


Abbildung 40: Dritter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

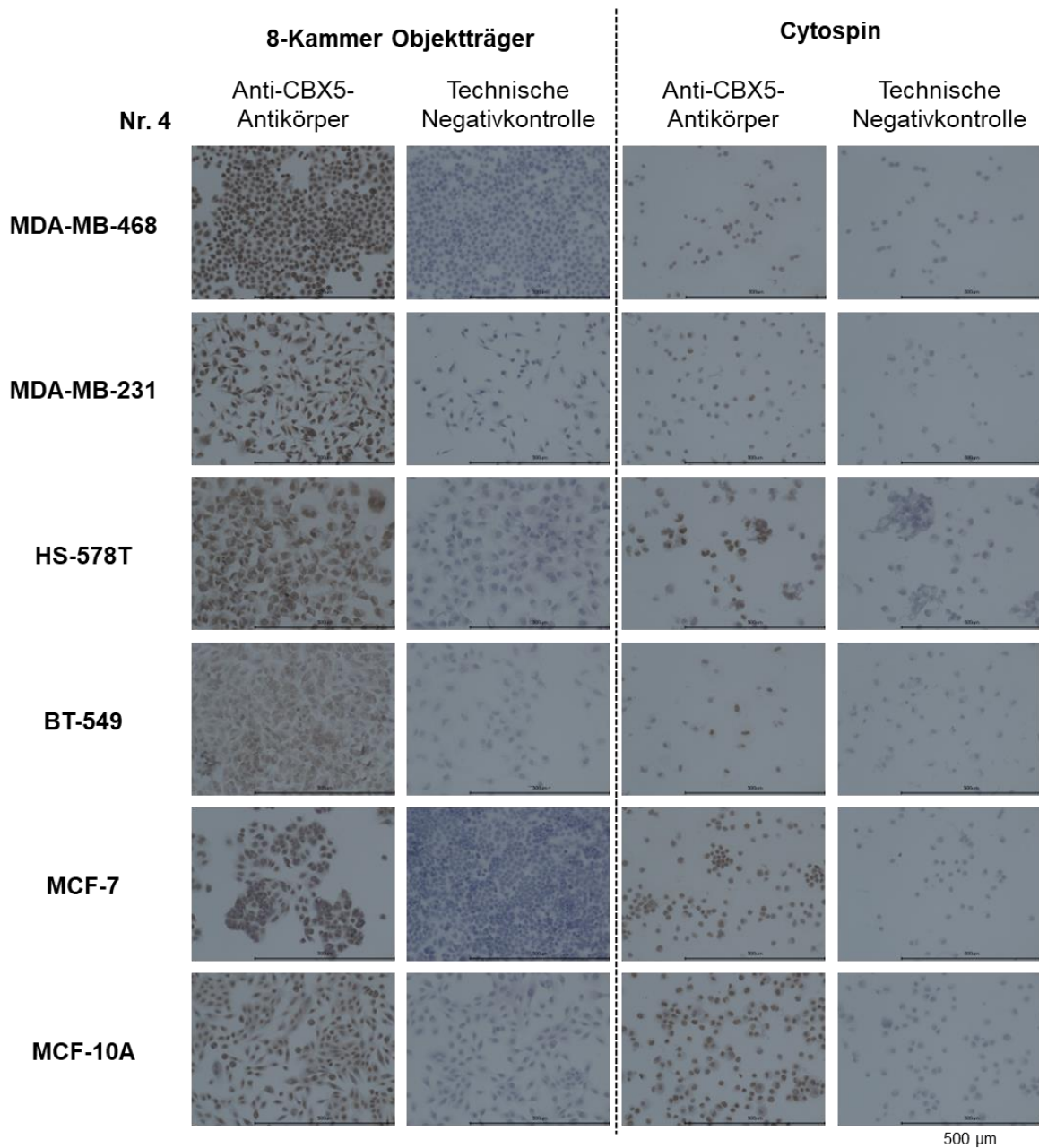


Abbildung 41: Vierter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-CBX5-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

8.1.2 Färbungen mit Anti-KDM5B-Antikörper

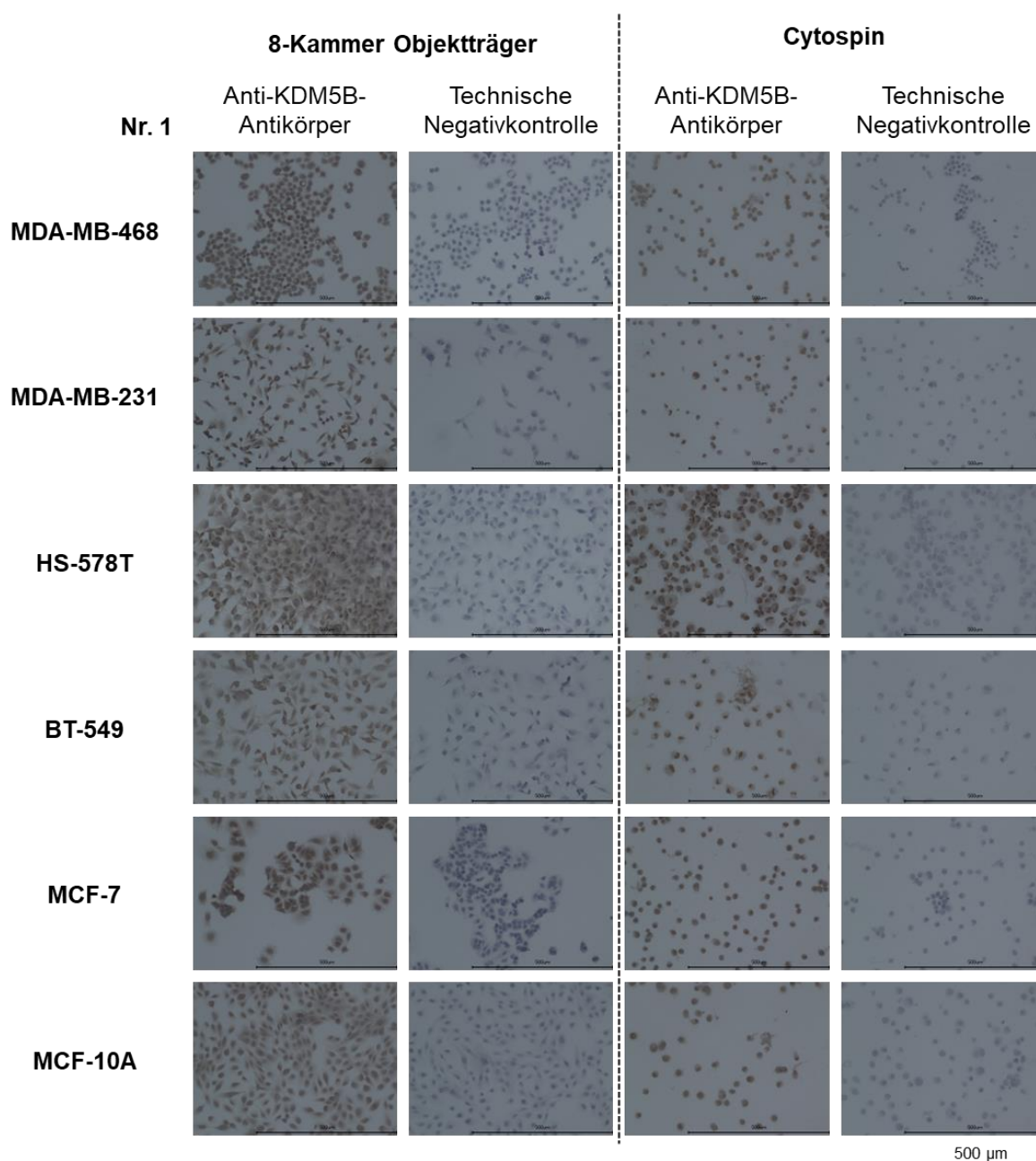


Abbildung 42: Erster Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

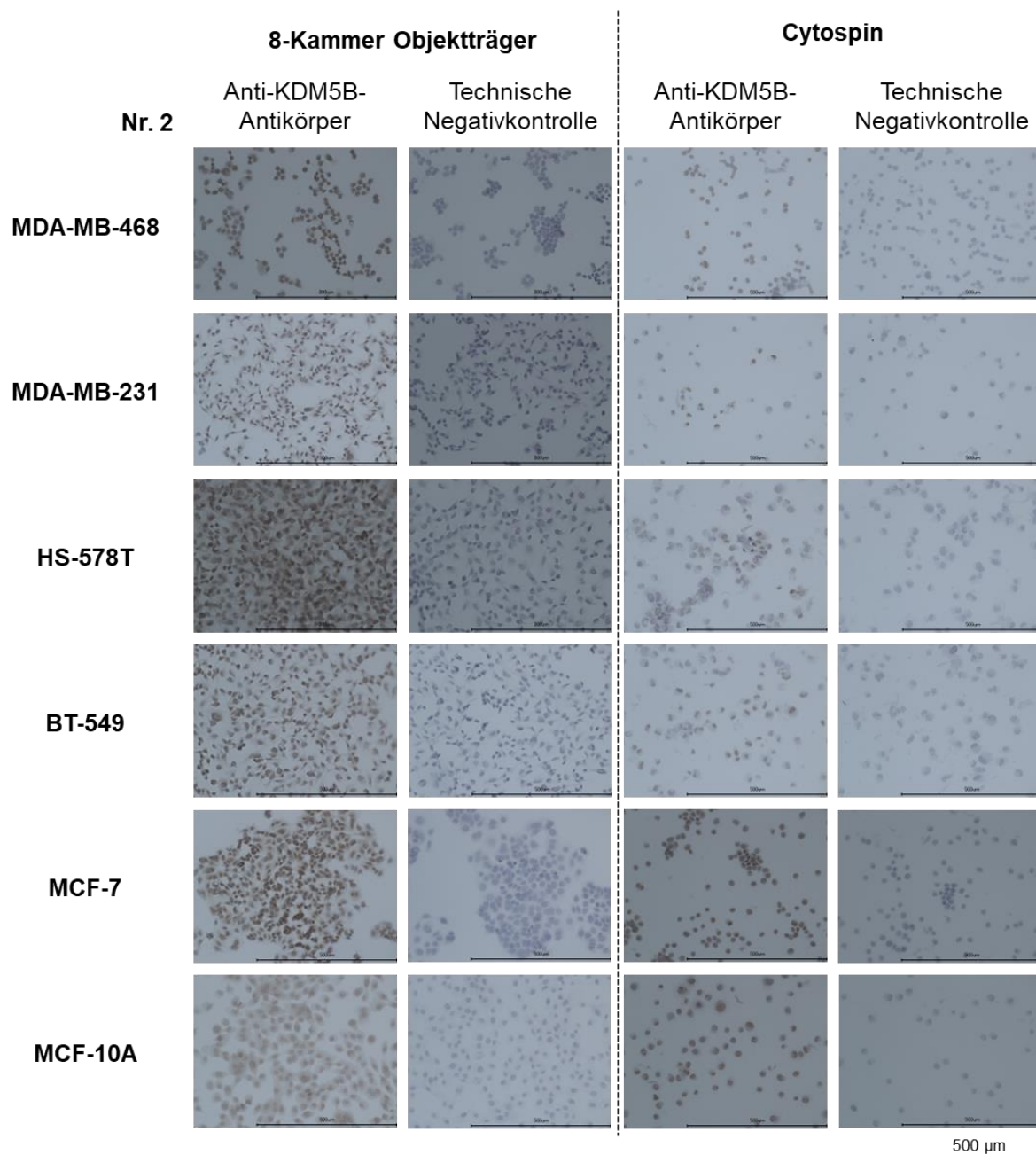


Abbildung 43: Zweiter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

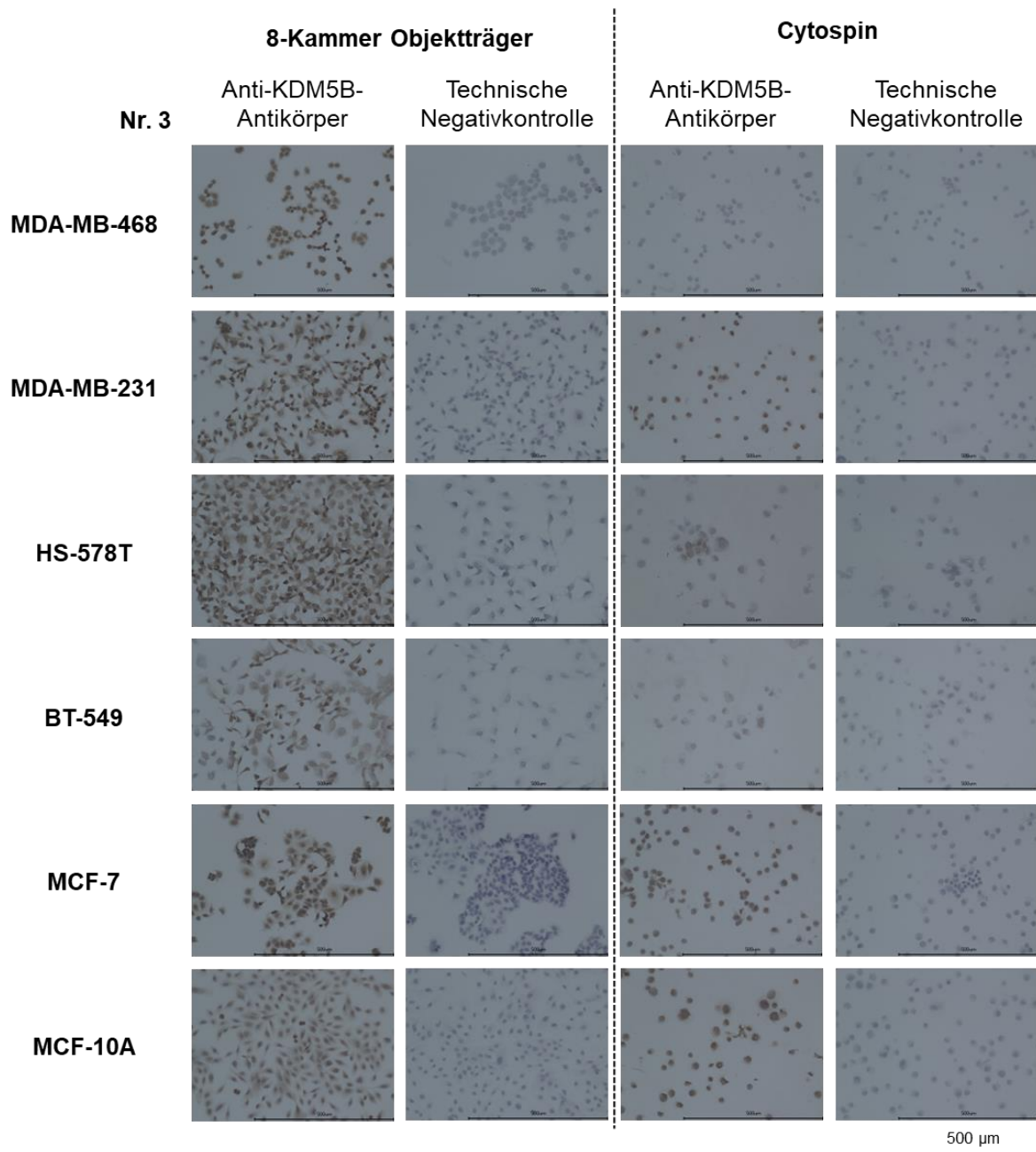


Abbildung 44: Dritter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

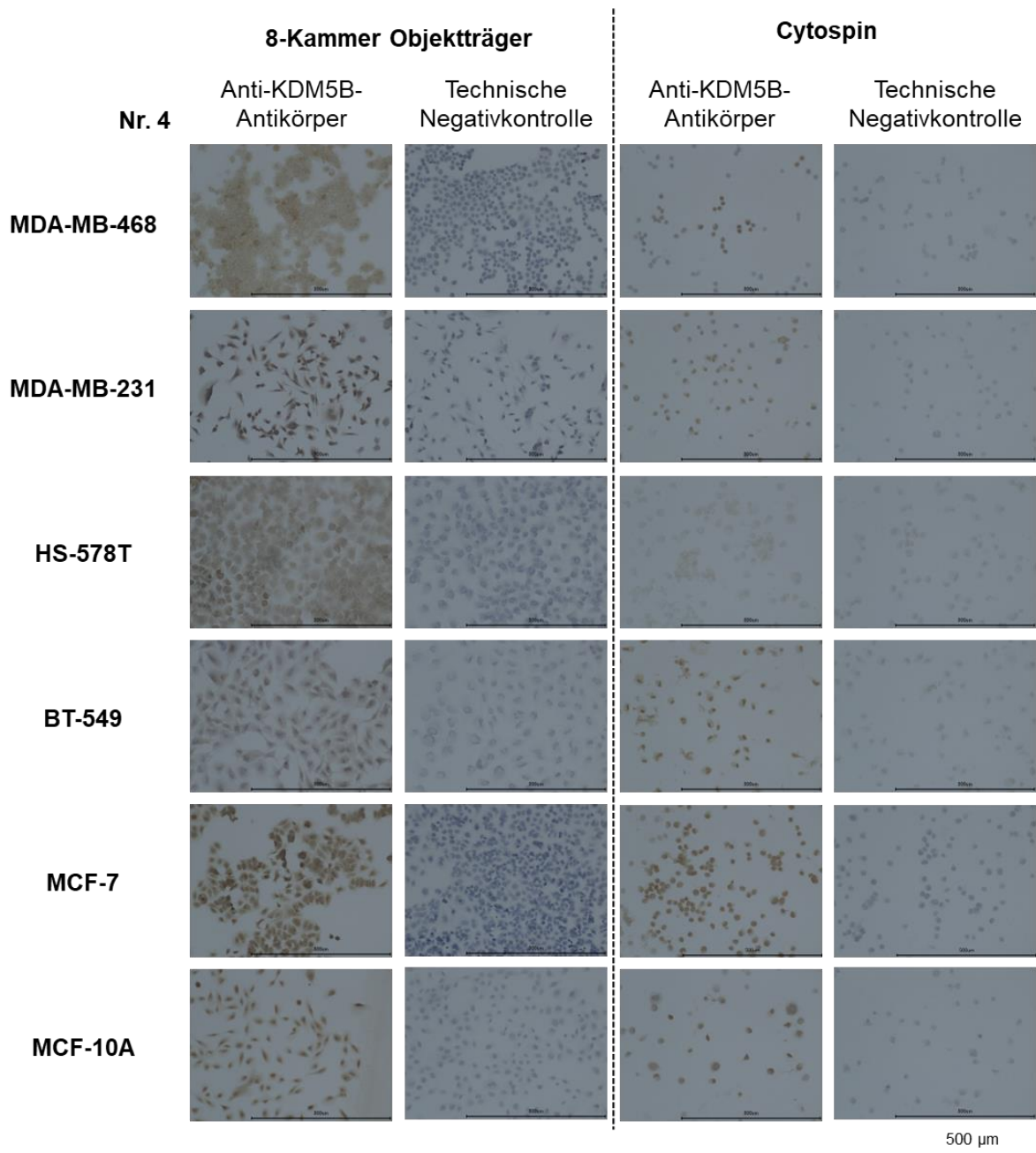


Abbildung 45: Vierter Versuchsdurchlauf immuncytochemischer Färbungen mit einem Anti-KDM5B-Primärantikörper sowie der zugehörigen technischen Negativkontrolle. Gefärbt wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-231, HS-578T, BT-549, MCF-7 und MCF-10A, welche zuvor auf einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert oder mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

8.2 Werte zu der siRNA-Knockdown-Etablierung

Werte der **Abbildung 23**: Mittlere Konzentration von Referenzgenen in den Zelllinien MDA-MB-468 und MCF-7 sowie die zugehörigen Standardabweichungen.

Mean conc	MDA-MB-468	MCF-7
ACTB	1,91518482711809	1,87209739643683
ATP5J	3,84047362081017	1,61041871417466
HMBS	2,49514526199436	2,27065644488835
HPRT	1,50462901072963	1,72558835702763
PPIA	5,36895602752657	1,66824523884966
TBP	2,68952781661380	1,71305539994944

STD conc	MDA-MB-468	MCF-7
ACTB	0,00026397754908	0,07622295442396
ATP5J	0,06830448172397	0,10764496588664
HMBS	0,11889705470158	0,02695925026607
HPRT	0,08149813275236	0,10081504693899
PPIA	0,08770798615084	0,06396731494432
TBP	0,21528667259467	0,02037347290722

Werte der **Abbildung 24**: Mittlere Konzentration von Referenzgenen in der Zelllinie MDA-MB-468 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B* und Kontroll-siRNA sowie die zugehörigen Standardabweichungen.

Mean conc	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72
ACTB	0,77902735	1,37360762	0,41304884
ATP5J	0,85463819	1,04760508	0,63746311
HMBS	0,60979839	0,93754033	0,21725259
HPRT	0,64859299	0,77975609	0,41203936
PPIA	0,97818519	1,63012221	0,92777153

STD conc	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72
ACTB	0,02851633	0,08483861	0,00727226
ATP5J	0,08866242	0,0928619	0,00238065
HMBS	0,04526813	0,09748807	0,00876819
HPRT	0,00987522	0,03454469	0,00504064
PPIA	0,00399244	0,02822853	0,00351924

Mean conc	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72
ACTB	0,68800569	1,25647187	1,38369828
ATP5J	1,07668062	1,329806	1,18692635
HMBS	0,84668525	0,91964474	0,91294591
HPRT	0,71582128	0,81541548	0,66763308
PPIA	1,37134863	1,9902731	1,52293453

STD conc	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72
ACTB	0,00395644	0,00319727	0,22737965
ATP5J	0,05284957	0,0300567	0,01744859
HMBS	0,08216414	0,06514966	0,12458347
HPRT	0,02025796	0,07847609	0,03896933
PPIA	0,03204848	0,48067083	0,00203186

Mean conc	KO 24	KO 48	KO 72
ACTB	0,67874975	0,94299468	0,72370648
ATP5J	1,05000404	1,48005352	0,78520177
HMBS	0,50802042	0,71638984	0,42930102
HPRT	0,62950776	0,71968361	0,45680914
PPIA	1,27071595	1,58750653	1,02

STD conc	KO 24	KO 48	KO 72
ACTB	0,03339361	0,01752642	0,00285203
ATP5J	0,02002935	0,18473935	0,06232512
HMBS	0,0064416	0,00928472	0,01469838
HPRT	0,00785555	0,0086961	0,00659123
PPIA	0,04977098	0,03020742	0

8 Anhang

Werte der **Abbildung 25** und **Abbildung 26**: Mittlere Konzentration der Referenzgene und der Zielgene *CBX5* und *KDM5B* in der Zelllinie MDA-MB-468 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- und Kontroll-siRNA sowie die zugehörigen Standardabweichungen. Außerdem sind das geometrische Mittel der Referenzgene und die darauf sowie auf die Kontrolle mit Kontroll-siRNA bezogenen Restaktivitäten von *CBX5* und *KDM5B* und die daraus resultierende Knockdowneffizienz in Prozent angegeben.

Haushaltsgene	Proben (mean conc)								
	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72	K0 24	K0 48	K0 72
ATCB	0,77902735	1,37360762	0,41304884	0,68800569	1,25647187	1,38369828	0,67874975	0,94299468	0,72370648
ATP5J	0,85463819	1,04760508	0,63746311	1,07668062	1,329806	1,18692635	1,05000404	1,48005352	0,78520177
HMBS	0,60979839	0,93754033	0,21725259	0,84668525	0,91964474	0,91294591	0,50802042	0,71638984	0,42930102
HPRT	0,64859299	0,77975609	0,41203936	0,71582128	0,81541548	0,66763308	0,62950776	0,71968361	0,45680914
PPIA	0,97818519	1,63012221	0,92777153	1,37134863	1,9902731	1,52293453	1,27071595	1,58750653	1,02

Geometrisches Mittel von ATCB, HMBS und HPRT	Proben								
	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72	K0 24	K0 48	K0 72
	0,67541454	1,00139129	0,33314632	0,74708992	0,98035628	0,94480337	0,60098548	0,78632139	0,52161859

Knockdown Gene	Proben (mean conc)								
	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72	K0 24	K0 48	K0 72
CBX5	0,02994681	0,05774199	0,0120568	0,42332102	0,55556332	0,51642078	0,29477218	0,45981423	0,28890082
KDM5B	0,23621211	0,50862768	0,07843465	0,02454465	0,06244468	0,03988534	0,15177755	0,28575615	0,16842945

Mean conc / GeoMittel der Haushaltsgene	Proben								
	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72	K0 24	K0 48	K0 72
CBX5	0,04433841	0,05766176	0,0361907	0,5666266	0,56669532	0,54659075	0,49048137	0,58476627	0,55385454
KDM5B	0,34972908	0,50792102	0,23543602	0,03285367	0,0636959	0,04221549	0,25254778	0,36340885	0,32289771

Quotient der normierten Konzentrationen von Knockdown und Kontrolle (Restaktivität)			
Knockdown Gene	Zeiten der Probeentnahme (h)		
	24	48	72
CBX5	0,09039775	0,09860652	0,06534333
KDM5B	0,13008893	0,1752734	0,13073951

Knockdown Effizienz			
Knockdown Gene	Zeiten der Probeentnahme (h)		
	24	48	72
CBX5	0,91	0,90	0,93
KDM5B	0,87	0,82	0,87

Fehler (STD Conc)									
Knockdown Gene	Proben								
	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72	K0 24	K0 48	K0 72
CBX5	0,00089984	0,00261876	0,00014066	0,00982783	0,02591602	0,02394214	0,00078527	0,00581177	0,00582547
KDM5B	0,0122268	0,00669116	0,004995	0,0013994	0,00739742	0,00364079	0,00224468	0,02306213	0,00043696

Fehler (STD Conc / Geomittel der Haushaltsgene)									
Knockdown Gene	Proben								
	CBX5 24	CBX5 48	CBX5 72	KDM5B 24	KDM5B 48	KDM5B 72	K0 24	K0 48	K0 72
CBX5	0,00133228	0,00261512	0,00018828	0,01315481	0,02643531	0,02534087	0,00130663	0,00739109	0,01116806
KDM5B	0,01810267	0,00668186	0,01499341	0,00187313	0,00754564	0,00385349	0,00373499	0,02932914	0,0008377

Fehler (STD Conc / Geomittel der Haushaltsgene) / Normierte Genexpression der Kontrollen			
Knockdown Gene	Zeiten der Probeentnahme (h)		
	24	48	72
CBX5	0,00183461	0,00447831	0,00025397
KDM5B	0,00554112	0,02035563	0,01127536

CBX5	Zeit nach Transfektion [h]		
	24	48	72
CBX5-Restaktivität	9,03977464	9,86065154	6,53433314
Knockdowneffizienz	90,9602254	90,1393485	93,4656669
Fehler	0,18346099	0,4478307	0,02539657

KDM5B	Zeit nach Transfektion [h]		
	24	48	72
KDM5B-Restaktivität	13,0088927	17,5273398	13,0739508
Knockdowneffizienz	86,9911073	82,4726602	86,9260492
Fehler	0,55411174	2,03556297	1,12753555

8.3 Werte zu den Zellfunktionsversuchen

Werte der **Abbildung 29**: Mittelwerte der migrierten Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 pro mm² aus drei Versuchsdurchläufen für die Lockmittel Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV, FCS sowie einer Kontrolle gegen serumfreies Medium. Angegeben sind außerdem die Gesamtmittelwerte, deren Standardabweichungen und mittels t-Test ermittelte p-Werte.

	Versuchsreihe	Lockmittel				
		Kontrolle gegen serumfreies Medium	Fibronectin	Kollagen I	Kollagen IV	FCS
Mittelwerte der gezählten Zellen pro mm ²	30_05_23 Nr1	5,636363636	14,4545455	83,0909091	72,727273	7,40909091
	30_05_23 Nr2	1,5	4,77272727	78,1363636	76,727273	4,09090909
	31_05_23 Nr2	6,363636364	6,86363636	122,272727	76,772727	12,2272727
		Kontrolle gegen serumfreies Medium	Fibronectin	Kollagen I	Kollagen IV	FCS
Mittelwert		4,50	8,70	94,50	75,41	7,91
Standardabweichung		2,623400733	5,09462797	24,1791266	2,3226339	4,09116161
T-Test			0,29433326	0,02216045	0,0000046	0,3018197

Werte der **Abbildung 30**: Mittelwerte der Zelladhäsion der Zelllinie MDA-MB-468 aus vierfachem Ansatz für die Lockmittel Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV sowie einer Kontrolle gegen BSA. Angegeben sind außerdem die Mittelwerte in Prozent bezogen auf die BSA-Kontrolle.

Mittelwerte der Adhäsion aus vierfach Ansatz			
BSA	Fibronectin	Kollagen I	Kollagen IV
0,09495803	0,30032218	0,2570913	0,20753315
Mittelwerte der Adhäsion in % bezogen auf BSA Kontrolle			
BSA	Fibronectin	Kollagen I	Kollagen IV
100	316,268321	270,742025	218,5524958

Werte der **Abbildung 31**: Mittelwerte der Zellproliferation der Zelllinie MDA-MB-468 72 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- oder Kontroll-siRNA in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Angegeben sind neben den Mittelwerten der einzelnen Versuchsdurchläufe außerdem die zusammengefassten Mittelwerte der drei Versuchsdurchläufe, deren Standardabweichung und mittels t-Test ermittelten p-Werte.

Proliferation:	72 h	nach Transfektion	
Mittelwerte aus Nr. 1-3		(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)	
Kontroll-siRNA	CBX5-Knockdown	KDM5B-Knockdown	Unbehandelte Zellen
100	81,26030429	92,60801958	97,85916151
Standardabweichung der Mittelwerte aus Nr. 1-3			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
0	1,784811597	8,77923598	21,32334261
T-Test (2 seitig) der Mittelwerte aus Nr. 1-3 (bezogen auf Kontroll siRNA)			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
	0,003010053	0,282111019	0,877956239

	Mittelwerte:	(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)		
Nr.	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
1	100	79,20337118	82,47465437	82,51876092
2	100	82,17776611	97,42738328	88,85036236
3	100	82,39977559	97,92202107	122,2083612

Werte der **Abbildung 32**: Mittelwerte der Zellproliferation der Zelllinie MDA-MB-468 96 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- oder Kontroll-siRNA in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Angegeben sind neben den Mittelwerten der einzelnen Versuchsdurchläufe außerdem die zusammengefassten Mittelwerte der drei Versuchsdurchläufe, deren Standardabweichung und mittels t-Test ermittelten p-Werte.

Proliferation:	96 h	nach Transfektion	
Mittelwerte aus Nr. 1-3		(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)	
Kontroll-siRNA	CBX5-Knockdown	KDM5B-Knockdown	Unbehandelte Zellen
100	78,62994044	93,72067459	104,0116327
Standardabweichung der Mittelwerte aus Nr. 1-3			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
0	1,360796346	10,99467547	15,87891447
T-Test (2 seitig) der Mittelwerte aus Nr. 1-3 (bezogen auf Kontroll siRNA)			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
	0,001348883	0,426822866	0,704408262

	Mittelwerte:	(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)		
Nr.	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
1	100	77,87212023	100,0626469	103,599789
2	100	77,81677332	100,0742582	88,34264632
3	100	80,20092776	81,02511868	120,0924629

Werte der **Abbildung 33**: Mittelwerte der Zellviabilität der Zelllinie MDA-MB-468 72 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- oder Kontroll-siRNA in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Angegeben sind neben den Mittelwerten der einzelnen Versuchsdurchläufe außerdem die zusammengefassten Mittelwerte der drei Versuchsdurchläufe, deren Standardabweichung und mittels t-Test ermittelten p-Werte.

Viabilität:	72 h	nach Transfektion	
Mittelwerte aus Nr. 1-3		(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)	
Kontroll-siRNA	CBX5-Knockdown	KDM5B-Knockdown	Unbehandelte Zellen
100	86,50371984	99,82533821	96,57898874
Standardabweichung der Mittelwerte aus Nr. 1-3			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
0	10,23875501	8,986445797	10,77562885
T-Test (2 seitig) der Mittelwerte aus Nr. 1-3 (bezogen auf Kontroll siRNA)			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
	0,149877763	0,976202433	0,637603051

	Mittelwerte:	(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)		
Nr.	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
1	100	82,04388937	91,44834329	88,57456194
2	100	79,25130739	109,3172002	92,33129059
3	100	98,21596275	98,71047116	108,8311137

Werte der **Abbildung 34**: Mittelwerte der Zellviabilität der Zelllinie MDA-MB-468 96 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- oder Kontroll-siRNA in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Angegeben sind neben den Mittelwerten der einzelnen Versuchsdurchläufe außerdem die zusammengefassten Mittelwerte der drei Versuchsdurchläufe, deren Standardabweichung und mittels t-Test ermittelten p-Werte.

Viabilität:	96 h	nach Transfektion	
Mittelwerte aus Nr. 1-3		(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)	
Kontroll-siRNA	CBX5-Knockdown	KDM5B-Knockdown	Unbehandelte Zellen
100	82,28623689	95,11178436	89,80184756
Standardabweichung der Mittelwerte aus Nr. 1-3			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
0	8,771028113	7,678528089	17,21402886
T-Test (2 seitig) der Mittelwerte aus Nr. 1-3 (bezogen auf Kontroll siRNA)			
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
	0,072901419	0,385123693	0,412725385

	Mittelwerte:	(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)		
Nr.	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
1	100	75,21282633	88,16780751	90,18585103
2	100	79,54551584	103,3582552	72,39902959
3	100	92,10036851	93,80929033	106,8206621

Werte der **Abbildung 35**: Mittelwerte der Zelladhäsion der Zelllinie MDA-MB-468 48 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- oder Kontroll-siRNA sowie einer zusätzlichen BSA-Kontrolle in Prozent bezogen auf die Kontrolle mit Kontroll-siRNA. Angegeben sind neben den Mittelwerten der einzelnen Versuchsdurchläufe außerdem die zusammengefassten Mittelwerte der drei Versuchsdurchläufe, deren Standardabweichung und mittels t-Test ermittelten p-Werte.

Adhäsion:	48 h	nach Transfektion		
Mittelwerte aus Nr. 1-3		(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)		
BSA-Kontrolle	Kontroll-siRNA	CBX5-Knockdown	KDM5B-Knockdown	Unbehandelte Zellen
28,7651005	100	137,3066217	111,8151188	190,4357631
Standardabweichung der Mittelwerte aus Nr. 1-3				
BSA Kontrolle	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
10,28431571	0	41,33821708	36,80650454	99,05840164
T-Test (2 seitig) der Mittelwerte aus Nr. 1-3 (bezogen auf Kontroll siRNA)				
BSA Kontrolle	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
0,006876167		0,258453371	0,634110896	0,254613868

	Mittelwerte:	(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)			
Nr.	BSA Kontrolle	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
1	38,98038982	100	119,6662826	84,9610831	212,1428654
2	28,90179066	100	184,5385345	153,7704446	276,8404672
3	18,41312102	100	107,7150481	96,71382881	82,32395664

Werte der **Abbildung 36**: Mittelwerte der Zelladhäsion der Zelllinie MDA-MB-468 72 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- oder Kontroll-siRNA sowie einer zusätzlichen BSA-Kontrolle in Prozent bezogen auf die Kontrolle mit Kontroll-siRNA. Angegeben sind neben den Mittelwerten der einzelnen Versuchsdurchläufe außerdem die zusammengefassten Mittelwerte der vier Versuchsdurchläufe, deren Standardabweichung und mittels t-Test ermittelten p-Werte.

Adhäsion:	72 h	nach Transfektion		
Mittelwerte aus Nr. 1-4		(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)		
BSA-Kontrolle	Kontroll-siRNA	CBX5-Knockdown	KDM5B-Knockdown	Unbehandelte Zellen
44,50197235	100	114,2923083	125,5534401	100,4294969
Standardabweichung der Mittelwerte aus Nr. 1-4				
BSA Kontrolle	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
14,91335953	0	35,34348816	15,56877487	28,72825491
T-Test (2 seitig) der Mittelwerte aus Nr. 1-4 (bezogen auf Kontroll siRNA)				
BSA Kontrolle	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
0,005020496		0,4778386	0,046333254	0,978024236

	Mittelwerte:	(Bezogen auf Kontroll siRNA in %)			
Nr.	BSA Kontrolle	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen
1	46,3010214	100	155,0194624	140,9392376	140,8600982
2	54,51864806	100	124,3440543	125,7405955	100,2489506
3	54,30793878	100	70,21463407	131,3526919	76,35236209
4	22,88028116	100	107,5910826	104,1812353	84,25657661

Werte der **Abbildung 37**: Mittelwerte der Zellmigration der Zelllinie MDA-MB-468 72 h nach Transfektion mit *CBX5*-, *KDM5B*- oder Kontroll-siRNA sowie einer zusätzlichen Kontrolle gegen serumfreies Medium in Prozent bezogen auf die Kontrolle mit Kontroll-siRNA. Angegeben sind neben den Mittelwerten der einzelnen Versuchsdurchläufe außerdem die zusammengefassten Mittelwerte der zwei Versuchsdurchläufe und deren Standardabweichung.

Migration:	72 h	nach Transfektion		
Mittelwerte aus Nr. 2,3,4		Zellen pro mm ²		
Kontroll-siRNA	CBX5-Knockdown	KDM5B-Knockdown	Unbehandelte Zellen	Kontrolle gegen serumfreies Medium
49,56818182	85,30681818	88,375	71,69318182	4,681818182
Standardabweichung der Mittelwerte aus Nr. 3,4				
Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen	Kontrolle gegen serumfreies Medium
9,73878885	10,30126015	2,233814604	27,43252899	4,69261773

	Mittelwerte:	Zellen pro mm ²			
Nr.	Kontroll siRNA	CBX5 Knockdown	KDM5B Knockdown	Unbehandelte Zellen	Kontrolle gegen serumfreies Medium
3	56,45454545	92,59090909	89,95454545	91,09090909	1,363636364
4	42,68181818	78,02272727	86,79545455	52,29545455	8

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt x und x für die hervorragende Betreuung und stetige Förderung des Projektes sowie x, x und x für ihre unermüdliche Hilfe und Unterstützung im Labor. Außerdem möchte ich mich bei x, x, x und x für den guten wissenschaftlichen Austausch und die großartige Zeit im Labor bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich auch bei x und x, durch deren Hilfe diese Arbeit methodisch umgesetzt werden konnte.

Ein besonderer Dank gebührt außerdem meiner Familie x, x und x für ihre immerwährende Unterstützung und Anteilnahme sowie x für seine wertvollen Korrekturvorschläge.

Zuletzt möchte ich mich ebenfalls bei meinem fantastischen Freundeskreis für die ständige Unterstützung und Motivation bedanken. Besonders hervorheben möchte ich dabei x, x, x, x, x, x, x und x, auf deren Ermutigung und Rückhalt ich mich immer verlassen konnte.

10 Tabellarischer Lebenslauf

zensiert