

Aus dem
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung zur Rolle von IRF1 in der Brustkrebsphysiologie

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

Vorgelegt von

Barbara Frey
aus Bad Urach

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: [REDACTED]

1. Gutachter: [REDACTED]

2. Gutachter: [REDACTED]

Tag der Promotion: 06. Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Das Mammakarzinom.....	3
2.1.1 Definition und Epidemiologie.....	3
2.1.2 Klassifikationen und Histopathologie.....	4
2.1.3 Risikofaktoren	5
2.1.4 Therapieoptionen	6
2.1.4.1 Operative Therapie	6
2.1.4.2 Radiotherapie.....	6
2.1.4.3 Chemotherapie	6
2.1.4.4 Spezifische Therapie bezogen auf den molekularen Subtyp	7
2.2 Der Interferon-regulierende Faktor 1 (IRF1).....	9
2.2.1 Entdeckung und Übersicht	9
2.2.2 Bedeutung von IRF1 im Mammakarzinom – in vitro und im Mausmodell.....	10
2.2.3 Bedeutung von IRF1 im Mammakarzinom – in vivo.....	11
2.2.4 Der IRF1-Signalweg.....	12
2.2.5 Der Einfluss von IRF1 beim endokrin-resistenten ER+ Mammakarzinom.....	14
2.2.6 Die Rolle von IRF1 bei der Entdifferenzierung des Brustepithels und der Bildung von Fernmetastasen	15
2.2.6.1 Überblick.....	15
2.2.6.2 Tumorzellmigration aufgrund von Epithel-mesenchymaler Transition.....	16
2.2.6.3 Die Funktion von Immunzellen bei der Tumorgenese.....	17
2.3 Zielsetzung der Arbeit.....	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	20
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.3 Geräte.....	21
3.1.4 Kit-Systeme.....	22
3.1.5 Oligonukleotidsequenzen	23
3.1.6 Zellkulturmedien.....	24
3.1.7 Zelllinien.....	24

3.2	Methoden	25
3.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen.....	25
3.2.1.1	Steriles Arbeiten in der Zellkultur.....	25
3.2.1.2	Kultivierung humaner Zelllinien	25
3.2.1.3	Kryokonservierung und Rekultivierung.....	25
3.2.1.4	Bestimmung der Zellkonzentration	26
3.2.2	RNA-Methoden	26
3.2.2.1	RNA-Extraktion	27
3.2.2.2	Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung	27
3.2.2.3	cDNA-Synthese	27
3.2.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	28
3.2.3.1	Prinzip der qRT-PCR	28
3.2.3.2	Durchführung der qRT-PCR.....	29
3.2.3.3	Auswertung der qRT-PCR.....	30
3.2.4	In-vitro-Transkription	30
3.2.5	Transfektion	32
3.2.6	MTT-Zellviabilitätsassay.....	34
3.2.7	Migration in der Boyden-Kammer.....	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Untersuchung der Expression von IRF1 in Mammakarzinomzellen mit qRT-PCR..	37
4.2	Transfektion von EGFP-mRNA in Mammakarzinomzellen.....	41
4.3	Zellviabilität der EGFP- und IRF1-transfizierten Mammakarzinomzellen.....	56
4.4	Chemotaktische Migration der EGFP- und IRF1-transfizierten Mammakarzinomzellen.....	60
4.4.1	Migration der Mammakarzinomzelllinie MCF7	60
4.4.2	Migration der Mammakarzinomzelllinie T47D.....	65
5	Diskussion	68
5.1	Transfektion von messenger-RNA	68
5.2	Bedeutung von IRF1 für die Migration von Mammakarzinomzellen.....	70
5.3	Ausblick	75
6	Zusammenfassung	77
7	Literaturverzeichnis.....	79
8	Anhang.....	87
9	Danksagung	98
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	99

Abkürzungsverzeichnis

AC/EC	Adriamycin/Epirubicin, Cyclophosphamid
ACTB	β-Aktin
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat
ARCA	Anti-Reverse Cap Analog
ATP5J	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial
B2M	β ₂ -Mikroglobulin
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA1	Breast Cancer 1
cDNA	complementary DNA
CGH	Comperative Genomic Hybridization
CMF	Cyclophosphamid, Methothrexat, 5-Fluoruracil
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER+	Östrogenrezeptor-positiv
ETDA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
FEC/FAC	5-Fluoruracil, Epirubicin/Adriamycin, Cyclophosphamid
H ₂ O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HER2	Human epidermal growth factor 2
HG	Haushaltsgen

HLA	Human Leukocyte Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HR	Hormonrezeptor
IFN- $\alpha/\beta/\gamma$	Interferon- $\alpha/\beta/\gamma$
IRF1	Interferon-regulierender Faktor 1
ISRE	Interferon-stimulated-responsive-element
JAK	Janus-family tyrosine kinase
MHC I	Major Histocompatibility Complex I
mRNA	messenger-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
P/S	Penicillin/Streptomycin
p53	Protein p53
pcDNA3	käufliches Plasmid der Firma Invitrogen
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
pH	Potentia hydrogenii
PKR	Proteinkinase R
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
qRT-PCR	quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBP	TATA-Box Binding Protein
TGF β	Transforming growth factor β
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNM	Tumor Nodus Metastasen
UICC	Union internationale contre le cancer
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für Brustkrebs in der Zielgruppe des Mammographie-Screenings und in übrigen Altersbereichen [1].....	3
Abbildung 2: Systemtherapie bei Patienten mit Mammakarzinom, angepasst an den molekularen Subtyp [3].....	8
Abbildung 3: Domänenstruktur von IRF1, bestehend aus einer DNA-Bindungsdomäne (N-Terminus) und einer regulatorischen Domäne (C-Terminus) [33].	9
Abbildung 4: Ligandenabhängige Aktivierung der JAK-STAT-Signalkaskade aufgrund von Phosphorylierung durch intrazelluläre JAK [46].	12
Abbildung 5: Der IRF1-Signalweg. Verändert nach [55].....	13
Abbildung 6: IRF1-reguliertes Zellschicksal mittels Caspasen, BIRC5 und Mitgliedern der BCL2-Familie [33].....	15
Abbildung 7: Modell zur Progression von Tumoren und Entwicklung von Metastasen [66].	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 8: Schema der bei metastasiertem Brustkrebs beobachteten Immun-Escape-Mechanismen [77].....	18
Abbildung 9: Grundschrirte der PCR mit SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff [80]	28
Abbildung 10: Auftragungsschema für den MTT-Zellviabilitätsassay	34
Abbildung 11: Auftragungsschema für die Migration in der Boyden-Kammer	36
Abbildung 12: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentrationen zw. MCF7 und MCF10A.....	38
Abbildung 13: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentrationen zw. T47D und MCF10A	38
Abbildung 14: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentrationen zw. BT549 und MCF10A.....	39
Abbildung 15: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentration zw. MDA-MB231 und MCF10A...39	
Abbildung 16: Relative IRF1-Expression in Prozent	41
Abbildung 17: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (mit Fluoreszenz)	44
Abbildung 18: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (ohne Fluoreszenz) ..	44
Abbildung 19: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (mit Fluoreszenz)	44
Abbildung 20: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (ohne Fluoreszenz) ..	44
Abbildung 21: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (mit Fluoreszenz).....	45
Abbildung 22: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (ohne Fluoreszenz).....	45
Abbildung 23: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (mit Fluoreszenz).....	45
Abbildung 24: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (ohne Fluoreszenz).....	45

Abbildung 25: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (mit Fluoreszenz)	46
Abbildung 26: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (ohne Fluoreszenz) ..	46
Abbildung 27: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (mit Fluoreszenz)	46
Abbildung 28: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (ohne Fluoreszenz) ..	46
Abbildung 29: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (mit Fluoreszenz)	47
Abbildung 30: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (ohne Fluoreszenz) ..	47
Abbildung 31: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (mit Fluoreszenz)	47
Abbildung 32: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (ohne Fluoreszenz) ..	47
Abbildung 33: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (mit Fluoreszenz)	49
Abbildung 34: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (ohne Fluoreszenz) ..	49
Abbildung 35: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (mit Fluoreszenz)	49
Abbildung 36: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 20X (ohne Fluoreszenz) ..	49
Abbildung 37: Tag 5 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (mit Fluoreszenz)	49
Abbildung 38: Tag 5 nach EGFP-mRNA Transfektion von MCF7 10X (ohne Fluoreszenz) ..	49
Abbildung 39: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 10X (mit Fluoreszenz).....	50
Abbildung 40: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 10X (ohne Fluoreszenz).....	50
Abbildung 41: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 10X (mit und ohne Fluoreszenz).....	51
Abbildung 42: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 20X (mit und ohne Fluoreszenz).....	52
Abbildung 43: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 10X (mit Fluoreszenz).....	53
Abbildung 44: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 10X (ohne Fluoreszenz).....	53
Abbildung 45: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 10X (mit und ohne Fluoreszenz).....	54
Abbildung 46: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 20X (mit und ohne Fluoreszenz).....	55
Abbildung 47: Überprüfung des Transfektionserfolges von MCF7 in einer 96-Well-Platte (EGFP-Signal 24h nach Transfektion).....	57
Abbildung 48: Überprüfung des Transfektionserfolges von T47D in einer 96-Well-Platte (EGFP-Signal 24h nach Transfektion).....	57
Abbildung 49: Zellviabilität der Tumorzelllinie MCF7	59
Abbildung 50: Zellviabilität der Tumorzelllinie T47D	59

<i>Abbildung 51: Überprüfung des Transfektionserfolges bei der Tumorzelllinie MCF7 in einer T25-Zellkulturflasche (EGFP-Signal 24h nach Transfektion)</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 52: Lichtmikroskopie-Aufnahmen (mit Rasterokular) von MCF7 nach Migration ..</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 53: Migration der IRF1-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie MCF7 (die nativen Zellen wurden zur Veranschaulichung mit dargestellt)</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 54: Migration der IRF1-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie MCF7</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 55: Überprüfung des Transfektionserfolges bei der Tumorzelllinie T47D in einer T25-Zellkulturflasche (EGFP-Signal 24h nach Transfektion)</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 56: Lichtmikroskop-Aufnahmen (mit Rasterokular) von T47D nach Migration.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 57: Migration der IRF1-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie T47D (die nativen Zellen wurden zur Veranschaulichung mit dargestellt)</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 58: The Hallmarks of Cancer [67].</i>	<i>71</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Tumorstadien des Mammakarzinoms nach UICC-Klassifikation [12].....</i>	<i>4</i>
<i>Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms [3].....</i>	<i>7</i>
<i>Tabelle 3: Programmstufen des Thermocyclers bei cDNA-Synthese.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 4: Programmschritte der qRT-PCR.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 5: Übersicht in-vitro Transkription.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 6: Übersicht Transfektion der Mammakarzinomzelllinie MCF7.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 7: Übersicht Transfektion der Mammakarzinomzelllinie T47D.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 8: Übersicht Transfektion der Mammakarzinomzelllinie BT549.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Transfektionsreagenzien.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 10: Zellwachstumsdauer in den unterschiedlichen Zellkulturgefäßen.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 11: Herkunft sowie klinische und pathologische Merkmale der Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D [91].....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 12: Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen, die in der Zelllinie T47D im Vergleich zu MCF7 hochreguliert sind oder nur dort vorkommen [92].....</i>	<i>96</i>
<i>Tabelle 13: Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen, die in der Zelllinie MCF7 im Vergleich zu T47D hochreguliert sind oder nur dort vorkommen [92].....</i>	<i>97</i>

1 Einleitung

Die epidemiologischen Daten sowie die immense Studienlage zum Mammakarzinom zeigen deutlich auf, welchen Stellenwert diese Erkrankung bei Frauen (und sehr selten auch bei Männern) einnimmt. Brustkrebs ist der häufigste Tumor der Frau in der westlichen Welt, das Mammakarzinom macht bei Frauen zwischen 35 und 59 Jahren etwa 40% aller Krebsneuerkrankungen aus. In Deutschland erkrankt zurzeit jede achte Frau an einem Mammakarzinom. Das entspricht 67297 Neuerkrankungen pro Jahr (RKI-Daten 2017) [1]. Die Bestimmung des Erkrankungsstadiums bei Diagnosestellung erfolgt anhand der TNM-Klassifikation nach UICC. Es wird die TumorgroÙe (T), der Lymphknotenbefall (N) sowie die Fernmetastasierung (M) beurteilt. Dabei wird die Prognose mit steigender TumorgroÙe schlechter. Wichtigster prognostischer Faktor ist der Lymphknotenstatus. 75% der Patienten leben die nächsten 10 Jahre rezidivfrei, wenn die axillären Lymphknoten nicht befallen sind. Bei 1-3 befallenen Lymphknoten liegt die Gesamtüberlebensrate nach 10 Jahren bei 36%, bei mehr als 3 Lymphknoten nur noch bei 14%. Das Vorhandensein von Fernmetastasen geht mit einer sehr schlechten Prognose einher [2].

Einen entscheidenden Einfluss auf Prognose und Therapieerfolg hat neben Lymphknotenbefall bzw. Vorhandensein von Metastasen und histologischem Grading vor allem das Rezeptorprofil. Man unterteilt das Mammakarzinom in vier molekulare Subtypen: Luminal A und B, HER2-*enriched* und *basal-like* [3]. Diese Einteilung basiert hauptsächlich auf der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus (östrogen und Progesteron) sowie des HER2-Status. Die Patienten erhalten, zusätzlich zur konventionellen Therapie bestehend aus Operation, Radio- und/oder Chemotherapie (je nach Diagnose), eine gezielte auf den jeweiligen Rezeptor ausgerichtete Therapie. Dabei werden bei ostrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom Tamoxifen als ostrogenrezeptormodulator und/oder Letrozol als Aromataseinhibitor eingesetzt und bei HER2-positivem Tumor wird eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab durchgeführt [4].

Neue Tumorthherapie-Strategien konzentrieren sich neben immunologischen Ansätzen auf die Identifizierung von Genen, deren Expression Einfluss auf die Tumorgenese und Metastasierung von Mammakarzinomen nimmt.

Im Jahre 1988 wurde der Interferon-regulierende Faktor 1 (IRF1) als das erste Mitglied der Familie der Interferon-regulierenden Faktoren identifiziert [5]. Während einer Studie über die Regulation des IFN- β -Gens durch einen Virus wurde ein Faktor, der an den IFN- β Genpromotor bindet und seine Transkription reguliert, gefunden, der IRF1 genannt wurde [5].

Mittlerweile ist bekannt, dass IRF1 eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort sowie bei der Regulierung von Apoptose, DNA-Schäden und Tumorsuppression spielt [6]. IRF1 ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor, der Interferon- und andere Zytokineffekte reguliert (aktiviert oder hemmt) durch Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz (ISRE *Interferon-stimulated-responsive-element*) in deren Promotoren [7].

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von IRF1 in der Brustkrebsphysiologie näher zu untersuchen. Dafür wurde zunächst eine quantitative *Real-Time* PCR unterschiedlicher Mammakarzinomzelllinien durchgeführt, um die vorhandene *IRF1*-Konzentration in diesen zu bestimmen. Analog den Ergebnissen anderer Studien wurde hierbei eine verminderte Expression von IRF1 beobachtet. Daraufhin wurde neben der Transfektion der Tumorzellen mit IRF1 und EGFP mRNAs (synthetisiert aus den entsprechenden Plasmidvektoren von Jessica Behnke [8]), ein MTT-Test durchgeführt und die chemotaktische Zellmigration betrachtet, um zu analysieren, wie eine Expressionssteigerung von IRF1 das Verhalten der Brustkrebszellen beeinflusst. Da IRF1 das Potential hat, über unterschiedliche Mechanismen die Tumorbildung/-dissemination zu verhindern, ist es ein sehr interessanter Angriffspunkt für neue Therapieansätze.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Bei dem Mammakarzinom handelt es sich um einen malignen Tumor ausgehend von den Milchgängen (duktales Karzinom) oder von den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom) der Mamma [9]. In den westlichen Industrieländern ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung und zugleich auch die häufigste Krebstodesursache der Frau [10]. Im Jahre 2017 lag die Anzahl der Frauen, die an Brustkrebs erkrankten bei 67297 (RKI-Daten 2017). Bei der Mammakarzinom Inzidenz (Rate der Neuerkrankungen) ist in Deutschland seit 1980 ein stetiger Anstieg der Fallzahlen zu verzeichnen ist. Vor allem nimmt die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit steigendem Alter zu. Etwa jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs [11]. Nach Einführung des Mammographie-Screening-Programms in Deutschland für Frauen von 50 bis 69 Jahren sind die Erkrankungsraten seit 2009 kontinuierlich zurückgegangen. Aktuell (2020) liegt sie nur noch leicht über dem Ausgangsniveau und auch die Brustkrebssterblichkeit entwickelt sich in der Screening-Altersgruppe deutlich günstiger als bei unter 50-jährigen und über 70-jährigen Frauen (Abbildung 1) [1].

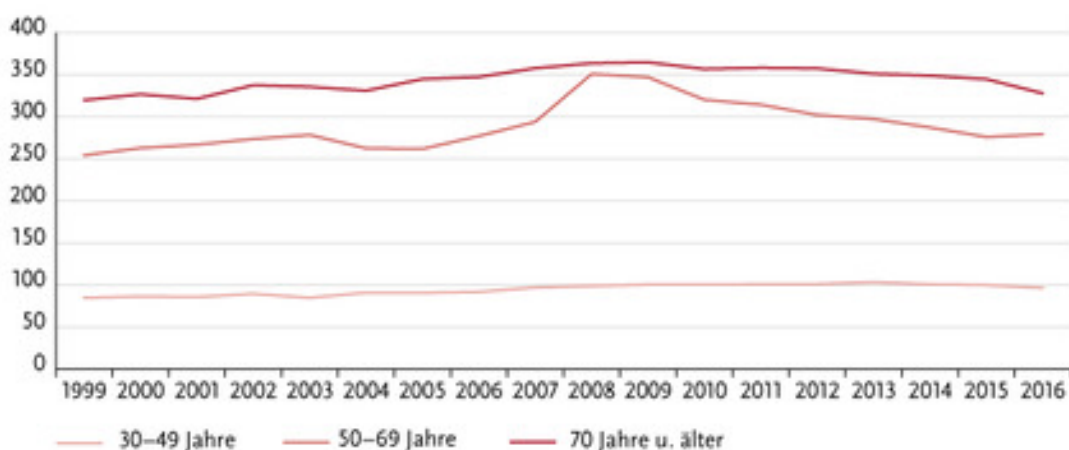


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für Brustkrebs in der Zielgruppe des Mammographie-Screenings (Frauen 50-69 Jahre) und in übrigen Altersbereichen (Frauen 30-49 Jahre, 70 Jahre und älter), Deutschland 1999-2016, je 100.000 (alter Europastandard)

2.1.2 Klassifikationen und Histopathologie

Die Stadien von Brustkrebs lassen sich nach Vorgaben der UICC (*Union internationale contre le cancer*) anhand des TNM-Systems zu fünf Stadiengruppen (0-IV) zusammenfassen; basierend auf der Tumorgroße (T), der Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und der Metastasierung (M) (Tabelle 1). Ausgehend von dieser Klassifikation werden die aktuellen Therapieempfehlungen herausgegeben [12]. Die c-TNM geht dabei von klinisch erfassten Werten aus, während die postoperativ histopathologische Klassifikation p-TNM genauer ist. Alle Fälle, bei denen Fernmetastasen diagnostiziert werden, sind unabhängig von der Größe des Primärtumors und dem Lymphknotenbefall dem UICC-Stadium IV zugeordnet [2].

Tabelle 1: Tumorstadien des Mammakarzinoms nach UICC-Klassifikation [12]

Stadium	T (Größe Primärtumor)	N (Befallene Lymphknoten)	M (Fern-) Metastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
IIIC	Jedes T	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

T0: kein Primärtumor nachweisbar

Tis: Carcinoma in situ

T1: bis 2 cm

T2: >2 cm bis 5 cm

T3: >5 cm

T4: jede Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut

N0: Keine

N1: 1-3 in der Axilla

N2: 2-9 in der Axilla

N3: 10 oder mehr in der Axilla oder unter/über dem Schlüsselbein

M0: keine nachweisbar

M1: nachweisbar (meist Lunge, Leber, Knochen)

Aus histologischer Sicht sind über 70% der Mammakarzinome Adenokarzinome, die aus dem Epithel der terminalen dukto-lobulären Einheit entstehen. Man unterscheidet zwischen invasiven und noninvasiven Adenokarzinomen (*Carcinoma in situ*); abhängig davon, ob die Basalmembran überschritten wird [13]. Invasive Mammakarzinome entwickeln sich aus Präkanzerosen, wobei die karzinomatöse Entartung häufig erst mit einer hohen Latenzzeit stattfindet [14].

Man unterteilt das invasive Mammakarzinom anhand seiner Histologie nach Elston und Ellis in drei Differenzierungsgrade bzw. Malignitätsgrade (englisch *Grading*): Anzahl der tubulären Strukturen (Ausbildung röhrenartiger Tumordrüsen), Kernpolymorphie (Vielgestaltigkeit der Zellkerne) und Mitoserate (Teilungsrate der Zellen). Pro Kriterium werden entsprechende Punkte vergeben. Je höher das Grading, desto ungünstiger ist das Verhalten der Tumorzellen. Man unterscheidet Tumoren mit Differenzierungsgrad 1, 2 oder 3 (G1 = gut differenziert, G2 = mäßig differenziert, G3 = schlecht differenziert). Präoperativ ist vor allem die Unterscheidung zwischen G2 (mäßig differenziert, mäßiger Malignitätsgrad) und G3 (schlecht differenziert, hoher Malignitätsgrad) relevant für eine eventuelle neoadjuvante Therapie [15].

2.1.3 Risikofaktoren

Als größter Risikofaktor für das Mammakarzinom gilt das zunehmende Alter. Dabei liegt das mediale Erkrankungsalter bei 64 Jahren, wobei das Erkrankungsrisiko ab dem 30. Lebensjahr stetig ansteigt [16]. Des Weiteren haben Frauen mit einem frühen Menarchenalter (vor dem 12. Lebensjahr) und einem sehr späten Menopausenalter (nach dem 55. Lebensjahr) ein höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken [17]. Eine entscheidende Rolle spielen auch Umweltfaktoren, wie Adipositas oder erhöhter Alkoholkonsum [18].

Die meisten Fälle von Brustkrebs sind sporadisch, ohne erkennbare Hinweise auf familiäre Häufung. Nur etwa 5-10% der Mammakarzinome sind erblich bedingt, wobei diese häufig mit pathogenen *BRCA1/BRCA2*-Varianten in Zusammenhang stehen. Die Proteine BRCA1 und 2 (*breast cancer 1 and 2*) spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur und erhöhen bei Verlust das Tumorrisiko insbesondere für Mammakarzinom, sowie auch Ovarialkarzinom und Kolonkarzinom [19]. Das durchschnittliche Risiko bei BRCA-Mutationsträgern bis zum Alter von 70 Jahren an Brustkrebs zu erkranken beträgt 65 % [20]. Von den Mutationen oben erwähnter Gene können auch Männer betroffen sein und somit mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an Prostatakrebs sowie an Brustkrebs erkranken [21].

2.1.4 Therapieoptionen

Aufgrund der Heterogenität des Mammakarzinoms ist Verlauf, Prognose und das Ansprechen auf Therapien bei der Tumorerkrankung sehr unterschiedlich [12].

2.1.4.1 Operative Therapie

Das Ziel der Operation eines Mammakarzinoms ist die vollständige Resektion des Tumors mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand (circa 2 cm zum umliegenden Gewebe) [24]. Zugleich erfolgt die Entnahme des Wächterlymphknotens (*sentinel lymph node*). Dies ist deshalb notwendig, um den Lymphknotenstatus ermitteln zu können. Je nachdem reicht es, nur den Wächterlymphknoten zu entfernen, oder es muss eine totale Axilläre Dissektion durchgeführt werden [22]. Bei einem lokalregionären Tumor ist der Therapieansatz mittels Operation kurativ, während bei einem Mammakarzinom mit Fernmetastasen der palliative Therapieweg eingeschlagen wird. Grundsätzlich wird unterschieden zwischen brusterhaltender Therapie (BET) und der Mastektomie, wobei heutzutage nach Möglichkeit die BET als operatives Standardverfahren angestrebt wird; insbesondere aufgrund der enormen positiven psychologischen Auswirkung auf die Patientinnen [23]. Als adjuvante Therapie zur BET erfolgt eine Radiotherapie, die zusätzlich zur Brust auch die Abflusswege der Lymphknoten miterfassen kann.

2.1.4.2 Radiotherapie

Die Radiotherapie leistet einen wichtigen Beitrag in der adjuvanten Therapie beim Mammakarzinom. In den meisten Fällen wird eine Verringerung des Rezidivrisikos erreicht. Abgesehen von dem Einsatz bei kurativer Absicht, spielt die Strahlentherapie auch bei palliativen Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom eine wichtige Rolle. Vor allem bei vorhandenen Knochenmetastasen kann die Bestrahlung zu einer signifikanten Verbesserung der Lebensqualität führen [25].

2.1.4.3 Chemotherapie

Nach der Operation folgt für viele Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko eine adjuvante Chemotherapie, um möglicherweise verbliebene Tumorzellen abzutöten. Dafür kommen verschiedene zytostatische Medikamente zum Einsatz, die nach individuellen Chemotherapieschemata eingesetzt werden. In der Regel werden Zytostatika als Kombinationen eingesetzt [24]. Zum Standard der Chemotherapie gehörte seit vielen Jahren das sogenannte CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil), mittlerweile wird jedoch je nach Verträglichkeit vermehrt entweder eine Dreierkombinationstherapie aus FEC/FAC (5-Fluoruracil, Epirubicin/Adriamycin, Cyclophosphamid) oder eine Zweierkombination aus AC/EC verwendet. Wenn die Lymphknoten mit Metastasen befallen waren, wird eine Ergänzung mit Taxanen (Paclitaxel) empfohlen [26]. Beim inflammatorischen

und lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom sowie bei primär inoperablen Tumoren hat sich zusätzlich die neoadjuvante Chemotherapie durchgesetzt. Zu den gängigen allgemeinen Nebenwirkungen der Chemotherapie zählen in erster Linie die Alopezie, verstärkte Übelkeit und Veränderungen des Blutbilds [27, 28].

2.1.4.4 Spezifische Therapie bezogen auf den molekularen Subtyp

Seit den etablierten Arbeiten von Perou und Sorlie vor etwa 20 Jahren klassifiziert man das Mammakarzinom in vier molekulare Subtypen. Dabei wird unterschieden zwischen Luminal A und B, HER2-*enriched* und *basal-like* (Tabelle 2) [3]. Diese Einteilung basiert auf der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus (HR), des HER2-Status und des Proliferationsmarkers KI-67 (gibt die Wachstumsgeschwindigkeit von Tumorzellen an).

Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms [3]

Subtyp	Molekulare Eigenschaften
Luminal-A-like Typ	Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ (mit niedriger Proliferationsrate)
Luminal-B-like Typ	Hormonrezeptor-positiv mit hoher Proliferationsrate, HER2+/-
HER2-Typ non-Luminal	HER2-positiv und Hormonrezeptor-negativ
Basal-like-Typ	Hormonrezeptor-negativ und HER2-negativ = „triple negative“

Hormonrezeptoren (HR) dienen als Bindungsstelle für Östrogen und Progesteron, wodurch das Wachstum von Brustkrebszellen beeinflusst wird. Wenn Tumorzellen hormonabhängig sind, lässt sich ihr Wachstum durch Hormonentzug verlangsamen oder stoppen. Dafür wird eine (Anti-) Hormontherapie bzw. endokrine Therapie durchgeführt und es kann je nach Ansprechen sogar auf eine Chemotherapie verzichtet werden [4]. Zu den bekanntesten Antiöstrogenen zählen Tamoxifen und Fulvestrant sowie die Aromatasehemmer Anastrozol, Letrozol und Exemestan.

HER2-Rezeptoren (*human epidermal growth factor receptor 2*) sind Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren, die die Krebszelle zur Teilung anregen. Das Vorhandensein von vielen HER2-Rezeptoren geht oft mit einem aggressiveren Verlauf der Krebserkrankung einher. Gezielte Therapien (wie der Antikörper Trastuzumab) blockieren diese Rezeptoren und hemmen damit das Zellwachstum [4].

Das Triple-negative (TNBC) Mammakarzinom unterliegt einer schlechteren Prognose als die anderen Subtypen, Patienten erhalten in der Regel eine neoadjuvante Polychemotherapie [29].

In Abbildung 2 ist eine Zusammenfassung der Therapien des Mammakarzinoms je nach Subtyp dargestellt:

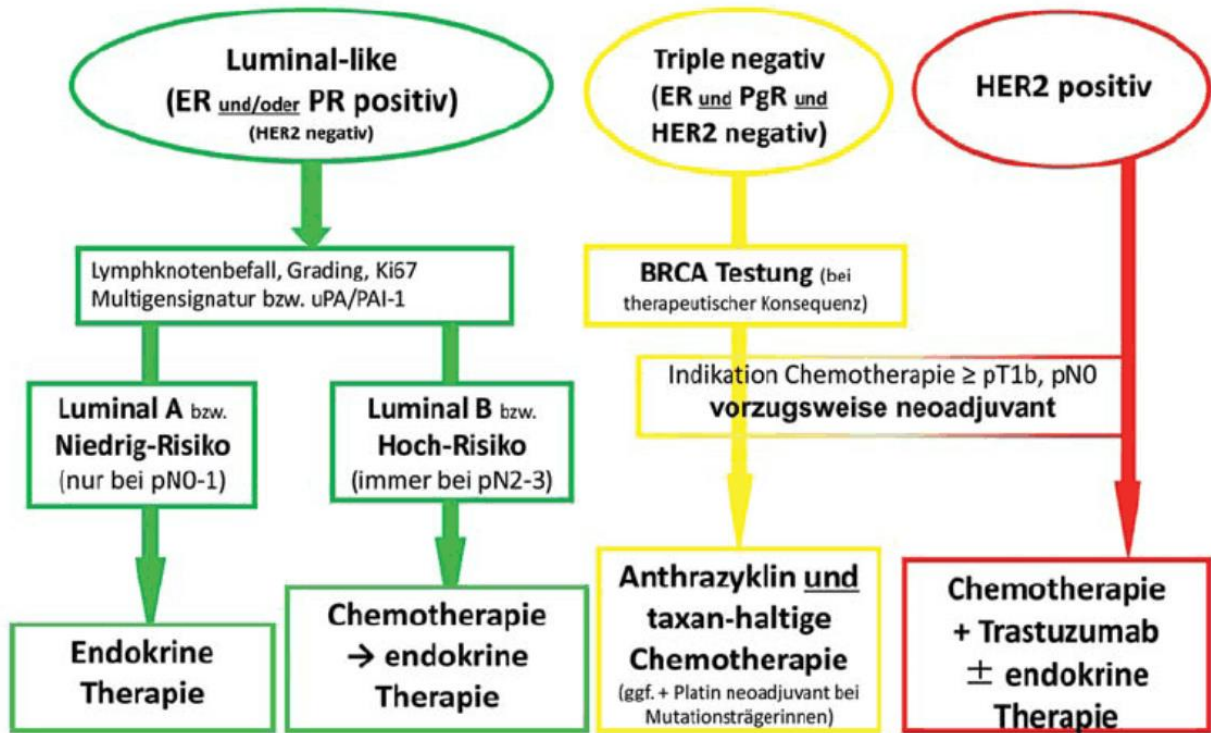


Abbildung 2: Systemtherapie bei Patienten mit Mammakarzinom, angepasst an den molekularen Subtyp [3].

2.2 Der Interferon-regulierende Faktor 1 (IRF1)

2.2.1 Entdeckung und Übersicht

Zunehmend wird deutlich, dass Tumorgenese und -progression auf genetischen Veränderungen beruhen. Solche Mutationen können sowohl Onkogene aktivieren als auch Tumorsuppressorgene inaktivieren. Während beim Mammakarzinom auf molekularer Ebene die Amplifikation der Onkogene *Her-2/neu/ErbB2*, *Myc* und *Int2* identifiziert wurde, ist über Tumorsuppressorgene, die direkt in die Entwicklung und/oder das Fortschreiten dieser Erkrankung involviert sind, bisher relativ wenig bekannt [30]. Eine veränderte Expression oder Funktion etablierter Tumorsuppressorgene wie *BRCA1/BRCA2* oder *TP53* erklären nicht vollständig die hohe Prävalenz von spontanen Brustkrebskrankungen. Zum Beispiel ist *BRCA1* bei <10 % aller Brustkrebs verloren oder mutiert [31] und *TP53* bei circa 30 % [32]. Die Suche nach weiteren Tumorsuppressorgenen ist wichtig, um neue Erkenntnisse über die Ätiologie und den natürlichen Verlauf von Brustkrebs zu gewinnen.

Im Jahre 1988 wurde der Interferon-regulierende Faktor 1 (IRF1) als das erste Mitglied der Familie der Interferon-regulierenden Faktoren identifiziert. Während einer Studie über die Regulation des IFN- β -Gens durch einen Virus wurde ein Faktor, der an den IFN- β Genpromotor bindet und seine Transkription reguliert, gefunden, der IRF1 genannt wurde [5]. Heute ist bekannt, dass IRF1 eine essenzielle Rolle bei der Immunantwort sowie in der Onkogenese spielt. IRF1 reguliert (aktiviert oder hemmt) die Expression von Zielgenen durch Bindung seines N-Terminus (Abbildung 3) an eine spezifische DNA-Sequenz (ISRE *Interferon-stimulated-responsive-element*) in deren Promotoren [7].

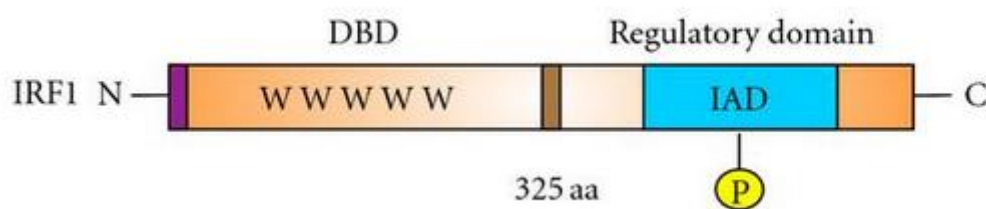


Abbildung 3: Domänenstruktur von IRF1, bestehend aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD, N-Terminus) und einer regulatorischen Domäne (C-Terminus). Die DBD ist durch fünf Tryptophanreste charakterisiert, die jeweils durch 10-18 Aminosäuren getrennt sind. Außerdem enthält IRF1 eine IRF-Assoziationsdomäne (IAD), deren Aktivität von der Phosphorylierung abhängig ist. Die Größe von IRF1 (in Aminosäuren, aa) ist ebenfalls angegeben. C: Carboxyl-Terminus, N: Amino-Terminus [33].

2.2.2 Bedeutung von IRF1 im Mammakarzinom – *in vitro* und im Mausmodell

Bouker et al. haben die Rolle von IRF1 als Tumorsuppressorgen bei Brustkrebs untersucht. Die Fragestellung war, ob die Funktion als Suppressor durch Beeinflussung des Zellzyklusübergangs, der Apoptose und/oder der Caspase-Aktivierung vermittelt wird. Es wurde ein dualer Ansatz verwendet und gemessen, ob die Überexpression von Wildtyp-IRF1 oder eines dominant negativen IRF1 (dnIRF1) gegensätzliche Effekte auf die Proliferation von Brustkrebszellen *in vitro* sowie auf die Tumorigenität in athymischen Nacktmäusen erzeugt.

In mechanistischen Studien wurden die Auswirkungen der Blockierung der endogenen IRF1-Expression auf den Zellzyklusübergang mittels Durchflusszytometrie, auf die Apoptose mittels Annexin-V-Färbung und auf die Caspase-Aktivierung mittels fluoreszierender Substratspaltung bestimmt. IRF1 mRNA und Protein werden in normalen, nicht-tumorigenen, Brustepithelzellen hoch exprimiert, in tumorigen (aber nicht metastatischen) findet eine reduzierte Expression statt, während in metastatischen Zelllinien die Expression nur noch sehr gering ist. In MCF7-Zellen, die mit einem Wildtyp-IRF1 transfiziert wurden (MCF7/IRF1), korreliert die IRF1-mRNA-Expression invers mit der Rate der Zellproliferation. Umgekehrt erhöht die Expression von dnIRF1 sowohl in MCF7 (MCF7/dnIRF1; p53-Wildtyp) als auch in T47D-Zellen (T47D/dnIRF1; p53-Mutante) die Zellproliferation.

In athymischen Nacktmäusen ist die Tumorzinzidenz von MCF7/IRF1-Xenotransplantaten reduziert, während MCF7/dnIRF1-Xenotransplantate signifikant höhere Inzidenzen aufweisen. MCF7/dnIRF1-Zellen zeigen eine 50%ige Abnahme der basalen Apoptose und eine signifikante Reduktion der Caspase 8 Aktivität; ähnliche Effekte treten in T47D/dnIRF1-Zellen auf, wobei die Effekte auf die Apoptose durch die Hemmung der Caspasen 3/7 und Caspase 8 vermittelt zu sein scheinen.

Nach den Studien von Bouker et al. werden die Effekte von IRF1/dnIRF1 also durch Veränderungen der Apoptoseraten und nicht durch Zellzyklusregulation vermittelt. Die Ergebnisse belegen eine funktionelle Rolle von IRF1 bei der Wachstumsunterdrückung von Mammakarzinomzellen und weisen stark darauf hin, dass IRF1 ein Tumorsuppressorgen bei Brustkrebs ist, welches unabhängig von p53 die Apoptose steuert. Ein Verlust der p53-Funktion hebt somit nicht die Fähigkeit von IRF1 auf, Entscheidungen über das Zellschicksal zu regulieren, was die Relevanz der IRF1-Expression für die Tumorgenese deutlich macht [34].

2.2.3 Bedeutung von IRF1 im Mammakarzinom – *in vivo*

Während oben beschriebene Studien in experimentellen Modellen durchgeführt wurden, verwendeten Connert et al. immunhistochemische Gewebe-Microarrays an einer größeren Stichprobe invasiver Mammakarzinom-Präparate und bewiesen damit, dass die IRF1-Expression in neoplastischem Brustgewebe reduziert war im Vergleich zu dem umgebenden Normalgewebe. Sie zeigten auch, dass die IRF1-Expression negativ mit der Tumorgroße korreliert, was bestätigt, dass der Verlust von IRF1 mit der Mammakarzinogenese verbunden ist [35]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Doherty et al., indem sie über niedrigere Konzentrationen von IRF1 in einem DCIS bzw. einem invasiven duktalem Karzinom als in dem angrenzenden Brustepithel berichteten [36].

Zhu et al. zeigten mithilfe von Proteinexpressionsstudien, dass in Brusttumoren der häufigste Ort von IRF1 im Zytosol liegt; was darauf hindeutet, dass IRF1 in einer inaktiven Form vorliegt. Im Gegensatz dazu exprimierten ein Teil der Tumoren IRF1 im Zellkern (bei mehr als der Hälfte der Tumorzellen), es handelt sich somit um eine transkriptionell aktive Form [37]. Einige Brusttumore können also die Aktivierung von IRF1 durch die Kontrolle seiner subzellulären Lokalisation regulieren und die wachstumshemmenden Mechanismen von IRF1 umgehen, indem sie dessen Expression herunterregulieren [37, 38].

Auf genomischer Ebene wurde der *IRF1*-Lokus auf Chromosom 5q31.1 zunächst bei Leukämie- und präleukämischen Myelodysplasiezellen als fehlend beschrieben [39]. Häufig ist *IRF1* auch bei Ösophagus- [40] und Magenkarzinomen (Punktmutation) deletiert (*loss of heterozygoty*) [41]. Etwa 11 % der sporadischen Mammakarzinome weisen den Verlust des Chromosoms 5q12-31 auf, der häufigste Chromosomenverlust, der durch vergleichende genomische Hybridisierung (CGH = *Comperative Genomic Hybridization*) nachgewiesen wurde [42]. Ein Allelverlust von IRF1 wird bei 32 % der Frauen mit Brustkrebs nachgewiesen (12/37 Brustgewebeproben). Dieser Verlust der Heterozygotie ist in den untersuchten Fällen mit einem erhöhten Rezidiv- und Sterberisiko assoziiert [43].

2.2.4 Der IRF1-Signalweg

Die Expression von IRF1 wird durch viele Zytokine aktiviert, darunter Interferone (IFN α , β und IFN γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Retinsäure, Interleukin 1 und 6 sowie durch virale Infektionen [44] (Abbildung 5). Die anfängliche Signalübertragung erfolgt dabei über den JAK-STAT-Signalweg, was zur Aktivierung des IRF1-Promotors durch die Transkriptionsfaktoren STAT1 und NF- κ B führt [45].

Der JAK-STAT-Signalweg (Abbildung 4) ist ein spezieller Signalübertragungsmechanismus, welcher zur Regulation der Homöostase, der Zellentwicklung und Wachstumskontrolle beiträgt; JAK = Januskinase (*just another kinase*) und STAT = *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT-Proteine). Der JAK-STAT-Signalweg bietet Zellen eine Möglichkeit, die Informationen extrazellulärer Signalpeptide von der Zellmembran nach intrazellulär zu den Promotoren der Zielgene im Zellkern weiterzuleiten.

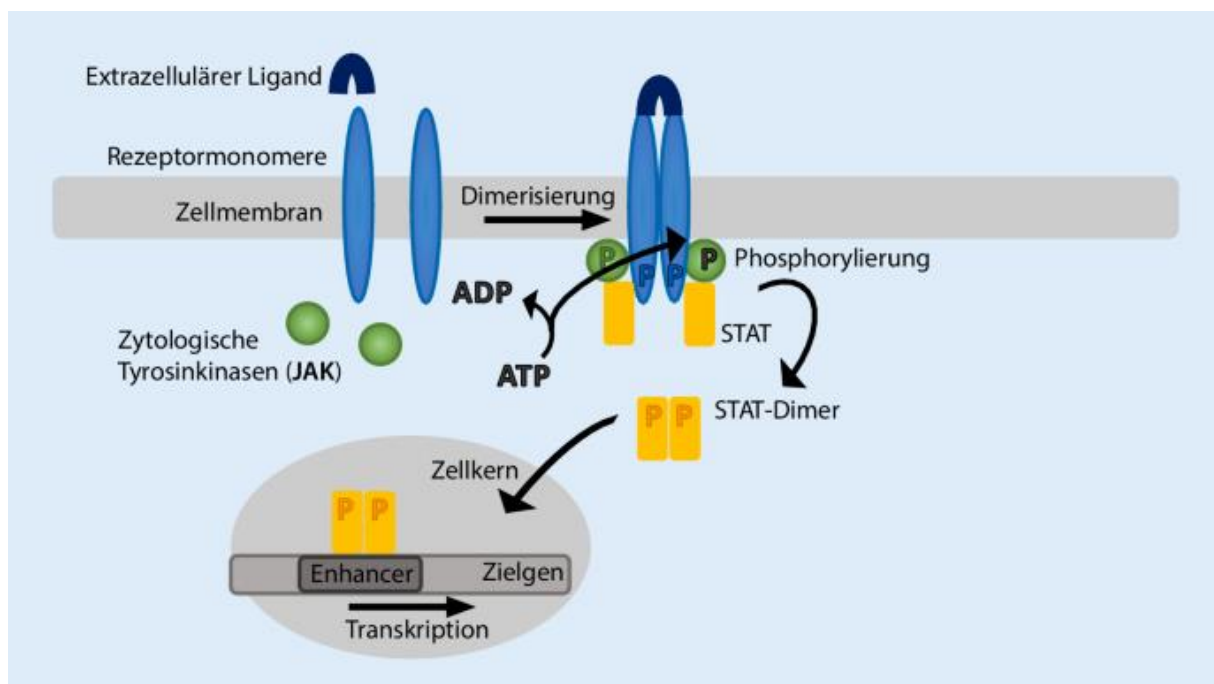


Abbildung 4: Ligandenabhängige Aktivierung der JAK-STAT-Signalkaskade aufgrund von Phosphorylierung (P) durch intrazelluläre JAK („just another kinase“). Dimerisierte STAT (STAT-Dimere) migrieren in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Enhancer-Sequenzen binden und die Transkription fördern (ADP Adenosindiphosphat, ATP Adenosintriphosphat) [46].

IRF1 hat eine bemerkenswerte funktionelle Vielfalt und kontrolliert die Transkription von Genen, die an der Vermittlung von antiviralen, immunmodulatorischen und antiproliferativen Effekten beteiligt sind [47]. Die antiproliferative Wirkung von IRF1 wird hauptsächlich auf seine

Induktion bestimmter Zielgene zurückgeführt, die das Zellwachstum herunterregulieren. Zu diesen gehören die Proteinkinase R (PKR) und STAT1 im JAK-STAT-Weg [47, 48]. Des Weiteren gehören zu den Prozessen, die der IRF1-Aktivierung nachgeschaltet sind, Veränderungen in der Expression von MHC-Klasse-I-Proteinen (*major histocompatibility complex*) sowie Einflussnahme auf die Entwicklung von T-Zellen und deren Differenzierung, von natürlichen Killern (NK) und die Induktion von Interleukin 12 [49]. Zusätzlich zu seinen essenziellen Funktionen bei der Aktivierung von Immunzellen ist IRF1 auch an der Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose, als Reaktion auf eine Vielzahl von Stressoren, beteiligt [50]. Zum Beispiel koordiniert IRF1 die Expression des Immunproteasoms [51], reguliert die Aktivität der menschlichen Telomerase [52] und kontrolliert wichtige Aspekte der DNA-Schadensreparatur [53]. Durch Aktivierung der Caspasen 1, 3, 7 und 8 kann IRF1 die Zellen zur Apoptose zwingen (Abbildung 5) [54].

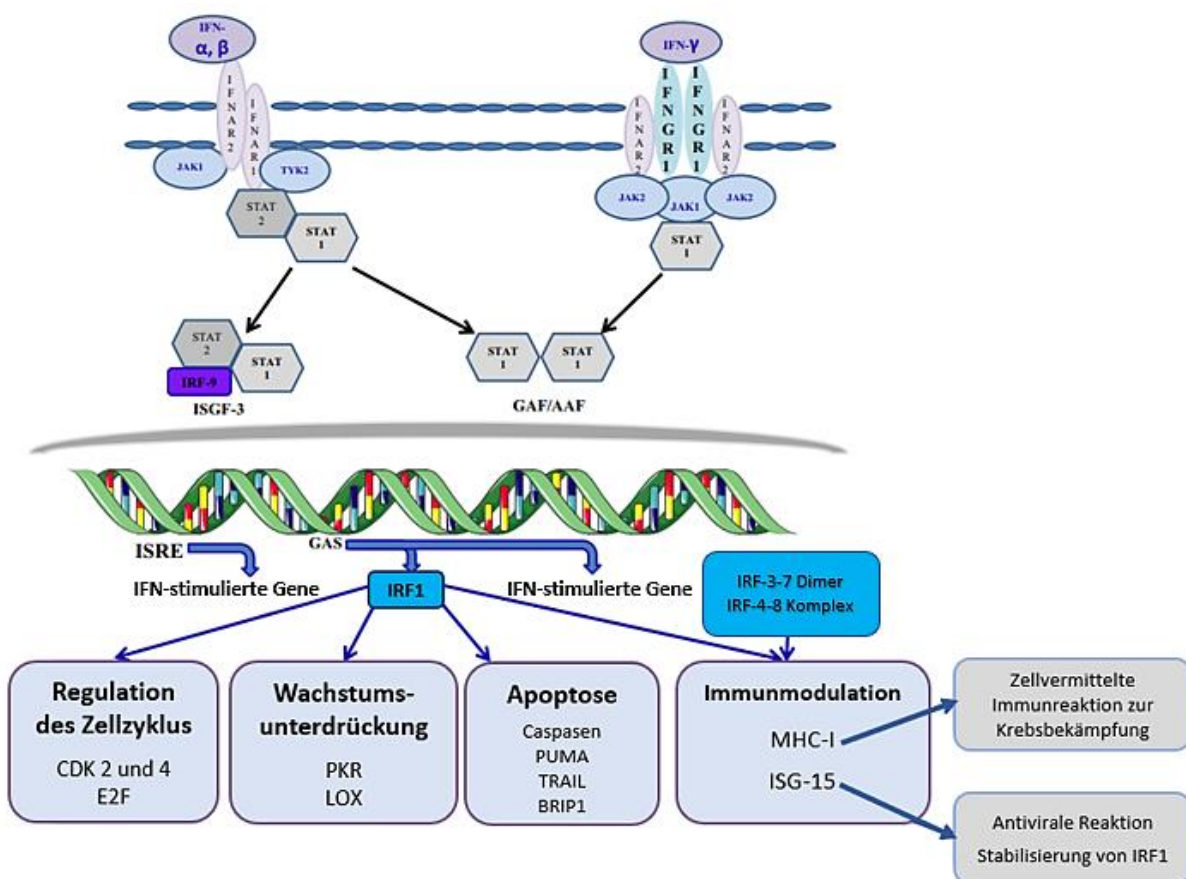


Abbildung 5: Der IRF1-Signalweg: Die Stimulation des Interferonrezeptors Typ I und II rekrutiert Janus- und Tyrosinkinase, die STAT phosphorylieren und aktivieren. STAT-Proteine lösen die nukleäre Translokation von IRF-Mitgliedern aus, wo sie mit ISRE (Interferon-stimulated-responsive-element) interagieren, um die Expression von Zielgenen zu regulieren, was zu verschiedenen physiologischen Reaktionen führt. Verändert nach [55].

Die Regulation der Expression betreffend, ist IRF1 ein kurzlebige Protein. Es kommt also durch Stimuli wie DNA-Schäden oder virale Infektionen zu schnellen Änderungen des *Steady-state*-Spiegels. [56]. Der genaue Mechanismus, der die IRF1-Stabilität reguliert, ist unbekannt, man weiß, dass IRF1 durch die E3-Ubiquitin-Ligase polyubiquitiniert und dann durch das 26S-Proteasom abgebaut wird [57].

2.2.5 Der Einfluss von IRF1 beim endokrin-resistenten ER+ Mammakarzinom

Resistenzen gegenüber einer endokrinen Therapie sind bei Brustkrebspatienten mit Östrogenrezeptor-positiven (ER+) Tumoren häufig und begrenzen den Erfolg dieser therapeutischen Strategie. Während die Mechanismen, von denen Ansprechen und Resistenz abhängen, noch nicht vollständig verstanden sind, ist man sich jedoch sicher, dass IRF1 einen regulatorischen Knotenpunkt in diesem Prozess darstellt [33].

Annähernd 70% der diagnostizierten Mammakarzinome sind Östrogenrezeptor-positiv. Randomisierte Studien und große Metaanalysen zeigen eindeutig, dass alle Brustkrebspatienten einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil durch Chemotherapie [58] plus endokrine Therapie haben, wobei das Antiöstrogen Tamoxifen zu den wirksamsten Medikamenten zählt. Dieser Erfolg ist jedoch limitiert aufgrund intrinsischer (*de novo*) oder erworbener Resistenzen gegenüber dem Wirkstoff [59].

Medikamentenresistenzen entstehen aus der Unfähigkeit einer Zelle, einen Signalweg zu induzieren, der einen irreversiblen Zelltod herbeiführt. Daher ist es wichtig, die Schlüsselaspekte der Signalübertragung bei Resistenz zu verstehen. Mehrere Gene, die das Überleben trotz Antiöstrogen-Behandlung ermöglichen, wurden anhand von Genexpressions-Microarrays untersucht, um Unterschiede zwischen Antiöstrogen-responsiven (MCF7/LCC1) und -resistenten Varianten (MCF7/LCC9) der menschlichen Brustkrebszelllinie MCF7 zu finden [60]. Ein bei der Regulation zwischen Zelltod/Überleben entscheidender Transkriptionsfaktor war IRF1, welches in der resistenten Zelllinie herunterreguliert war. Die Brustkrebszellen schützen sich dadurch vor der IRF1-induzierten Hemmung der Proliferation und/oder Induktion der Apoptose [50].

IRF1 ist ein Schlüsselmediator des Zelltods für die Antiöstrogene Fulvestrant [61] und Tamoxifen [62]. Der in Abbildung 6 beschriebene Signalweg veranschaulicht den Mechanismus, mit dem IRF1 über Mitglieder der BCL2 Familie [63], sowie über CASP 8 und CASP 3/7 [34] die Apoptose reguliert.

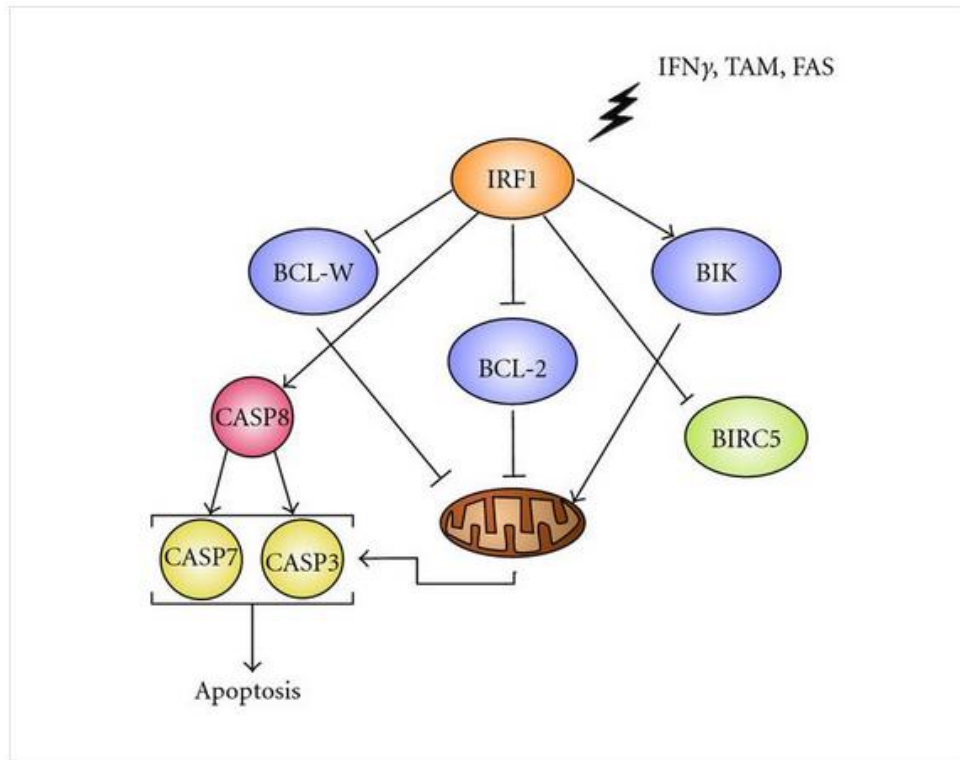


Abbildung 6: IRF1-reguliertes Zellschicksal mittels Caspasen, BIRC5 und Mitgliedern der BCL2-Familie [33].

2.2.6 Die Rolle von IRF1 bei der Entdifferenzierung des Brustepithels und der Bildung von Fernmetastasen

2.2.6.1 Überblick

Bei der Metastasierung handelt es sich um die Ablösung von Zellen vom Primärtumor, die Zirkulation über Blut- und/oder Lymphsystem zu einem entfernten Organ und die damit einhergehende Entstehung eines sekundären Tumors. Dafür ist jedoch eine Reihe von Schritten notwendig (Abbildung 7). An erster Stelle steht die Transformation des Primärtumors in eine metastasierungsfähige Zelle und der Anschluss an das Gefäßsystem (Angiogenese). Die Zellen verlieren ihre Zelladhäsion und dringen mittels aktiver Migration in das umliegende Gewebe ein. Daraufhin erfolgt die Intravasion und Dissemination der Tumorzellen zu einem neuen Ort, wo sie sich an die Umgebung adaptieren und schließlich einen sekundären Tumor (Metastase) ausbilden [64].

Mammakarzinome metastasieren sowohl hämatogen als auch lymphogen. Während die oberen äußeren und mamillär lokalisierten Karzinome bevorzugt in axilläre Lymphknoten metastasieren, führen Mammakarzinome in den inneren Quadranten häufiger zu Metastasierungen in die Lymphknotenstationen entlang der Arteria thoracica interna. Die häufigsten Metastasierungsorte beim Brustkrebs sind (mit absteigender Häufigkeit) Knochen, Lunge, Leber und Gehirn [65].

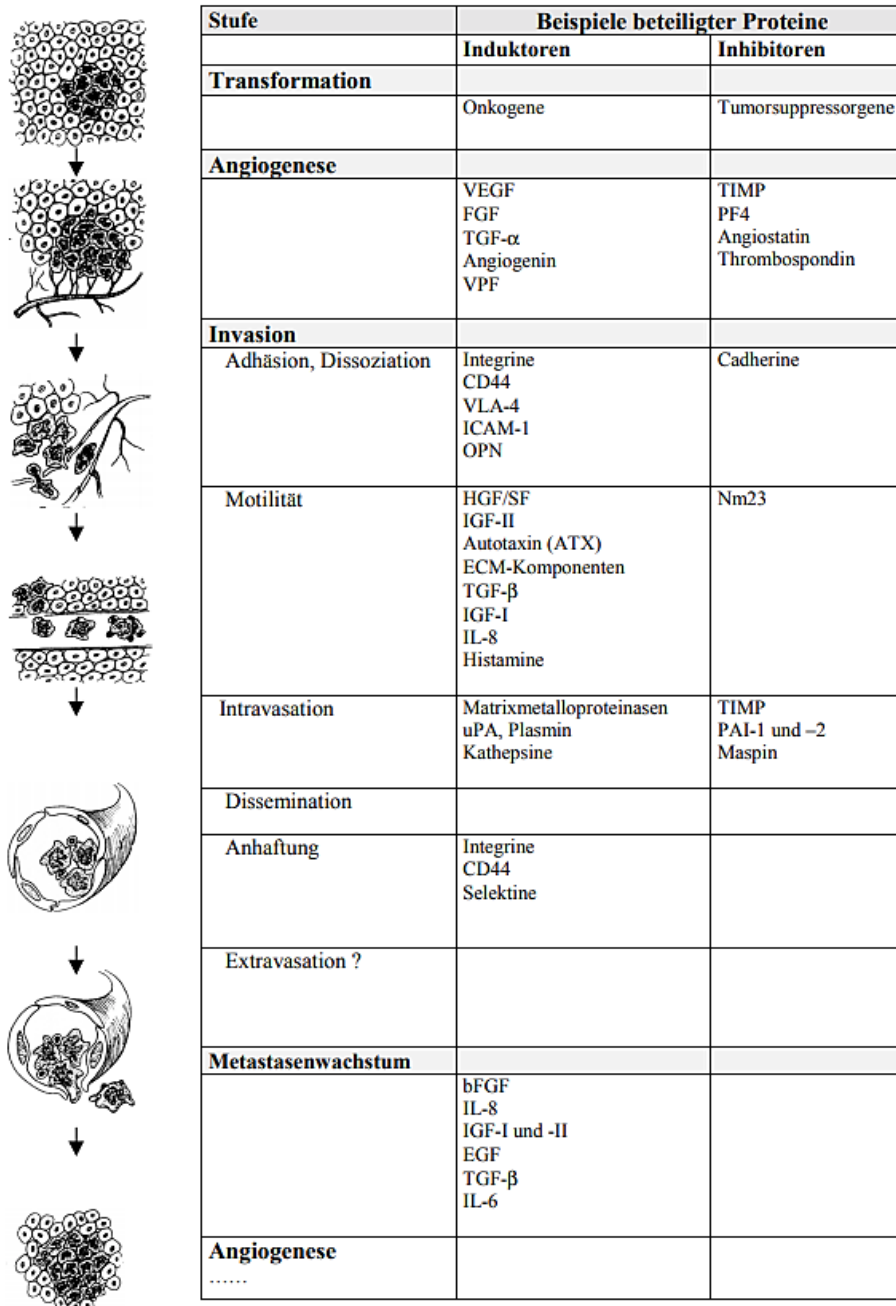


Abbildung 7: Modell zur Progression von Tumoren und Entwicklung von Metastasen [66].

2.2.6.2 Tumorzellmigration aufgrund von Epithel-mesenchymaler Transition

Eine Voraussetzung für lokale und systemische Ausbreitung von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit zur gesteigerten Migration [67]. Den dafür notwendigen Prozess der morphologischen Alteration bezeichnet man als Epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Die EMT ist ein wichtiges zelluläres Entdifferenzierungsprogramm während der Embryonalentwicklung und der Wundheilung, welches bei Krebs fälschlicherweise aktiviert wird [68]. EMT ermöglicht den Krebszellen von einem proliferativen Zustand in einen wandernden, invasiven zu wechseln und fördert somit die Tumorigenese. EMT wird durch die Mikroumgebung des Tumors induziert, hauptsächlich durch den von Stroma- und Tumorzellen sezernierten Transforming

growth factor β (TGF β), sowie durch Tumorhypoxie [69]. Epitheliale Zellen erlangen dabei die Eigenschaften von Mesenchymzellen. Über die Herabregulation von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin entsteht ein Verlust der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion [70].

Des Weiteren kann der von Thrombozyten sezernierte TGF β die EMT im Blut induzieren oder aufrechterhalten und somit zirkulierende Tumorzellen vor der Eliminierung durch Immunzellen schützen. Nach Erreichen des Metastasierungsortes findet eine Umkehrung der EMT statt - die MET (mesenchymal-epitheliale Transition) und versetzt die Krebszellen von einem beweglichen in einen proliferativen Zustand zurück, wodurch das Wachstum von Makrometastasen erleichtert wird. Aufgrund ihrer hohen zellulären Plastizität wird angenommen, dass Krebszellen in einem Hybridzustand des EMT-Spektrums aggressiver und metastasierender sind als vollständig mesenchymale oder epitheliale Zellen [71, 72].

Meyer-Schall et al. untersuchten in ihren Studien die Funktion von IRF1 während des EMT-Prozesses. Während IRF1 in Anwesenheit von TGF β die EMT fördert, hält er bei dessen Abwesenheit den epithelialen Differenzierungsstatus von Brustdrüsenepithelzellen aufrecht.

Das RNAi-vermittelte Gen-Silencing von *IRF1* in Brustdrüsenepithelzellen führt zur Expression von mesenchymalen Faktoren und Smad-Transkriptionsaktivität. Umgekehrt führt das Gen-Silencing von *IRF1* bei TGF β -induzierter EMT zu einer Verhinderung des mesenchymalen Übergangs und stabilisiert die Expression von E-Cadherin. Diese kontextabhängige Doppelrolle von IRF1 bei der Regulation der epithelial-mesenchymalen Plastizität liefert wichtige neue Erkenntnisse über den funktionellen Beitrag und das therapeutische Potenzial von Interferon-regulierten Faktoren bei Brustkrebs [73].

2.2.6.3 Die Funktion von Immunzellen bei der Tumorgenese

Krebserkrankungen entwickeln sich durch kontinuierliche Interaktion mit Immunzellen in der Mikroumgebung des Tumors [74]. Eine höhere Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und eine erhöhte immunbezogene Genexpression sind mit einem besseren Überleben bei Triple-negativen, HER2-positiven und Hochrisiko-ER-positiven Mammakarzinomen im Frühstadium assoziiert, selbst wenn keine systemische adjuvante Therapie durchgeführt wurde [75, 76].

Metastasierende Brustkrebszellen entziehen sich der Immunüberwachung durch mehrere Mechanismen (Abbildung 8): Zum einen findet eine Herunterregulierung eines breiten Spektrums von chemotaktischen und immunaktivierenden Zytokinen statt; dazu gehören Liganden/Rezeptor-Paare wie CCL19/CCR7 oder IL15/IL15R, Interferon-regulierte Gene wie *STAT1*, *IRF1* und *IFI27/35*, sowie die Expression von MHC-Klasse-I-Proteinen. Außerdem führt eine verringerte Antigenpräsentation zu einer an Immunzellen verarmten Mikroumgebung des Tumors. Zum anderen kann die Hochregulierung von immunsuppressiven und

immuneskapiven Mechanismen zu einer immuninerten Umgebung führen; so wie die Expression von Makrophagenmarkern (CD163), tumorfördernden Genen des Toll-like-Rezeptor-Signalwegs (CD14/TLR1,-2,-4,-5,-6/MyD88), HLA-E und weitere [77].

Ein aktueller Therapieansatz, welcher sich die Relevanz des Immunsystems bei der Tumorentstehung zunutze macht, ist der Immuncheckpoint-Inhibitor Atezolizumab [78]. Immuncheckpoints sind wichtige Kontrollpunkte des Immunsystems. Sie basieren auf Oberflächenrezeptoren (z.B. PD-1), die zusammen mit ihren Liganden (PD-L1) das Immunsystem daran hindern körpereigene Zellen anzugreifen. Diesen Mechanismus nutzen Tumorzellen, um den Angriffen des Immunsystems zu entgehen (Immunescape). Checkpoint-Inhibitoren blockieren inhibitorische Immuncheckpoints und lösen damit eine Abwehrreaktion des Immunsystems auf das Tumorgewebe aus [79]. Trotz signifikanter Behandlungsergebnisse in vielen klinischen Studien kommt es bei Immuncheckpoint-Inhibitoren des Öfteren zu Resistenzen sowie adversen Reaktionen, weshalb zusätzlich an weiteren Möglichkeiten geforscht wird, um in das Immunsystem bei der Tumorbildung einzugreifen. Ein interessanter Therapieansatz wäre hierbei die Expressionssteigerung von Transkriptionsfaktoren wie IRF1, welches am Anfang einer immunmodulatorischen Signalkaskade steht und durch den Tumor herunterreguliert worden war.

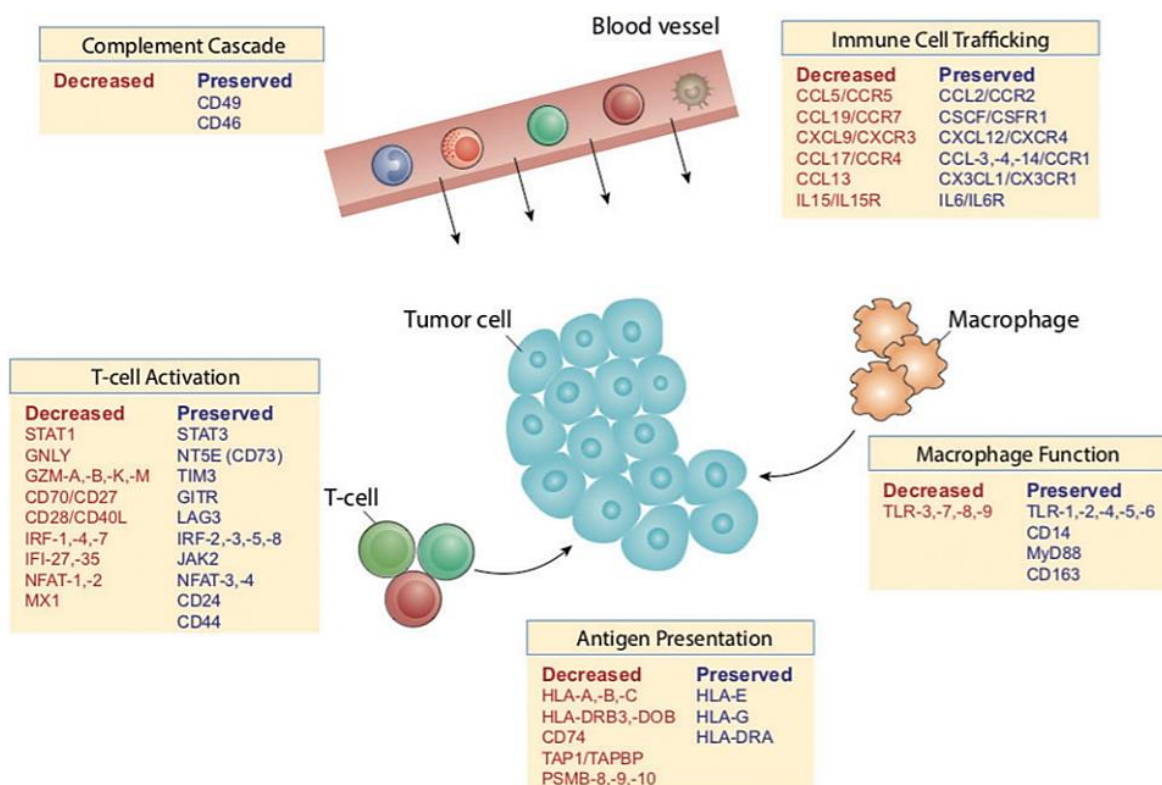


Abbildung 8: Schema der bei metastasiertem Brustkrebs beobachteten Immun-Escape-Mechanismen. Gene sind nach Immunfunktionen gruppiert, rot zeigt Gene mit deutlich reduzierter Expression und blau solche mit erhaltener Expression an [77].

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Während IRF1 im Mammakarzinom herunterreguliert ist, wird es in dem angrenzenden gesundem Brustepithel normal exprimiert. Aus dieser Beobachtung resultierte die Frage nach der Relevanz bzw. Konsequenz dieser Expressionsänderung für die Tumorgenese und den Vorgang der Metastasenbildung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von IRF1 in der Brustkrebsphysiologie näher zu untersuchen. Dafür wurden verschiedene Tumorzellen ausgewählt, mit IRF1-mRNA (und EGFP-mRNA als Vergleich) transfiziert und anschließend die Zellviabilität mit Hilfe des MTT-Tests sowie die chemotaktische Migration in der Boyden-Kammer untersucht. Aufgrund des Potentials von IRF1 die Tumorbildung/-dissemination über verschiedene Mechanismen zu beeinflussen, könnte es als interessantes *target* für eine zielgerichtete Therapie gesehen und diesbezüglich weiter erforscht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Collagen human Typ 1	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
dNTP 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Gibco, Carlsbad, USA
Ethanol absolute, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Fetal calf serum (FCS)	Gibco, Carlsbad, USA
Fibronectin Bovine Protein Plasma	Thermo Fisher, Waltham, USA
Hemacolor Rapid Staining of Blood Smear Solution 2	Merck, Darmstadt
Hemacolor Rapid Staining of Blood Smear Solution 3	Merck, Darmstadt
Hydrochloric acid 1 mol/l (1N) HCl	Merck, Darmstadt
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix	VWR International, Radnor, USA
Lipofectamine Messenger Max	Thermo Fisher, Waltham, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
MTT 0,5 %	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Nagellack Express Nailcare	Maybelline Jade, New York, USA
OligodT 100 mM	Metabion, Planegg-Steinkirchen
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Puffer nach Weise Tabletten	Merck, Darmstadt
SDS (10%ig)	Carl Roth, Karlsruhe
Terg-a-Zyme	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Terralin® liquid	Schülke & Mayr, Norderstedt
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

24-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Cell Lifter	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckgläser Marienfeld 24x50 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalhandschuhe	VWR International, Radnor, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 1 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen, (5, 15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kryo-Röhrchen (1 ml)	Thermo Scientific, Waltham, USA
LightCycler 480 96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
LUNA™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Südkorea
Matrix-Pipettenspitzen, 250 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objekträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten, Kunststoff	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Starlab, Hamburg
Polycarbonatmembranen 25x80 mm (Porengröße 8 µm)	Neuro Probe, Gaith., USA
Serologische Pipettenspitzen (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (T25/25 cm ² , T75, T175)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellkulturschalen (Ø 6 und 10 cm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

3.1.3 Geräte

Autoklav Systec-V-100	Systec, Linden
Boyden-Migrationskammer (48-Well-Mikro-Chemotaxis-Kammer)	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Computer	Dell, Round Rock, USA
Eismaschine	Ziegra, Hannover
Elektronische Matrix-Pipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ELISA Reader GLOMAX multi	Promega detections system, Mannheim
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80°C	Nalge Nunc Int., Penfield, USA
Heiz- und Magnetrührer	IKA Labortechnik, Stauffen
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4°C	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen

LightCycler 480 II	Roche, Basel, Schweiz
LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Südkorea
Mikroskop Diavert	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	PeqLab, Radnor, USA
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden
Scheren	Labotec, Wiesbaden
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Fresco 21 Centrifuge	Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe Minivac Power	PeqLab, Radnor, USA
Vortex Mixer	Starlab, Hamburg
Vortex VF2	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad Certomat WR	B. Braun, Melsungen
Zählkammer Neubauer Improved	VWR International, Radnor, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

3.1.4 Kit-Systeme

HiScribe T7 ARCA mRNA Synthesis Kit	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
M-MuLV Reverse Transcriptase Kit	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
Monarch RNA Cleanup Kit	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
NucleoSpin RNA Plus Kit	Macherey-Nagel, Düren

3.1.5 Oligonukleotidsequenzen

Die folgenden Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert und in der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) eingesetzt. Sowohl die entsprechenden Annealing-Temperaturen als auch die jeweiligen Amplikongrößen sind in Klammern angegeben.

Haushaltsgen-Primer:

<i>HPRT</i> (61 °C, 111 bp)	F: ATTGACACTGGCAAACAATGC R: TCCAACACTTCGTGGGGTCC
<i>ATP5J</i> (61 °C, 150 bp)	F: TCAGCCGTCTCAGTCCAT TT R: ACTAGCATCAACAGGTCCTCC
<i>PPIA</i> (61 °C, 163 bp)	F: ACGTGGTATAAAAGGGGCGG R: TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG
<i>ACTB</i> (60 °C, 200 bp)	F: CACTCTTCCAGCCTTCCTTC R: TTGATCTTCATTGTGCTGGGT
<i>B2M</i> (60 °C, 98 bp)	F: ATGAGTCCTGCCGTGTGA R: GGCATCTTCAAACCTCCATG
<i>TBP</i> (61 °C, 127 bp)	F: GGATAAGAGAGCCACGAACCAC R: TTAGCTGCTGGAAAACCCAACCTTCTG

Primer des zu untersuchenden Gens:

<i>IRF1</i> (62 °C, 172 bp)	F: CAT CCC AGT GGA AGT TGT R: CCCATCCACGTTTGTGGCT
---------------------------------------	--

Die folgenden Sequenzen wurden für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen verwendet. Die Plasmidvektoren mussten dafür mittels in-vitro Transkription in mRNA umgeschrieben werden.

Vektoren:

pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1	Jessica Behnkes Plasmidvektor
pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP	Jessicas Behnkes Plasmidvektor

mRNA (Positivkontrolle):

CleanCap EGFP mRNA	TriLink BioTechnologies, San Diego, USA
--------------------	---

3.1.6 Zellkulturmedien

DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 (+) L-Glutamine	Gibco, Carlsbad, USA
Opti-MEM	Gibco, Carlsbad, USA

3.1.7 Zelllinien

BT549 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zelllinie wurde aus dem papillär-invasiven duktalem Karzinom einer kaukasischen, 72-jährigen Patientin gewonnen.

MCF7 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zelllinie stammt aus dem malignen Pleuraerguss einer kaukasischen, 69-jährigen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma.

MCF10A (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zellen sind nicht kanzeröse Brustepithelzellen einer 36-jährigen kaukasischen Frau. Sie wurden bei einer Mammareduktion entnommen.

MDA-MB231 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zellen wurden aus dem malignen Pleuraerguss einer 51-jährigen, kaukasischen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma isoliert.

T47D (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zelllinie wurde ursprünglich dem malignen Pleuraerguss einer 54-jährigen Patientin mit einem infiltrierenden duktalem Karzinom der Brust entnommen.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

3.2.1.1 Steriles Arbeiten in der Zellkultur

Alle Kulturarbeiten und Versuche mit den unterschiedlichen Zelllinien dieser Arbeit wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Dafür wurden die entsprechenden Materialien entweder im Rahmen der Laborbestellungen steril geliefert oder entsprechend autoklaviert und verwendet. Zellkulturmedium sowie notwendige Substrate wurden vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die entsprechenden Behälter anschließend mit Ethanol (Terralin liquid) desinfiziert, bevor diese unter die Werkbank gelegt wurden.

3.2.1.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Kultiviert wurden die Zelllinien stets im Inkubator bei 37°C sowie bei einem CO₂-Gehalt von 5%. Als Nährmedium für die humanen Brustkrebszelllinien MCF7, MDA-MB231, BT549 sowie T47D diente RPMI-1640 mit dem entsprechenden Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin sowie Streptomycin (P/S).

Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau entweder in einer T75-Flasche oder in einer T175-Flasche kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 bis 90 Prozent wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit 6 ml DPBS gewaschen und die adhärennten Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Die Inkubationszeit betrug je nach Zelllinie zwischen 5 und 7 Minuten. Der Ablösevorgang ließ sich unter dem Mikroskop beobachten. Nach Zugabe von 6 ml Nährmedium wurden die Zellen resuspendiert und je nach gewünschter Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung von den Zellen wurde zunächst einmal das Medium aus der T175-Flasche abgezogen, im nächsten Schritt die adhärennten Zellen mit DPBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in Medium (6 ml) wurde die Zellsuspension für 10 min bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand verworfen. Zu dem zurückgebliebenen Zellpellet wurde Medium mit 10% DMSO hinzugegeben und anschließend resuspendiert. Pro T175-Flasche wurden 8 Aliquots mit jeweils 1 ml Zellsuspension/Röhrchen hergestellt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst im

Isopropylgefäß bei -80 °C zwischengelagert und nach einer Woche in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Beim Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden diese in ein Falcon-Röhrchen (15 ml) überführt und dann mit 5 ml Nährmedium verdünnt. Nach dem Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 1000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml Medium gelöst und schließlich in eine Zellkulturflasche (T175) mit bereits vorgelegtem Medium (19 ml) überführt.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellkonzentration

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die einzelnen Zellsuspensionen mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Dafür wurden beide Seiten der Zählkammer mit 10 µl der bei der Zellgewinnung erhaltenen Zellsuspension an den Rand des Deckglases befüllt. Dabei wird die Suspension durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. Anschließend wird das Hämozytometer unter das Mikroskop gelegt und vier der großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die genaue Zellzahl wurde dann wie folgt bestimmt:

Σ Zellzahl aller Quadrate/4 = Mittelwert der Zellzahl/Quadrat

Mittelwert der Zellzahl eines Quadrates x 10^4 = Zellen/ml

Zellen/ml x Volumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl

3.2.2 RNA-Methoden

3.2.2.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion aus den Zellen wurde das *NucleoSpin RNA Plus Kit* und das beiliegende Protokoll von MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG verwendet.

Im ersten Schritt wurde unter sterilen Bedingungen an der Werkbank das Kulturmedium abgesaugt und pro Schale 350 µl *RNA Lysis Buffer LBP* zugegeben. Um alle Zellen vollständig abzulösen wurden diese mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und das Lysat im Anschluss auf eine *gDNA Removal Column* in einem 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert. Somit blieben DNA und Proteine der Zellen in der *gDNA Removal Column* zurück und der Säulendurchfluss bestand nun hauptsächlich aus RNA. Diesem wurde 100 µl *Binding Solution BS* hinzugegeben und das gesamte Volumen wurde gut gemischt. In der weiteren Durchführung wurde die Probe in eine *RNA Plus Column* pipettiert, für 15 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Im anschließenden ersten Waschschriff wurden 200 µl *Buffer WB1* auf die *RNA Plus Column* pipettiert und bei 11000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Säulendurchfluss wieder verworfen. Im

zweiten und dritten Waschschrift, wurden 600 bzw. 250 μl *Buffer WB2* auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bzw. 2 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurde die *RNA Plus Column* in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 30 μl RNase-freies Wasser hinzugegeben und 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die isolierte RNA wurde quantifiziert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.2.2 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung

Um Reinheit und Konzentration der extrahierten RNA zu bestimmen, wurden die einzelnen RNA-Proben mit dem *Nanodrop 1000 Spectrophotometer von Peqlab* durchgeführt. Dabei wird die Konzentration der RNA in $\text{ng}/\mu\text{l}$ angegeben. Weiterhin wird die optische Dichte photometrisch bei Absorptionswerten von 260 nm und 280 nm ($A_{260/280}$) gemessen. Dabei entspricht ein Verhältnis von ~ 2 einer reinen RNA, während Werte unterhalb auf eine Kontamination der Probe mit Protein, genomischer DNA oder auch aromatischen Substanzen deuten. Vor der Messung wird zunächst immer der Leerwert (engl. *Blank*) mit 1 μl RNase-freiem Wasser festgesetzt, bevor mit der eigentlichen Messung (1 μl RNA) fortgefahren wird.

3.2.2.3 cDNA-Synthese

Für die Amplifikation bzw. Analysierung der isolierten, einzelsträngigen RNA mittels PCR ist zunächst die Synthese einer doppelsträngigen, komplementären DNA (cDNA) notwendig. Diese wird mit mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase hergestellt.

Dafür wurde das entsprechende Volumen an RNA, welches anhand der vorhandenen Konzentration berechnet wurde, vorgelegt und 1 μl Oligo dT (100 mM) sowie 4 μl dNTP (je 2,5 mM) zugegeben. Das Gemisch wurde anschließend mit RNase-freiem H_2O auf ein Gesamtvolumen von 16 μl aufgefüllt. Das Reaktionsgefäß wurde für fünf Minuten im Thermocycler bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Im Anschluss wurde dem Reaktionsgemisch 2 μl 10X Buffer, 1 μl RiboLock sowie 1 μl Reverse Transkriptase (200 U/ μl) zugefügt und der Reaktionsansatz mit insgesamt 20 μl Gesamtvolumen für 60 Minuten bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ in den Thermocycler gestellt. Im nächsten Schritt waren es dann zehn Minuten bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ und abschließend wurde die Probe auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ runtergekühlt. Im Gegensatz zur RNA kann die synthetisierte cDNA langfristig bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Tabelle 3: Programmstufen des Thermocyclers bei cDNA-Synthese.

Dauer	Temperatur
5 Minuten	80 °C
∞	4 °C
60 Minuten	42 °C
10 Minuten	90 °C
∞	4 °C

3.2.3 Quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

3.2.3.1 Prinzip der qRT-PCR

Durchgeführt wurde die *qRT-PCR* mit dem *LightCycler 480 II* von Roche. Die quantitative *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion dient zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und ermöglicht im Vergleich zur herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion auch deren Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mithilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit (*real time*) erfasst werden. Verwendet wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I*. Dieser interkaliert in die während der PCR synthetisierte doppelsträngige DNA. Im Zuge der Interkalation kommt es zu einer Konformationsänderung des Farbstoffes. Dies führt zu einem enormen Anstieg des Fluoreszenzsignals, welches somit vom *LightCycler* detektiert werden kann. Dabei ist das gemessene Fluoreszenzsignal direkt proportional zur Menge an vorhandener dsDNA.

Die folgende Abbildung soll die drei wesentlichen Grundschritte einer Polymerase-kettenreaktion darstellen:

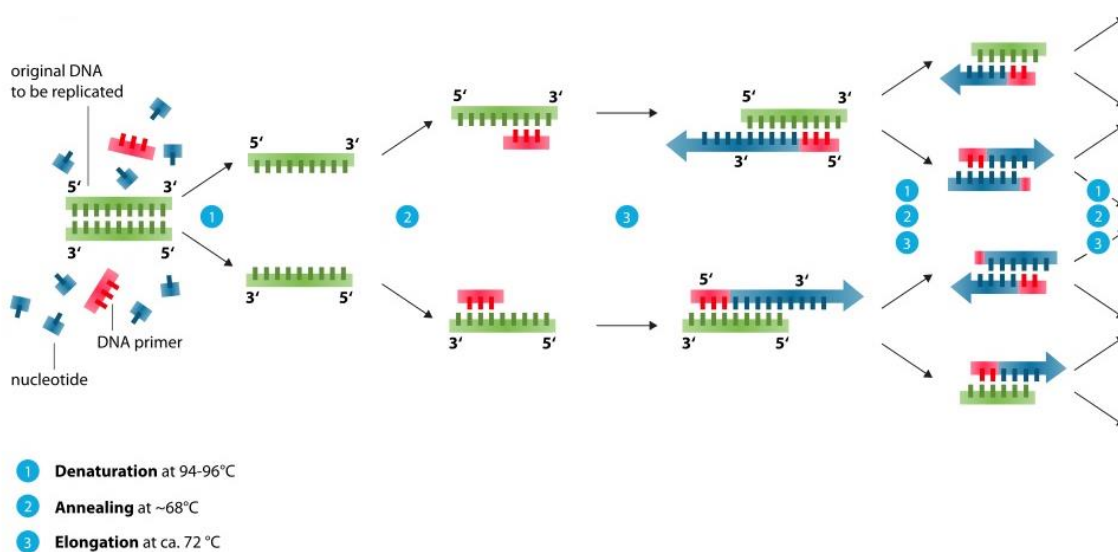


Abbildung 9: Grundschritte im Rahmen der PCR mit SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff [80].

(1) Im ersten Schritt (Denaturierung) werden mittels Hitze die beiden Einzelstränge der doppelsträngigen DNA, die von den Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden, voneinander getrennt.

(2) Im zweiten Schritt (*Annealing*) wird die Temperatur gesenkt und die Primer lagern sich innerhalb des Stranges an eine bestimmte DNA-Sequenz an, die amplifiziert werden soll.

(3) Im letzten Schritt (Elongation) bindet die DNA-Polymerase an die Primer und die eigentliche DNA-Replikation beginnt. Dazu bewegt sie sich Schritt für Schritt an dem Einzelstrang entlang und erstellt währenddessen mit der Hilfe von freien Nukleotiden das komplementäre Gegenstück zum Ausgangsstrang.

3.2.3.2 Durchführung der qRT-PCR

Die synthetisierte cDNA (3.2.2.3) wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit RNase-freiem H₂O verdünnt. Somit lagen als Proben für die *qRT-PCR* verdünnte cDNAs der Zelllinien MCF7, BT549, T47D, MDA-MB231 und MCF10A vor. Das Ziel war der Vergleich der IRF1-Konzentration der jeweiligen Brustkrebszelllinie mit der gesunden Brustepithelzelllinie MCF10A. Zusätzlich zu den Proben wurde noch eine Standardreihe bzw. Verdünnungsreihe benötigt, die bei der Auswertung als Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung (Standardgerade) diente. Zur Herstellung dieser wurden zwei unterschiedliche cDNAs, welche sowohl unser zu untersuchendes Gen IRF1 als auch die bekannten Haushaltsgene enthielten, verwendet und im folgenden Verhältnis 1:5, 1:10, 1:20: 1:40, 1:80 und 1:160 verdünnt. Jeder Verdünnungsstufe entspricht eine festgelegte Konzentration.

Für die *qRT-PCR* wurden 96-Well-Platten (*LightCycler 480 II*) verwendet. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde folgender Mastermix angesetzt (pro Ansatz):

→ 3,2 µl RNase freies H₂O

→ 0,4 µl Forward Primer (c = 10 µM)

→ 0,4 µl Reverse Primer (c = 10 µM)

→ 5,0 µl *KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix*

Der Mastermix wurde mithilfe einer elektrischen Pipette in die entsprechenden Wells der 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden als Duplikate jeweils 1 µl der Standardreihe und der zu untersuchenden Proben zu dem Mastermix gegeben. Die fertige 96-Well-Platte wurde mit Transparenzfolie versiegelt, kurz abzentrifugiert und dann die Messung im *LightCycler 480 II* durchgeführt. Die folgende Tabelle stellt die Programmübersicht der *qRT-PCR* dar:

Tabelle 4: Programmschritte der qRT-PCR.

Programmschritte	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	5 s
<i>Annealing</i>	Primerspezifisch 58-62 °C	5 s
Elongation	72 °C	1 s
Schmelzkurve	65 °C – 95 °C	5 s pro °C
Kühlen	40 °C	∞

3.2.3.3 Auswertung der qRT-PCR

Die *qRT-PCR* wurde mithilfe der *LightCycler 480 II Software* ausgewertet. Basierend auf die Messwerte der eingesetzten Standardreihe wurde zunächst eine Standardgerade erstellt. Hierbei war darauf zu achten, dass diese keinen *Link* (Krümmung) aufwies und die Effizienz im Bereich zwischen 1,9 und 2,0 lag. Um dies zu erreichen wurden teilweise einzelne Verdünnungsstufen der Standardreihe aus der Berechnung herausgenommen. Nun wurden die zu untersuchenden Proben über die Standardgerade gelegt und somit ihre Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse wurden anschließend in Microsoft Excel übertragen.

3.2.4 *In-vitro*-Transkription

Als *In-vitro*-Transkription bezeichnet man die DNA-abhängige Synthese von RNA im Labor außerhalb eines lebenden Organismus.

Jessica Behnke hat im Rahmen ihrer Masterarbeit in der AG Prawitt zwei Plasmidvektoren (pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1 und pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP) hergestellt. Ziel war es, durch die Plasmidvektoren die Produktion einer stabilen mRNA zu ermöglichen. Für diesen Zweck wurden der 5'-und 3'-UTR (*untranslated regions*) des Hämoglobins (Hbb-UTR) verwendet und in den DNA-basierten Ausgangsvektor (pcDNA3 der Firma Invitrogen) kloniert. Die anschließend eingebrachten offenen Leserahmen des *IRF1* und *EGFP* wurden durch die Hbb-UTR-Struktur flankiert, was die daraus hergestellte mRNA in den Zielzellen stabilisierte.

Einer dieser Vektoren enthält den offenen Leserahmen für das humane *IRF1*-Gen, der andere den für das *EGFP*-Gen als Vergleich für die folgenden Versuche. Das *EGFP*-Gen kodiert für ein grün fluoreszierendes Protein (EGFP = *enhanced green fluorescent protein*). Das *IRF1*-Gen kodiert für ein gleichnamiges Protein, welches Mitglied der *Interferon Regulatory Factor*-Familie ist. Die Plasmidvektoren (pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1 und pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP) wurden in bereits linearisierter Form zur Verfügung gestellt, damit nur die gewollte Sequenz von der RNA-Polymerase transkribiert wird.

Für das Durchführen einer Transfektion oben erwähnter Gene im Rahmen dieser Doktorarbeit, ist es notwendig, dass diese Gene als mRNA vorliegen. Dazu wurde das *HiScribe T7 ARCA mRNA Synthesis Kit* von *New England Biolabs (NEB)* verwendet. Die meisten eukaryotischen mRNAs benötigen eine 7-Methylguanosin (m7G)-Cap-Struktur am 5'-Ende und einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende, um später effizient translatiert werden zu können. Das verwendete Kit ist für die Synthese einer ARCA-capped (*Anti-Reverse Cap Analog*) und poly(A)-tailed mRNA *in vitro* konzipiert. Die Protein-codierende Sequenz des vorliegenden DNA-Templates wird in Gegenwart eines Gemisches von Ribonukleotiden von einer T7-RNA-Polymerase spezifisch transkribiert.

Als erstes wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß folgende Komponenten nacheinander hinzugegeben und anschließend in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert:

Tabelle 5: Übersicht in-vitro Transkription.

RNase-freies H₂O	7 µl	
2X ARCA/NTP Mix	10 µl	1mM GTP, 4mM ARCA, 1,25 mM CTP, 1,25 mM UTP, >1,25 mM ATP final
DNA-Template: -pcDNA3 mit IRF1-Gen -pcDNA mit EGFP-Gen	x µl	1 µg
T7 RNA Polymerase Mix	2 µl	<i>Not Applicable</i>
Gesamtvolumen	20 µl	

Die Konzentration der zur Verfügung gestellten Plasmidvektoren betrug 1 µg/µl. Demensprechend wurde jeweils 1 µl verwendet. Der Reaktionsansatz wurde mit RNase-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden 2 µl DNase I hinzugegeben, resuspendiert und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Stabilisierung der synthetisierten mRNA fand post-transkriptionell eine 3'Polyadenylierung statt. Dazu wurden 5 µl *10X Poly(A) Polymerase Reaction Buffer* und 5µl *Poly(A) Polymerase* hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit RNase-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt, mikrozentrifugiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde mit der mRNA Aufreinigung fortgefahren. Dazu wurde das *Monarch RNA Cleanup Kit* von *New England Biolabs (NEB)* verwendet. Der Reaktionsansatz wurde auf eine Säule in einem 2ml Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden 100 µl *RNA Cleanup Binding Buffer* sowie 150 µl Ethanol zu der hergestellten mRNA hinzugegeben, resuspendiert und für 1 Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl *RNA Cleanup Wash Buffer*

hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Zum Schluss wurde die Säule mit 50 µl RNase-freiem H₂O eluiert und der Säulendurchfluss in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert. Die hergestellten IRF1 und EGFP mRNAs wurden für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen verwendet.

3.2.5 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurde IRF1-mRNA sowie zum Vergleich EGFP-mRNA in unterschiedliche Tumorzelllinien (MCF7, T47D und BT549) transfiziert. Synthetisiert wurde diese mRNA aus den von Jessica Behnke zur Verfügung gestellten Plasmidvektoren (s. Abschnitt 3.2.4 *In-vitro*-Transkription).

Bei der Transfektion von mRNA kommt es nicht zur Integration der Nukleinsäure in das Genom der Wirtszelle. Die transfizierte mRNA führt zur Stimulation des Proteinsynthese-Apparates im Zytoplasma, wo dann das entsprechende Genprodukt gebildet wird.

Das Einbringen der Fremd-RNA in die Wirtszelle ist mithilfe verschiedener Reagenzien möglich. In dieser Arbeit wurde *Lipofectamine Messenger Max* von Invitrogen als Transfektionsreagenz verwendet.

Für die Transfektion wurde nach Herstellerprotokoll gearbeitet und zunächst bei einer 24-Well-Platte pro Well 25 µl OPTI-MEM mit 1,5 µl Lipofectamin in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darüber hinaus wurden pro Well 25 µl OPTI-MEM mit der benötigten mRNA-Menge in einem zusätzlichen Reaktionsgefäß für 5 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die OPTI-MEM-Lipofectamin Mischung und die OPTI-MEM-mRNA Mischung zusammengegeben, kurz gevortext und schließlich für 5 min bei RT inkubiert. Mit dem bereits vorgewärmten Kultivierungs-Medium wurden dann das Gemisch auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Abschließend wurde das Medium aus der 24-Well-Platte entfernt und 500 µl der mRNA-Lösung hinzugegeben, wobei vorsichtig mit der Pipette an den Rand des Wells pipettiert wurde, um so keine adhärenen Zellen vom Plattenboden zu lösen.

Die folgenden Tabellen stellen eine Übersicht über alle wichtigen Voraussetzungen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen dar. Dabei wurden, ausgehend von der 24-Well-Platte, die für andere Gefäße benötigten Mengen anhand des Durchmessers berechnet. In Tabelle 6 bis 8 werden zunächst der Durchmesser des Zellkulturgefäßes, die bei Versuchsbeginn ausplattierte Anzahl an Tumorzellen sowie die verwendete Menge an EGFP- und IRF1-mRNA aufgezeigt. Anschließend werden die Mengen der eingesetzten Transfektionsreagenzien Opti-MEM und Lipofectamin, als auch das verwendete Volumen an

Nährmedium dargestellt (Tabelle 9). Des Weiteren kann man die Zellwachstumsdauer der verwendeten Brustkrebszelllinien bis zu einer Konfluenz von 70-90% (notwendig für die Transfektion) erkennen (Tabelle 10).

Tabelle 6: Übersicht Transfektion der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Zellkulturgefäß	Durchmesser	Zellzahl	EGFP-/IRF1-mRNA Menge
96-Well-Platte	6,4 mm ²	10000	12,5 ng
24-Well-Platte	19 mm ²	7000	50 ng
T25-Flask	250 mm ²	1,4 x 10 ⁶	650 ng

Tabelle 7: Übersicht Transfektion der Mammakarzinomzelllinie T47D.

Zellkulturgefäß	Durchmesser	Zellzahl	EGFP-/IRF1-mRNA Menge
96-Well-Platte	6,4 mm ²	10000	37,5 ng
24-Well-Platte	19 mm ²	6000	150 ng
T25-Flask	250 mm ²	1,3 x 10 ⁶	1950 ng

Tabelle 8: Übersicht Transfektion der Mammakarzinomzelllinie BT549.

Zellkulturgefäß	Durchmesser	Zellzahl	EGFP-mRNA Menge
24-Well-Platte	19 mm ²	10000	150 ng

Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit der BT549-Zelllinie wurde sie im Laufe dieser Arbeit nicht weiterverwendet und die Transfektion nur bei einer 24-Well-Platte durchgeführt.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Transfektionsreagenzien

Zellkulturgefäß	OPTI-MEM	Lipofectamin	Medium
96-Well	5 µl	0,15 µl	200 µl
24-Well	25 µl	0,75 µl – 1,5 µl	500 µl
T25-Flask	325 µl	19,5 µl	6,5 ml

Tabelle 10: Zellwachstumsdauer in den unterschiedlichen Zellkulturgefäßen

Zellkulturgefäß	Anzahl Tage
96-Well-Platte	1 Tag (T47D) 2 Tage (MCF7)
24-Well-Platte	3 Tage
T25-Flasche	1 Tag

3.2.6 MTT-Zellviabilitätsassay

Der MTT-Zellviabilitätsassay ist ein Verfahren zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität. Bei dem namensgebenden Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) handelt es sich um einen gelben, wasserlöslichen Farbstoff, der von den lebenden Zellen zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird, d.h. lebende Zellen färben sich blau.

Für den MTT-Zellviabilitätsassay wurden in eine 96-Well-Platte pro Well je 5000 oder 10000 Zellen in 200 µl Nährmedium ausplattiert. Nach 24 h (T47D) bzw. 48h (MCF7) wurden die Zellen in der ersten Spalte der 96-Well-Platte mit IRF1-mRNA transfiziert und diejenigen in der zweiten Spalte mit EGFP-mRNA. Die Konzentration betrug 12,5 ng/Well bei MCF7 und 37,5 ng/Well bei T47D. Die dritte Spalte bestand aus nativen, untransfizierten Tumorzellen (Abbildung 10).

Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgesaugt und 10µl einer 0,5%igen MTT-Lösung in 100 µl Nährmedium pro Well hinzugegeben, resuspendiert und schließlich für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach Beenden der Inkubation wurden 100 µl Solubilisierungspuffer pro Well zugegeben, erneut resuspendiert und für 4h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption am ELISA Reader bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 750 nm) gemessen.

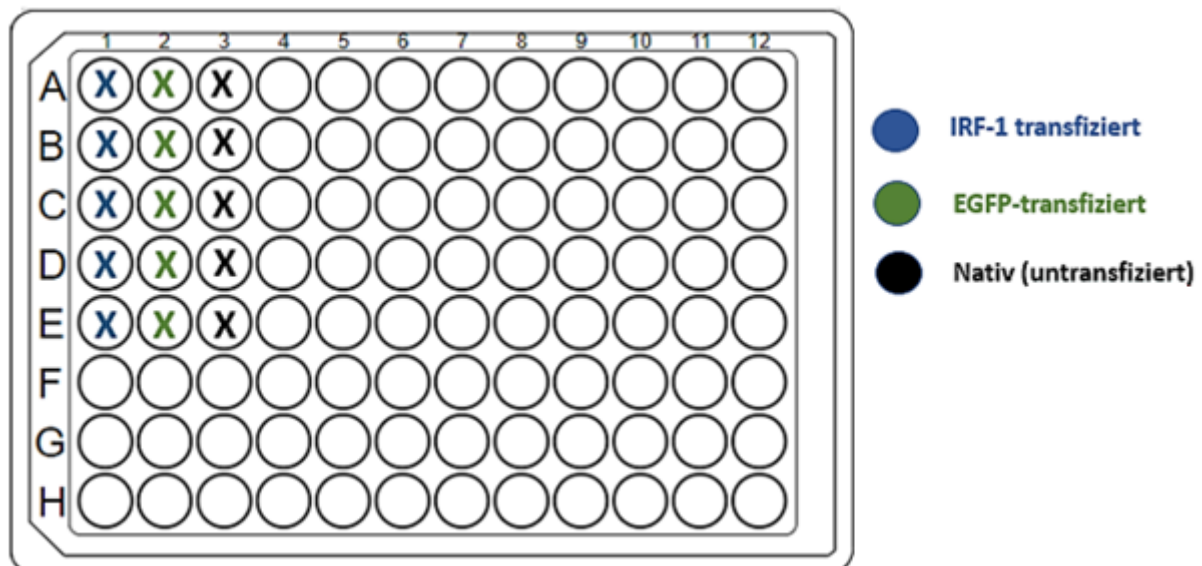


Abbildung 10: Auftragungsschema für den MTT-Zellviabilitätsassay

3.2.7 Migration in der Boyden-Kammer

Bei dieser Methodik geht es darum, eine aktive Migration von Zellen durch Membranporen hin zu einem Lockstoff nachzuweisen. Die Boyden-Kammer besteht dabei aus einer Grund- und einer Deckplatte mit jeweils 48 Wells. Beide Bereiche sind durch eine Polycarbonat-Membran (8 µm Porengröße) getrennt. Aufgrund der geringeren Größe der Poren im Vergleich zu der Zellgröße, muss die Zelle in einer aktiv gerichteten Bewegung durch die Poren migrieren. Nach der Durchquerung adhären die Zellen an der Unterseite der Membran. Für die chemotaktisch wirkenden Lockstoffe wurden Kollagen I in der Konzentration 25 µg/ml (MCF7) und in der Konzentration 35 µg/ml (T47D) in serumfreiem Medium verwendet. Die Vertiefungen im unteren Teil der Boyden-Migrationskammer wurden mit je 29 µl der verwendeten Chemotaxine aufgefüllt. Serumfreies Medium diente im Rahmen dieser Methodik als Negativkontrolle. Anschließend wurde die Membran 2-3 Minuten in DBPS eingelegt und dann mit der glänzenden Seite nach unten auf die Kammer gelegt. Danach wurden der Dichtungsring und die obere Deckplatte aufgesetzt und mit den dazugehörigen Schrauben fixiert. Nun wurden in die Vertiefungen der oberen Kammer 50 µl der zu untersuchenden Zellsuspension pro Well pipettiert. Im Anschluss wurde die Boyden-Kammer für 16 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Der Versuchsaufbau im Rahmen dieser Arbeit umfasste fünf Tage. Am ersten Tag wurden die beiden Tumorzelllinien MCF7 ($1,4 \times 10^6$ Zellen) und T47D ($1,3 \times 10^6$ Zellen) jeweils in drei T25-Flaschen überführt und für 24h kultiviert. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit EGPF-mRNA und mit IRF1-mRNA transfiziert. Die Konzentration betrug 650 ng/Flasche bei MCF7 und 1950 ng/Flasche bei T47D. Jeweils eine T25-Flasche beinhaltete native, untransfizierte Tumorzellen. Am dritten Tag wurden alle Zellen auf FCS-freies Medium umgestellt. Am vierten Tag fand die aktive Migration in der Boyden-Kammer statt. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin-Reaktion abgelöst und die Zellkonzentration mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Um für die Migration die gewünschte Zellkonzentration zu erreichen, wurde das entsprechende Volumen abgenommen und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Bei der Zelllinie MCF7 wurden pro Well 3×10^4 Zellen verwendet, bei der Zelllinie T47D $3,5 \times 10^4$ Zellen/Well. Das entsprechende Volumen wurde mit FCS-freiem Medium auf 50 µl aufgefüllt und wie oben beschrieben in die Boyden-Kammer pipettiert (Abbildung 11).

Am nächsten Tag wurde die Boyden-Kammer auseinandergenommen, die Membran vorsichtig mit zwei Klammern fixiert und auf der rauen Seite abgelegt. Nicht migrierte Zellen auf der rauen Seite wurden durch Ziehen durch Puffer von Weisse und Abstreifen entfernt. Migrierte Zellen auf der glänzenden Seite der Membran wurden 1 Minute in gekühltem Methanol fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen mit dem *Hemacolor* Färbekit angefärbt. Dafür wurde die Membran dreimal durch die rötliche *Lösung 2* und sechsmal durch die

bläuliche *Lösung 3* gezogen und anschließend sorgfältig im Puffer von Weise ausgewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran auf einen Objektträger fixiert. Zur Reinigung der verwendeten Boyden-Kammer wurde 1%ige Terg-a-zyme Lösung verwendet.

Für die Auswertung der chemotaktischen Migration wurden die Areale der migrierten Zellen am Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung mithilfe eines Rasterokulars betrachtet. Das Sichtfenster des Rasterokulars besteht aus einem Quadrat, welches von 10x10 mm Kleinquadraten gebildet wird. Es wurden pro Migrationsfeld 10 Quadrate ausgezählt. Dieses Vorgehen wurde für 4 Wells wiederholt und anschließend davon der Mittelwert gebildet.

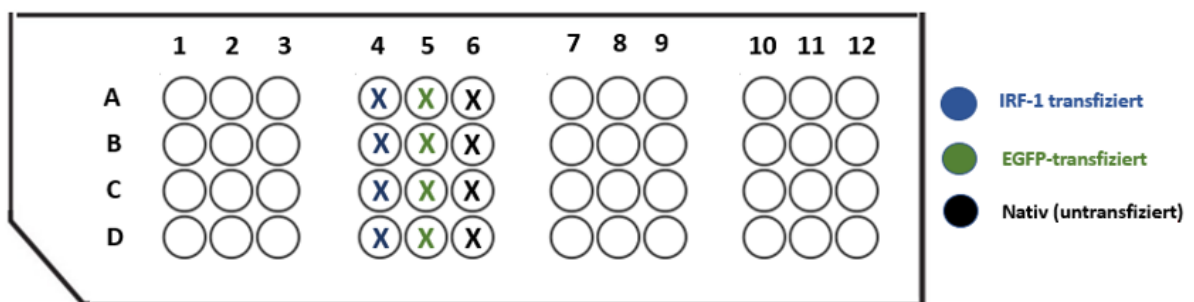


Abbildung 11: Auftragungsschema für die chemotaktische Migration in der Boyden-Kammer

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Expression von *IRF1* in Mammakarzinomzellen mittels qRT-PCR

Ziel der Doktorarbeit war es, die Funktion von *IRF1* (*Interferon Regulatory Factor 1*) in Tumorzelllinien zu untersuchen. Dafür wurde zunächst die Expression des *IRF1*-Gens in ausgewählten Brusttumorzelllinien mit dessen Expression in der gesunden Brustepithelzelllinie MCF10A verglichen.

Zur Normierung der verwendeten cDNA-Mengen wurde als erstes die Genexpression bekannter Haushaltsgene (HG) untersucht und daraus ein Konzentrationsverhältnis gebildet. Haushaltsgene werden, im Gegensatz zu den regulierten Genen, unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert. Sie kodieren für Proteine, die für den Grundstoffwechsel von Zellen verantwortlich sind.

Bei den vier Mammakarzinomzelllinien MCF7, T47D, BT549 und MDA-MB231 wurden die Konzentrationen von sechs Haushaltsgenen mittels *qRT-PCR* gemessen und jeweils mit deren Konzentration in der gesunden Mammazelllinie MCF10A verglichen. Von diesen sechs Haushaltsgenen wurden *HPRT*, *ACTB*, *PPIA* und *TBP* ausgewählt, da diese ein ähnliches Konzentrationsverhältnis zueinander aufzeigten (ähnliche relative HG-Expression zwischen Tumorzelllinie und MCF10A). Nur bei MDA-MB231 wurde *HPRT* ausgelassen, da bei dieser Zelllinie das HG-Konzentrationsverhältnis von *HPRT* zu stark von dem der anderen Haushaltsgene abwich.

Die folgenden Grafen stellen den Vergleich der Haushaltsgen-Konzentration zwischen jeweiliger Tumorzelllinie und MCF10A dar:

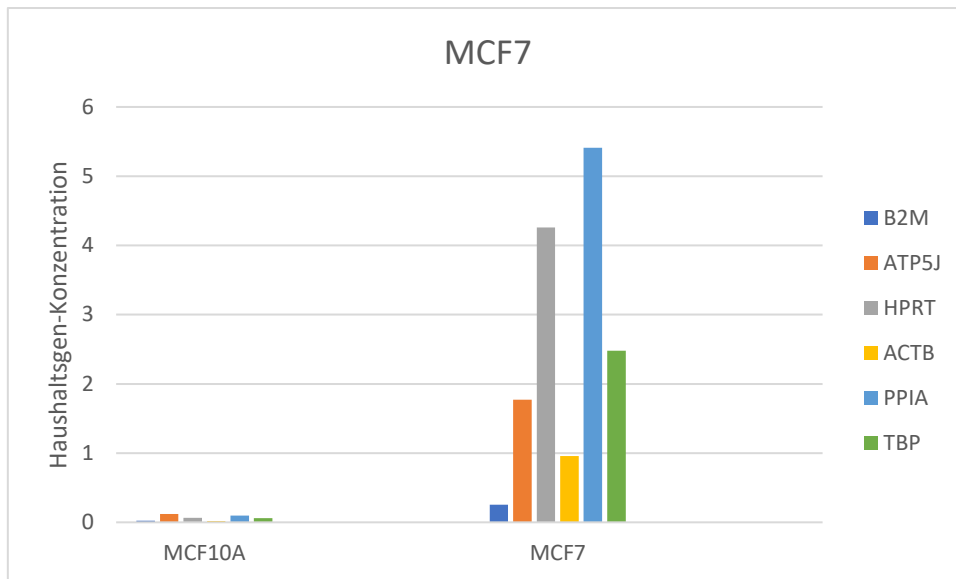


Abbildung 12: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentrationen zwischen MCF7 und MCF10A. Das Konzentrationsverhältnis ist hinter dem jeweiligen HG in Klammern angegeben und betrug wie folgt: B2M (10:1), ATP5J (15:1), HPRT (70:1), ACTB (53:1), PPIA (55:1), TBP (42:1). Ausgewählt wurden die vier Haushaltsgene HPRT, ACTB, PPIA, TBP.

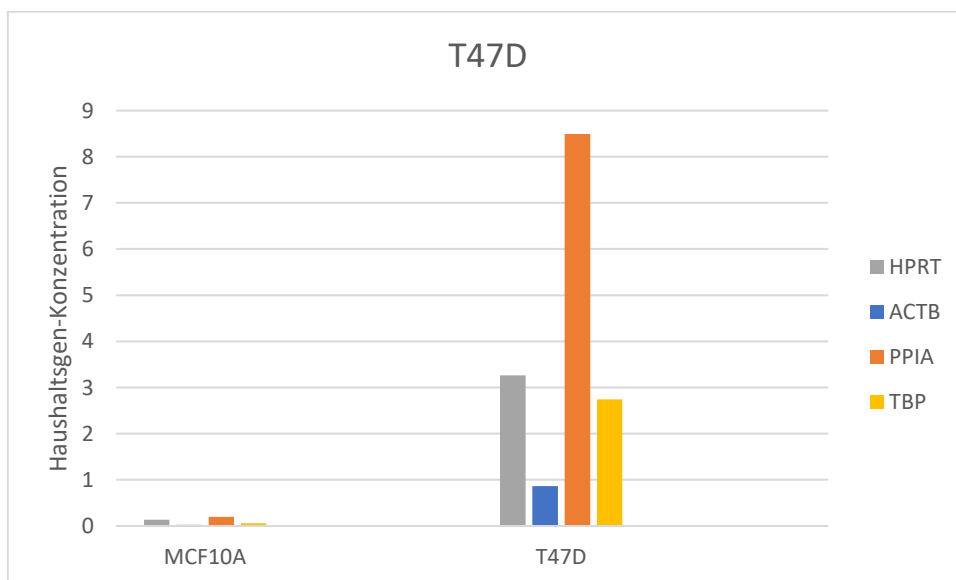


Abbildung 13: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentrationen zwischen T47D und MCF10A. Das Konzentrationsverhältnis ist hinter dem jeweiligen HG in Klammern angegeben und betrug wie folgt: HPRT (24:1), ACTB (33:1), PPIA (42:1), TBP (49:1).

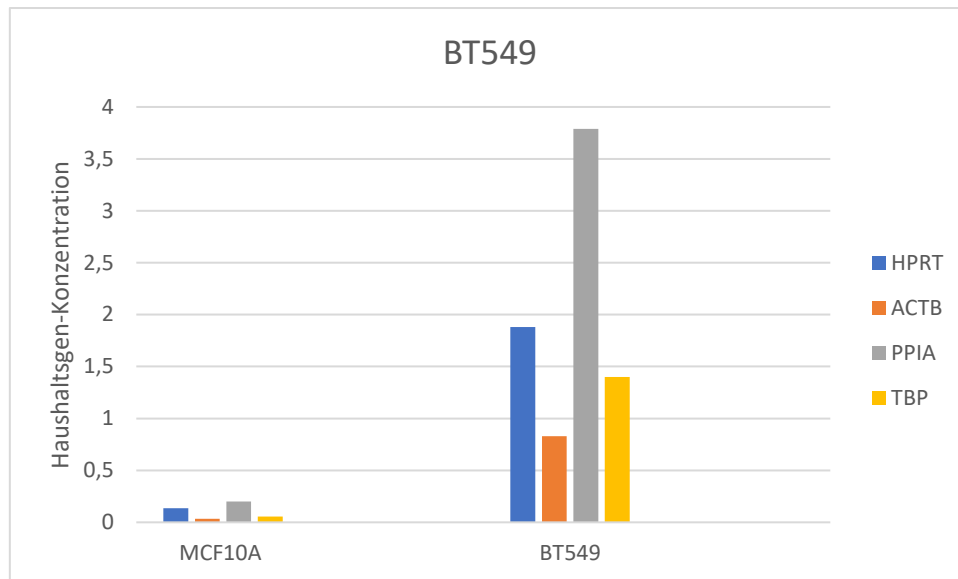


Abbildung 14: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentrationen zwischen BT549 und MCF10A. Das Konzentrationsverhältnis ist hinter dem jeweiligen HG in Klammern angegeben und betrug wie folgt: HPRT (14:1), ACTB (25:1), PPIA (18:1), TBP (25:1).

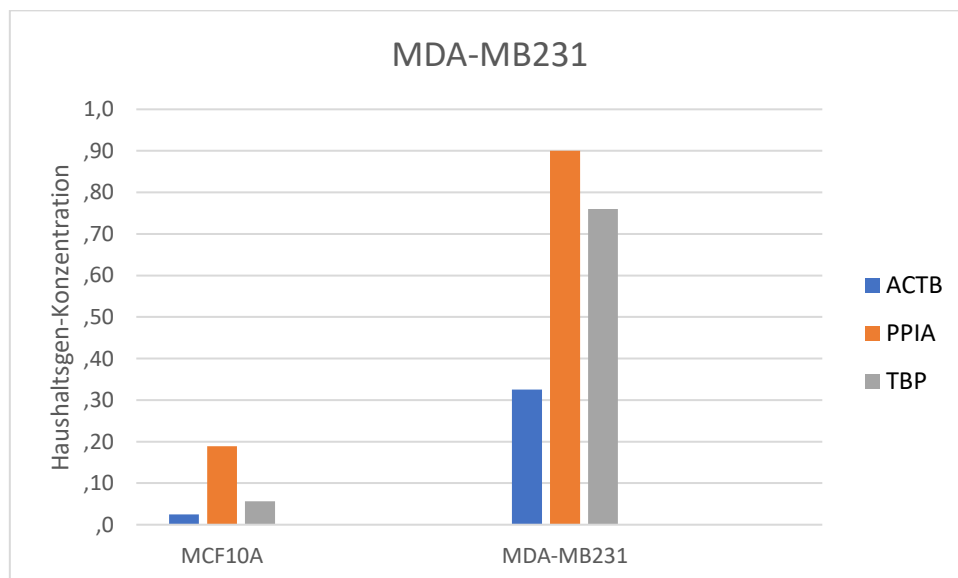


Abbildung 15: Vergleich der Haushaltsgen-Konzentrationen zwischen MDA-MB231 und MCF10A. Hier wurden nur die drei Haushaltsgene ACTB, PPIA und TBP ausgewählt, da das Konzentrationsverhältnis bei HPRT zu stark von dem der anderen drei HG abwich. Das Konzentrationsverhältnis ist hinter dem jeweiligen HG in Klammern angegeben und betrug wie folgt: HPRT (40:1), ACTB (13:1), PPIA (5:1), TBP (14:1).

Anhand der normierten HG-Expression kann die Expression weiterer Gene berechnet werden. Zunächst wurde dafür aus den Konzentrationen der Haushaltsgene das geometrische Mittel wie folgt gebildet:

$$\text{Geometrisches Mittel} = \sqrt[4]{MW(HPRT) \cdot MW(ACTB) \cdot MW(PPIA) \cdot MW(TBP)}$$

Das geometrische Mittel wurde sowohl für die jeweilige Tumorzelllinie als auch für MCF10A ausgerechnet. Anschließend wurde die Konzentration des zu untersuchenden *IRF1*-Gens durch dieses geometrische Mittel geteilt. Wenn man nun das Ergebnis mit derselben Rechnung bei MCF10A vergleicht, erhält man das Verhältnis *IRF1*-Expression Tumorzelllinie zu gesunder Brustzelllinie.

Die Berechnung wird beispielhaft für MCF7 dargestellt:

		IRF1-Konzentration in MCF7	
MCF7:	$\sqrt[4]{4,26 \cdot 0,957 \cdot 5,41 \cdot 2,48} = 2,72$	$\frac{0,68}{2,72} = 0,25$	8%
MCF10A:	$\sqrt[4]{0,0635 \cdot 0,0181 \cdot 0,0958 \cdot 0,0588} = 0,051$	$\frac{0,153}{0,051} = 3$	100%
		IRF1-Konzentration in MCF10A	

Die Expression des *IRF1*-Gens war bei der Tumorzelllinie MCF7 auf 8% herabreguliert. T47D hingegen wies eine Reduktion von *IRF1* auf 20% auf, BT549 auf 13%. Bei MDA-MB231 konnte bei dem *IRF1*-Gen im Vergleich zur normalen Brustzelllinie keine Herabregulation beobachtet werden.

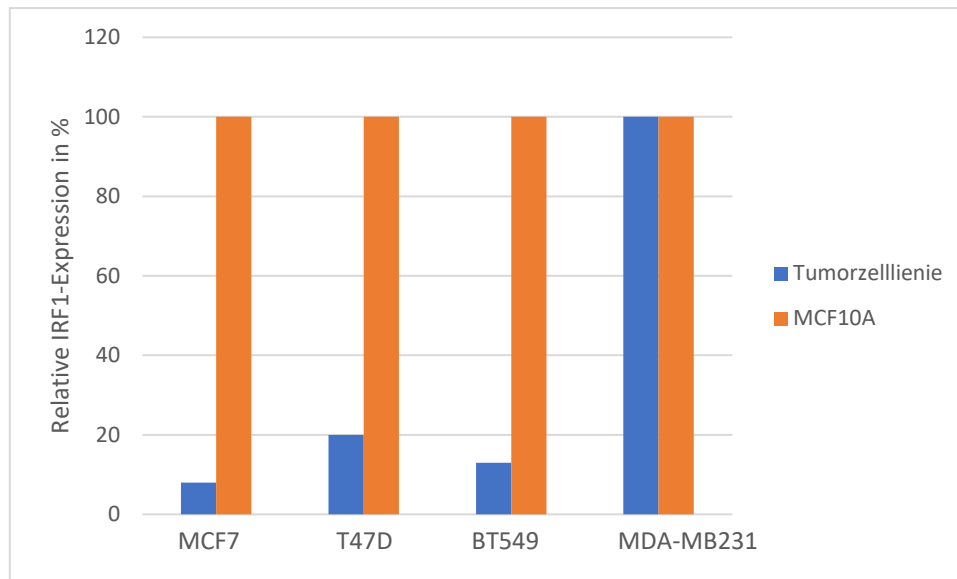


Abbildung 16: Relative IRF1-Expression in %. Es ist eine signifikante Herabregulation des IRF1-Gens bei den drei Tumorzelllinien MCF7, T47D und BT549 zu beobachten. Bei MDA-MB231 entspricht die Expression von IRF1 der gesunden Brustepithelzelllinie MCF10A.

Da bei den drei Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, BT549 für das *IRF1*-Gen eine signifikante Herabregulation zu beobachten war, wurden diese für die weiteren Versuche verwendet. Die durch *in-vitro*-Transkription von Jessica Behnkes linearisierten Plasmidvektoren (pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1 und pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP) hergestellte mRNA wurde in die untersuchten Brustkrebszellen transfiziert und anschließend beobachtet, wie sich eine Hochregulation von *IRF1* auf deren Physiologie auswirkt. Zur Untersuchung der Rolle von IRF1 in der Brustkrebsphysiologie wurden im Rahmen dieser Arbeit der MTT-Zellviabilitätsassay sowie die chemotaktische Migration in der Boyden-Kammer durchgeführt und ausgewertet.

4.2 Transfektion von EGFP-mRNA in Mammakarzinomzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei der bereits beschriebenen Tumorzelllinien (MCF7, T47D und BT549) mit der durch *in-vitro*-Transkription aus Jessica Behnkes linearisiertem Plasmidvektor (pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP) hergestellten EGFP-mRNA transfiziert. Als Positivkontrolle diente kommerziell erworbene *CleanCap* EGFP-mRNA der Firma *TriLink BioTechnologies*. Zur Dosisfindung wurden die Transfektionen zunächst mit 24-Well-Platten durchgeführt und dann anhand des Durchmessers der Wells die entsprechende mRNA-Menge für weitere Flächen errechnet (Tabellen 6 und 7). Ziel war es, beginnend 24h nach Transfektion, die Aufrechterhaltung der Zellviabilität sowie die Fluoreszenzintensität der Zellen (leuchtend grün) unter dem Mikroskop zu dokumentieren. Die beiden Plasmidvektoren

pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP und pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1 sind ähnlich konstruiert, weshalb eine Vergleichbarkeit der daraus synthetisierten mRNAs angenommen wird. Somit kann die für EGFP herausgefundene mRNA-Menge für nachfolgende Transfektionen auf IRF1 übertragen werden.

Für die Tumorzelllinie MCF7 wurden insgesamt 7000 Zellen/Well eingesetzt und anschließend bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert (3 Tage). Im nächsten Schritt wurden die Zellen dann mit 50 ng EGFP-mRNA transfiziert. Für die Positivkontrolle wurden ebenfalls 50 ng eingesetzt und als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. Nach 24h war das Fluoreszenzsignal am stärksten bzw. die EGFP-Expression am größten, weshalb die weiteren Versuche mit dem MTT-Zellviabilitätsassay und der Migration in der Boyden-Kammer beide 24h nach Transfektion durchgeführt wurden. Generell konnte beobachtet werden, dass das Fluoreszenzsignal der Zellen auch fünf Tage nach Transfektion noch vorhanden war, allerdings mit einer geringeren Fluoreszenzintensität und mit immer weniger vorhandenen Zellen.

Bei der Zelllinie T47D wurden 6000 Zellen/Well eingesetzt und bei der BT549-Zelllinie 10000 Zellen/Well. Auch hier wurde bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert (3 Tage). Für beide Tumorzellen betrug die transfizierte EGFP-mRNA Menge 150 ng. Bei dieser Menge wurde die notwendige Zellviabilität am besten gewährleistet (kein Absterben von Zellen). Das Fluoreszenzsignal war ebenfalls wie bei MCF7 nach 24h am stärksten und auch nach fünf Tagen noch sichtbar.

Zu beobachten war bei allen Tumorzelllinien eine Aggregation der Zellen untereinander, was für ein inhomogenes Wachstum verantwortlich war. Es führte zur Bildung eines mittigen Zellrasens mit weiteren vereinzelt Zellklumpen und komplett unbewachsenen Flächen dazwischen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die 24-Well-Platte 20 Minuten nach Ausplattieren der Zellen noch einmal aus dem Inkubator herausgenommen und durch vorsichtiges Neigen der Platte nach oben und unten eine bessere Verteilung der Tumorzellen ermöglicht.

Entscheidend für eine gelungene Transfektion war neben der Anpassung der Lipofectamin-Menge nach Herstellerprotokoll vor allem das Verwenden der richtigen Menge an mRNA. Die Menge an mRNA musste einerseits groß genug sein, damit von der Zelle ausreichend EGFP synthetisiert wurde und die Zellen somit eine gute Fluoreszenzintensität aufwiesen. Andererseits wurde beobachtet und musste berücksichtigt werden, dass die transfizierte mRNA Entzündungsreaktionen in den Zellen einleitet und diese dementsprechend bei zu hohen mRNA-Mengen sterben.

Die folgenden Abbildungen stellen die unterschiedlichen Intensitäten des Fluoreszenzsignals von Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion bei den Tumorzelllinien MCF7, T47D und BT549 dar. Die Mikroskopie-Aufnahmen wurden einmal mit und einmal ohne Fluoreszenzlicht gemacht. Die Belichtungszeit betrug bei allen Bildern 500 ms. Betrachtet wurden die transfizierten Zellen jeweils mit 10-facher und 20-facher Vergrößerung.

Bei MCF7 ist jeder Tag separat mit Erläuterungen versehen. Da sich die beiden Tumorzelllinien T47D und BT549 annähernd identisch wie MCF7 verhalten, wurde für diese ein Komposit für die fünf Tage erstellt und nur mit einer kurzen Zusammenfassung versehen. Für Tag 1 ist immer die Positivkontrolle zum Vergleich mit dargestellt.

MCF7 Tag 1 (24h):

Bei der Betrachtung der Aufnahme mit Fluoreszenzlicht bei der Zelllinie MCF7 ist bei beiden Vergrößerungen ein eindeutiges und starkes Fluoreszenzsignal zu sehen (Abbildung 17 und 19). Hervorzuheben ist, dass das Fluoreszenzsignal des EGFP-Proteins, welches durch Translation der selbst synthetisierten EGFP-mRNA gebildet wurde, 24h nach Transfektion (Tag 1) eine ähnliche Fluoreszenzintensität aufweist wie die Positivkontrolle (Abbildung 21 und 23). Hiermit kann die Aussage getroffen werden, dass die Transfektion der EGFP-mRNA, welche aus dem linearisierten Vektor pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP hergestellt wurde, sehr gut funktioniert hat (vergleichbar mit der kommerziellen Kontrolle).

Wenn man die Tumorzellen in Bezug auf ihre Viabilität 24h nach Transfektion beurteilt, erkennt man bei den Bildern ohne Fluoreszenzlicht die Zellen in einem guten gesunden Zustand bei einer Konfluenz von geschätzt 80% (Abbildung 18). Die Viabilität entspricht in etwa der Positivkontrolle (Abbildung 22), woran zu erkennen ist, dass der hergestellte Vektor gut toleriert wird und keinen offensichtlich toxischen Einfluss auf die Zellen hat. Daraus können wir ableiten, dass auch die in den folgenden Versuchen transfizierte IRF1-mRNA keine bzw. sehr geringe Toxizität für die Zellen aufweisen wird.

MCF7 Tag 1 (24h):

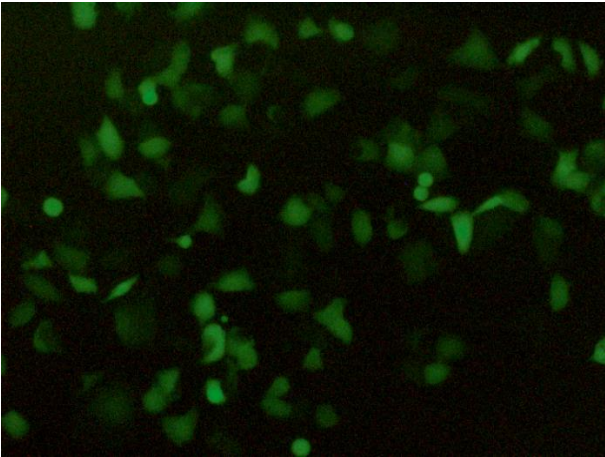


Abbildung 17: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (mit Fluoreszenz)

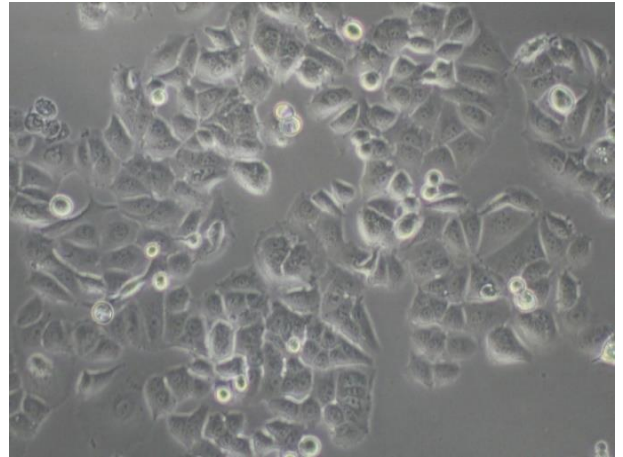


Abbildung 18: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (ohne Fluoreszenz)

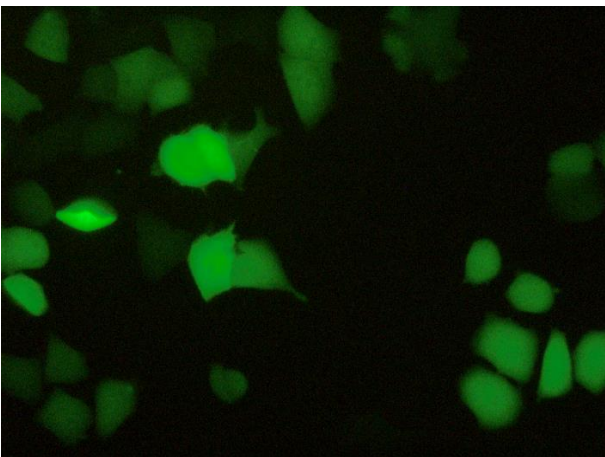


Abbildung 19: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (mit Fluoreszenz)

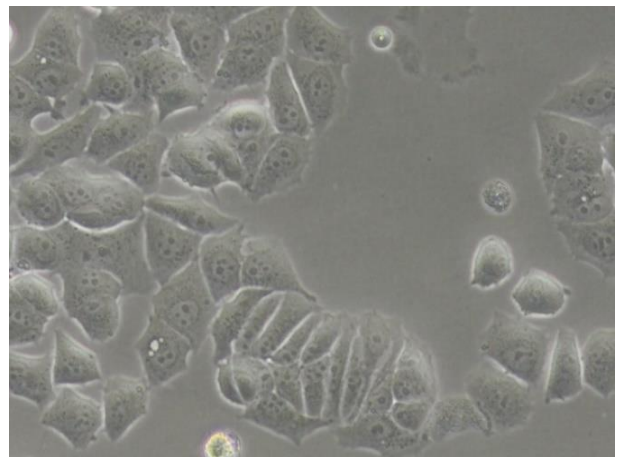


Abbildung 20: Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (ohne Fluoreszenz)

MCF7 Positivkontrolle Tag 1 (24h):

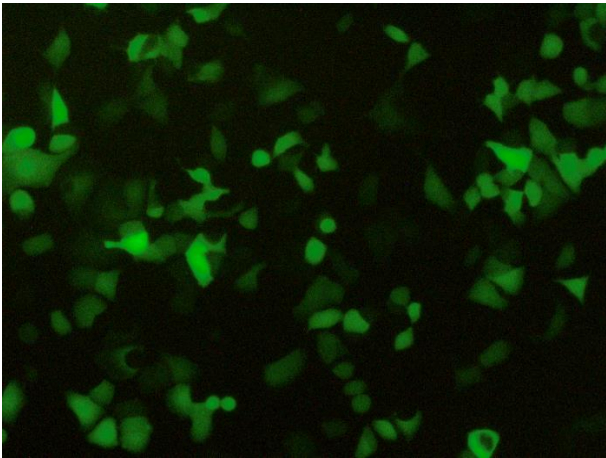


Abbildung 21: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (mit Fluoreszenz)

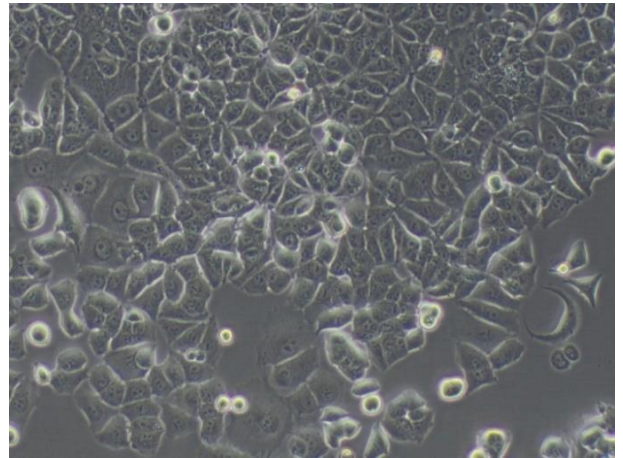


Abbildung 22: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (ohne Fluoreszenz)

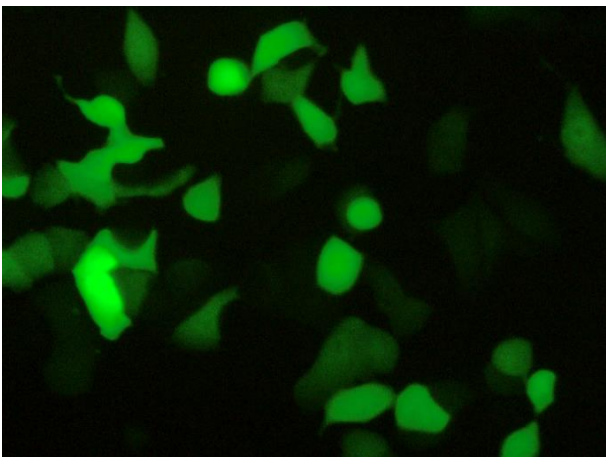


Abbildung 23: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (mit Fluoreszenz)

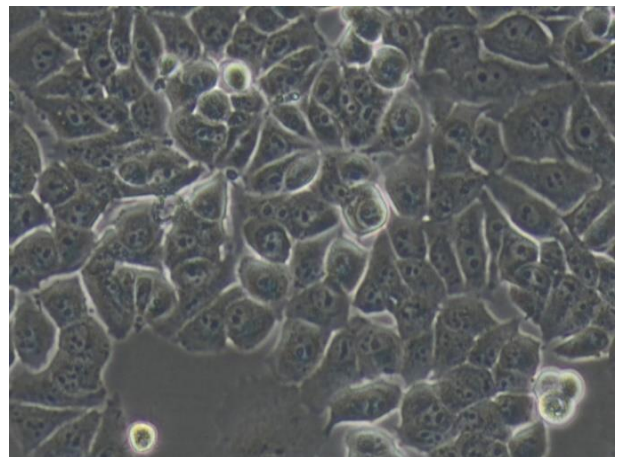


Abbildung 24: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (ohne Fluoreszenz)

MCF7 Tag 2 (48h):

Auch an Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion ist weiterhin ein hohes Fluoreszenzsignal in beiden Vergrößerungen zu sehen (Abbildung 25 und 27). Es ist nur eine leichte Abnahme der Intensität im Vergleich zu Tag 1 erkennbar. Daraus lässt sich schließen, dass das aus der hergestellten mRNA translatierte grün fluoreszierende Protein EGFP stabil ist oder stetig nachproduziert wird. Außerdem ist schön zu erkennen, dass die Proteinexpression im Zytoplasma stattfindet (grün) und der Zellkern ausgespart wird und schwarz bleibt (roter Kreis bei Abbildung 27). Auch die Zellviabilität ist an Tag 2 bei einer Konfluenz von 70-80% weiterhin sehr gut (Abbildung 26).

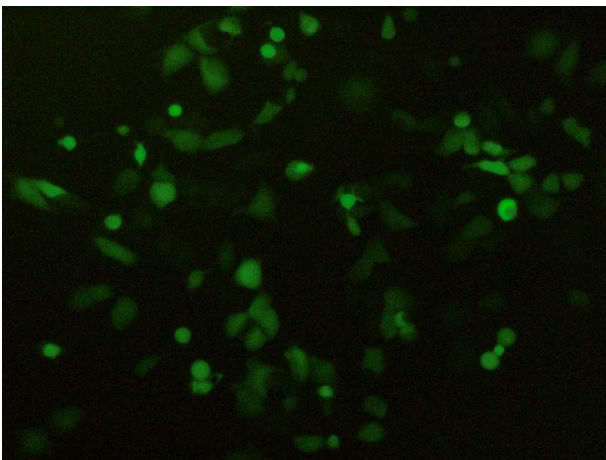


Abbildung 25: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (mit Fluoreszenz)

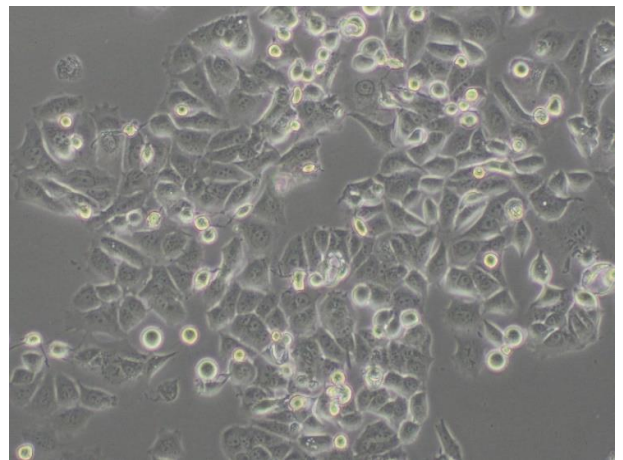


Abbildung 26: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (ohne Fluoreszenz)

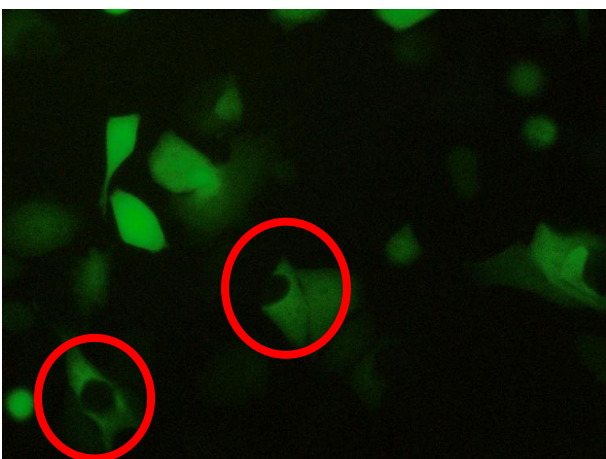


Abbildung 27: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (mit Fluoreszenz)

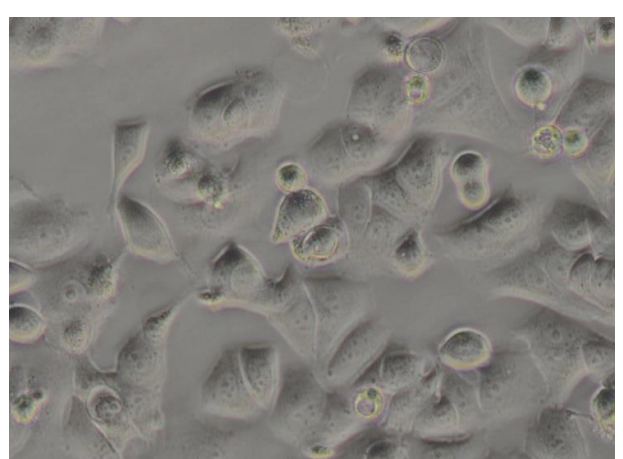


Abbildung 28: Tag 2 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (ohne Fluoreszenz)

MCF7 Tag 3 (72h):

An Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion zeigt die Brustkrebszelllinie MCF7 eine leichte Abnahme des Fluoreszenzsignal (Abbildung 29) im Vergleich zum vorherigen Tag (Abbildung 25), die Zellviabilität ist weiterhin in einem guten Zustand.

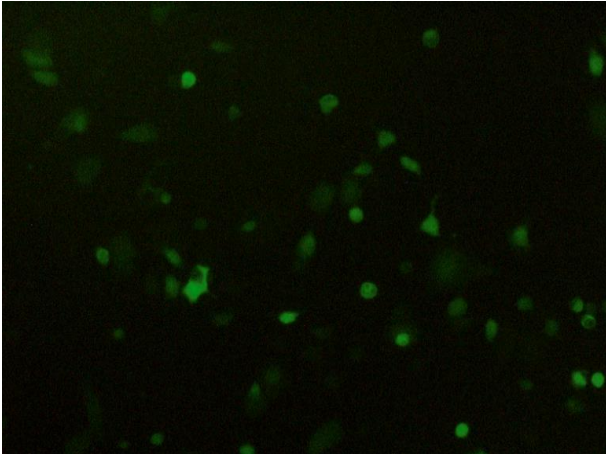


Abbildung 29: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (mit Fluoreszenz)

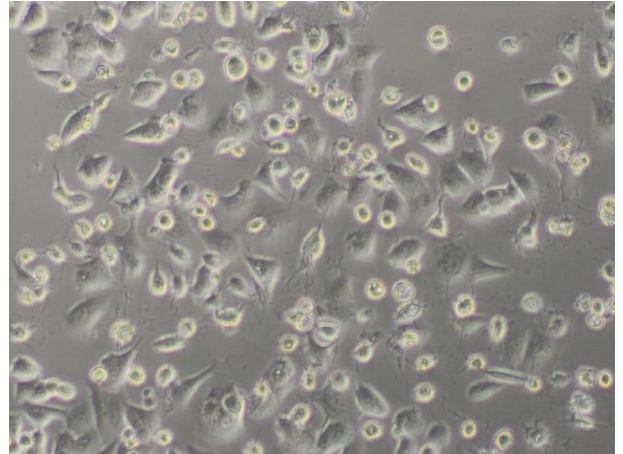


Abbildung 30: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (ohne Fluoreszenz)

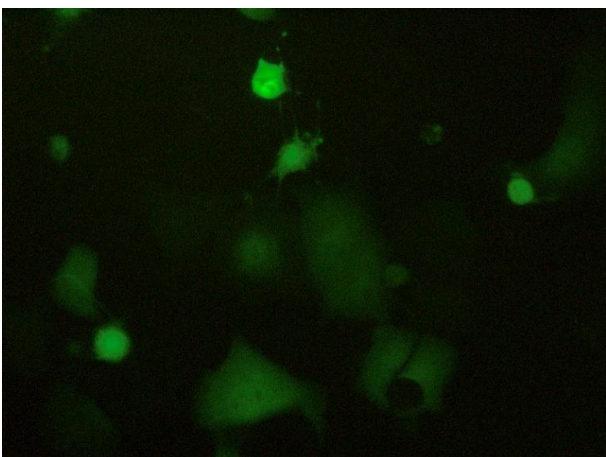


Abbildung 31: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (mit Fluoreszenz)

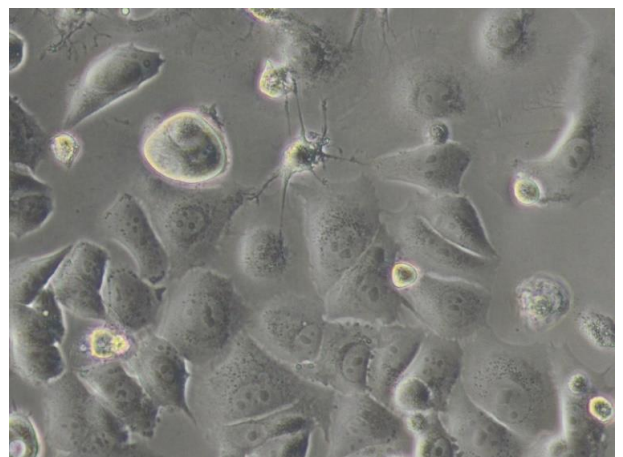


Abbildung 32: Tag 3 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (ohne Fluoreszenz)

Tag 4 und 5 (96h und 120h):

Am vierten und fünften Tag ist nur noch ein schwaches Fluoreszenzsignal zu sehen (Abbildung 33 und 37) und auch die Zellkonfluenz nimmt im Vergleich zu den vorigen Tagen nach EGFP-mRNA Transfektion ab. Die 24-Well-Platte ist nicht mehr so dicht bewachsen, man erkennt eine Abnahme des Zell-Zell-Kontaktes und zunehmend unbewachsene Flächen dazwischen (Abbildung 38).

Hervorzuheben ist, dass die Fluoreszenzintensität zwar im Laufe der Woche abgenommen hat, jedoch auch an Tag 5 noch vorhanden ist. Daraus lässt sich auf eine Stabilität des Proteins IRF1 (bzw. der zugrundeliegenden transfizierten IRF1-mRNA) schließen, dessen physiologische Rolle wir mithilfe des MTT-Zellviabilitätsassays und der chemotaktischen Migration in der Boyden-Kammer im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchen werden.

Tag 4 (96h):

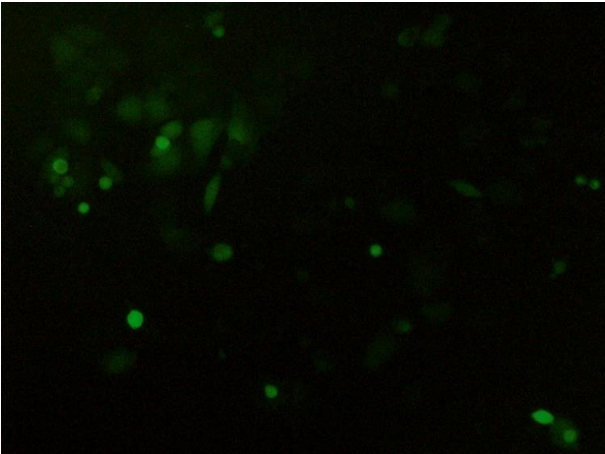


Abbildung 33: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (mit Fluoreszenz)

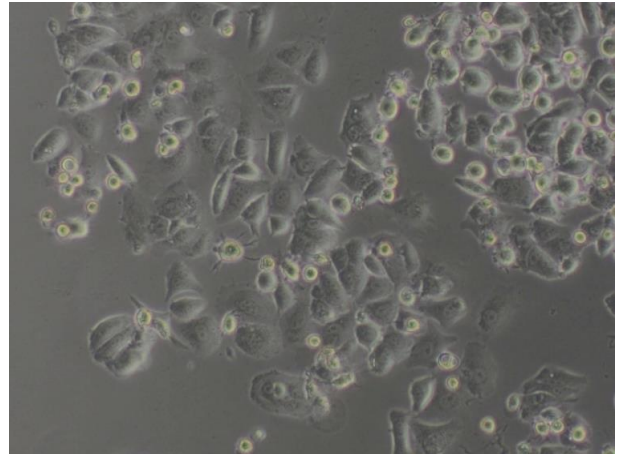


Abbildung 34: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (ohne Fluoreszenz)

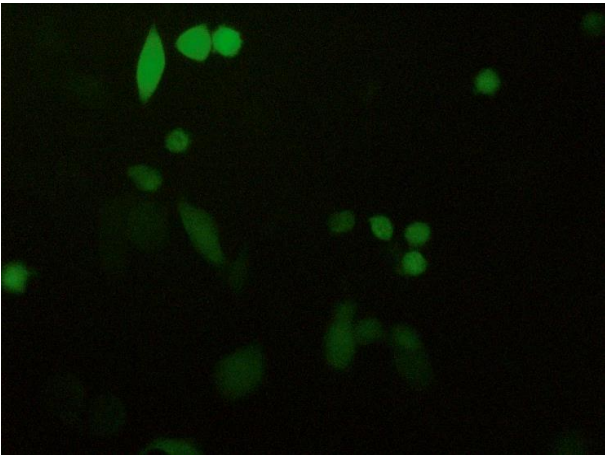


Abbildung 35: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (mit Fluoreszenz)

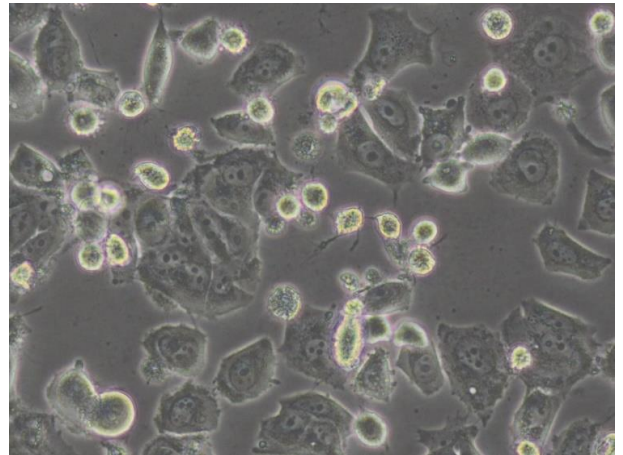


Abbildung 36: Tag 4 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 20X (ohne Fluoreszenz)

Tag 5 (120h):

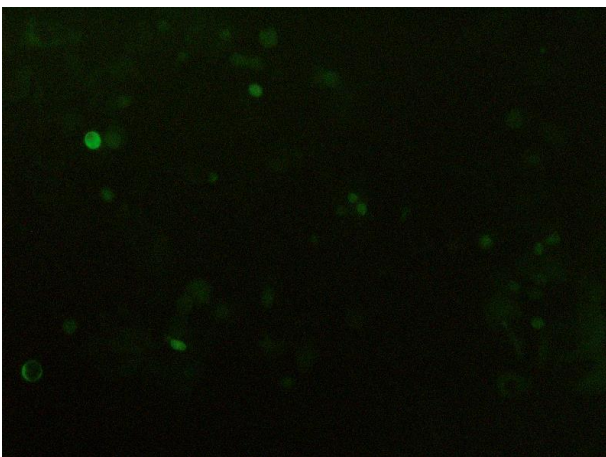


Abbildung 37: Tag 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (mit Fluoreszenz)

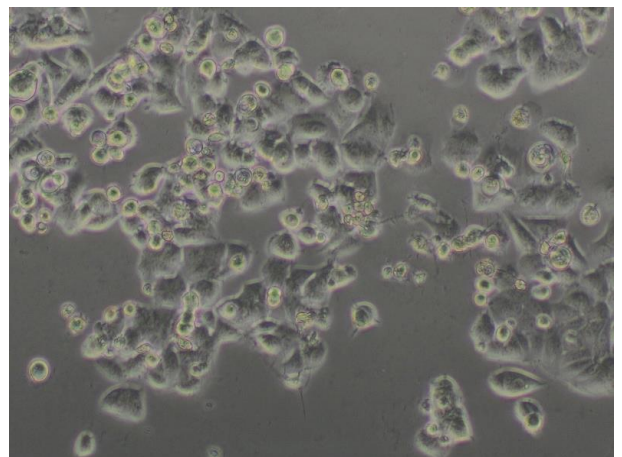


Abbildung 38: Tag 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie MCF7 10X (ohne Fluoreszenz)

Im Folgenden sind die unterschiedlichen Intensitäten des Fluoreszenzsignals nach EGFP-mRNA Transfektion bei der Tumorzelllinie T47D dargestellt. Für den ersten Tag ist die Positivkontrolle mit abgebildet. Tage 1 bis 5 sind in zwei Kompositis dargestellt, einmal mit 10-facher und einmal mit 20-facher Vergrößerung.

Zu beobachten ist eine, verglichen mit der Positivkontrolle (Abbildung 39), gute Fluoreszenzintensität, welche im Laufe der Woche kontinuierlich abnimmt. Ebenso verhält sich die Zellviabilität.

T47D Positivkontrolle Tag 1:

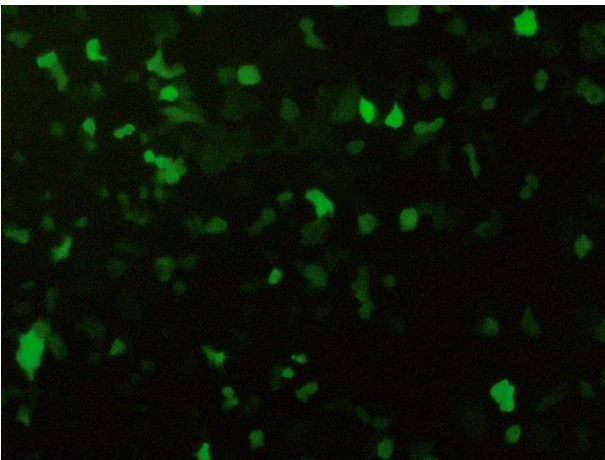


Abbildung 39: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 10X (mit Fluoreszenz)

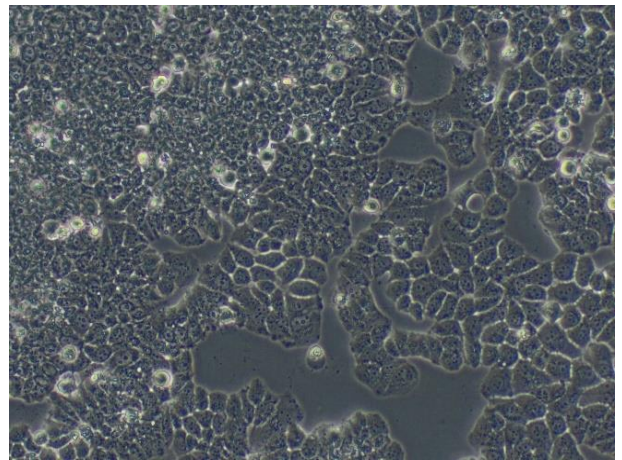


Abbildung 40: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 10X (ohne Fluoreszenz)

T47D Komposit Tag 1 bis 5 (mit 10-facher Vergrößerung):

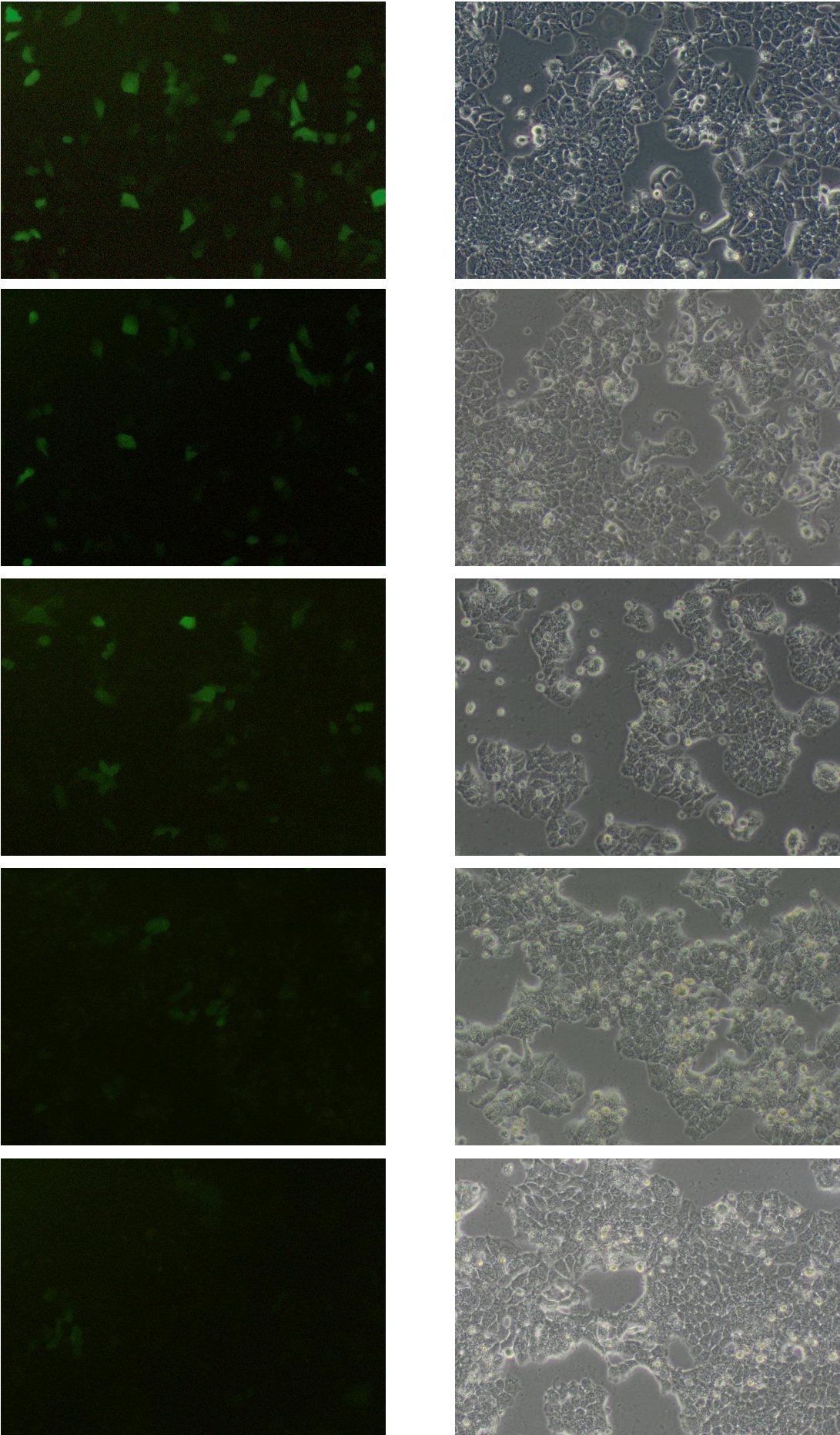


Abbildung 41: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 10X (mit und ohne Fluoreszenz)

T47D Komposit Tag 1 bis 5 (mit 20-facher Vergrößerung):

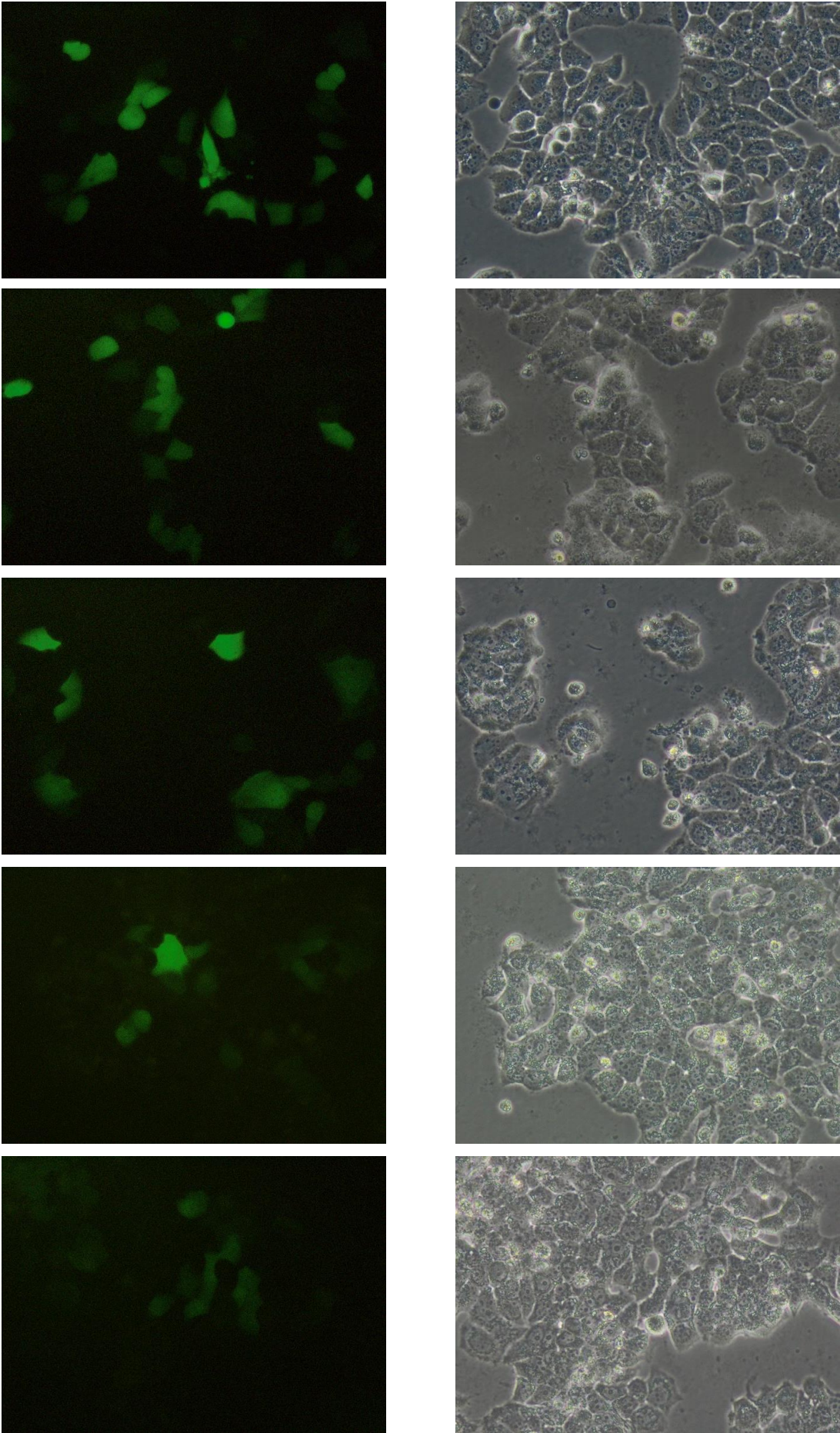


Abbildung 42: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie T47D 20X (mit und ohne Fluoreszenz)

Abschließend sind im Folgenden die Fluoreszenzsignal-Abbildungen für die EGFP-mRNA Transfektion bei der Tumorzelllinie BT549 dargestellt: Auch hier nimmt die Fluoreszenzintensität mit der Tagesanzahl stetig ab, ist jedoch selbst an Tag 5 noch in geringem Ausmaß zu beobachten. Ähnlich verhält sich auch die Zellviabilität.

BT549 Positivkontrolle Tag 1:

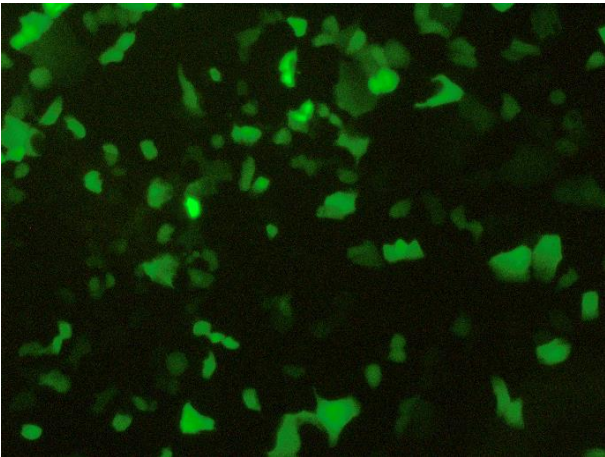


Abbildung 43: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 10X (mit Fluoreszenz)

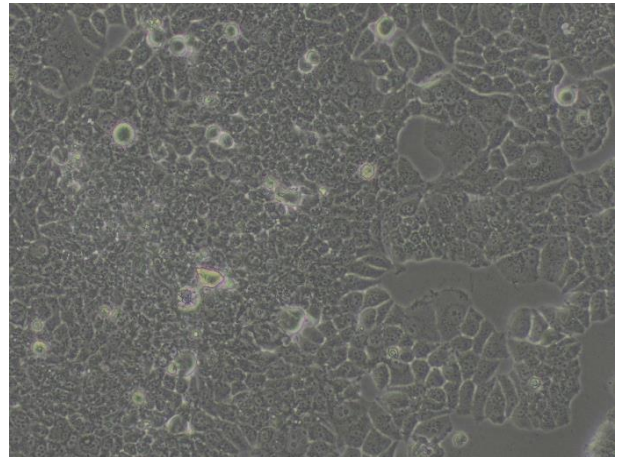


Abbildung 44: Positivkontrolle Tag 1 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 10X (ohne Fluoreszenz)

BT549 Komposit Tag 1 bis 5 (mit 10-facher Vergrößerung):

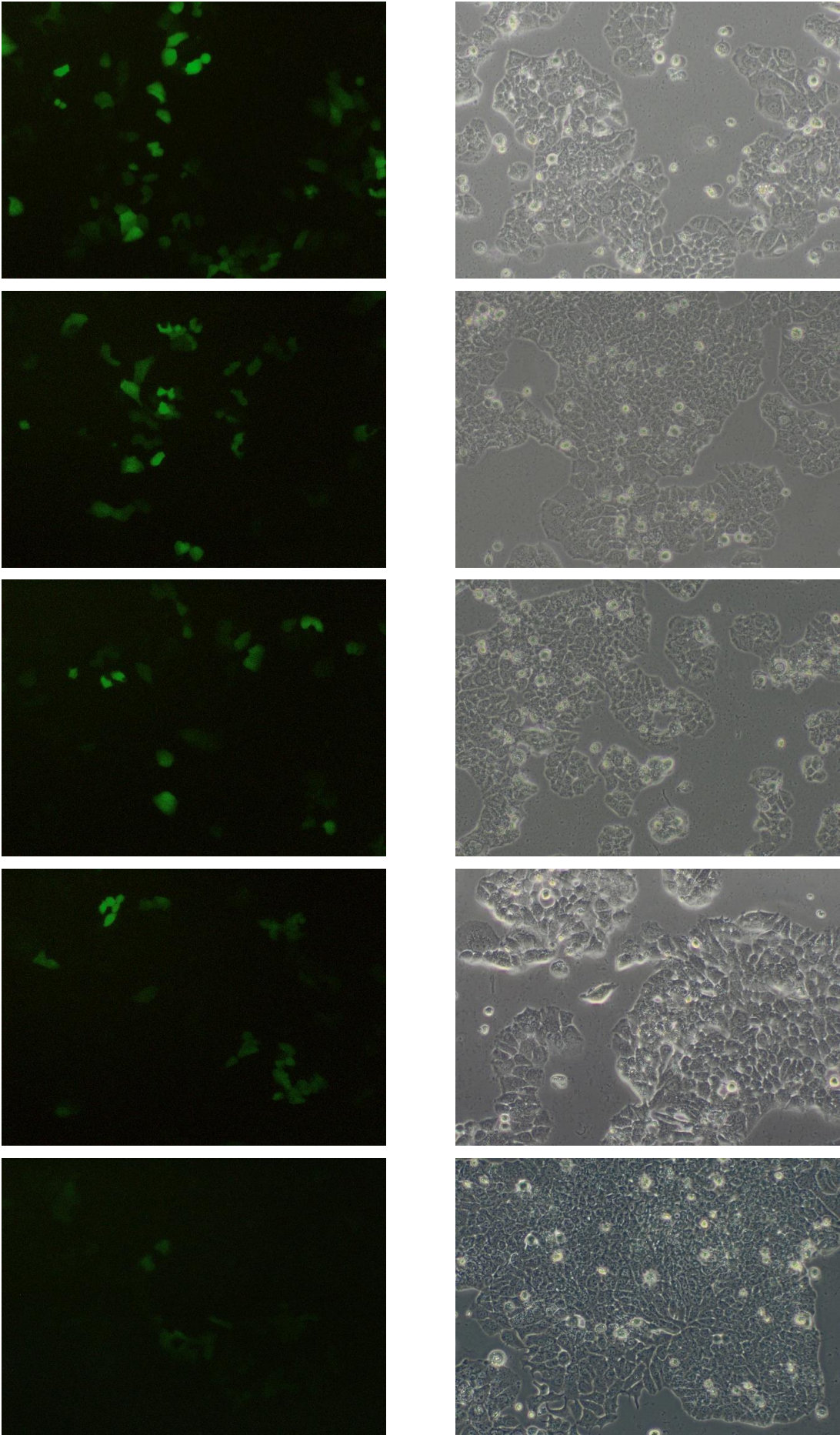


Abbildung 45: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 10X (mit und ohne Fluoreszenz)

BT549 Komposit Tag 1 bis 5 (mit 20-facher Vergrößerung):

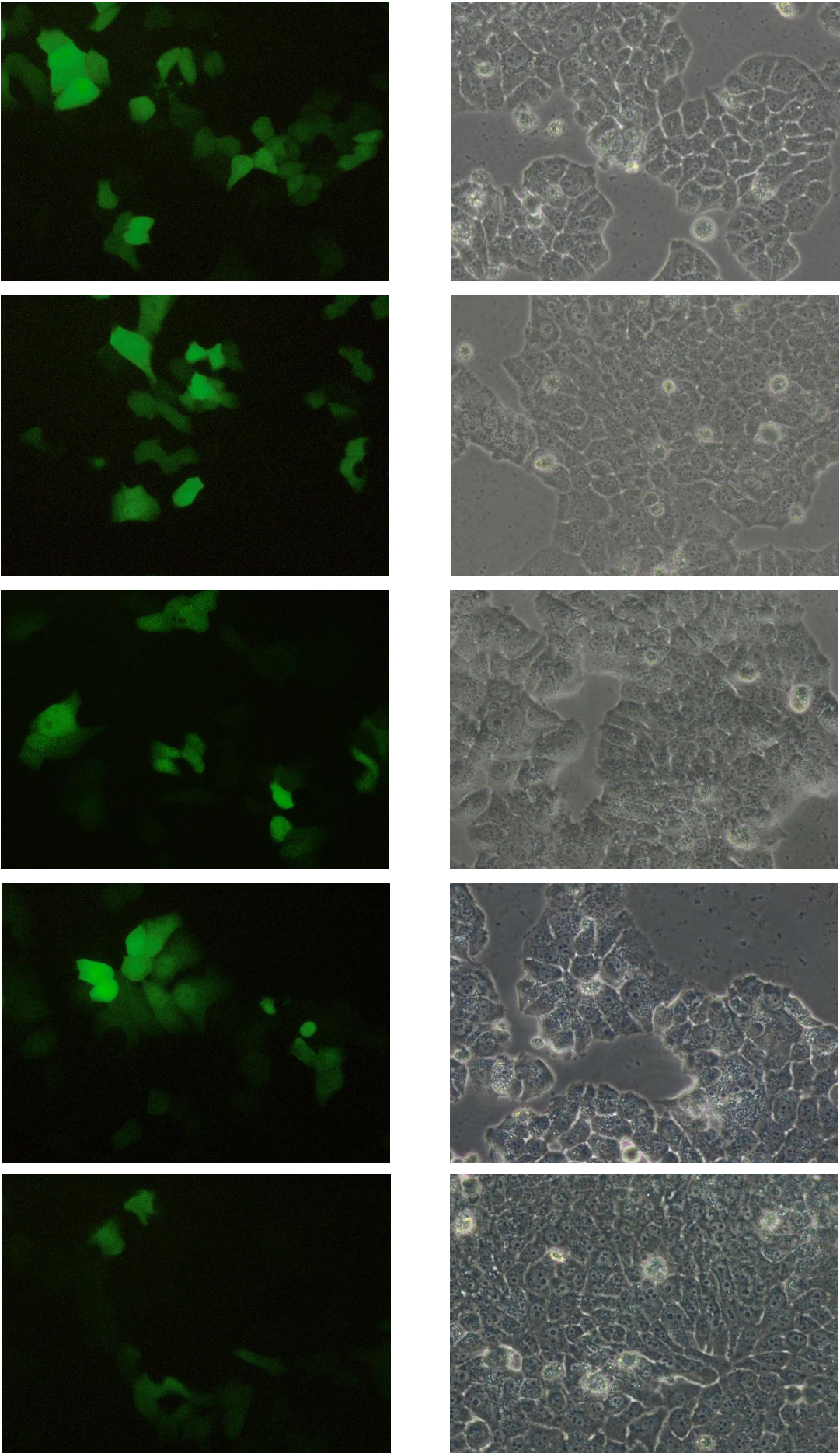


Abbildung 46: Tag 1 bis 5 nach EGFP-mRNA Transfektion der Tumorzelllinie BT549 20X (mit und ohne Fluoreszenz)

4.3 Zellviabilität der EGFP- und IRF1-transfizierten Mammakarzinomzelllinien

Zur Messung der Viabilität der mit EGFP- und IRF1-mRNA transfizierten Mammakarzinomzellen wurde in dieser Arbeit ein MTT-Test durchgeführt. Für den Versuchsaufbau wurde eine 96-Well-Platte verwendet und pro Well sowohl für EGFP als auch für IRF1 insgesamt 1×10^4 Zellen eingesetzt, als native Kontrolle wurden nur 5×10^3 Zellen ausgesät. Kultiviert wurden die ausplattierten Zellen zwei Tage (MCF7) und ein Tag (T47D). Die für die Transfektion verwendete mRNA-Menge betrug 12,5 ng bei der Zelllinie MCF7 und 37,5 ng bei T47D. Der Transfektionserfolg von EGFP wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft (Abbildung 47 und 48). Da die beiden mRNAs aus ähnlichen Konstrukten synthetisiert worden waren (pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP und pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1), konnte somit auch von einer erfolgreichen Transfektion mit der IRF1-mRNA ausgegangen werden. Schließlich wurde der MTT-Zellviabilitätsassay sowohl mit den transfizierten als auch mit den nativen Tumorzellen durchgeführt.

Die folgenden Abbildungen stellen die Kontrolle des Transfektionserfolges für die Tumorzelllinien MCF7 und T47D vor dem Durchführen des MTT-Tests dar. Beide Vergrößerungen der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen (10X und 20X) zeigen deutlich die intensiven Fluoreszenzsignale 24h nach der EGFP-Transfektion (Abbildung 47 und 48: Bilder A und C)

Bei den Bildern ohne Fluoreszenzlicht erscheinen die Zellen leicht durchsichtig, was an dem geringen Durchmesser der 96-Well-Platte liegt. Dadurch gibt es insgesamt weniger Zellen und es entsteht kein ausreichender Kontrast. Die zu transfizierenden Zellen sind jedoch gesund gewachsen und weisen eine ausreichende Konfluenz auf.

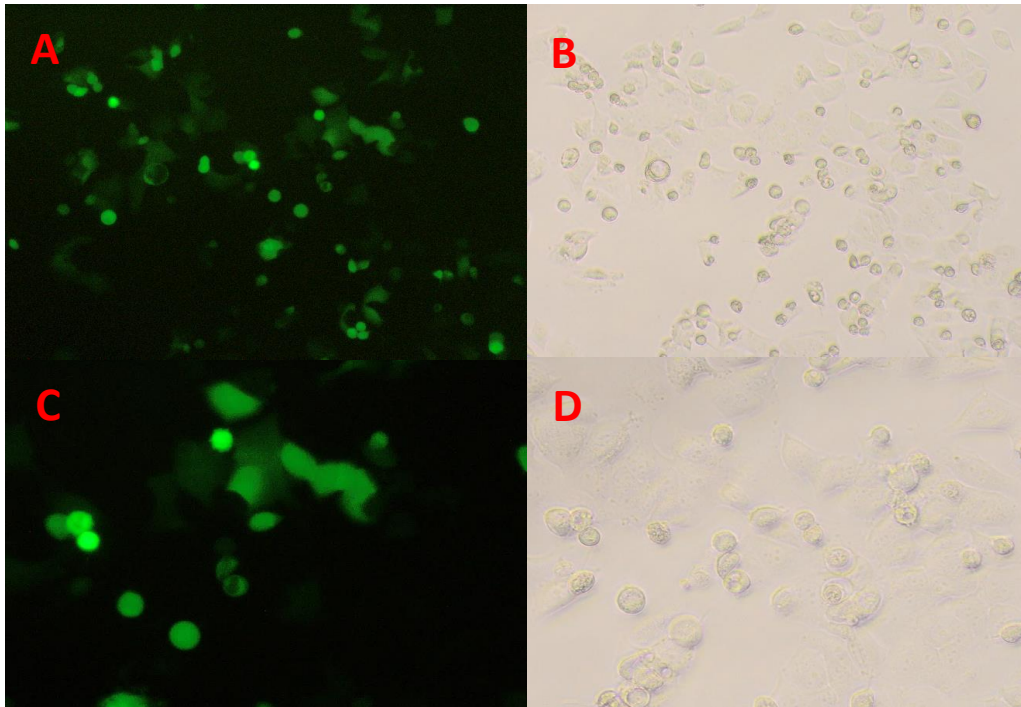


Abbildung 17: Überprüfung des Transfektionserfolges bei der Tumorzelllinie MCF7 in einer 96-Well-Platte (EGFP-Signal 24h nach Transfektion). A: 10X (mit Fluoreszenz), B: 10X (ohne Fluoreszenz), C: 20X (mit Fluoreszenz), D: 20X (ohne Fluoreszenz).

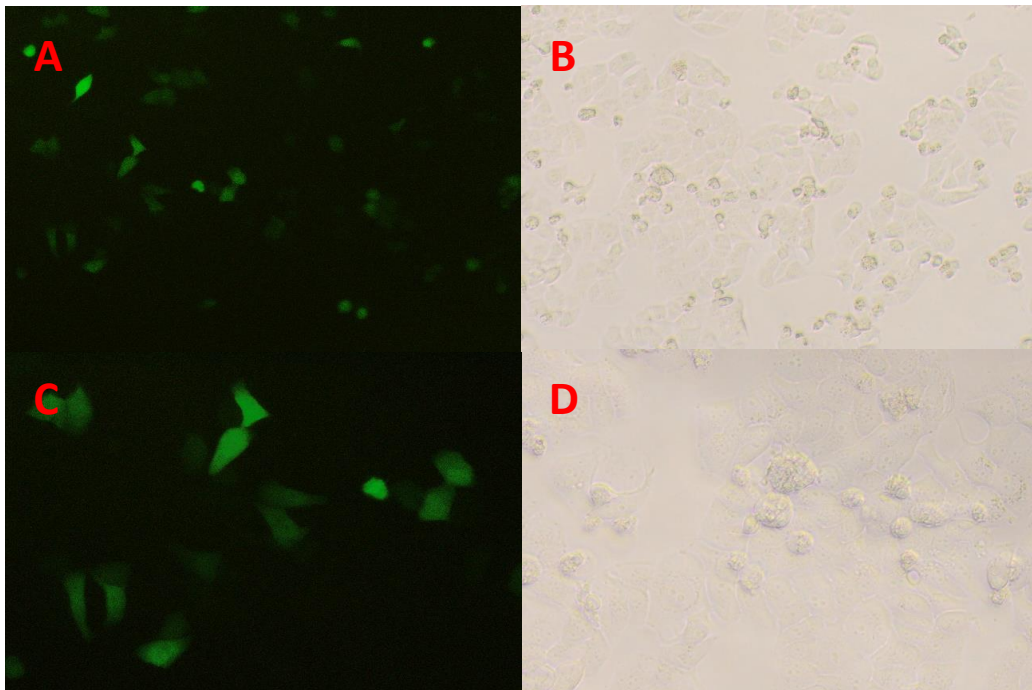


Abbildung 18: Überprüfung des Transfektionserfolges bei der Tumorzelllinie T47D in einer 96-Well-Platte (EGFP-Signal 24h nach Transfektion). A: 10X (mit Fluoreszenz), B: 10X (ohne Fluoreszenz), C: 20X (mit Fluoreszenz), D: 20X (ohne Fluoreszenz).

Die Viabilität der transfizierten Mammakarzinomzellen im MTT-Assay ist in den folgenden Graphen dargestellt. Verglichen wurden die EGFP- und IRF1-transfizierten Zellen sowohl untereinander als auch mit der jeweiligen nativen Tumorzelllinie MCF7 bzw. T47D (Abbildung 49 und 50). Dabei lässt sich anhand der Graphen erkennen, dass die Viabilität nahezu identisch ist und die Transfektionen somit keinen signifikanten Einfluss auf die Zelllebensfähigkeit hatten. Die transfizierte mRNA übt demzufolge keine offensichtlich toxische Wirkung auf die verwendeten Brustkrebszellen aus, was als eine wichtige Grundvoraussetzung für die im nächsten Abschnitt untersuchte chemotaktische Migration in der Boyden-Kammer anzusehen ist.

Wenn man die Viabilität der mit IRF1-mRNA transfizierten Zellen nur für sich genommen betrachtet, ist diese bei der T47D-Zelllinie leicht reduziert (0,96 bei T47D und 1,06 bei MCF7).

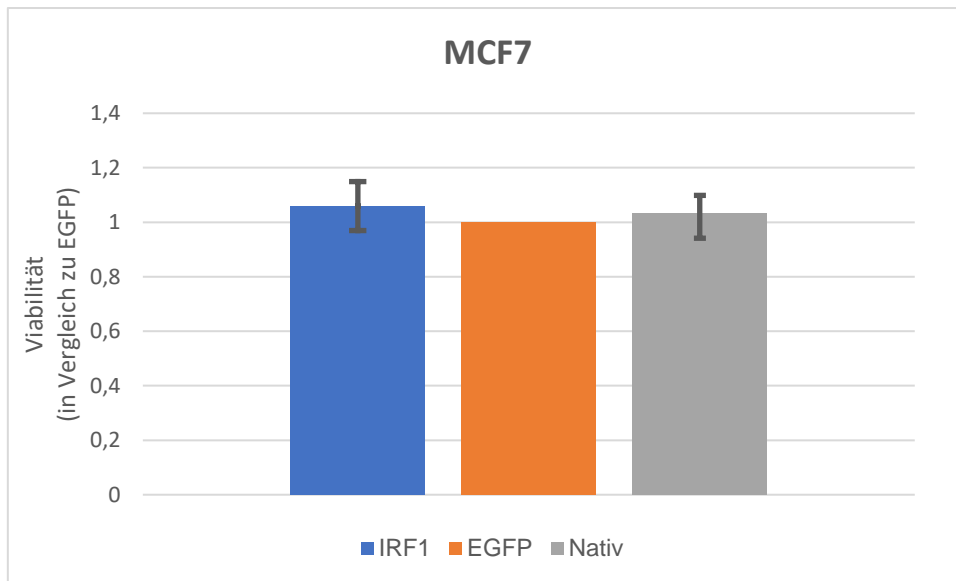


Abbildung 19: Zellviabilität der Tumorzelllinie MCF7. Die Viabilität der Zellen wurde in einem MTT-Assay ermittelt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die EGFP-transfizierten Zellen, sowie die Standardabweichungen.

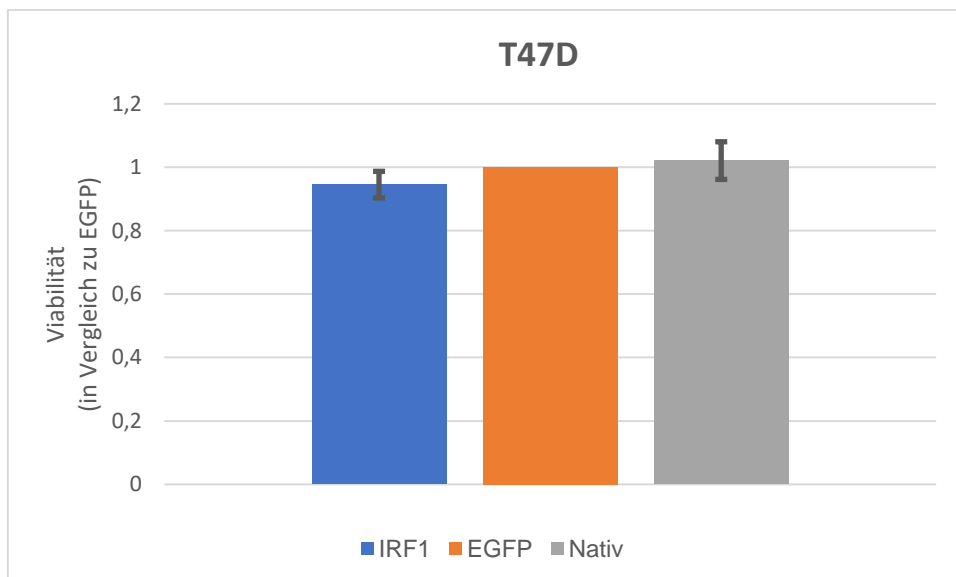


Abbildung 20: Zellviabilität der Tumorzelllinie T47D. Die Viabilität der Zellen wurde in einem MTT-Assay ermittelt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die EGFP-transfizierten Zellen, sowie die Standardabweichungen.

4.4 Chemotaktische Migration der EGFP- und IRF1-transfizierten Mammakarzinomzellen

Die Prognose des Mammakarzinoms verschlechtert sich beim Vorhandensein von Fernmetastasen drastisch. Die Metastasenbildung ist ein komplexer Vorgang und von vielen verschiedenen Einflussfaktoren abhängig. Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Identifizierung von Genen, deren Expression Einfluss auf diesen Prozess nehmen. Ein bedeutsames Gen hierbei ist *IRF1*, dessen physiologische Rolle bei der Brustkrebsentstehung und -dissemination in diesem Abschnitt näher untersucht wurde. Dafür wurde das chemotaktische Migrationspotential in Richtung des Extrazellular-Matrix-Komponenten Kollagen I in einer Boyden-Kammer für die IRF1-transfizierten Zellen der Tumorzelllinien MCF7 und T47D analysiert. Als Vergleich wurden native Zellen sowie EGFP-transfizierte Zellen mitgeführt.

4.4.1 Migration der Mammakarzinomzelllinie MCF7

Für die Migration wurden die Tumorzellen in einer T25-Zellkulturflasche kultiviert. Für IRF1 sowie für EGFP wurden insgesamt $1,4 \times 10^6$ Zellen in die T25-Flasche gegeben, während für die nicht zu transfizierenden Zellen (nativ) nur 1×10^6 eingesetzt wurden. Nach 24h wurde die Transfektion mit 650 ng mRNA durchgeführt und anschließend via Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Nach dem Umstellen auf Hungermedium wurde mit der Zellmigration begonnen (siehe 3.2.7 Migration in der Boyden-Kammer).

Abbildung 51 stellt die Mikroskopie-Aufnahmen nach EGFP-mRNA Transfektion in einer T25-Zellkulturflasche dar. Das vorhandene Fluoreszenzsignal diente hierbei als Kontrolle, um vor dem Beginn der Migration in der Boyden-Kammer die erfolgreiche Transfektion zu bestätigen.

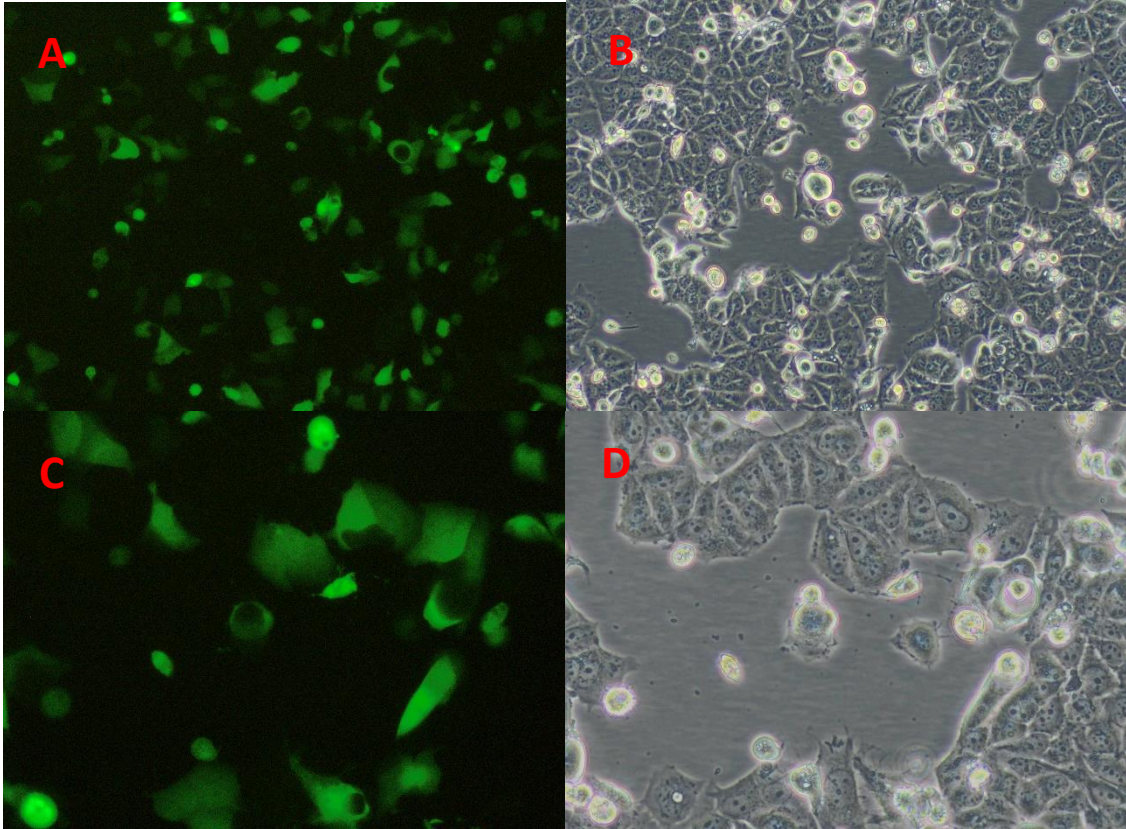


Abbildung 21: Überprüfung des Transfektionserfolges bei der Tumorzelllinie MCF7 in einer T25-Zellkulturflasche (EGFP-Signal 24h nach Transfektion). A: 10X (mit Fluoreszenz), B: 10X (ohne Fluoreszenz), C: 20X (mit Fluoreszenz), D: 20X (ohne Fluoreszenz).

Für die anschließende Zellmigration wurden 3×10^4 Zellen/Well und 25 μ l Kollagen I eingesetzt. Die MCF7-Zelllinie migriert generell inhomogen, da sie zu Agglomerationen neigt, weshalb hier bei allen Migrationen die dichten Areale ausgezählt wurden.

In der folgenden Abbildung ist deutlich das unterschiedliche Migrationspotential sowohl der transfizierten Zellen untereinander als auch verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe zu erkennen. Während man bei IRF1 maximal 12 Zellen/Quadrat zählt (Abbildung 52; D), sind es bei EGFP circa 19 Zellen/Quadrat (Abbildung 52; E) und bei den nativen Zellen 78/Quadrat (Abbildung 52; F). Diese Verteilung der migrierten Zellen entspricht in etwa der des darunter abgebildeten Graphen (Abbildung 53).

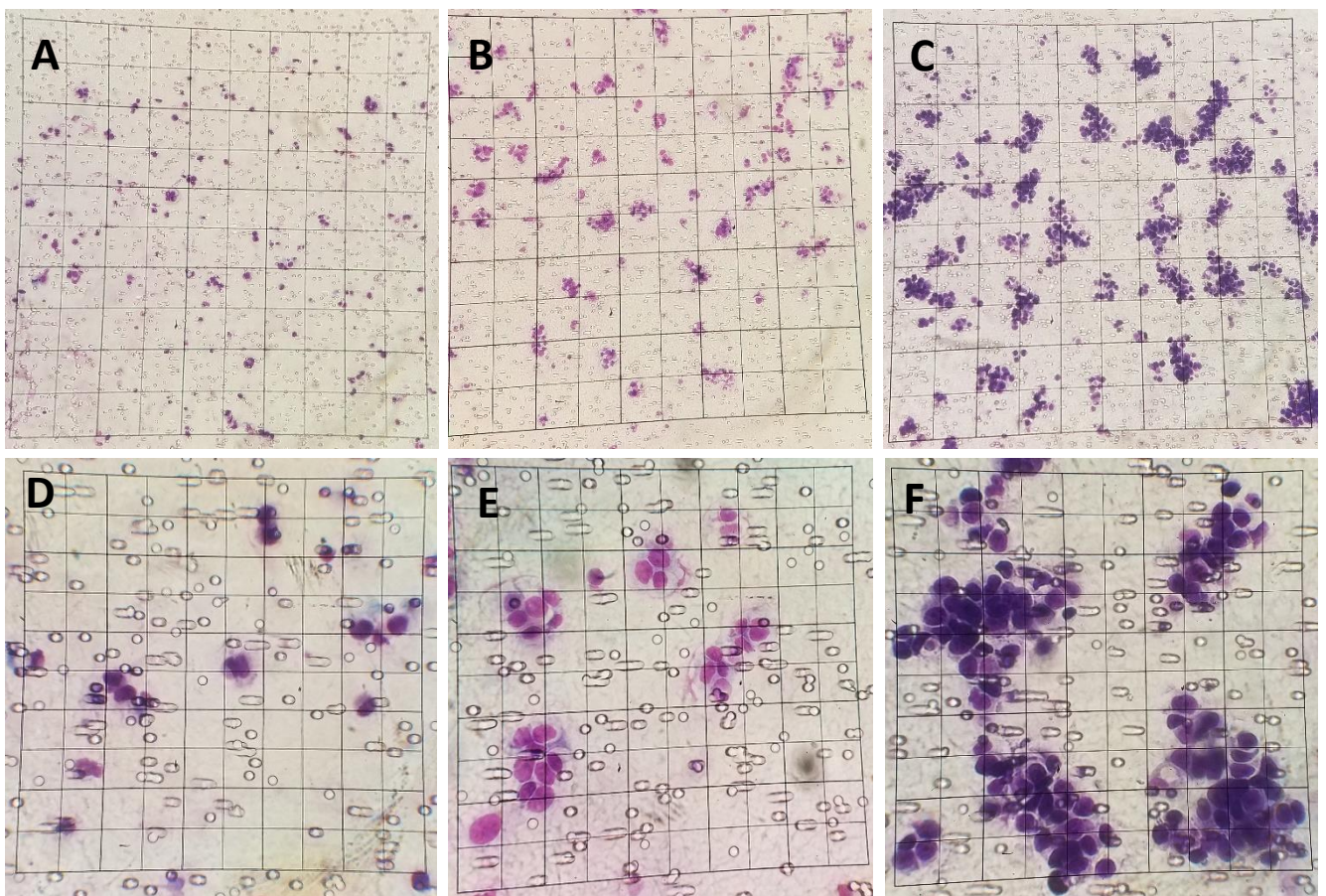


Abbildung 22: Lichtmikroskopie-Aufnahmen (mit Rasterokular) der Tumorzelllinie MCF7 nach Migration. A: nach IRF1-Transfektion (10X), B: nach EGFP-Transfektion (10X), C: native Zellen (10X), D: nach IRF1-Transfektion (40X), E: nach EGFP-Transfektion (40X), F: native Zellen (40X).

Die folgenden Graphen stellen die Ergebnisse der Migration von IRF1-transfizierten im Vergleich zu EGFP-transfizierten Zellen sowie zu der nativen untransfizierten Tumorzelllinie dar. Während in dem oberen Graphen alle drei abgebildet sind (Abbildung 53), sind danach zur besseren Veranschaulichung nur die transfizierten Zellen gezeigt (Abbildung 54).

Man erkennt offensichtlich, wie stark eine Transfektion das Migrationspotential der Mammakarzinomzellen beeinflusst. Im prozentualen Vergleich zu den EGFP-transfizierten Zellen liegt die Migration der nativen Kontrollgruppe bei 403% (Abbildung 53).

Für die Untersuchung der physiologischen Rolle von IRF1 bei der Migration wurde deshalb aufgrund der Ähnlichkeit der transfizierten mRNAs nur mit EGFP verglichen. Dabei kann eine signifikante Reduktion des Migrationspotentials auf 78% ($p=0,02$) festgestellt werden (Abbildung 54).

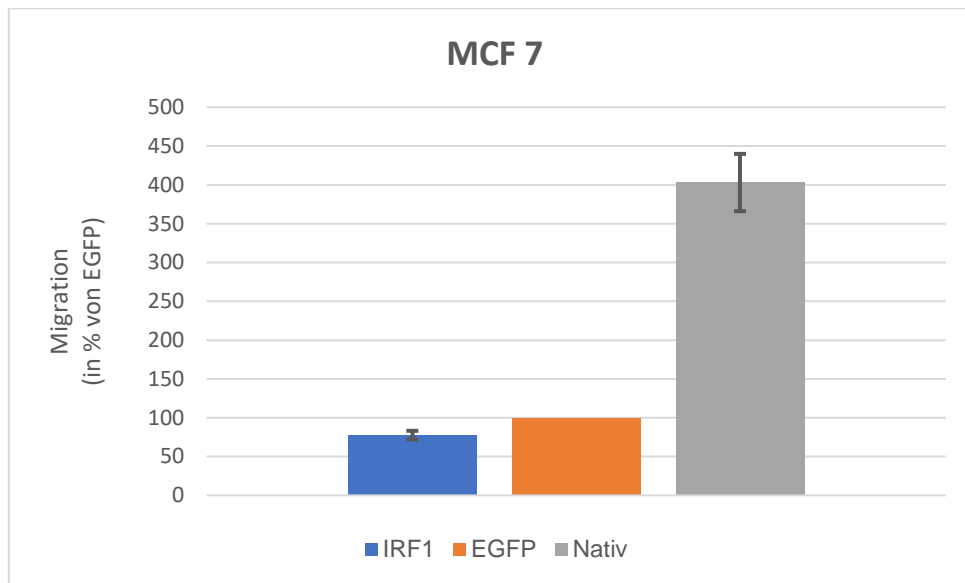


Abbildung 23: Migration der IRF1-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie MCF7. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16h in einer Boyden-Kammer ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die EGFP-transfizierten Zellen, sowie die Standardabweichungen. Die nativen Zellen wurden zur Veranschaulichung mit dargestellt.

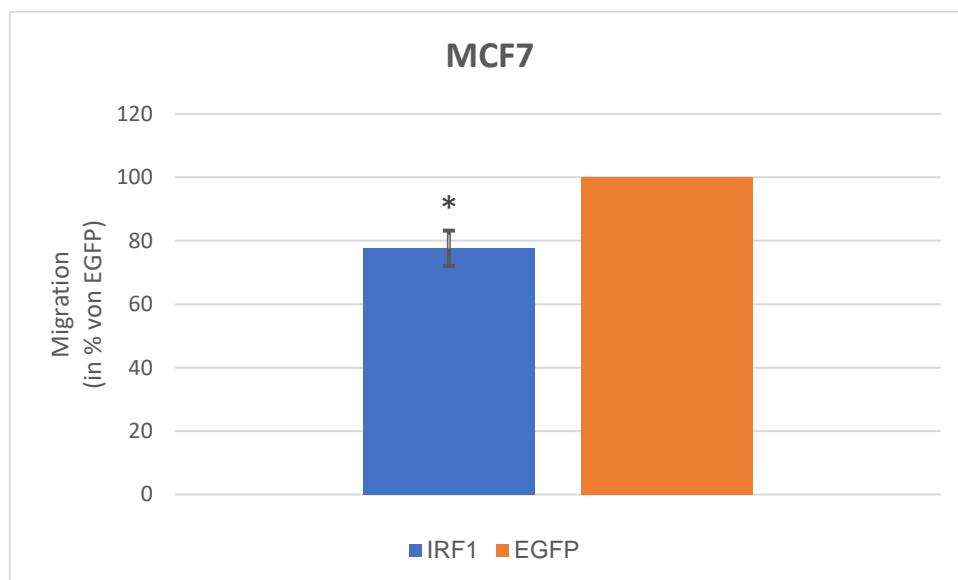


Abbildung 24: Migration der IRF1-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie MCF7. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16h in einer Boyden-Kammer ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die EGFP-transfizierten Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert <0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die EGFP-transfizierten Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.4.2 Migration der Mammakarzinomzelllinie T47D

Für die Zellkultivierung wurde wieder eine T25-Flasche verwendet. Sowohl für IRF1 als auch für EGFP wurden $1,3 \times 10^6$ Zellen ausplattiert, während für die nativen untransfizierten Zellen nur 9×10^5 eingesetzt wurden. Für die Transfektion wurden insgesamt 1950 ng mRNA verwendet. Die weiteren Schritte wurden analog zu 4.4.1 durchgeführt. Nach Kontrolle der erfolgreichen Transfektion (Abbildung 55) wurde mit der Zellmigration in der Boyden-Kammer begonnen.

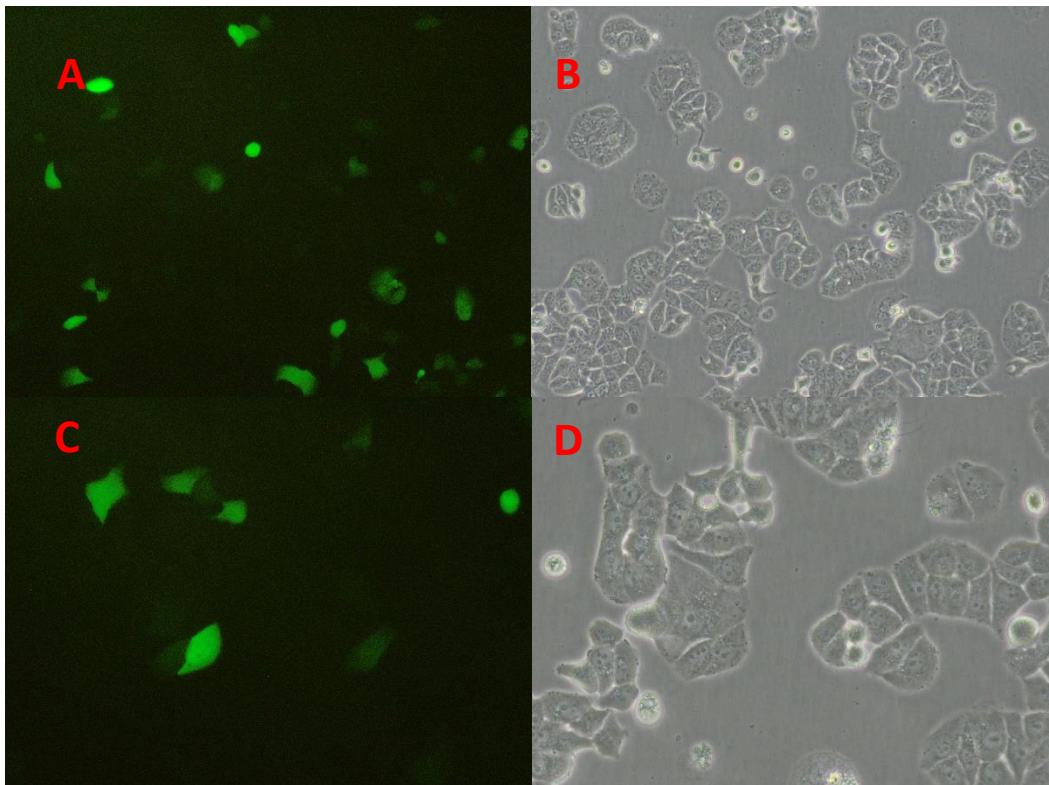


Abbildung 25: Überprüfung des Transfektionserfolges bei der Tumorzelllinie T47D in einer T25-Zellkulturflasche (EGFP-Signal 24h nach Transfektion). A: 10X (mit Fluoreszenz), B: 10X (ohne Fluoreszenz), C: 20X (mit Fluoreszenz), D: 20X (ohne Fluoreszenz)

Für die Migration wurden insgesamt $3,5 \times 10^4$ Zellen pro Well und $35 \mu\text{l}$ Kollagen I eingesetzt. Da die Tumorzelllinie T47D mit Hungermedium nur gering migriert, wurde für eine bessere Versuchsdurchführung 0,5% an FCS hinzugegeben.

In der folgenden Abbildung lässt sich ein ähnliches Migrationspotential der IRF1- und EGFP-transfizierten Zellen erkennen. Während man für IRF1 9 Zellen/Quadrat zählt (Abbildung 56; A), sind es für EGFP 11 Zellen/Quadrat (Abbildung 56; B). Bei der untransfizierten Kontrollgruppe sind es 30 Zellen/Quadrat (Abbildung 56; C).

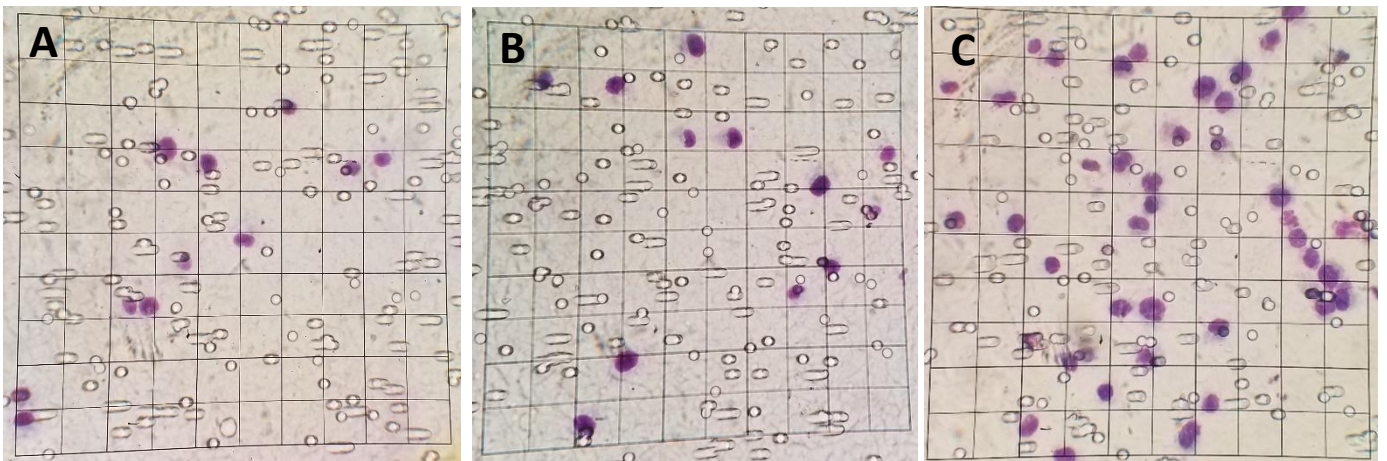


Abbildung 26: Lichtmikroskop-Aufnahmen (mit Rasterokular) der Tumorzelllinie T47D nach Migration. A: nach IRF1-Transfektion (10X), B: nach EGFP-Transfektion (10X), C: native Zellen (10X)

Anhand des Graphen lässt sich erkennen, dass die Tumorzelllinie T47D nach IRF1-Transfektion eine leichte Reduktion der Migration auf 91% (Abbildung 57) erfährt, verglichen mit den EGFP-transfizierten Zellen.

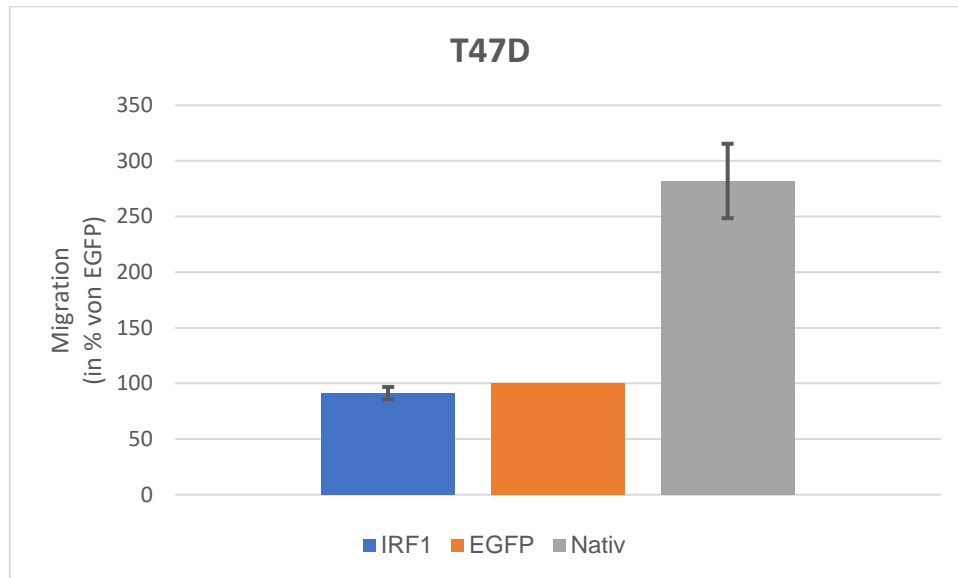


Abbildung 27: Migration der IRF-1-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie T47D. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16h in einer Boyden-Kammer ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die EGFP-transfizierten Zellen, sowie die Standardabweichungen. Die nativen Zellen wurden zur Veranschaulichung mitgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IRF1 (im Vergleich zu EGFP) bei der Mammakarzinomzelllinie MCF7 zu einer signifikanten Reduktion der Migration führt (78%, $p=0,02$), während bei T47D nur ein leicht reduziertes Migrationspotential zu beobachten ist (91%).

Wenn man die native Kontrollgruppe als Vergleich heranzieht, lässt sich bei beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der Migrationsfreudigkeit aufgrund der Behandlung der Zellen durch die Transfektion erkennen.

5 Diskussion

5.1 Transfektion von messenger-RNA

Überall in unserem Körper finden sich Proteine, welche den Zellen als molekulare *tools* für die unterschiedlichsten Funktionen dienen. Je nach Struktur ermöglichen sie unter anderem die Zellmigration, transportieren Metabolite, pumpen Ionen, katalysieren chemische Reaktionen, erkennen Botenstoffe oder leiten Signale weiter. Proteine sind daher ein beliebtes Ziel für Therapieansätze.

Techniken, welche die Proteinexpression mithilfe von exogen in die Zelle eingebrachten Substanzen beeinflussen, sind daher für Forschung und Medizin unverzichtbar. Die bisher gängigste Methode zur exogenen Proteinexpression beruhte auf DNA-basierten viralen oder nicht-viralen Vektoren [81]. Allerdings existiert bei DNA-basierten Vektoren die Möglichkeit, dass diese sich in das Genom der Wirtszelle integrieren und permanente Mutationen verursachen [82].

Eine neue Klasse von Therapeutika stellen mRNA-basierte Pharmazeutika dar, welche zunehmend medizinische Anwendungen finden [83, 84]. Messenger-RNA kann zur Kodierung funktioneller Peptide verwendet werden, wodurch zum Beispiel *in vivo* tumorassoziierte Antigene für die Krebsimmuntherapie oder Antigene für die Impfung gegen Infektionskrankheiten hergestellt werden können. Ihre Limitation liegt in der Instabilität, dem schnellen Abbau durch Ribonukleasen sowie der geringen zellulären Aufnahme [85,86]. Eine große Herausforderung stellt daher die Entwicklung geeigneter Trägersysteme dar, um die Aufnahme von mRNA zu erhöhen und sie für Patienten anwendbar zu machen [87]. Während die meisten Ansätze zum RNA-Transport auf Nanopartikeln basieren, die entweder kationische Lipide oder Polymere zur Komplexierung und Kondensation der RNA enthalten [88], verwendeten Siewert et al. hybride Nanopartikel, welche aus lipidischen und polymeren Komponenten zusammengesetzt waren, was zu einer verbesserten Transfektionseffizienz für mRNA führte [89]. Für viele Anwendungen sind jedoch weiterhin verbesserte, maßgeschneiderte Vehikel erforderlich, um die spezifischen Bedürfnisse für den RNA-Transport hin zu einem bestimmten Zelltyp oder für eine gezielte therapeutische Intervention zu erfüllen, und somit Gegenstand der aktuellen Forschung.

Bei der Suche nach Genen, deren Expression Einfluss auf die Tumorgenese und Metastasierung von Mammakarzinomen nimmt, wurde IRF1 in einer Vielzahl von Studien als Tumorsuppressor identifiziert und ist bei vielen Brustkrebszellen herunterreguliert [34, 35, 36]. Die verminderte *IRF1*-Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit bei den Zelllinien MCF7, T47D und BT549 mittels qRT-PCR bestätigt. Aus dieser Beobachtung resultierte die Frage,

wie sich die (im Vergleich zum normalen Brustepithelgewebe) fehlende bzw. reduzierte Expression von IRF1 auf die Physiologie der oben erwähnten Zellen auswirkt.

Die beiden von Jessica Behnke im Rahmen ihrer Masterarbeit hergestellten Plasmidvektoren pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP und pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1 wurden durch *in-vitro*-Transkription in mRNA umgeschrieben und anschließend in die Mammakarzinomzellen transfiziert. Dafür musste zunächst ein Protokoll etabliert werden, um eine Transfektion von IRF1 in die Tumorzellen zu ermöglichen. Da nur die erfolgreiche Transfektion von EGFP-mRNA mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden kann und aufgrund der Ähnlichkeit der hergestellten Plasmidvektoren auch eine Vergleichbarkeit der daraus synthetisierten mRNAs angenommen werden konnte, wurde die zu transfizierende Menge an mRNA anhand von EGFP definiert und dann für die weiteren Versuche auf IRF1 übertragen. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche hat dies gut funktioniert. Eine Methode zur genaueren Überprüfung des Transfektionserfolges bzw. des aus der translatierten mRNA hergestellten Proteins wäre jedoch die Untersuchung mittels Western Blot. Damit könnte man IRF1 auch direkt nachweisen und nicht nur indirekt über das vorhandene Fluoreszenzsignal des vergleichbaren EGFP-Proteins.

Als Transfektionsreagenz wurde *Lipofectamine Messenger Max* der Firma Invitrogen verwendet, welches auf Nanopartikeln basiert, die kationische Lipide zum RNA-Transport enthalten. *Lipofectamine* besteht aus einem 3:1-Gemisch von DOSPA (2,3-Dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propaniminiumtrifluoracetat) und DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin), das mit den negativ geladenen Nukleinsäuremolekülen einen Komplex bildet und ihnen somit dabei hilft, die elektrostatische Abstoßung der Zellmembran zu überwinden. Die kationischen Lipidmoleküle von *Lipofectamine* enthalten ein neutrales Co-Lipid (Helferlipid). Das neutrale Co-Lipid vermittelt die Fusion mit der Zellmembran wodurch die mRNA-haltigen Liposomen (an der Oberfläche positiv geladen) mit der negativ geladenen Plasmamembran lebender Zellen fusionieren können. Die mit Nukleinsäure beladenen Moleküle gelangen ins Zytoplasma und werden dort translatiert [90].

Entscheidend für eine gelungene Transfektion ist neben der Anpassung der Lipofectamin-Menge nach Herstellerprotokoll vor allem das Verwenden der richtigen Menge an mRNA. Die Menge an mRNA muss einerseits groß genug sein, damit die Zelle das gewünschte Protein in ausreichendem Ausmaß synthetisiert und damit die beabsichtigte Reaktion der Zellen *in vitro*, sowie im übertragenen Sinne im menschlichen Körper *in vivo*, ausgelöst wird. Andererseits wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, dass die transfizierte mRNA Entzündungsreaktionen in den Zellen einleitet und diese dementsprechend bei zu hohen mRNA-Mengen sterben. Ähnliche Beobachtungen machten Moradian et al. in ihrer Studie [91].

Sie untersuchten die mRNA-Transfektion von Monozyten und Makrophagen in einer 24-Well-Platte und stellten fest, dass bei Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien die Lebensfähigkeit der Zellen mit steigender mRNA-Konzentration abnimmt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Zellen vor der Transfektion gesund sein müssen und eine ausreichende Konfluenz von 70 bis 90 Prozent aufweisen (*Lipofectamine Messenger Max Transfection Protocol*).

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Faktoren hat die Transfektion sehr gut funktioniert. Bei allen drei Tumorzelllinien war die Proteinexpression analog zur verwendeten Positivkontrolle am ersten Tag am stärksten und nahm im Laufe der Woche kontinuierlich ab, war jedoch auch am fünften Tag noch vorhanden. Das mittels Translation der mRNA hergestellte Protein weist somit entweder selbst eine gute Stabilität auf oder es wird stetig nachproduziert und kann seine von ihm geforderten Funktionen in der Zelle adäquat erfüllen. Dafür ist auch entscheidend, dass die transfizierte mRNA gut toleriert wird und keinen offensichtlich toxischen Einfluss auf die Physiologie der Zellen hat, was man daran erkennt, dass diese auch am fünften Tag noch eine ausreichende Konfluenz aufweisen und nicht aufgrund der Transfektion gestorben sind.

Einen weiteren Beweis für die gelungene Transfektion sowie für die geringe Toxizität der verwendeten mRNA in der ermittelten Dosierung liefert der MTT-Zellviabilitätsassay, welcher mit den Mammakarzinomzelllinien MCF7 und T47D durchgeführt wurde. Die Viabilität der EGFP- und IRF1-transfizierten Zellen sowohl untereinander als auch verglichen mit der jeweiligen nativen Tumorzelllinie ist dabei nahezu identisch. Die Tumorzellen haben also trotz Transfektion nicht an Viabilität einbüßen müssen und das exprimierte Protein scheint adäquat zu funktionieren, ohne einen Schaden in der Zelle zu verursachen.

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Transfektionsprotokoll für IRF1-mRNA (sowie für EGFP-mRNA als Vergleich) funktioniert somit gut und kann für weitere Experimente mit Brustkrebszellen verwendet werden.

5.2 Bedeutung von IRF1 für die Migration von Mammakarzinomzellen

Die *Hallmarks of Cancer* umfassen zehn biologische Fähigkeiten, die während der mehrstufigen Entwicklung maligner Tumoren erworben werden (Abbildung 58). Sie stellen ein Organisationsprinzip dar, um die Komplexität von neoplastischen Erkrankungen zu erklären. Die Tumorzellen können demnach ihre proliferative Signalübertragung aufrechterhalten, Wachstums suppressoren umgehen, Apoptose inhibieren, sich unendlich teilen, Angiogenese

induzieren, in benachbartes Gewebe eindringen und in entfernte Organe streuen, den Energiestoffwechsel programmieren und dem Immunsystem ausweichen. Begünstigt wird der Erwerb dieser Merkmale durch genomische Instabilität, welche eine genetische Vielfalt erzeugt sowie durch tumorfördernde Entzündungen [67].

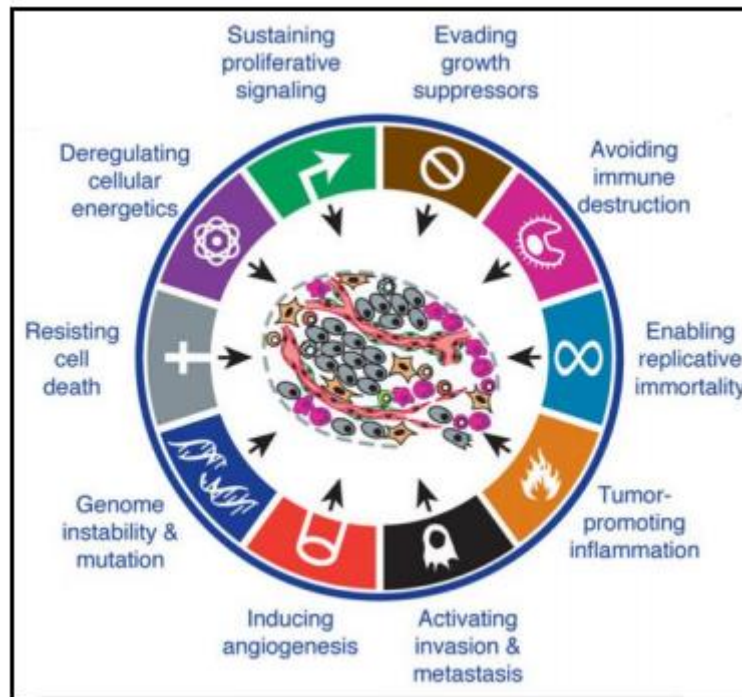


Abbildung 28: The Hallmarks of Cancer. Die Abbildung zeigt die von Hanahan et al. definierten charakteristischen Eigenschaften, die einen Tumor ausmachen [67].

Den notwendigen Prozess der morphologischen Alteration für die lokale und systemische Ausbreitung von Tumorzellen bezeichnet man als Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [67]. Dabei erlangen epitheliale Zellen die Eigenschaften von Mesenchymzellen, durch die Herabregulation von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Catherin entsteht ein Verlust der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion und die Zellen wandern in das umgebende Stroma ein. Außerdem wandern sie über die Invasion von Blut- und Lymphgefäßen zu anderen Lokalisationen und bilden dort Metastasen [70].

Das Vorhandensein von Fernmetastasen bei Diagnosestellung verschlechtert die Prognose des Mammakarzinoms erheblich. Gegenstand aktueller Forschung ist unter anderem das Gen IRF1, dessen Expression bedeutsamen Einfluss auf die Brustkrebsentstehung und -dissemination nimmt.

IRF1 hat eine bemerkenswerte funktionelle Vielfalt und kontrolliert die Transkription von Genen, die an der Vermittlung von antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekten beteiligt sind [47]. Zu den Prozessen, die der IRF1-Aktivierung nachgeschaltet sind, gehören Veränderungen in der Expression von MHC-Klasse-I-Proteinen sowie Einflussnahme auf die Entwicklung von T-Zellen und deren Differenzierung, von natürlichen Killerzellen (NK) und die Induktion von Interleukin 12 [49]. Des Weiteren ist es an der Regulierung des Zellzyklus sowie der DNA-Schadensreparatur beteiligt [53] und kann Zellen mittels Aktivierung von Caspasen zur Apoptose zwingen [54]. Die antiproliferative Wirkung von IRF1 wird hauptsächlich durch die Induktion bestimmter Zielgene wie STAT1 im JAK-STAT-Signalweg, die das Zellwachstum herunterregulieren, vermittelt [47] (s. Abschnitt 2.2.4).

Zur genaueren Untersuchung der Rolle von IRF1 im Rahmen des Metastasierungsprozesses wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* das chemotaktische Migrationspotential der beiden Mammakarzinomzelllinien MCF7 und T47D in Richtung des Extrazellulär-Matrix-Komponenten Kollagen I in einer Boyden-Kammer untersucht. Hierfür wurden IRF1- und EGFP-transfizierte Zellen sowie eine native Kontrollgruppe verwendet. Da IRF1 als Tumorsuppressorgen identifiziert wurde, welches in den verwendeten Zellen herunterreguliert war, müsste infolgedessen eine Expressionssteigerung (Angleichen des Expressionsniveaus an das einer normalen Brustepithelzelle) zu einer Reduktion der Migrations- bzw. Metastasierungsfreudigkeit führen. Während bei T47D nur eine leicht reduzierte Migration zu beobachten war (91% im Vergleich zu EGFP), führte die IRF1-Transfektion bei der Tumorzelllinie MCF7 zu einer signifikanten Reduktion der Migration (78% verglichen mit EGFP) (s. Abschnitt 4.4).

Wenn man nun der Frage auf den Grund geht, was eine Zelle zur Metastasierung befähigt, stellt die Herabregulation von IRF1 bei der Mammakarzinomzelllinie MCF7 einen entscheidenden Prozess dar. Die Expression von IRF1 reflektiert somit möglicherweise einen bestimmten Status der Zelle: je nach Stärke der Expression werden die Signalwege, die der IRF1-Aktivierung nachgeschaltet sind (Veränderungen in der Expression des MHC-Klasse-I-Komplexes, Einflussnahme auf die Entwicklung von Immunzellen, Induktion bestimmter Zielgene in der JAK-STAT-Signalkaskade, Aktivierung von Caspasen) unterschiedlich beeinflusst und es kommt zur Tumorbildung bzw. Metastasierung oder eben nicht.

Bei der Tumorzelllinie T47D hingegen führt die Expressionssteigerung von IRF1 nur zu einer leichten Reduktion des Migrationspotentials. Dies könnte an den unterschiedlichen molekularen Eigenschaften der verwendeten Tumorzelllinien liegen. Obwohl beide Zelllinien den Luminal-A-Subtyp (ER/PR positiv) von Brustkrebs repräsentieren [92] und Herkunft sowie Tumortyp identisch sind (Tabelle 11), zeigten Aka et al. in ihren Studien, dass mehr als 164 Proteine unterschiedlich exprimiert wurden (Tabelle 12 und 13, Anhang). Proteine (wie G1/S-

spezifisches Cyclin-D3 und Prohibitin), die an der Stimulation des Zellwachstums, an Anti-Apoptose-Mechanismen und an der Krebsentstehung beteiligt sind, waren in T47D stärker exprimiert. Zudem erhöht waren die Biomarker Cathepsin B und D, Hitzeschockprotein 70-1 (HSP70.1) und das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) [92]. Indessen waren bei der Zelllinie MCF7 Proteine, die die Transkriptionsrepression und Apoptoseregulation beeinflussen (wie der Transkriptionsrepressor NF-X1, das Nitrilase-Homolog 2 und Interleukin-10) sowie der Biomarker Protein S100-A14 verstärkt exprimiert [93].

In weiteren Studien beobachteten Yu et al., dass die ER α -, PR- und P300-Bindung an regulatorische Elemente unterschiedliche genomische Landschaften zwischen MCF7- und T47D-Zelllinien in den gleichen hormonellen Zuständen zeigte. Insbesondere war die T47D-Zelllinie deutlich empfindlich gegenüber Progesteron, während die MCF7-Zelllinie in Gegenwart von Östrogen nicht auf Progesteron reagierte [94].

Ein außerdem relevanter Unterschied zwischen den beiden verwendeten Zelllinien ist der p53-Mutationsstatus, während MCF7 den p53-Wildtyp exprimiert, besitzt T47D die mutierte Form (Tabelle 11) [92]. Das p53-Protein ist ein Tumorsuppressor, welcher bei DNA-Schäden in der Zelle akkumuliert und die Expression von Genen, die an der DNA-Reparatur und Regulierung der Apoptose beteiligt sind, induziert. TP53-Mutationen sind bei über der Hälfte aller Krebserkrankungen nachweisbar. Dadurch sind genetisch entartete, potenziell maligne Zellen nicht mehr in der Lage in den apoptotischen Zelltod einzutreten, um sich selbst zu zerstören. Sie können ungehemmt proliferieren und im schlimmsten Fall auch metastasieren [95].

Während eine Expressionssteigerung von IRF1 in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 zu einer Reduktion der Migration *in vitro* führte, wurde bei der T47D-Zelllinie kein signifikanter Einfluss festgestellt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass in MCF7 bei intaktem p53 IRF1 die Schlüsselrolle bei der Migration spielt, während bei T47D die p53-Mutation der entscheidendere Faktor der Tumorgenese ist.

Tabelle 11: Herkunft sowie klinische und pathologische Merkmale der Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D [91].

Zelllinie	Gen-Cluster	ER	PR	HER2	p53	Herkunft	Tumortyp	Alter
MCF7	Lu	+	+	-	+/- ^{WT}	PE	IDC	69
T47D	Lu	+	+	-	++ ^M	PE	IDC	54

Die zwei dargestellten Zelllinien MCF7 und T47D wurden mittels Array-CGH auf ER/PR-Positivität, HER2-Überexpression sowie den p53-Proteingehalt und -Mutationsstatus (^M mutiertes Protein, ^{WT} Wildtyp) untersucht. IDC: invasiv-duktales Karzinom, Lu: luminal; PE: Pleuraerguss

Zellmigration ist ein sehr komplexer Prozess, der die Aktivierung membrangebundener Rezeptoren für Chemotaxine, den Einbau von Membranvesikeln und die Verlängerung fibrillärer Proteine (Aktin) umfasst. Wo IRF1 bei der Zelllinie MCF7 hemmend eingreift, bzw. welche genauen Unterschiede in der Proteinexpression der beiden Zelllinien für das unterschiedliche Migrationsverhalten nach IRF1-Transfektion verantwortlich ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Ein zudem relevanter Aspekt bei der Beurteilung des Migrationspotentials der transfizierten Zellen in der Boyden-Kammer ist die Annahme, dass die IRF1- und EGFP-mRNAs vergleichbar sind. Dadurch werden die physiologischen Nebeneffekte einer Transfektion, wenn man sie in Bezug zur unbehandelten (nativen) Kontrollgruppe betrachtet, auf jeden Fall deutlich besser berücksichtigt. Die von Jessica Behnke zur Verfügung gestellten linearisierten Plasmidvektoren pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP und pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1 sind ähnlich konstruiert, dennoch weisen sie eben die unterschiedlichen Nukleotidsequenzen von EGFP und IRF1 auf. EGFP ist ein guter Vergleichspartner, um zu prüfen, ob die Transfektion an sich erfolgreich war. Eine bessere Kontrolle für die Migration wäre allerdings eine der IRF1-Sequenz in der Basenzusammensetzung entsprechende mRNA. Das könnte man z.B. erreichen, indem man direkt nach dem Startcodon ein Stoppcodon einbaut oder durch das Verwenden einer mRNA, in welcher die IRF1-Sequenz falsch herum orientiert und damit nicht funktional ist.

Um eine generalisierte Aussage über den Einfluss von IRF1 auf die Metastasierung von Mammakarzinomzellen zu formulieren, müsste die Migration weiterer Zelllinien unter Berücksichtigung ihrer spezifischen molekularen Eigenschaften untersucht werden. Außerdem sollten der Zellviabilitätsassay und die chemotaktische Migration in der Boyden-Kammer auch bei BT549 durchgeführt werden, diese Zelllinie stand aufgrund von Lieferschwierigkeiten für die vorliegende Arbeit nicht mehr zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit wäre, Zellen aus einer Brustreduktion zu nehmen (zum Beispiel MCF10A) und anschließend IRF1 mittels RNAi-vermitteltem Gen-Silencing auszuschalten und zu schauen, ob die Zellen dadurch eine erhöhte Migrationstendenz aufweisen.

In dem Versuchsaufbau wurde die Migration isolierter Tumorzellen *in vitro* untersucht, ohne die Berücksichtigung der Mikroumgebung des Tumors. In ihren Studien transfizierten Meyer-Schall et al. die murinen Brustkrebszelllinien Py2T und 4T1 mit gegen IRF1 gerichteter siRNA und führten anschließend eine Migration in der Boyden-Kammer durch. Die Zellen waren vorher über längere Zeit mit TGF β (wird von dem Tumormikromilieu sezerniert) behandelt worden. Hierbei wird eine kontextabhängige Doppelrolle von IRF1 bei dem Metastasierungsprozess beschrieben. Während es in Anwesenheit von TGF β die EMT fördert, hält es bei dessen Abwesenheit den epithelialen Differenzierungsstatus von

Brustdrüsenepithelzellen aufrecht und stabilisiert die Expression von E-Catherin, u.a. durch die Regulation der Lokalisierung und die Unterdrückung der Aktivität von Smad-Transkriptionsfaktoren [73]. Die beschriebenen Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, hier führte in Abwesenheit von TGF β die Expressionssteigerung von IRF1 bei der Mammakarzinomzelllinie T47D zu einer leichten und bei MCF7 zu einer signifikanten Reduktion der Migration. Interessant wäre folglich in weiteren Versuchen zu überprüfen, wie sich das Migrationspotential der transfizierten Zellen bei Zugabe des Wachstumsfaktors verändert.

5.3 Ausblick

IRF1 hat bei einer Vielzahl bösartiger Tumorerkrankungen, einschließlich des Mammakarzinoms, eine bemerkenswerte funktionelle Vielfalt und kontrolliert die Transkription von Genen, die an der Vermittlung von antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekten beteiligt sind [47]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass IRF1 einen relevanten Einfluss auf das Migrationsverhalten ausgewählter Mammakarzinomzelllinien *in vitro* zu haben scheint. Eine Expressionssteigerung von IRF1 mittels mRNA-Transfektion führt zu einer signifikanten Reduktion der Migration von MCF7 in der Boyden-Kammer. Wenn man es also *in vivo* schaffen würde, der Herabregulation von IRF1 bei an Brustkrebs erkrankten Patienten entgegenzuwirken, könnte man damit möglicherweise den Tumorprogress aufhalten und die Metastasierung verhindern.

Ein interessanter Versuchsansatz wäre auch, die verwendeten Mammakarzinomzelllinien *in vitro* mit verschiedenen Chemotherapeutika zu behandeln. Bei MCF7, T47D und BT549 wurde eine Herabregulation von IRF1 nachgewiesen, während bei der Brustepithelzelllinie MCF10A die IRF1-Expression nicht verändert ist. Idealerweise werden hauptsächlich sich schnell teilende Zellen von einer Chemotherapie zerstört, da sie u.a. nicht die Zeit zur DNA-Reparatur haben. Wie in dieser Arbeit beschrieben, reflektiert IRF1 möglicherweise einen bestimmten Status der Zellen, durch seine Herabregulation entstehen aggressive, schnell proliferierende Tumorzellen. Diese müssten somit empfänglicher für eine chemotherapeutische Behandlung sein als die gesunde Zelllinie MCF10A. Außerdem könnte man untersuchen, ob und wie sich das Migrationsverhalten unter Chemotherapie verändert, die Dosierung der verschiedenen Chemotherapeutika könnte eventuell mit der Aktivität von IRF1 korreliert werden.

Annähernd 70% der diagnostizierten Mammakarzinome sind Östrogenrezeptor-positiv. Häufig ist hierbei die endokrine Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen aufgrund von Resistenzen gegenüber dem Wirkstoff begrenzt [59]. Es ist bekannt, dass die Expression von IRF1 in

endokrin-resistenten Brustkrebszellen herunterreguliert ist und somit diese Zellen vor der IRF1-induzierten Hemmung der Proliferation und/oder der Induktion des Zelltods schützt [33].

Bereits vor über 20 Jahren wurde die Fähigkeit von Interferonen, Brustkrebszellen für Tamoxifen zu sensibilisieren, gezeigt. IFN α , IFN β und IFN γ wurden jeweils bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt, um entweder eine Antiöstrogenempfindlichkeit zu induzieren und/oder die zelluläre Immunität zu stimulieren [96]. Van den Berg et al. zeigten, dass die Kombination von IFN α und Tamoxifen eine größere antiproliferative Wirkung auf ZR-75-1 Brustkrebszellen hatte als jedes der beiden Medikamente allein [97]. IRF1 könnte als Angriffspunkt obiger Medikamente eine entscheidende Schlüsselrolle spielen, erstens wird es durch Zytokine wie u.a. IFN α , β und IFN γ aktiviert [44] und zweitens führt es über den JAK-STAT1-Signalweg zur Induktion bestimmter Zielgene (darunter auch Interferone), welche die überschießende Proliferation der Tumorzelle hemmen [55] (s. Abschnitt 2.2.4).

Ebenfalls bei Melanomzellen induziert eine Pegylierung (kovalente Bindung eines Polyethylenglykol-Moleküls an ein Protein) von IFN α die IRF1-vermittelte Signalübertragung und sensibilisiert die Zellen für Chemotherapie [98]. Pegyliertes IFN α wird derzeit in der Monotherapie und in Kombination mit Chemotherapie bei verschiedenen Krebsarten eingesetzt [99, 100]. Auch beim Mammakarzinom könnte die Wiederherstellung der IRF1-Expression sowie die Kontrolle seiner Modulation einen entscheidenden Vorteil zusätzlich zur herkömmlichen Chemotherapie bringen.

Interessante Erkenntnisse liefern auch Ergebnisse aus der Immunforschung. Lehtonen et al. haben in ihren Studien die Wirkung von IFN-alpha und IL12 (aus Makrophagen stammende Zytokine) auf die Expression von IRF-Transkriptionsfaktoren in menschlichen NK- und T-Zellen untersucht. Sie fanden eine starke Hochregulierung der mRNA- und Proteinexpression von IRF1, IRF4 und IRF8 vor, was darauf hindeutet, dass IFN-alpha und IL12 angeborene und Th1-Immunreaktionen durch Induktion der Genexpression ausgewählter IRFs verstärken können [101]. Es ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie an der Steuerung der Lymphozytendifferenzierung und -funktionen beteiligt sind. Eine verstärkte Immunreaktion könnte sich wiederum auf die Tumorgenese auswirken und zu einer Verlangsamung des Wachstums sowie zu einer geringeren Metastasierung führen.

Auf alle Fälle besteht weiterhin viel Forschungsbedarf bezüglich der molekularen Mechanismen, welche letztendlich die Entstehung und Ausbreitung von Brustkrebs verursachen. Ein klares Verständnis der IRF1-Aktivierung und seines Signalweges ist dabei unabdingbar, einerseits um die Entdeckung neuer Wirkstoffkandidaten voranzutreiben, andererseits um die IRF1-Expression als prognostischen Faktor bei Tumorerkrankungen der Mamma nutzen zu können.

6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist der häufigste Tumor der Frau in der westlichen Welt. Trotz fortschrittlicher Therapieoptionen endet die Erkrankung insbesondere beim Vorliegen von Fernmetastasen häufig tödlich. Zunehmend wird der Stellenwert genetischer Veränderungen bei der Tumorgenese und -progression deutlich, durch Mutationen können sowohl Onkogene aktiviert als auch Tumorsuppressorgene inaktiviert sein. In der vorliegenden Arbeit wurde das Tumorsuppressorgen IRF1 näher untersucht in Bezug auf seine Rolle in der Brustkrebsphysiologie. IRF1 hat eine bemerkenswerte funktionelle Vielfalt und kontrolliert die Transkription von Genen, die an der Vermittlung von antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekten beteiligt sind [47].

Zunächst wurde mittels qRT-PCR eine verringerte IRF1-Konzentration in den Mammakarzinomzelllinien MCF7, T47D und BT549 nachgewiesen und daraufhin ein Protokoll etabliert zur Transfektion von IRF1-mRNA (sowie EGFP-mRNA als Vergleich) in diese Tumorzelllinien. Synthetisiert wurde die verwendete mRNA mittels in-vitro-Transkription aus den linearisierten Plasmidvektoren pcDNA3-Hbb-UTR-IRF1 und pcDNA3-Hbb-UTR-EGFP. Anschließend wurde mit den transfizierten Zellen ein MTT-Zellviabilitätsassay durchgeführt und die chemotaktische Zellmigration in der Boyden-Kammer betrachtet, um zu untersuchen, wie eine Expressionssteigerung von IRF1 das Verhalten der Brustkrebszellen beeinflusst.

Die erfolgreiche Transfektion wurde anhand der EGFP-transfizierten Zellen durch Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Bei allen drei Tumorzelllinien war die Proteinexpression analog zur verwendeten Positivkontrolle am ersten Tag am stärksten und nahm im Laufe der Woche kontinuierlich ab, ähnlich verhielt sich die Zellkonfluenz. Das mittels Translation der mRNA hergestellte EGFP-Protein wies also einerseits eine gute Stabilität und Funktionalität auf und andererseits eine geringe Toxizität für die Zelle. In dem durchgeführten MTT-Test der Tumorzelllinien MCF7 und T47D zeigte sich eine annähernd identische Viabilität der EGFP- und IRF1-transfizierten Zellen sowohl untereinander als auch verglichen mit der jeweiligen nativen Kontrollgruppe.

Zur Untersuchung des Einflusses von IRF1 auf den Metastasierungsprozess wurde *in vitro* das chemotaktische Migrationspotential der verwendeten Zelllinien in Richtung des Extrazellular-Matrix-Komponenten Kollagen I in einer Boyden-Kammer untersucht. Da *IRF1* als Tumorsuppressorgen identifiziert wurde [6], welches in den verwendeten Zellen herunterreguliert war, müsste infolgedessen eine Expressionssteigerung (Angleichen des Expressionsniveaus an das einer normalen Brustepithelzelle) zu einer Reduktion der Migrations- bzw. Metastasierungsfreudigkeit führen. Während bei T47D nur eine leicht reduzierte Migration zu beobachten war (91% im Vergleich zu EGFP), führte die IRF1-

Transfektion bei der Tumorzelllinie MCF7 zu einer signifikanten Reduktion der Migration (78% verglichen mit EGFP).

Wenn man es in Zukunft schaffen würde, *in vivo* der Herabregulation von IRF1 bei an Brustkrebs erkrankten Patienten entgegenzuwirken, könnte man damit den Tumorprogress verlangsamen und möglicherweise die Metastasierungsaktivität der Zellen beeinflussen. Voraussetzung hierfür ist ein klares Verständnis der IRF1-Aktivierung und seines Signalweges.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Robert Koch-Institut (Hrsg) (2019) Zentrum für Krebsregisterdaten [Internet]. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html. Zugegriffen: 25. Mai 2021
- (2) Österreichische Gesellschaft für chirurgische Onkologie. Consensus-Bericht Mammakarzinom [Internet]. <https://www.aco-asso.at/publikationen/aco-asso-consensusberichte/consensus-bericht-mammakarzinom/5-stadieneinteilung-und-prognose-des-mammakarzinoms/>. Zugegriffen: 25. Mai 2021
- (3) Deutsches Ärzteblatt. Frühes Mammakarzinom: Exzellente Heilungsraten bei wenig aggressiver Therapie. 2015; 112(20): DOI: 10.3238/PersOnko.2015.05.15.04
- (4) Deutsche Krebsgesellschaft. Tumorbilogie: Charakterisierung des Brusttumors [Internet] <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/tumorbilogie.html>. Zugegriffen: 02.06.2021
- (5) Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. Cell. 1988 Sep 9;54(6):903-13. doi: 10.1016/s0092-8674(88)91307-4. PMID: 3409321.
- (6) National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: IRF1 interferon regulatory factor 1 [*Homo sapiens* (human)] [Internet] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3659>. Zugegriffen: 03.06.2021
- (7) Escalante CR, Yie J, Thanos D, Aggarwal AK. Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. Nature. 1998 Jan 1;391(6662):103-6. doi: 10.1038/34224. PMID: 9422515
- (8) Jessica Behnke (Masterthesis in der AG Prawitt): Development and characterization of an in vitro transcribed vector-based mRNA for transfection of eukaryotic cells. Mainz, 2021
- (9) Kreipe (Hrsg), Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Moch H. Pathologie. Urban & Fischer; 2012 (5. Auflage)
- (10) Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. Clin Obstet Gynecol. 2016 Dec;59(4):651-672. doi: 10.1097/GRF.000000000000239. PMID: 27681694.
- (11) Robert Koch-Institut (Hrsg) (2019) Krebs in Deutschland für 2015/2016 [Internet]. <https://edoc.rki.de/handle/176904/6012.2>. Zugegriffen: 25.Mai 2021
- (12) Amboss. Mammakarzinom [Internet]. https://next.amboss.com/de/article/_k05qT Zugegriffen: 25. Mai 2021
- (13) Lüllmann-Rauch R, Paulsen F Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme; 2012
- (14) Schmoll, Hans-Joachim, Höffken, Klaus, Possinger, Kurt (Hrsg.). Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie. Springer; 2006

- (15) Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG), Deutsche Krebsgesellschaft (DKG): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. [Internet]. Zugegriffen: 26. Mai 2021.
- (16) Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 [Internet]. <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3264/28oaKVmif0wDk.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Zugegriffen: 25. Mai 2021
- (17) Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993;15(1):36-47. doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036115. PMID: 8405211.
- (18) Fallone F, Deudon R, Muller C, Vaysse C. Cancer du sein, obésité et tissu adipeux - Un trio à haut risque [Breast cancer, obesity and adipose tissue: a high-risk combination]. *Med Sci (Paris)*. 2018 Dec;34(12):1079-1086. French. doi: 10.1051/medsci/2018298. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30623763.
- (19) Lee A, Moon BI, Kim TH. BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Ann Lab Med.* 2020 Mar;40(2):114-121. doi: 10.3343/alm.2020.40.2.114. PMID: 31650727; PMCID: PMC6822003.
- (20) Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003 May;72(5):1117-30. doi: 10.1086/375033. Epub 2003 Apr 3. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2003 Sep;73(3):709. PMID: 12677558; PMCID: PMC1180265.
- (21) Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol.* 2004 Feb 15;22(4):735-42. doi: 10.1200/JCO.2004.05.055. PMID: 14966099.
- (22) Veronesi P, Corso G. Standard and controversies in sentinel node in breast cancer patients. *Breast.* 2019 Nov;48 Suppl 1:S53-S56. doi: 10.1016/S0960-9776(19)31124-5. PMID: 31839161.
- (23) Lagendijk M, van Maaren MC, Saadatmand S, Strobbe LJA, Poortmans PMP, Koppert LB, Tilanus-Linthorst MMA, Siesling S. Breast conserving therapy and mastectomy revisited: Breast cancer-specific survival and the influence of prognostic factors in 129,692 patients. *Int J Cancer.* 2018 Jan 1;142(1):165-175. doi: 10.1002/ijc.31034. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28884470.
- (24) Deutsche Krebsgesellschaft. Brustkrebs: Therapieverfahren im Überblick [Internet] <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/therapie/brust-krebs-therapieverfahren-im-ueberblick.html> Zugegriffen: 02.06.2021
- (25) Castaneda SA, Strasser J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surg Oncol Clin N Am.* 2017 Jul;26(3):371-382. doi: 10.1016/j.soc.2017.01.013. Epub 2017 May 11. PMID: 28576177.
- (26) Schneeweiss, A., Huober, J., Jackisch, C. et al. 15. Internationale St.-Gallen-Konsensus-Konferenz: Behandlung des frühen Mammakarzinoms. *Onkologe* 23, 666–677 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00761-017-0248-0>
- (27) Hauner K, Maisch P, Retz M. Nebenwirkungen der Chemotherapie [Side effects of chemotherapy]. *Urologe A.* 2017 Apr;56(4):472-479. German. doi: 10.1007/s00120-017-0338-z. PMID: 28251254.

- (28) Goodman M. Managing the side effects of chemotherapy. *Semin Oncol Nurs.* 1989 May;5(2 Suppl 1):29-52. doi: 10.1016/0749-2081(89)90080-6. PMID: 2657931.
- (29) Deutsches Ärzteblatt. Fortgeschrittenes Triple-negatives Mammakarzinom: Immuntherapien in Prüfung. 2017; 114(24): [14]; DOI: 10.3238/PersOnko/2017.06.16.03
- (30) Runnebaum I.B., Kieback D.G., Friedmann T., Sukumar S., Kreienberg R. Mutationen des p53 Tumorsuppressor-Gens beim Mammakarzinom und Suppression des neoplastischen Phänotyps durch Wildtyp p53. In: Krebs D., Berg D. (eds) *Gynäkologie und Geburtshilfe* 1992. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-77857-5_305
- (31) de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, de Vries EG. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet.* 2002 Apr;39(4):225-42. doi: 10.1136/jmg.39.4.225. PMID: 11950848; PMCID: PMC1735082.
- (32) Kaur RP, Vasudeva K, Kumar R, Munshi A. Role of p53 Gene in Breast Cancer: Focus on Mutation Spectrum and Therapeutic Strategies. *Curr Pharm Des.* 2018;24(30):3566-3575. doi: 10.2174/1381612824666180926095709. PMID: 30255744.
- (33) Schwartz JL, Shajahan AN, Clarke R. The Role of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF1) in Overcoming Antiestrogen Resistance in the Treatment of Breast Cancer. *Int J Breast Cancer.* 2011;2011:912102. doi: 10.4061/2011/912102. Epub 2011 Jul 3. PMID: 22295238; PMCID: PMC3262563.
- (34) Bouker KB, Skaar TC, Riggins RB, Harburger DS, Fernandez DR, Zwart A, Wang A, Clarke R. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) exhibits tumor suppressor activities in breast cancer associated with caspase activation and induction of apoptosis. *Carcinogenesis.* 2005 Sep;26(9):1527-35. doi: 10.1093/carcin/bgi113. Epub 2005 May 5. PMID: 15878912.
- (35) Connett JM, Badri L, Giordano TJ, Connett WC, Doherty GM. Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 expression in breast cancer tissue microarrays. *J Interferon Cytokine Res.* 2005 Oct;25(10):587-94. doi: 10.1089/jir.2005.25.587. PMID: 16241857.
- (36) Doherty GM, Boucher L, Sorenson K, Lowney J. Interferon regulatory factor expression in human breast cancer. *Ann Surg.* 2001 May;233(5):623-9. doi: 10.1097/00000658-200105000-00005. PMID: 11323500; PMCID: PMC1421301.
- (37) Zhu Y, Singh B, Hewitt S, Liu A, Gomez B, Wang A, Clarke R. Expression patterns among interferon regulatory factor-1, human X-box binding protein-1, nuclear factor kappa B, nucleophosmin, estrogen receptor-alpha and progesterone receptor proteins in breast cancer tissue microarrays. *Int J Oncol.* 2006 Jan;28(1):67-76. PMID: 16327981.
- (38) Hoshiya Y, Gupta V, Kawakubo H, Brachtel E, Carey JL, Sasur L, Scott A, Donahoe PK, Maheswaran S. Mullerian inhibiting substance promotes interferon gamma-induced gene expression and apoptosis in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2003 Dec 19;278(51):51703-12. doi: 10.1074/jbc.M307626200. Epub 2003 Oct 7. PMID: 14532292.
- (39) Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML, Yamamoto H, Harada K, Meeker TC, List AF, et al. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science.* 1993 Feb 12;259(5097):968-71. doi: 10.1126/science.8438156. PMID: 8438156.
- (40) Ogasawara S, Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, Ishida K, Satoh N, Uesugi N, Saito K, Satodate R. Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma. *Gastroenterology.* 1996 Jan;110(1):52-7. doi: 10.1053/gast.1996.v110.pm8536888. PMID: 8536888.

- (41) Nozawa H, Oda E, Ueda S, Tamura G, Maesawa C, Muto T, Taniguchi T, Tanaka N. Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer. *Int J Cancer*. 1998 Aug 12;77(4):522-7. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980812)77:4<522::aid-ijc8>3.0.co;2-w. PMID: 9679752.
- (42) Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 Mar;21(3):177-84. PMID: 9523192.
- (43) Cavalli LR, Riggins RB, Wang A, Clarke R, Haddad BR. Frequent loss of heterozygosity at the interferon regulatory factor-1 gene locus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 May;121(1):227-31. doi: 10.1007/s10549-009-0509-8. Epub 2009 Aug 21. PMID: 19697121; PMCID: PMC2941871.
- (44) Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:535-84. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400. PMID: 18303999.
- (45) Harada H, Takahashi E, Itoh S, Harada K, Hori TA, Taniguchi T. Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol Cell Biol*. 1994 Feb;14(2):1500-9. doi: 10.1128/mcb.14.2.1500-1509.1994. PMID: 7507207; PMCID: PMC358505.
- (46) Küber, H., Dolff, S. JAK-STAT-Signalweg in der Pathogenese der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD). *Nephrologie* 15, 188–190 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11560-020-00427-5>
- (47) Nguyen H, Lin R, Hiscott J. Activation of multiple growth regulatory genes following inducible expression of IRF-1 or IRF/RelA fusion proteins. *Oncogene*. 1997 Sep 18;15(12):1425-35. doi: 10.1038/sj.onc.1201318. PMID: 9333018.
- (48) Beretta L, Gabbay M, Berger R, Hanash SM, Sonenberg N. Expression of the protein kinase PKR in modulated by IRF-1 and is reduced in 5q- associated leukemias. *Oncogene*. 1996 Apr 4;12(7):1593-6. PMID: 8622878.
- (49) Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci*. 2008 Mar;99(3):467-78. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00720.x. Epub 2008 Jan 9. PMID: 18190617.
- (50) Tanaka N, Ishihara M, Lamphier MS, Nozawa H, Matsuyama T, Mak TW, Aizawa S, Tokino T, Oren M, Taniguchi T. Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature*. 1996 Aug 29;382(6594):816-8. doi: 10.1038/382816a0. PMID: 8752276.
- (51) Namiki S, Nakamura T, Oshima S, Yamazaki M, Sekine Y, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS Lett*. 2005 May 23;579(13):2781-7. doi: 10.1016/j.febslet.2005.04.012. Epub 2005 Apr 20. PMID: 15907481.
- (52) Lee SH, Kim JW, Lee HW, Cho YS, Oh SH, Kim YJ, Jung CH, Zhang W, Lee JH. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) is a mediator for interferon-gamma induced attenuation of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression. *Oncogene*. 2003 Jan 23;22(3):381-91. doi: 10.1038/sj.onc.1206133. PMID: 12545159.
- (53) Tamura T, Ishihara M, Lamphier MS, Tanaka N, Oishi I, Aizawa S, Matsuyama T, Mak TW, Taki S, Taniguchi T. An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature*. 1995 Aug 17;376(6541):596-9. doi: 10.1038/376596a0. PMID: 7637809.
- (54) Tanaka N, Ishihara M, Kitagawa M, Harada H, Kimura T, Matsuyama T, Lamphier MS, Aizawa S, Mak TW, Taniguchi T. Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is

dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell*. 1994 Jun 17;77(6):829-39. doi: 10.1016/0092-8674(94)90132-5. PMID: 8004672.

(55) Alsamman K, El-Masry OS. Interferon regulatory factor 1 inactivation in human cancer. *Biosci Rep*. 2018 May 8;38(3):BSR20171672. doi: 10.1042/BSR20171672. PMID: 29599126; PMCID: PMC5938431.

(56) Pion E, Narayan V, Eckert M, Ball KL. Role of the IRF-1 enhancer domain in signalling polyubiquitination and degradation. *Cell Signal*. 2009 Oct;21(10):1479-87. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.05.004. Epub 2009 May 18. PMID: 19450680.

(57) Nakagawa K, Yokosawa H. Degradation of transcription factor IRF-1 by the ubiquitin-proteasome pathway. The C-terminal region governs the protein stability. *Eur J Biochem*. 2000 Mar;267(6):1680-6. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01163.x. PMID: 10712599.

(58) Clahsen PC, van de Velde CJ, Goldhirsch A, Rossbach J, Sertoli MR, Bijnen L, Sylvester RJ. Overview of randomized perioperative polychemotherapy trials in women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 1997 Jul;15(7):2526-35. doi: 10.1200/JCO.1997.15.7.2526. PMID: 9215821.

(59) Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2001 Mar;53(1):25-71. PMID: 11171938.

(60) Gu Z, Lee RY, Skaar TC, W KB, Welch JN, Lu J, Liu A, Zhu Y, Davis N, Leonessa F, Br nner N, Wang Y, Clarke R. Association of interferon regulatory factor-1, nucleophosmin, nuclear factor-kappaB, and cyclic AMP response element binding with acquired resistance to Faslodex (ICI 182,780). *Cancer Res*. 2002 Jun 15;62(12):3428-37. PMID: 12067985.

(61) Bouker KB, Skaar TC, Fernandez DR, O'Brien KA, Riggins RB, Cao D, Clarke R. Interferon regulatory factor-1 mediates the proapoptotic but not cell cycle arrest effects of the steroidal antiestrogen ICI 182,780 (faslodex, fulvestrant). *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):4030-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3602. PMID: 15173018.

(62) Bowie ML, Dietze EC, Delrow J, Bean GR, Troch MM, Marjoram RJ, Seewaldt VL. Interferon-regulatory factor-1 is critical for tamoxifen-mediated apoptosis in human mammary epithelial cells. *Oncogene*. 2004 Nov 18;23(54):8743-55. doi: 10.1038/sj.onc.1208120. PMID: 15467738.

(63) Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, Croce CM, Alnemri ES, Huang Z. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 20;97(13):7124-9. doi: 10.1073/pnas.97.13.7124. PMID: 10860979; PMCID: PMC16510.

(64) Kozłowski J, Kozłowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015 Apr 8;69:447-51. doi: 10.5604/17322693.1148710. PMID: 25897105.

(65) Uhl, Bernhard: Gynäkologie und Geburtshilfe compact. Georg Thieme Verlag 2018, DOI: 10.1055/b-002-57150

(66) Andrea U. Gnirke (Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München): Studien zur zellbiologischen Funktion des „Progressions-assoziierten Proteins“ (PAP) und dessen Bedeutung für die Invasivität von Mammakarzinomzellen. München, 2000

(67) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

(68) Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016 Jun 30;166(1):21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028. PMID: 27368099.

- (69) Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):670-691. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.037. PMID: 28187288; PMCID: PMC5308465.
- (70) Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007. PMID: 19945376.
- (71) Huang RY, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT, Ng AH, Chung VY, Chu YS, Matsumura N, Lai HC, Lee YF, Sim WJ, Chai C, Pietschmann E, Mori S, Low JJ, Choolani M, Thiery JP. An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis*. 2013 Nov 7;4(11):e915. doi: 10.1038/cddis.2013.442. PMID: 24201814; PMCID: PMC3847320.
- (72) Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, Van Keymeulen A, Brown D, Moers V, Lemaire S, De Clercq S, Minguijón E, Balsat C, Sokolow Y, Dubois C, De Cock F, Scozzaro S, Sopena F, Lanas A, D'Haene N, Salmon I, Marine JC, Voet T, Sotiropoulou PA, Blanpain C. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*. 2018 Apr;556(7702):463-468. doi: 10.1038/s41586-018-0040-3. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29670281.
- (73) Meyer-Schaller N, Tiede S, Ivanek R, Diepenbruck M, Christofori G. A dual role of Irf1 in maintaining epithelial identity but also enabling EMT and metastasis formation of breast cancer cells. *Oncogene*. 2020 Jun;39(24):4728-4740. doi: 10.1038/s41388-020-1326-0. Epub 2020 May 14. PMID: 32404986.
- (74) Voena C, Chiarle R. Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy. *Discov Med*. 2016 Feb;21(114):125-33. PMID: 27011048.
- (75) Bianchini G, Qi Y, Alvarez RH, Iwamoto T, Coutant C, Ibrahim NK, Valero V, Cristofanilli M, Green MC, Radvanyi L, Hatzis C, Hortobagyi GN, Andre F, Gianni L, Symmans WF, Pusztai L. Molecular anatomy of breast cancer stroma and its prognostic value in estrogen receptor-positive and -negative cancers. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 1;28(28):4316-23. doi: 10.1200/JCO.2009.27.2419. Epub 2010 Aug 30. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2010 Nov 10;28(32):4868. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2012 Feb 20;30(6):679. PMID: 20805453.
- (76) Karn T, Pusztai L, Holtrich U, Iwamoto T, Shiang CY, Schmidt M, Müller V, Solbach C, Gaetje R, Hanker L, Ahr A, Liedtke C, Ruckhäberle E, Kaufmann M, Rody A. Homogeneous datasets of triple negative breast cancers enable the identification of novel prognostic and predictive signatures. *PLoS One*. 2011;6(12):e28403. doi: 10.1371/journal.pone.0028403. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22220191; PMCID: PMC3248403.
- (77) Szekely B, Bossuyt V, Li X, Wali VB, Patwardhan GA, Frederick C, Silber A, Park T, Harigopal M, Pelekanou V, Zhang M, Yan Q, Rimm DL, Bianchini G, Hatzis C, Pusztai L. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2018 Nov 1;29(11):2232-2239. doi: 10.1093/annonc/mdy399. PMID: 30203045.
- (78) Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Maiya V, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA; IMpassion130 Investigators. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jan;21(1):44-59. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30689-8. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31786121.
- (79) Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol*. 2021 Jan 24;16:223-249. doi: 10.1146/annurev-pathol-042020-042741. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33197221.
- (80) Open Science - Lebenswissenschaften im Dialog: Die Polymerase-Kettenreaktion [Internet]. <https://www.openscience.or.at/de/wissen/genetik-und-zellbiologie/2020-04-22-die-polymerase-kettenreaktion-pcr/>. Zugriffen: 09.06.2021

- (81) Oh S, Kessler JA. Design, Assembly, Production, and Transfection of Synthetic Modified mRNA. *Methods*. 2018 Jan 15;133:29-43. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.10.008. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29080741; PMCID: PMC5807177.
- (82) Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol*. 2011 Feb;29(2):121-8. doi: 10.1038/nbt.1769. Erratum in: *Nat Biotechnol*. 2011 May;29(5):459. PMID: 21301435.
- (83) Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, Boegel S, Schrörs B, Vascotto F, Castle JC, Tadmor AD, Schoenberger SP, Huber C, Türeci Ö, Sahin U. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*. 2015 Apr 30;520(7549):692-6. doi: 10.1038/nature14426. Epub 2015 Apr 22. Erratum in: *Nature*. 2015 Jul 16;523(7560):370. PMID: 25901682; PMCID: PMC4838069.
- (84) Pascolo S. Vaccination with messenger RNA (mRNA). *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(183):221-35. doi: 10.1007/978-3-540-72167-3_11. PMID: 18071662.
- (85) Grudzien-Nogalska E, Kowalska J, Su W, Kuhn AN, Slepnev SV, Darzynkiewicz E, Sahin U, Jemielity J, Rhoads RE. Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties. *Methods Mol Biol*. 2013;969:55-72. doi: 10.1007/978-1-62703-260-5_4. PMID: 23296927.
- (86) Tavernier G, Andries O, Demeester J, Sanders NN, De Smedt SC, Rejman J. mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release*. 2011 Mar 30;150(3):238-47. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.020. Epub 2010 Oct 21. PMID: 20970469.
- (87) Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat Commun*. 2018 Apr 12;9(1):1410. doi: 10.1038/s41467-018-03705-y. PMID: 29650952; PMCID: PMC5897557.
- (88) Hart SL. Prospects for RNA delivery with nanotechnologies. *Gene Ther*. 2017 Mar;24(3):121. doi: 10.1038/gt.2017.15. PMID: 28356601.
- (89) Siewert CD, Haas H, Cornet V, Nogueira SS, Nawroth T, Uebbing L, Ziller A, Al-Gousous J, Radulescu A, Schroer MA, Blanchet CE, Svergun DI, Radsak MP, Sahin U, Langguth P. Hybrid Biopolymer and Lipid Nanoparticles with Improved Transfection Efficacy for mRNA. *Cells*. 2020 Sep 5;9(9):2034. doi: 10.3390/cells9092034. PMID: 32899484; PMCID: PMC7563888.
- (90) Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. 2004 Jun;33(2):95-103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023. PMID: 15121163.
- (91) Moradian H, Roch T, Lendlein A, Gossen M. mRNA Transfection-Induced Activation of Primary Human Monocytes and Macrophages: Dependence on Carrier System and Nucleotide Modification. *Sci Rep*. 2020 Mar 6;10(1):4181. doi: 10.1038/s41598-020-60506-4. PMID: 32144280; PMCID: PMC7060354.
- (92) Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):515-27. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008. PMID: 17157791; PMCID: PMC2730521.
- (93) Aka JA, Lin SX. Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7. *PLoS One*. 2012;7(2):e31532. doi: 10.1371/journal.pone.0031532. Epub 2012 Feb 24.

Erratum in: PLoS One. 2012;7(4): doi/10.1371/annotation/18f08a33-35e1-4bf9-8d21-476757dccbef. Adjo Aka, Juliette [corrected to Aka, Juliette Adjo]. PMID: 22384035; PMCID: PMC3286449.

(94) Yu S, Kim T, Yoo KH, Kang K. The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 May 6;486(3):752-758. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.114. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28342866.

(95) Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6. doi: 10.1038/358015a0. PMID: 1614522.

(96) Carpi A, Nicolini A, Antonelli A, Ferrari P, Rossi G. Cytokines in the management of high risk or advanced breast cancer: an update and expectation. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 Dec;9(8):888-903. doi: 10.2174/156800909790192392. PMID: 20025599.

(97) van den Berg HW, Leahey WJ, Lynch M, Clarke R, Nelson J. Recombinant human interferon alpha increases oestrogen receptor expression in human breast cancer cells (ZR-75-1) and sensitizes them to the anti-proliferative effects of tamoxifen. *Br J Cancer*. 1987 Mar;55(3):255-7. doi: 10.1038/bjc.1987.49. PMID: 3567059; PMCID: PMC2001764.

(98) Upreti M, Koonce NA, Hennings L, Chambers TC, Griffin RJ. Pegylated IFN- α sensitizes melanoma cells to chemotherapy and causes premature senescence in endothelial cells by IRF-1 mediated signaling. *Cell Death Dis*. 2010;1(8):e67. doi: 10.1038/cddis.2010.43. PMID: 21197417; PMCID: PMC3010727.

(99) Son MJ, Song HS, Kim MH, Kim JT, Kang CM, Jeon JW, Park SY, Kim YJ, Groves MD, Park K, Kim JH, Nam DH. Synergistic effect and condition of pegylated interferon alpha with paclitaxel on glioblastoma. *Int J Oncol*. 2006 Jun;28(6):1385-92. PMID: 16685440.

(100) Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N; AVOREN Trial investigators. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007 Dec 22;370(9605):2103-11. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61904-7. PMID: 18156031.

(101) Lehtonen A, Lund R, Lahesmaa R, Julkunen I, Sareneva T, Matikainen S. IFN-alpha and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells. *Cytokine*. 2003 Nov 7;24(3):81-90. doi: 10.1016/j.cyto.2003.07.001. PMID: 14581002.

8 Anhang

Werte zu Abbildung 12: Vergleich der Haushaltsgen- und IRF1-Konzentrationen zwischen MCF7 und MCF10A.

B2M						
	Cp	MeanCp	STD Cp	Conc	Mean conc	STD conc
MCF10A	22,96	23,16	0,28	2,86E-02	2,54E-02	0,00452548
MCF10A	23,36			2,22E-02		
MCF7	19,81	19,76	0,07	2,44E-01	2,53E-01	0,01202082
MCF7	19,71			2,61E-01		
ATP5J						
	Cp	MeanCp	STD Cp	Conc	Mean conc	STD conc
MCF10A	25,16	25,17	0,02	1,20E-01	1,19E-01	0,00141421
MCF10A	25,18			1,18E-01		
MCF7	21,14	21,12	0,02	1,76E+00	1,77E+00	0,0212132
MCF7	21,11			1,79E+00		
HPRT						
	Cp	MeanCp	STD Cp	Conc	Mean conc	STD conc
MCF10A	28,23	28,245	0,0212132	6,42E-02	0,0635	0,00098995
MCF10A	28,26			6,28E-02		
MCF7	21,93	21,945	0,0212132	4,30E+00	4,26	0,05656854
MCF7	21,96			4,22E+00		
ACTB						
	Cp	MeanCp	STD Cp	Conc	Mean conc	STD conc
MCF10A	20,55	20,54	2,00E-02	1,79E-02	1,81E-02	0,00028284
MCF10A	20,52			1,83E-02		
MCF7	14,75	14,78	4,00E-02	9,77E-01	9,57E-01	0,02828427
MCF7	14,81			9,37E-01		
PPIA						
	Cp	MeanCp	STD Cp	Conc	Mean conc	STD conc
MCF10A	22,98	22,92	0,07	9,50E-02	9,85E-02	0,00494975

MCF10A	22,87			1,02E-01		
MCF7	16,91	17,01	0,14	5,78	5,41	0,51618795
MCF7	17,11			5,05		
TBP						
	Cp	MeanCp	STD Cp	Conc	Mean conc	STD conc
MCF10A	32,27	32,07	0,29	5,20E-02	5,88E-02	0,00954594
MCF10A	31,86			6,55E-02		
MCF7	26,29	26,41	0,17	2,69	2,48	0,28991378
MCF7	26,53			2,28		
IRF1						
	Cp	MeanCp	STD Cp	Conc	Mean conc	STD conc
MCF10A	27,79	27,78	0,02	1,51E-01	1,53E-01	0,00282843
MCF10A	27,76			1,55E-01		
MCF7	25,52	25,55	0,05	6,96E-01	6,80E-01	0,02262742
MCF7	25,59			6,64E-01		

Werte zu Abbildung 49: Zellviabilität der Tumorzelllinie MCF7.

1. Wiederholung:

Read 1	560	nm			
	1		2		3
A	0,4024872		0,359533		0,4326657
B	0,4554388		0,3750259		0,4300303
C	0,4356689		0,4079807		0,4823292
D	0,5686713		0,427359		0,4233834
E	0,4623858		0,3900453		0,4164528
Read 2	750	nm			
	1		2		3
A	0,04550398		0,00339988		0,01290112
B	0,0456458		0,00166073		0,00108916
C	0,02953044		0,00868306		0,0284083
D	0,07393061		0,01883227		0,00696675
E	0,05436889		0,03599433		0,04882933
Auswertung					

Read 1-2				
	IRF1		EGFP	Nativ
A	0,35698322		0,35613312	0,41976458
B	0,409793		0,37336517	0,42894114
C	0,40613846		0,39929764	0,4539209
D	0,49474069		0,40852673	0,41641665
E	0,40801691		0,35405097	0,36762347
Mitterwert	0,41513446		0,37827473	0,41733335
in %	1,09744169		1	1,10325465
Stabw.	0,04969617			0,03142934

2. Wiederholung:

Read 1	560	nm		
	1		3	5
A	0,6177548		0,6203638	0,5372857
B	0,5472853		0,5798086	0,4874073
C	0,6225964		0,5515248	0,4674087
D	0,602949		0,562193	0,5746249
E	0,481099		0,6220696	0,7052254
Read 2	750	nm		
	1		3	5
A	0,1149827		0,1044768	0,0486472
B	0,07561436		0,07403709	0,01476601
C	0,1020775		0,06881173	0,02587687
D	0,09194125		0,07689838	0,07257315
E	0,14387		0,1626294	0,2351716
Auswertung				
Read 1-2				
	IRF1		EGFP	Nativ
A	0,5027721		0,515887	0,4886385
B	0,47167094		0,50577151	0,47264129
C	0,5205189		0,48271307	0,44153183
D	0,51100775		0,48529462	0,50205175
E	0,337229		0,4594402	0,4700538
Mitterwert	0,46863974		0,48982128	0,47498343
in %	0,95675659		1	0,96970763
Stabw.	0,07571242			0,02273737

3. Wiederholung:

Read 1	560	nm		
	1		2	3
A	0,5748721		0,5491847	0,495645
B	0,544898		0,5206574	0,5136009
C	0,6038998		0,4769228	0,5009137
D	0,5562295		0,5962748	0,6158763
E	0,7507619		0,6058853	0,6167197
Read 2	750	nm		
	1		2	3
A	0,09614972		0,09065131	0,0484338
B	0,07769752		0,06307511	0,04640902
C	0,08910909		0,04910068	0,04132004
D	0,07615043		0,1611644	0,2009608
E	0,2943542		0,2520283	0,2289497
Auswertung				
Read 1-2				
	IRF1		EGFP	Nativ
A	0,47872238		0,45853339	0,4472112
B	0,46720048		0,45758229	0,46719188
C	0,51479071		0,42782212	0,45959366
D	0,48007907		0,4351104	0,4149155
E	0,4564077		0,353857	0,38777
Mitterwert	0,47944007		0,42658104	0,43533645
in %	1,12391321		1	1,02052461
Stabw.	0,02197094			0,03325572

Zusammengefasst:

MCF7			
	IRF1	EGFP	Nativ
1	1,09744169	1	1,10325465
2	0,95675659	1	0,96970763
3	1,12391321	1	1,02052461
	IRF1	EGFP	Nativ
Mittelwert	1,0593705	1	1,0311623
Stabw	0,08984651		0,06740602

Abbildung 50: Zellviabilität der Tumorzelllinie T47D

1. Wiederholung:

Read 1	560	nm		
	1		2	3
A	0,4727643		0,3876181	0,4776814
B	0,440824		0,4640098	0,4670627
C	0,5361243		0,4601502	0,4985626
D	0,3903871		0,4981938	0,4844172
E	0,4691285		0,4950055	0,4342763
Read 2	750	nm		
	1		2	3
A	0,04320063		0,01490454	0,00066859
B	0,03199985		0,02232758	0,00223606
C	0,05979287		0,01145857	0,00148773
D	0,01170845		0,02323032	0,00315658
E	0,06532221		0,04234203	0,00995971
Auswertung				
Read 1-2				
	IRF1		EGFP	Nativ
A	0,42956367		0,37271356	0,47701281
B	0,40882415		0,44168222	0,46482664
C	0,47633143		0,44869163	0,49707487
D	0,37867865		0,43691988	0,48126062
E	0,40380629		0,45585177	0,42431659
Mitterwert	0,41944084		0,43117181	0,46889831
in %	0,97279281		1	1,08749759
Stabw.	0,03659823			0,02746224

2. Wiederholung:

Read 1	560	nm		
	1		2	3
A	0,3830003		0,4160536	0,422035
B	0,4213352		0,4229014	0,468933
C	0,4537412		0,5842131	0,4792276
D	0,5722893		0,5050412	0,5147291
E	0,4274704		0,4739034	0,46891
Read 2	750	nm		
	1		2	3

A	0,00889232		0,01536786		0,0176523
B	0,01181959		0,00808442		0,00943669
C	0,09492292		0,04244209		0,00300699
D	0,06454367		0,01544432		0,00160177
E	0,02657076		0,03368638		0,03003412
Auswertung					
Read 1-2					
	IRF1		EGFP		Nativ
A	0,37410798		0,40068574		0,4043827
B	0,40951561		0,41481698		0,45949631
C	0,35881828		0,54177101		0,47622061
D	0,50774563		0,48959688		0,51312733
E	0,40089964		0,44021702		0,43887588
Mitterwert	0,41021743		0,45741753		0,45842057
in %	0,89681178		1		1,00219283
Stabw.	0,05819113				0,04065992

3. Wiederholung:

Read 1	560	nm			
	1		2		3
A	0,3247086		0,2845606		0,3368742
B	0,3596932		0,310629		0,378285
C	0,3027855		0,4566139		0,3590706
D	0,4277745		0,3750677		0,3405115
E	0,4248745		0,4010198		0,32089442
Read 2	750	nm			
	1		2		3
A	0,02589143		0,00424627		0,0254866
B	0,03572016		0,01362083		0,02673475
C	0,02345185		0,0567809		0,01835062
D	0,07049148		0,03014628		0,02370505
E	0,06890843		0,05051447		0,01322879
Auswertung					
Read 1-2					
	IRF1		EGFP		Nativ
A	0,29881717		0,28031434		0,3113876
B	0,32397304		0,29700817		0,35155025

C	0,27933365		0,399833		0,34071998
D	0,35728302		0,34492142		0,31680645
E	0,35596607		0,35050533		0,30766563
Mitterwert	0,32307459		0,33451645		0,32562598
in %	0,96579582		1		0,97342292
Stabw.	0,03447668				0,01938418

Zusammengefasst:

T47D			
	IRF1	EGFP	Nativ
1	0,97279281	1	1,08749759
2	0,89681179	1	1,00219283
3	0,96579582	1	0,97342292
	IRF1	EGFP	Nativ
Mittelwert	0,94513347	1	1,02103778
Stabw	0,04199379		0,05932627

Werte zu Abbildung 53: Migration der *IRF1*-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie MCF7 (die nativen Zellen wurden zur Veranschaulichung mit dargestellt).

Nr.1	MCF7			
		IRF1	EGFP	Nativ
	Zellzahl	91	120	472
	(pro Well)	93	151	419
		106	79	458
		77	91	338
	Mittelwert	91,75	110,25	421,75
	in %	83,2199546	100	382,539683
Nr.2	MCF7			
		IRF1	EGFP	Nativ
	Zellzahl	88	108	450
		144	214	961
		144	190	579
		153	170	1049
	Mittelwert	132,25	170,5	759,75
	in %	77,5659824	100	445,601173

Nr.3	MCF7			
		IRF1	EGFP	Nativ
	Zellzahl	164	206	998
		175	248	879
		199	301	963
		164	219	869
	Mittelwert	175,5	243,5	927,25
	in %	72,073922	100	380,800821
Allgemeine Auswertung				
MCF7				
	IRF1	EGFP	Nativ	
1	83,2199546	100	382,539683	
2	77,5659824	100	445,601173	
3	72,073922	100	380,800821	
	IRF1	EGFP	Nativ	
Mittelwert	77,619953	100	402,980559	
Stabw	5,5732123	0	36,9207728	

Werte zu Abbildung 54: Migration der *IRF1*-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie MCF7.

Paired t test of Data 1

	Data Set-A
Table Analyzed	Data 1
Column B	EGFP
vs.	vs.
Column A	IRF-1
Paired t test	
P value	0.0201
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.955 df=2
Number of pairs	3
How big is the difference?	
Mean of differences	22.38
SD of differences	5.573
SEM of differences	3.218
95% confidence interval	8.535 to 36.22
R squared (partial eta squared)	0.9603
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	Vertical line
P value (one tailed)	
P value summary	
Was the pairing significantly effective?	

Werte zu Abbildung 57: Migration der *IRF1*-transfizierten Zellen in Richtung Kollagen I der Zelllinie T47D (die nativen Zellen wurden zur Veranschaulichung mit dargestellt).

Nr.1	T47D mit 0,5% FCS			
		IRF1	EGFP	Nativ
	Zellzahl	60	76	195
	(pro Well)	58	68	173
		51	65	250
		69	64	230
	Mittelwert	59,5	68,25	212
	in %	87,1794872	100	310,622711
Nr.2	T47D mit 0,5% FCS			
		IRF1	EGFP	Nativ
	Zellzahl	61	72	258
		70	81	189
		75	74	171
		72	85	287
	Mittelwert	69,5	78	226,25
	in %	89,1025641	100	290,064103
Nr.3	T47D mit 0,5% FCS			
		IRF1	EGFP	Nativ
	Zellzahl	36	61	110
		66	62	120
		48	41	125
		55	46	160
	Mittelwert	51,25	52,5	128,75
	in %	97,6190476	100	245,238095
Allgemeine Auswertung				
T47D				
	IRF1	EGFP	Nativ	
1	87,1794872	100	310,622711	
2	89,1025641	100	290,064103	
3	97,6190476	100	245,238095	
	IRF1	EGFP	Nativ	
Mittelwert	91,3003663	100	281,97497	
Stabw	5,55597482	0	33,4344517	

Table 12: Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen, die in der Zelllinie T47D im Vergleich zu MCF7 hochreguliert sind oder nur dort vorkommen [92].

Spot	FC	Description	UniProt number	MW exp/pred (kDa)	pI exp	Pep	Function description and/or biological process
2810	3.0	Phosphoserine phosphatase	P78330	26/25	5.4	15	Serine biosynthesis
		Uncharacterized protein EIF4E (Fragment)	A8MX72	26/25	5.4	5	Protein biosynthesis
		cDNA FLJ76387...arginine/serine-rich 9...	A8K3M9	26/26	5.4	5	Nucleic acid binding
		Transmembrane emp24 domain-containing prot. 7	Q9Y3B3	26/25	5.4	5	Transport
		Heat shock protein beta-1 † (2873,2808,4439)	P04792	26/23	5.4	3	Stress resistance, actin organization
		Peroxiredoxin-4	Q13162	26/31	5.4	2	Redox regulation of the cell
2490	6.1	P09493-3 Isoform 3 of P09493	P09493-3	32/33	4.6	38	Muscle contraction
		Proliferating cell nuclear antigen *‡	P12004	32/29	4.6	16	DNA replication
2682	2.1	Protein CDV3 homolog * (2658,2399)	Q9UKY7	28/27	5.4	6	Cell proliferation
		N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	O95865	28/30	5.4	5	Anti-apoptosis, arginine catabolism
		Prohibitin (2674,4384)	P35232	28/30	5.4	5	DNA synthesis, cell proliferation
2869	3.2	Glutathione S-transferase Mu 2	P28161	25/26	6.1	53	Metabolic process
		5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	Q8TCD5	25/23	6.1	25	Nucleotide metabolism
		17β-Hydroxysteroid dehydrogenase 10 *	Q5H927	25/26	6.1	6	Oxidoreductase - metabolism
		Protein-L-isospartate(D-aspartate) O-methyltransferase	P22061	25/25	6.1	4	Protein methylation, protein repair
2903	4.3	Cathepsin B *‡	P07858	24/38	5.1	4	Tumor invasion and metastasis
		Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Q12931	24/80	5.1	3	Chaperone
2399	3.0	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	Q15274	35/31	5.8	9	Pyridine nucleotide biosynthesis
		Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P40925	35/36	5.8	4	Gluconeogenesis
		L-lactate dehydrogenase A chain	P00338	35/37	5.8	4	Glycolysis
		Farnesyltransferase	O95749	35/35	5.8	4	Isoprene biosynthesis
		Splicing factor, arginine/serine-rich 1	Q07955	35/28	5.8	3	mRNA processing
		STIP1 homology and U box-containing protein 1	Q9UNE7	35/35	5.8	3	Chaperone activity modulation
		Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	35/37	5.8	3	Pre-mRNA processing http://www.uniprot.org/keywords/KW-0508
		39S ribosomal protein L3, mitochondrial	P09001	35/39	5.8	2	Translation
2685	U	Cathepsin D * (2658,2873,2674,2682,4384,4375,1968)	P07339	28/45	5.0	20	Proteolysis
		cDNA, FLJ92320, highly similar to Homo sapiens glutathione S-transferase theta 2 (GSTT2), mRNA	B2R533	28/28	5.0	5	Transferase
		Uncharacterized protein PSME2 (2682,2674,4384)	A8MZ76	28/29	5.0	4	Proteasome activation
		Inositol monophosphatase	P29218	28/30	5.0	5	Phosphatidylinositol biosynthesis
		Chloride intracellular channel protein 1	O00299	28/27	5.0	3	Ion transport
		Density-regulated protein	O43583	28/22	5.0	2	Translation initiation
2879	U	Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1) *	P08107	25/70	5.2	4	Stress response, polypeptide folding
		A-kinase anchor protein 3	O75969	25/95	5.2	2	Capacitation and acrosome reaction
2508	U	Caspase-3 subunit p12	P42574	32/32	6.2	14	Apoptosis
		Nuclear protein Hcc-1	P82979	32/24	6.2	5	Cell growth, carcinogenesis
		Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	P63244	32/35	6.2	4	Regulation of the activity of kinases, tissue differentiation
		G1/S-specific cyclin-D3	P30281	32/33	6.2	4	Cell cycle control
		ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	P36542	32/33	6.2	3	ATP synthesis, ion transport, transport
		Carbonyl reductase [NADPH] 1	P16152	32/30	6.2	2	Catalysis of reduction
		Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	P13804	32/35	6.2	2	Electron transport
		Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	32/31	6.2	2	Apoptosis, host-virus interaction, transport
		Proline-5-carboxylate reductase	A6NFM2	32/33	6.2	2	Amino-acid biosynthesis
		Cell division control protein 2 homolog	P06493	32/34	6.2	2	Cell cycle control (s-phase, mitosis)
		2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	Q16698	32/36	6.2	2	Oxidoreductase
		Elongation factor Ts, mitochondrial	P43897	32/35	6.2	2	Protein biosynthesis
cDNA FLJ76011, highly similar to Homo sapiens lactamase, beta 2A8K2D6 (LACTB2), mRNA		32/33	6.2	2	Hydrolase activity		

Tabelle 13: Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen, die in der Zelllinie MCF7 im Vergleich zu T47D hochreguliert sind oder nur dort vorkommen [92].

Spot	FC	Description	UniProt number	MW exp/ pred (kDa)	pI exp	Pep	Function description and/or biological process
2808	3.2	Triosephosphate isomerase	P60174	28/27	6.2	19	Fatty acid biosynthesis, glycolysis
		Protein ETHE1, mitochondrial	O95571	28/28	6.2	2	Suppression of p53-induced apoptosis
2212	2.0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 ₍₄₃₇₅₎	P31942	42/37	6.5	13	mRNA processing
		Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	O43488	42/40	6.5	8	Cellular aldehyde metabolism
		Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	Q8N335	42/38	6.5	6	Glycerol-3-phosphate catabolism
		Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	O14979	42/46	6.5	2	Transcription regulation
4384	5.2	Latexin	Q98540	31/26	5.5	14	Metalloendopeptidase inhibition
		Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	31/29	5.5	4	Immunoproteasome assembly
		cDNA, FLJ96310 _(2674,2617,4375,4384)	B2RCV1	31/33	5.5	2	Transport
4375	11	cDNA, FLJ94267, highly similar to Homo sapiens glutathione S-transferase ₍₃₁₈₄₎	B2R983	32/28	6	16	Metabolism
		NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, mitoch.	Q9NTG7	32/44	6	2	NAD-dependent deacetylase activity
3427	3.3	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like	O75368	17/13	5.2	14	Sh3 domain binding, sh3/sh2 adaptor
3184	2.7	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric	P19105	21/20	4.6	7	Cytokinesis, receptor capping, cell locomotion
3405	2.4	Profilin ₍₃₁₀₂₎	Q4VBQ4	21/15	4.6	12	Actin binding
		Cellular retinoic acid-binding protein 1	P29762	21/16	4.6	2	Transport
		TRM112-like protein	Q9UI30	21/14	4.6	2	Protein binding
3102	2.2	Chromobox protein homolog 3* ₍₃₀₉₅₎	Q13185	21/21	5.1	11	Transcription regulation
		BH3-interacting domain death agonist p11	P55957	21/22	5.1	2	Apoptosis
		Chromobox protein homolog 5	P45973	21/22	5.1	2	Repressor of transcription, chromatin assembly or disassembly
3095	7.0	Cytochrome c-releasing factor 21*	O75223	23/21	5.0	5	Induction of apoptosis
1968	4.7	Interleukin-10	P22301	50/21	5.0	2	Inhibits the synthesis of cytokines, B cell proliferation, anti-apoptosis
		Telomerase-binding protein EST1A	Q86U58	50/160	5.0	2	Telomere regulation, nonsense-mediated mRNA decay
		Bullous pemphigoid antigen 1, isoforms 6/9/10	O94833	50/591	5.0	2	Cell adhesion
		cAMP response element-binding protein	P16220	50/37	5.0	2	Host-virus interaction, transcription
		Coiled-coil domain-containing protein 110	Q8TBZ0	50/97	5.0	2	Unknown
		CHD9 protein	B2RTU2	50/326	5.0	2	Transcription, transcription regulation
		Transcriptional repressor NF-X1	Q12986	53/124	5.1	2	Transcription regulation
1870	5.7	MHC class I antigen (Fragment)	A2TEM8	53/11	5.1	2	Immune response
		Probable global transcription activator SNF2L2	B1ALG3	53/181	5.1	2	Transcriptional coactivator cooperating with nuclear hormone receptors
		Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial ₍₂₈₈₇₎	P30048	25/28	6.2	2	Redox regulation of the cell
4439	U	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial ₍₂₈₈₇₎	P30048	25/28	6.2	2	Redox regulation of the cell
4492	U	Transgelin-2	P37802	20/22	5.6	8	Muscle development
4404	U	Pyridoxine 5'-phosphate oxidase (F.)	Q53FP0	29/30	5.8	5	Pyridoxine biosynthesis
		Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	Q13907	29/26	5.8	4	Steroid, lipid, carotenoid biosynthesis
3563	U	Calcyphosin	Q13938	23/21	4.6	10	Regulation of ionic transport
4572	U	Protein S100-A14 ‡	Q9HCY8	16/12	5.0	4	Calcium ion binding
4530	U	Calmodulin-like 5	Q55QI3	18/16	4.2	4	Calcium ion binding
4094	U	NADP-dependent malic enzyme	P48163	75/64	5.8	24	Nadp biosynthetic process
		T-complex protein 1 subunit alpha	P17987	75/60	5.8	12	Protein folding
		Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P13674	75/61	5.8	10	Protein metabolic process
		Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	75/51	5.8	5	Host-virus interaction, mRNA processing
		Beta-galactosidase	A8MZ11	75/73	5.8	3	Glycosidase, hydrolase
		REST corepressor 1	Q9UKL0	75/53	5.8	2	transcription transcription regulation

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir meine Doktorarbeit ermöglicht und mich darin unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön geht an [REDACTED] für die Bereitstellung seines Labors, man konnte in jedem Gespräch etwas von ihm lernen – sei es über das Thema der Doktorarbeit oder über allgemeine medizinische Fragestellungen. Danke für die Möglichkeit, an einem so aktuellen und interessanten Thema arbeiten und mich so in die Forschung der AG Prawitt des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin mit einbringen zu dürfen.

An zweiter Stelle gilt mein Dankeschön [REDACTED] für die geduldige Unterstützung und Hilfe in allen Bereichen des Laborlebens.

Außerdem möchte ich mich bei [REDACTED] bedanken, sie hat sich immer und überall Zeit genommen, um mir im Labor alles ausführlich zu erklären.

Vielen Dank auch an [REDACTED] für die Zweitkorrektur, sowie an [REDACTED] für das Einarbeiten in das Labor der Frauenklinik.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, die stets für mich da sind und mich bei meinen Vorhaben motivieren.