

Die *myocardin-related transcription factor A* (MRTF-A) -
vermittelten Effekte einer hohen Gewebefestigkeit auf
Brustepithelzellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Marie-Luise Barbara Doll, geb. Melcher

Betreuer: Prof. Dr. Guido Posern

Gutachterinnen:

Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld, Halle

Prof. Dr. Monilola Olayioye, Stuttgart

Verteidigung: 14.08.2023

REFERAT/ZUSAMMENFASSUNG

Brustkrebs gehört aufgrund seiner hohen Prävalenz zu den großen medizinischen Herausforderungen dieses Jahrhunderts. Ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms stellt eine hohe Brustdichte bzw. Gewebefestigkeit dar, die häufig mit einer erhöhten Rho-GTPase-Aktivität einhergeht. Effektorproteine der Rho-GTPasen sind die *myocardin-related transcription factors* (MRTF) A und B, für die bereits eine Schlüsselrolle bei der malignen Transformation und Metastasierung von Epithelzellen nachgewiesen wurde. MRTF-A ist essentiell für die regelhafte Azinibildung von MCF10A Brustepithelzellen in einer weichen Zellkulturmatrix. Weitere Studien belegen die Mechanosensitivität von MRTF-A, wobei sich dessen transkriptionelle Aktivität in Abhängigkeit von der Festigkeit des umliegenden Gewebes verändert. Ziel dieser Arbeit ist es nun, die wechselseitigen Einflüsse von unterschiedlichen Gewebefestigkeiten sowie einer variablen MRTF-A-Aktivität auf die Azinibildung zu untersuchen. Dabei sollen Matrices mit verschiedenen Festigkeiten verwendet werden, die sowohl die Festigkeit der gesunden Brust (ca. 200 Pascal) als auch die des Tumorgewebes (> 3000 Pascal) widerspiegeln.

Eine erhöhte Festigkeit der 3D-Kultur-Matrix induzierte die Bildung protrusiver Ausläufer an benignen MCF10A Azini. Dies konnte durch die Behandlung mit dem MRTF-Inhibitor CCG 203971 partiell aufgehoben werden. Mit Hilfe eines Reporter-Assays wurde weiterhin eine erhöhte MRTF-A-Aktivität in Azini, welche auf festen Matrices wuchsen, festgestellt. Die Untersuchung von primären Organoiden in 3D-Kultur zeigte erstmals auch in diesen einen festigkeitsabhängigen Phänotyp. Eine Verminderung der MRTF-A-Aktivität mittels Inhibitors ging auch hier mit einem Rückgang der protrusiven Strukturen einher, wobei es keine Auswirkungen auf die Lumenfüllung der Primärorganoiden gab. Eine MRTF-A-Überexpression hingegen führte zu einer matrixunabhängigen Füllung der Organoiden.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit einen invasions-fördernden Einfluss einer hohen Gewebefestigkeit auf humane und murine Brustepithelzellen nachweisen, welcher wahrscheinlich durch MRTF-A mediiert wird. Damit gibt es erste Hinweise, dass der MRTF-SRF-Signalweg ein potentielles Ziel für eine anti-tumorale Therapie des Mammakarzinoms darstellt.

Doll, Marie-Luise Barbara: Die *myocardin-related transcription factor A* (MRTF-A) - vermittelten Effekte einer hohen Gewebefestigkeit auf Brustepithelzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2022

Anmerkung zum Urheberrecht

Teile der Ergebnisse, die in dieser Dissertation beschrieben werden, wurden 2022 in *Cell Communication and Signaling* publiziert:

„Interplay of the transcription factor MRTF-A and matrix stiffness controls mammary acinar structure and protrusion formation“

Marie-Luise Melcher, Ines Block, Karolin Kropf, Anurag Kumar Singh und Guido Posern

Cell Communication and Signaling. 20:158

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 <i>Myocardin-related transcription factors (MRTFs)</i> | 1 |
| 1.1.1 Struktur und Regulation | 1 |
| 1.1.2 Funktion | 4 |
| 1.1.3 MRTF-SRF-Inhibitoren | 5 |
| 1.2 Das Mammakarzinom | 6 |
| 1.2.1 Ätiologie | 6 |
| 1.2.2 Histologie | 7 |
| 1.2.3 Klinischer Verlauf und Therapie | 8 |
| 1.2.4 Prognostische und prädiktive Faktoren | 9 |
| 1.3 Dreidimensionale Zellkultur | 10 |
| 1.3.1 Festigkeit | 11 |
| 1.3.2 3D-Kulturen von Brustepithel | 14 |
| 2. Zielstellung | 17 |
| 3. Material und Methoden | 18 |
| 3.1 Material | 18 |
| 3.1.1 Geräte und Reagenzien | 18 |
| 3.1.2 Zusammensetzung von Lösungen | 21 |
| 3.1.3 Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper | 24 |
| 3.1.4 Zelllinien und Mäuse | 25 |
| 3.2 Methoden | 26 |
| 3.2.1 2D-Kultivierung von Zelllinien | 26 |
| 3.2.2 3D-Kultivierung von Zelllinien | 27 |
| 3.2.3 Gewinnung von Primärzellen | 30 |
| 3.2.4 Western Blot | 30 |
| 3.2.5 RNA-Isolation und qRT-PCR | 31 |
| 3.2.6 Genotypisierung | 32 |
| 3.2.7 Immunfluoreszenz | 33 |
| 3.2.8 Luziferase-Assay | 33 |
| 3.2.9 Cell Viability Assay | 34 |

| | | |
|-----------|--|-------------|
| 3.2.10 | Rheometrische Messungen | 34 |
| 3.2.11 | Statistische Auswertung & Darstellung..... | 35 |
| 4. | Ergebnisse | 36 |
| 4.1 | Etablierung geeigneter Zellmodelle | 36 |
| 4.1.1 | Rekombinante MCF10A Zelllinie..... | 36 |
| 4.1.2 | Brustkrebszelllinien..... | 40 |
| 4.2 | Etablierung geeigneter MRTF-Inhibitoren | 41 |
| 4.2.1 | CCG 1423 | 41 |
| 4.2.2 | CCG 222740 | 42 |
| 4.2.3 | CCG 203971 | 43 |
| 4.3 | Analyse der festigkeitsabhängigen Azinigenese von MCF10A | 44 |
| 4.3.1 | Matrices unterschiedlicher Festigkeit aus Polyacrylamid | 45 |
| 4.3.2 | PuraMatrix™ | 46 |
| 4.3.3 | Matrices unterschiedlicher Festigkeit aus Matrigel/Collagen I-Mischungen..... | 47 |
| 4.3.4 | Überschichtung mit Collagen IV..... | 49 |
| 4.3.5 | Matrigen SoftSlip | 50 |
| 4.4 | Analyse der Rolle von MRTFs in festigkeitsabhängiger Azinigenese..... | 51 |
| 4.5 | Analyse der festigkeitsabhängigen Sphäroidbildung in Brustkrebszelllinien | 54 |
| 4.6 | Analyse von Primärorganoiden in Abhängigkeit von Matrixfestigkeit und MRTF-Aktivität | 55 |
| 4.6.1 | Untersuchungen bei basaler MRTF-A-Aktivität | 56 |
| 4.6.2 | Untersuchungen bei MRTF-A-Überexpression | 57 |
| 4.6.3 | Untersuchungen bei MRTF-A-Inhibierung | 60 |
| 5. | Diskussion | 62 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 72 |
| 7. | Thesen | 80 |
| | Erklärungen..... | VII |
| | Danksagung..... | VIII |

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Mitgliedern der Myocardin-Familie

Abbildung 2 – Schematische Darstellung des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges

Abbildung 3 – Schematische Darstellung ausgewählter Aspekte der Mechanotransduktion mit der zentralen Rolle des Aktinzytoskeletts.

Abbildung 4 – Makroskopische sowie mikroskopische Darstellung der Brustdrüse *in vitro* und *in vivo*

Abbildung 5 – Induktion von MRTF-A und Effekte auf die Zellvitalität in rekombinanten Zelllinien auf die Zellvitalität in 2D-Kulturen

Abbildung 6 – Induktion von MRTF-A und Effekte auf die Azinimorphologie in rekombinanten Zelllinien in 3D-Kulturen

Abbildung 7 – Analyse der MRTF-A-Expression und Sphäroidbildung in MCF7, MDA-MB-468 und T47D

Abbildung 8 – Untersuchungen zur Wirkung von CCG 1423

Abbildung 9 – Untersuchungen zur Wirkung von CCG 222740

Abbildung 10 – Untersuchungen zur Wirkung von CCG 203971

Abbildung 11 – Rheometrische und morphologische Untersuchungen von MCF10A auf Polyacrylamidgelen

Abbildung 12 – MCF10A für 4 Tage auf Matrigel/Collagen-I-Gelen mit variierender Zusammensetzung

Abbildung 13 – MCF10A für 4 Tage auf Matrigel- oder Collagen-I-Gelen mit Collagen-IV-Beschichtung

Abbildung 14 – MCF10A für 4 Tage auf Matrigen SoftSlips mit geringer („weich“, 200 Pascal) und hoher („fest“, 4000 Pascal) Festigkeit

Abbildung 15 – Analyse der Rolle MRTF-A's in der festigkeitsabhängigen MCF10A Azinigenese

Abbildung 16 – MCF7 und T47D für 4 bzw. 14 Tage auf Matrigel/Collagen-I-Gelen mit variierender Zusammensetzung

Abbildung 17 – Primäre NMRI-Organoiden auf Matrigel oder Collagen I

Abbildung 18 – Primäre Organoiden auf Matrigel, einem 1:1 Matrigel/Collagen-I-Gemisch (MC) oder Collagen I nach Behandlung mit 0,25 µM 4-OH-Tamoxifen für 5 Tage

Abbildung 19 – Primäre NMRI-Organoiden auf Matrigel, einem 1:1 Matrigel/Collagen-I-Gemisch (MC) oder Collagen I nach Behandlung mit 20 µM CCG 203971 (n=3) oder DMSO (n=2) für 5 Tage

Abbildung 20 – Schematische Abbildung der MCF10A Aziniformation und Primärorganoiden *in vitro* sowie der Folgen einer Störung dieser

Abbildung 21 – Schematische Zusammenfassung der beobachteten Effekte an MCF10A Azini und Primärorganoiden

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Übersicht der molekularen Subgruppen des Mammakarzinoms

Tabelle 2 – Equipment

Tabelle 3 – Allgemeine Chemikalien

Tabelle 4 – Reagenzien und Chemikalien für die Zellkultur

Tabelle 5 – Vorgefertigte Lösungen, Assays und Kits

Tabelle 6 – Enzyme

Tabelle 7 – Größenstandards für Gelelektrophorese und Western Blots

Tabelle 8 – Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9 – Puffer und Lösungen

Tabelle 10 – Plasmide

Tabelle 11 – Oligonukleotide für qRT-PCR

Tabelle 12 – Primer für die Genotypisierung

Tabelle 13 – Primäre Antikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

Tabelle 14 – Sekundäre Antikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz

Tabelle 15 – Zelllinien

Tabelle 16 – Mäuse

Tabelle 17 – Volumina der Reagenzien in μl zur Polyacrylamidgel-Herstellung verschiedener Festigkeiten

Tabelle 18 – Genutzte Mischverhältnisse von FibrinCol® und Matrigel und deren Bezeichnung

Tabelle 19 – Reaktionsansatz und Temperaturprogramm zum Nachweis der Wap-Cre und MRTF-A-Kassette

Abkürzungsverzeichnis

- AC Acrylamid
- APS Ammoniumpersulfat
- Bis-AC Bis-Acrylamid
- BM Basalmembran
- Bp Basenpaare
- BRCA 1/2 *Breast Cancer 1/2*
- BSA *Bovine serum albumin* (Rinderserumalbumin)
- cDNA *complementary DNA* (komplementäre DNS)
- CO₂ Kohlenstoffdioxid
- DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol
- DCIS Duktales Carcinoma in Situ
- DMEM *Dulbecco's modified Eagle medium*
- DMSO Dimethylsulfoxid
- dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat
- ECM Extrazellulärmatrix
- EDTA *Ethylene-diamine-tetra-acetic acid*
- EGF *Epidermal Growth Factor* (Epithelialer Wachstumsfaktor)
- EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor* (Epithelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor)
- FA *focal adhesion* (Fokale Adhäsionen)
- FCS *fetal calf serum* (Kälberserum)
- GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
- HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethan-sulfonische Säure
- HER2 Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2
- IF Immunfluoreszenz
- IST Insulin-Transferin-Selenium
- Min Minuten
- mRNA Ribonukleinsäure (messenger RNA)
- NaOH Natriumhydroxid
- NaCl Natriumchlorid
- NHS N-Hydroxysuccinimide
- NST *No Special Type*
- PBS *phosphate-buffered Saline* (Phosphatgepufferte Salzlösung)
- PCR *polymerase chain reaktion* (Polymerasekettenreaktion)

- PEI Polyethylenimin
- PFA Paraformaldehyd
- qRT-PCR *real-time quantitative* PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
- SD *Standard deviation* (Standardabweichung)
- SDS Natriumdodecylsulfat
- SEM *Standard Error of the Mean* (Standardfehler)
- Sec Sekunden
- SRE *serum response element*
- SRF *serum response factor*
- Tab. Tabelle
- TEMED N,N,N,N-Tetra-methyl-ethylene-diamin
- Taq *Thermus aquaticus*
- RT Raumtemperatur
- ÜN Über Nacht
- WB Western Blot
- WHO World Health Organisation
- 2D Zwei-dimensional
- 3D Drei-dimensional

1. Einleitung

1.1 *Myocardin-related transcription factors (MRTFs)*

Die präzise Regulation der Genexpression ist essentiell für die Funktionalität der Zelle. Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche dabei involviert sind. Diese regulatorischen Proteine steuern durch die Bindung an spezifische DNA-Abschnitte die Initiation der Transkription. Ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor ist der *serum response factor* (SRF). Dieses 1986 durch R. Treisman identifizierte Protein bindet über die sogenannte CARG box (mit der Sequenz CC(A/T)₆GG) an die DNA und kontrolliert dadurch die Expression diverser Zielgene, welche u.a. für Transkriptionsfaktoren oder Zytoskelettproteine kodieren (Esnault et al., 2014; Treisman, 1986). Die Aktivität der SRF-abhängigen Transkription wird von zwei SRF-Kofaktor-Familien reguliert. Neben den *ternary complex factors* (TCFs), handelt es sich dabei um die Myocardin-Familie der SRF-Kofaktoren (Posern & Treisman, 2006). Außer Myocardin, welches ausschließlich in Zellen der glatten Muskulatur sowie des Herzens exprimiert wird, enthält diese auch die *myocardin-related transcription factors* A und B (MRTF-A und -B) (Wang et al., 2001). MRTF-A und -B weisen zwar eine mit Myocardin vergleichbare Struktur auf, jedoch werden sie in diversen embryonalen und adulten Geweben exprimiert (Wang et al., 2002). Initial wurde MRTF-A, welches auch unter den Namen *megakaryoblastic leukemia 1* (MKL1) und *megakaryocytic acute leukemia* (MAL) bekannt ist, als Fusionsprotein des *RNA-binding motif protein 15* (RBM15) identifiziert. Dieses wurde in Patientenproben von Säuglingen und Kindern, welche an einer akuten megakaryoblastischen Leukämie erkrankt waren, gefunden (Ma et al., 2001; Mercher et al., 2001). Das onkogene Fusionsprotein RBM15-MKL1, auch OTT-MAL genannt, wird dabei durch eine chromosomale Translokation (t(1;22)(p13;q13)) generiert und führt zu einer konstitutiven Aktivierung des SRF-Signalweges (Descot et al., 2008).

1.1.1 Struktur und Regulation

Die drei Mitglieder der Myocardin-Familie zeigen vielfach übereinstimmende Domänenstrukturen. N-Terminal befinden sich sowohl in Myocardin als auch in MRTF-A und -B bis zu drei konservierte Arginin-Prolin-X-X-X-Glutaminsäure-Leucin-Motive (RPEL-Motive), welche durch kurze Linkersequenzen verbunden werden (Abbildung 1). Die RPEL-Domänen samt Linker sind in der Lage maximal 5 Aktinmonomere zu binden, wodurch der Kernimport reguliert wird. Im Vergleich zu den MRTFs weisen die RPEL-Domänen 1 und 2 des Myocardins eine geringe Affinität zu Aktin auf. Dies erklärt das Myocardin konstitutiv aktiv im Zellkern vorliegt (Guettler

et al., 2008; Miralles et al., 2003; Mouilleron et al., 2011). An die RPEL-Motive anschließend folgen zwei basische Regionen (B1,2), eine glutaminreiche Region (Q), ein SAP (SAF-A/B, Azinus, PIAS) -Motiv sowie eine Leucin-Zipper-Domäne (LZ). Die konservierte basische Region sowie die glutaminreiche Region ermöglichen die Bindung mit SRF. Nicht gänzlich geklärt bleibt die Funktion der SAP-Domäne. Jedoch konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des SAP-Motives sich nicht auf die Bindung von MRTF-A an SRF auswirkt (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003). Das Leucin-Zipper-Motiv ermöglicht die Bindung von Myocardin und MRTF-A/-B an SRF und die C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) stimuliert die Aktivierung der Transkription (Miralles et al., 2003; Wang et al., 2002).

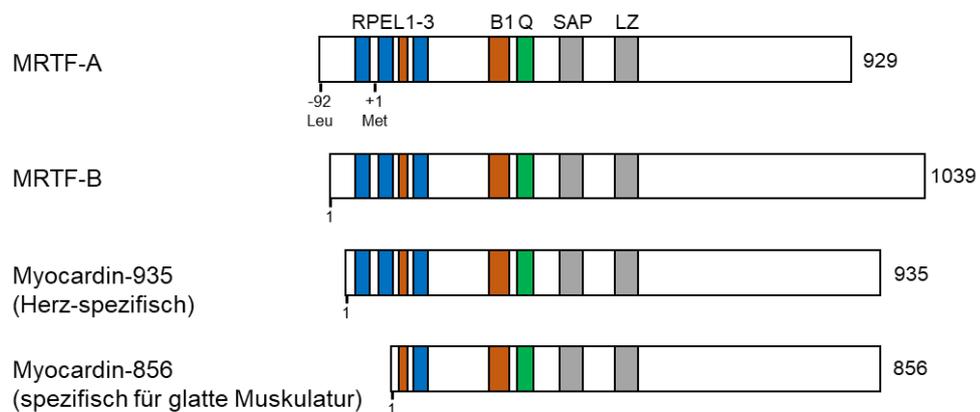


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Mitgliedern der Myocardin-Familie: MRTF-A, MRTF-B und Myocardin-Isoformen 935 und 856. RPEL: Arg-Pro-X-X-X-Glu-Leu-Aktinbindemotiv (blau in Abb.); B1/2: basische Region 1/2 (rot in Abb.); Q: glutaminreiche Region (grün); SAP: SAF-A/B (grau), Azinus, PIAS-homologe Domäne; LZ: Leucin zipper-Motiv; (grau) TAD: Transaktivierungsdomäne
Modifiziert nach Posern und Treisman 2006 (Posern & Treisman, 2006).

Im Gegensatz zu Myocardin, welches sich konstitutiv aktiv im Zellkern findet, wird die Aktivität der MRTFs über das Aktinzytoskelett gesteuert. Wie erstmals 2003 beschrieben, verhindert die Bindung von Aktinmonomeren an die N-terminalen RPEL-Motive von MRTF-A und -B sowohl deren nukleären Import als auch die nachfolgende Aktivierung der SRF-abhängigen Transkription (Miralles et al., 2003; Mouilleron et al., 2011). Die Aktinmonomere blockieren dabei durch Konfirmationsänderung des nukleären Lokalisationssignals (NLS) den Importin- α/β -abhängigen Kernimport (Pawłowski et al., 2010). Im Zellkern verhindert die Bindung von Aktin an MRTF-A bzw. -B außerdem die Aktivierung von SRF und bewirkt einen schnellen Export der Proteine ins Zytoplasma (Vartiainen et al., 2007). Die Aktindynamik einer Zelle wird maßgeblich durch Rho-GTPasen gesteuert (Abbildung 2). Aktiviert durch verschiedene extrazelluläre Signale,

stimulieren beispielsweise mDia1, ein Diaphanous-verwandtes Formin, oder LIM-Domänen-Kinasen (LIMK) über ROCK (Rho-associated coiled-coil containing kinase) den Aufbau von Aktinfilamenten (F-Aktin) aus Aktinmonomeren (G-Aktin) (Geneste et al., 2002; Sotiropoulos et al., 1999). Die vermehrte Bildung von Aktinfilamenten führt schließlich zur Dissoziation der inhibitorischen MRTF-G-Aktin-Komplexe, was den Kernimport von MRTF-A und -B und damit die SRF-abhängige Genexpression ermöglicht.

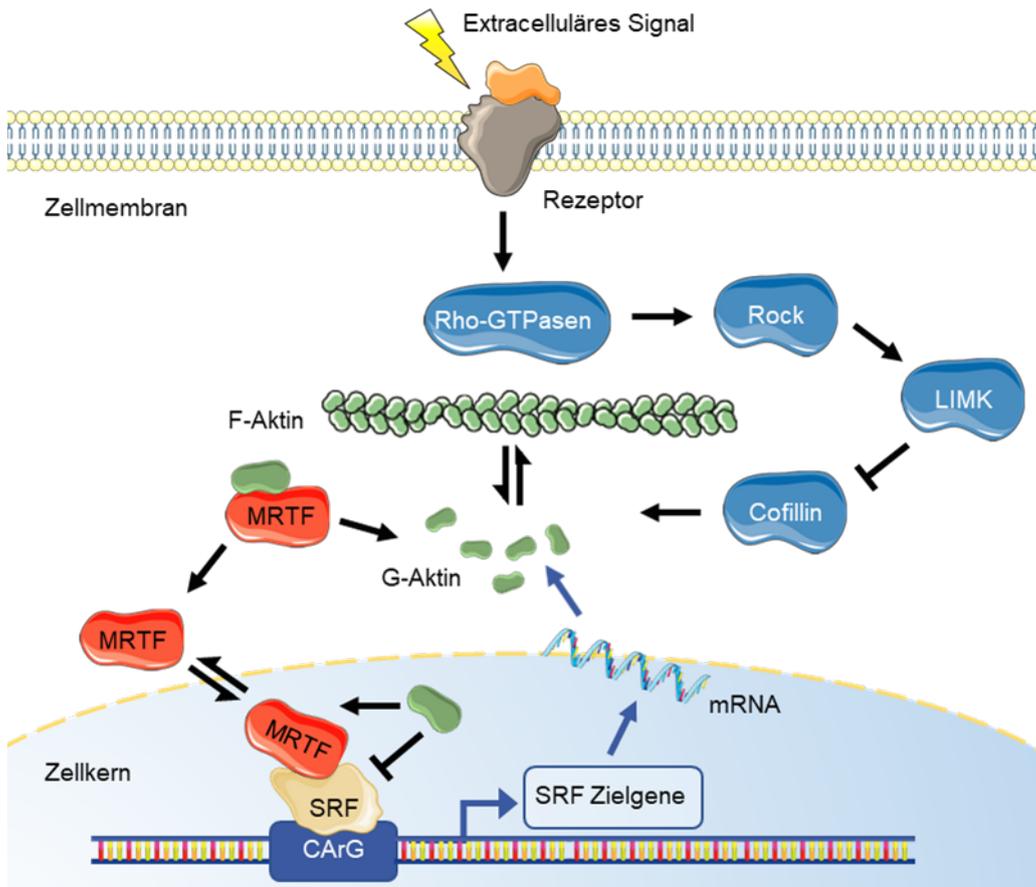


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges. Durch extrazelluläre Stimuli werden verschiedene Rho-GTPasen aktiviert. Diese stimulieren über diverse Zytoskelettmodulatoren, wie die ROCK (Rho-associated coiled-coil containing kinase), den Aufbau von filamentärem Aktin (F-Aktin) aus Aktin-Monomeren (G-Aktin). G-Aktin bindet über die N-terminalen RPEL-Motive an MRTF-A und -B. Die Aktivierung des Rho-GTPase Signalweges verringert den Anteil an G-Aktin und löst damit den inhibitorischen MRTF-Aktin-Komplex. MRTF-A und -B können nun in den Zellkern importiert werden, an SRF binden und die SRF-abhängige Genexpression induzieren. Modifiziert nach Knöll und Beck 2011 (Knöll & Beck, 2011).

1.1.2 Funktion

Mittels des MRTF-SRF-Signalweges wird die Transkription von knapp 700 Zielgenen reguliert. Diese kodieren unter anderem für Proteine, welche Zellmotilität und -adhäsion, Proliferation und Apoptose steuern (Esnault et al., 2014; Kalita et al., 2012; Raftopoulou & Hall, 2004; Scharenberg et al., 2010). Auch in der Mechanotransduktion nimmt der MRTF-SRF-Signalweg eine wichtige Rolle ein (siehe 1.3.1) (Foster et al., 2017; Hadden et al., 2017; Lee & Chaudhuri, 2018; Olson & Nordheim, 2010). Die spezifischen Funktionen der Transkriptionsfaktoren der Myocardin-Familie konnten mit Hilfe verschiedener *knock-out* Tiermodelle gezeigt werden. So wurde in Mäusen demonstriert, dass eine Null-Mutation von Myocardin, durch die fehlerhafte Entwicklung von vaskulären, glatten Muskelzellen, bereits embryonal letal verläuft (Li et al., 2003). Ein *knock-out* von MRTF-A führte im Mausmodell zur Bildung vergrößerter, minder organisierter Brustdrüsen sowie zur Störung der Differenzierung myoepithelialer Zellen (Li et al., 2006; Sun et al., 2006). Dadurch waren die betroffenen Mäuse nicht in der Lage ihre Nachkommen zu säugen. Außerdem beobachteten Sun *et al.*, dass 35 % der MRTF-A^{-/-} Embryonen aufgrund kardiovaskulärer Nekrosen starben (Sun et al., 2006). Gewebe-spezifische Doppel-*Knock-Outs* von MRTF-A und -B zeigten weiterhin, dass beide für die Differenzierung von Nerven- sowie vaskulären Zellen essentiell sind (Hinkel et al., 2014; Mokalled et al., 2010; Trembley et al., 2015; Weinl et al., 2013).

Die Funktion der MRTFs wurde ebenso in einer Vielzahl von Überexpressionsstudien untersucht, wobei die Aktivität von MRTF-A und -B künstlich erhöht wird. So konnte gezeigt werden, dass MRTF-A anti-proliferativ wirkt und in die Regulierung der Apoptose eingreift (Descot et al., 2008; Shaposhnikov et al., 2012). Mittels drei-dimensionaler (3D) Kultur von Brustepithelzellen wurde ferner demonstriert, dass sowohl eine Überexpression als auch Deletion von MRTF-A zu einer gestörten Aziniformation führt. Dies konnte auch durch das Einbringen von MRTF-B in Zellen bzw. Azini mit verminderter MRTF-A-Aktivität nicht gänzlich rückgängig gemacht werden, was gegen eine vollständige funktionelle Redundanz von MRTF-A und -B spricht (Seifert & Posern, 2017). Des Weiteren wurde eine verstärkte Proliferation, fehlregulierte Apoptose sowie eine beginnende epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) durch die Überexpression von MRTF-A beobachtet. EMT beschreibt einen Prozess, in welchem epitheliale Zellen Charakteristika von mesenchymalen Zellen annehmen, wie beispielsweise den Verlust von Polarität oder das Auflösen von Zellkontakten (Kalluri & Weinberg, 2009). Dieser Vorgang ist speziell in der Progression von Tumoren von essentieller Bedeutung, da es diesen ermöglicht die Basalmembran zu durchbrechen und zu metastasieren (Tiwari et al., 2012). Die Rolle von MRTF-A in der Krebsentstehung und -metastasierung ist uneindeutig. Zwar wurde den MRTFs auch eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben, jedoch gibt es nun zunehmend Hinweise für eine

onkogene Funktion dieser (Descot et al., 2009; Liao et al., 2014; Xu et al., 2018; Yoshio et al., 2010). Medjkane *et al.* zeigten 2009, dass die Verminderung der MRTF-A-Aktivität mittels siRNAs zur Verringerung der Adhäsion, Motilität und Invasion von MDA-MB-231 Brustkrebszellen führt. Diese Beobachtungen wurden mittels Transplantation dieser Zellen in Mäuse bestätigt (Medjkane et al., 2009). Darüber hinaus wurde auch der MRTF-A-Aktivatoren Thymosin β 4 mit Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung gebracht (Morita et al., 2007; Weissbach et al., 2016). Außerdem scheinen die MRTFs auch in anderen Krebsentitäten, wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom, eine onkogene Funktion zu erfüllen (Song et al., 2016).

1.1.3 MRTF-SRF-Inhibitoren

Aufgrund der vielfältigen Funktionen MRTF-A's und seiner potentiellen Rolle in humanen Pathologien stand die künstliche Inhibierung des MRTF-SRF-Signalweges frühzeitig im Fokus. So wurde 2007 mittels eines modifizierten *serum response element* (SRE)-Luziferase-Assays erstmals ein niedermolekularer Inhibitor des Rho-MRTF-SRF-Signalweges identifiziert (Evelyn et al., 2007). CCG 1423 schien in die Rho-A-nachgeschaltete MRTF-A-SRF-abhängige Transkription einzugreifen. Wo genau der Inhibitor wirkt, blieb unklar. Vermutet wird, dass CCG 1423 direkt an MRTF-A oder ein anderes Protein mit RPEL-Motiv bindet und so den nukleären Import von MRTF-A inhibiert (Hayashi et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass CCG 1423 die Invasion von Prostata- sowie Ovarial-Karzinom-Zellen in Matrigel vermindert.

In den Folgejahren wurde auf Grundlage dessen verschiedene Inhibitoren der zweiten Generation entwickelt. CCG 222740 wurde 2017 vorgestellt (Yu-Wai-Man et al., 2017). Es konnte u.a. in Pankreaszellen gezeigt werden, dass dieser, bei verminderter Zytotoxizität, anti-tumorale Effekte vermittelt (Leal et al., 2019).

Der etablierteste unter den MRTF-SRF-Inhibitoren, CCG 203971, weist im Vergleich zu CCG 1423 eine geringere Toxizität auf und vermindert die Migration von Prostatakarzinomzellen um ein Vielfaches stärker als sein Vorgänger (Bell et al., 2013). Der exakte Wirkungsmechanismus bleibt auch bei CCG 203971 noch nicht gänzlich entschlüsselt. Bell *et al.* gehen jedoch von MRTF-A als Angriffspunkt aus, wobei wahrscheinlich dessen nukleärer Import inhibiert wird (Bell et al., 2013). In Rho-C-überexprimierenden Melanomzellen wurde durch CCG 203971 eine verminderte Invasion und Migration *in vitro* sowie eine Reduktion der Lungenmetastasierung *in vivo* festgestellt (Haak et al., 2017).

Erste Hinweise für eine Korrelation von MRTF-Aktivität und Gesamt-Überleben in Daten von Brustkrebs- und Pankreaskarzinompatienten legen einen möglichen klinischen Einsatz der Inhibitoren in Zukunft nahe (Leal et al., 2019; Seifert & Posern, 2017). Die Testung der Tauglichkeit verschiedener Inhibitoren für diese Arbeit erfolgt in Abschnitt 4.2.

1.2 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom gehört aufgrund seiner hohen Prävalenz zu den großen medizinischen Herausforderungen dieses Jahrhunderts (Bray et al., 2018). Mit knapp 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland bildet es die mit Abstand häufigste Krebsentität bei Frauen (Koch-Institut, 2016). Weltweit wurde 2018 rund 2 Millionen Frauen Brustkrebs diagnostiziert, wobei die höchsten Inzidenzen neben Australien in Europa zu finden sind (Bray et al., 2018). Damit erkrankt statistisch eine von acht Frauen in ihrem Leben an Brustkrebs. Hingegen betreffen nur ca. 1 % der Neuerkrankungen Männer. Die Sterblichkeit ist in den letzten Jahrzehnten leicht zurückgegangen. 2016 lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 87 % (Koch-Institut, 2016).

1.2.1 Ätiologie

Das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken wird durch vielfältige Faktoren beeinflusst, welche bis heute Gegenstand der Forschung sind. Neben Umweltfaktoren werden dabei besonders endokrine, endogene aber auch konstitutionelle Faktoren untersucht. Der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms ist das Alter. Dabei steigt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken mit zunehmendem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei 64 Jahren (Koch-Institut, 2016). Eine große Rolle spielen außerdem hormonelle Einflüsse, im Besonderen die des Östrogens. So gilt ein langer hormonell aktiver Zeitraum, das heißt eine frühe Menarche sowie späte Menopause, als Risikofaktor. Eine frühe erste Geburt sowie eine lange Stillzeit sind hingegen als protektive Faktoren bekannt. Die Auswirkung der längerfristigen Einnahme eines oralen Kontrazeptivums wird viel diskutiert. Wahrscheinlich führt dies zu einer geringen Risikoerhöhung für Brustkrebs. Auch Übergewicht, welches zu einem erhöhten Östrogenlevel führt, ist als Risikofaktor festzuhalten.

In 75 % der Fälle tritt Brustkrebs sporadisch auf, wobei ca. 15 bis 20 % der Patientinnen eine Brustkrebsdiagnose im Zusammenhang mit einer positiven Familienanamnese aufweisen. Entsprechend spielen auch diverse genetische und epigenetische Faktoren eine kritische Rolle. Ein prominentes Beispiel dafür sind Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA 1 und 2 (breast cancer 1 und 2), welche mit einem Lebenszeitrisiko für Brustkrebs von 60 % einhergehen. Als weitere Gene, welche bei Mutation mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert sind, sind insbesondere TP53, Her-2/neu oder CHEK2 zu nennen (Scalia-Wilbur et al., 2016).

Ein weiterer unabhängiger Risikofaktor ist eine erhöhte Brustdichte, die mammographisch festgestellt wird (Boyd et al., 2014; Boyd et al., 1998). Dies kann sowohl auf eine Vermehrung des Drüsengewebes, als auch auf ein dichteres Bindegewebe, auch Stroma genannt,

zurückzuführen sein. Diverse Studien zeigen eine 1,8- bis 6-fache Risikoerhöhung durch eine erhöhte Gewebefestigkeit an (Boyd et al., 1998; Vacek & Geller, 2004). Es handelt es sich bei der Brustdichte um einen starken, validen Risikofaktor, welcher für eine große Altersspanne relevant ist (McCormack & Santos Silva, 2006). Die biologischen Hintergründe für diese Assoziation sind noch Gegenstand der Forschung. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Bereiche mit höherer Festigkeit einen erhöhten Collagen-I-Gehalt sowie vermehrt fibrotische Anteile enthalten (Alowami et al., 2003). Auch eine erhöhte Rho-GTPase-Aktivität wurde in festen Tumoren gefunden (Fritz et al., 1999). Außerdem bleibt festzuhalten, dass auch Brusttumoren selbst eine erhöhte Festigkeit aufweisen. Ist das gesunde Brustgewebe mit durchschnittlich 200 Pascal eher weich, so weisen viele Brusttumoren eine Festigkeit von über 3000 Pascal auf (Paszek et al., 2005). Wie genau mechanische Stimuli auf die Induktion und Regulation eines malignen Phänotyps von Brustepithelzellen wirken und welche Signalwege daran beteiligt sind, bleibt aktueller Gegenstand der Forschung (Carey et al., 2017; Chaudhuri et al., 2014; Provenzano et al., 2008). Dies soll mit Hilfe dieser Arbeit untersucht werden.

1.2.2 Histologie

Mammakarzinome bezeichnen epitheliale Neoplasien der Brustdrüse, deren Einteilung anhand der Ursprungsgewebe erfolgt. Danach wird zwischen lobulären, von den Milchdrüsenläppchen ausgehenden und dukталen, vom Milchgangsepithel ausgehenden, Neoplasien differenziert. Darauf aufbauend wurden lange Zeit invasiv dukтale und invasiv lobuläre Mammakarzinome unterschieden. Mit der neuen WHO-Klassifikation 2014 entfiel der Terminus „dukтал“. Stattdessen bilden nun die „invasiven Karzinome ohne speziellen Typ“ („*no special type*“; NST) mit ca. 75% der Mammakarzinome die größte Subgruppe. Diese enthält alle kohäsiv wachsenden Tumorzellverbände mit variabler glandulärer Differenzierung. Davon abzugrenzen sind die invasiven Karzinome mit speziellem Typ. Den größten Anteil innerhalb dieser Gruppe macht das invasiv-lobuläre Karzinom aus. Aufgrund der fehlenden Expression von E-Cadherin zeichnen sich die Zellen dieses Karzinoms durch ein charakteristisches kettenförmiges Wachstum aus. Von den invasiven Karzinomen abzugrenzen sind die *Carcinoma in situ*, welche durch eine klonale Vermehrung von Epithelzellen ohne Überschreitung der Basalmembran charakterisiert sind. Deren häufigster Vertreter, das dukтale *Carcinoma in situ* (DCIS), fällt in 70 % der Fälle durch Mikrokalk-Ablagerungen im Mammographie-Screening auf. Ohne Therapie beträgt das mittlere Zeitintervall zwischen Diagnose des DCIS und invasivem Mammakarzinom 9 Jahre (Collins et al., 2005).

1.2.3 Klinischer Verlauf und Therapie

Das Mammakarzinom fällt in der Regel erst im fortgeschrittenen Stadium durch Symptome auf. Klassisch gehören dazu vor allem das Auftreten von unscharf begrenzten, nicht verschieblichen Knoten. Weiterhin treten Veränderungen der Haut, wie beispielsweise Rötungen, Hauteinziehungen oder Entzündungen auf, aber auch eine Retraktion der Mamille, mamilläre Sekretion und vergrößerte axilläre sowie supraklavikuläre Lymphknoten sind abklärungsbedürftig. In fortgeschrittenen Stadien kann es außerdem zu Exulzerationen kommen. Die Abklärung von suspekten Befunden sollte mittels Mammographie, Sonographie oder Kontrastmittel-MRT erfolgen. Den beiden erstgenannten Verfahren obliegt dabei durch ihre gute Verfügbarkeit die wichtigste Rolle, wobei bei sehr dichtem Brustgewebe die Sonographie das Mittel der Wahl darstellt (Ohuchi et al., 2016). Zur Diagnosesicherung bedarf es einer Mammabiopsie samt histologischer Klassifikation.

Die Therapie des Mammakarzinoms fußt auf drei Säulen. Neben der operativen Therapie, welche häufig primär durchgeführt wird, kommen sowohl eine systemische als auch Strahlentherapie zum Einsatz. Die definitiven Therapie-Algorithmen sind in der „interdisziplinären S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ der deutschen Krebsgesellschaft (DKG) festgelegt. Zusammenfassend zielt die operative Therapie auf die Komplettresektion (R0) des Tumors ab (Moran et al., 2014). Dabei kommen verschiedenen operative Eingriffe in Betracht, welche nach klinischen Parametern, wie dem Brust-Tumor-Verhältnis, aber auch nach dem Wunsch der Patientin ausgewählt werden (Voogd et al., 2001).

Die zweite Therapiesäule stellt die systemische Therapie dar, welche sich jeweils aus drei Komponenten zusammensetzt. Als Chemotherapeutika kommen standardmäßig Anthrazykline und Taxane zum Einsatz. Daneben erfolgt bei Tumoren, die den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2) exprimieren, die Anwendung des monoklonalen HER2-Antikörpers Trastuzumab. Eine Antihormontherapie wird bei Hormonrezeptor-positiven Karzinomen eingesetzt und senkt sowohl die Mortalität als auch das Rezidivrisiko. Als prominentester Vertreter ist der selektive Östrogen-Rezeptor-Modulator Tamoxifen zu nennen. Die Strahlentherapie, als dritte Säule, senkt das Risiko für eine Rezidiventstehung sowie Metastasierung. Sie wird nach einer brusterhaltenden Operation bei allen invasiven Mammakarzinomen eingesetzt, kann jedoch auch zur lokalen Therapie krankheitsbedingter Schmerzen genutzt werden.

1.2.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Ziel ist es mit Hilfe von prognostischen und prädiktiven Faktoren eine möglichst individuelle Therapieentscheidung zu treffen, um den Patientinnen so eine optimale Behandlung zu gewährleisten und Übertherapie zu vermeiden. Während Prognosefaktoren dabei einen Hinweis auf den Verlauf der Erkrankung geben können, dienen prädiktive Faktoren zur Einschätzung des Ansprechens auf eine bestimmte Therapie. Um dies zu ermöglichen, wird versucht die heterogene Gruppe der Mammakarzinome möglichst präzise zu charakterisieren. Die etablierten prognostischen Faktoren werden standardmäßig, vor allem anhand der Tumormorphologie, erhoben. Dazu gehört neben der Tumorgröße, auch der Lymphknotenstatus sowie die Metastasierung. Darauf basierend wurde das System der TNM-Klassifikation entwickelt, nach welchem sich häufig auch die Therapieempfehlung richtet. Daneben spielt auch die Differenzierung der Tumorzellen, das sogenannte *Grading (G1-3)*, eine wichtige Rolle (Elston & Ellis, 2002). Anhand der Anzahl der Mitosen, der Kernpolymorphien und tubulären Strukturen wird der Differenzierungsgrad des Tumors bestimmt, wobei eine fortgeschrittene Differenzierung (G1) mit einer besseren Prognose einhergeht. Neben der histologischen Klassifizierung (siehe 1.2.2) gibt insbesondere der Hormonrezeptorstatus des Karzinoms Aufschluss über dessen Invasivität (Hammond et al., 2010; Wolff et al., 2013).

In den letzten Jahren haben neben diesen klassischen Prognosefaktoren immunhistochemisch ermittelte Tumorcharakteristika Einzug in den Klinikalltag erhalten. Das Expertengremium der St. Gallen Konferenz 2011 und 2013 legte darauf basierend die Einteilung in definierte, molekulare Subgruppen fest (Goldhirsch et al., 2013; Goldhirsch et al., 2011). Die daraus abgeleitete Einteilung in immunhistochemisch bestimmte Subtypen basiert auf der Expression von Hormonrezeptoren, dem HER2-Status sowie des Ki-67-Proliferationsindex. Ki-67 ist ein Protein, welches im Zellkern sich teilender Zellen exprimiert wird. Immunhistochemisch sichtbar gemacht, erlaubt es die Beurteilung der Proliferationsrate des Tumors (Denkert et al., 2013). Ein hoher Proliferationsindex spricht dabei für Malignität und schnelles Tumorwachstum. Durch die präzise Bestimmung des Phänotyps des Tumors wird nicht nur eine noch individuellere Therapieentscheidung, sondern auch eine genauere Abschätzung der Prognose möglich (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). So haben Patientinnen mit Tumoren der Subgruppe Luminal-A ein besseres *Outcome* als Patientinnen mit Tumoren anderer Subgruppen. Des Weiteren werden Luminal-A-Tumoren zumeist nur mit Anti-Hormontherapie behandelt, während solche vom Luminal-B-Typ zusätzlich den Einsatz einer Chemotherapie indizieren.

Tabelle 1: Übersicht der molekularen Subgruppen des Mammakarzinoms. (Modifiziert nach Goldhirsch et al. 2011 und 2013 (Goldhirsch et al., 2013; Goldhirsch et al., 2011))

| Intrinsischer Subtyp | Luminal A | Luminal B | | HER2-enriched | Basal-like |
|------------------------------------|---|---|--|-----------------------------|-----------------------------|
| Immunhistochem. bestimmte Subtypen | Luminal A-like | Luminal B-like | | HER2+ | Tripel negativ |
| | | HER2- | HER2+ | | |
| | ER+ ($\geq 1\%$) PgR+ ($\geq 20\%$) HER2- Ki-67 niedrig (<14%) | ER+ ($\geq 1\%$) HER2- <u>Min 1 von:</u> Ki-67 hoch ($\geq 14\%$) PgR- (<20%) | ER+ ($\geq 1\%$) HER2- Jedes Ki-67 Jeder PgR-Status | ER- PgR- (<20%) HER2+ | ER- PgR- (<20%) HER2- |
| Erwartetes invasives Potential | gering | mittel | mittel | hoch | sehr hoch |

1.3 Dreidimensionale Zellkultur

Seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts sind Forschende in der Lage Zellen außerhalb ihres Ursprungsorganismus zu kultivieren (Schmitz, 2020). Diese, mittlerweile weltweit etablierte, Methode ermöglicht es nicht nur grundlegende zellbiologische Mechanismen zu untersuchen, sondern stellt auch ein wertvolles Werkzeug der klinischen Forschung dar. Die klassische Zellkultur beruht auf dem adhärenenten, zwei-dimensionalen (2D) Wachstum immortalisierter Zellen auf einer harten Oberfläche wie Glas oder Plastik. Zwar weist die 2D Zellkultur viele Vorteile wie u.a. eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf, nichtsdestotrotz handelt es sich um eine artifizielle Methode. Dies ist vor allem dem zwei-dimensionalen Wachstum der Zellen ohne ihre natürliche Umgebung, dem sogenannten *microenvironment*, geschuldet. Letzteres wird vor allem durch die Extrazellulärmatrix (*extracellular matrix*, ECM) gebildet, welche nicht nur der mechanischen Stabilität dient, sondern auch alle chemischen, biologischen und mechanischen Interaktionen einer Zelle mit ihrer Umgebung mediiert. Sie umfasst alle Makromoleküle im Interzellularraum und besteht damit vorherrschend aus Collagen-Fasern, Lamininen, Kohlenhydraten wie Glykosaminoglykanen und löslichen Substanzen wie Elektrolyten. Die Nachahmung der natürlichen ECM in einem künstlichen Zellkulturkontext zeichnet die drei-dimensionale (3D) Zellkultur aus. Diese schlägt die Brücke zwischen der

etablierten, aber artifiziiellen 2D-Kultur und *in vivo* Experimenten, welche durch die Betrachtung eines gesamten Organismus oft eine hohe Komplexität aufweisen. Die 3D-Kultur ermöglicht ein Einwachsen der Zellen in die x-, y- und z-Achse. Dabei werden Zellen von ECM-Proteinen umgeben, um ihre natürliche Umgebung, samt derer biologischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften, nachzuahmen. Neben der Untersuchung von gesunden Zellen und deren Interaktionen, bietet dies die Grundlage, um auch die Ursachen und Abläufe der malignen Transformation von Zellen zu analysieren. So spielen bei der Tumorgenese und Metastasierung häufig auch Interaktionen der Zellen mit ihrer unmittelbaren Umgebung eine entscheidende Rolle (Janmey & Miller, 2011; Wirtz et al., 2011). Um das drei-dimensionale Wachstum von Zellen zu ermöglichen, werden häufig trägerbasierte Systeme angewandt. Bei diesen Trägern handelt es sich um natürliche oder synthetische Matrices, in welchen die Zellen eingebettet werden. So können beispielsweise Matrigel- und Collagen-Gele oder Alginat-, Polyacrylamid- und PEG-basierte Matrices genutzt werden. Die meisten Matrices sind Hydrogele, welche hauptsächlich aus Wasser bestehen. Dieses wird von ebenfalls enthaltenen wasser-unlöslichen Polymeren gebunden, sodass ein drei-dimensionales Netzwerk entsteht. Die Verknüpfung der Polymerstränge erfolgt dabei chemisch oder physikalisch. In der dreidimensionalen Zellkultur von Brustepithelzellen sind im Besonderen Matrigel- sowie Collagen-I-Gele etabliert, worauf im Kapitel 1.3.2 detailliert eingegangen wird.

1.3.1 Festigkeit

Ein großer Vorteil der 3D-Zellkultur ist, dass viele Parameter, wie beispielsweise die Porengröße der Matrix oder das Einbringen ausgewählter ECM-Proteine, exakt angepasst werden können. Ein wichtiger Aspekt, welcher in der 3D-Zellkultur modifiziert werden kann, ist die Festigkeit der Matrix. Im Englischen als „*stiffness*“ bezeichnet, beschreibt die Festigkeit den Widerstand einer Matrix gegenüber mechanischem Stress. Mit Hilfe eines Rheometers lässt sich dieser Widerstand messen und wird häufig als Elastizitätsmodul (*elastic modulus*) in Pascal angegeben (Hebner et al., 2008). Zellen sind in der Lage die mechanischen Eigenschaften und Reize ihrer Umgebung wahrzunehmen. Das Erfassen mechanischer Signale, die Umwandlung in intrazelluläre Prozesse sowie deren reziproke Auswirkung auf die Zellumgebung wird dabei als Mechanotransduktion bezeichnet (siehe Abbildung 3). Mechanosensitive, membranständige Moleküle sind häufig an der Erkennung der physikalischen Stimuli beteiligt. Dazu zählen neben Ionenkanälen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auch die Familie der Integrine, welche mit zwei Glykoproteinketten die Zellmembran durchspannen (Martinac, 2014; Schwartz, 2010). Als Reaktion auf einen mechanischen Stimulus bilden sich in der Zellmembran integrin-assoziierte

fokale Proteinkomplexe, die fokalen Adhäsionen (FA), welche die ECM mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbinden (Bershadsky et al., 2003). Gibt es einen mechanischen Reiz, binden die Integrine mit ihrer extrazellulären Domäne an ECM-Proteine und leiten dieses Signal nach intrazellulär, wo deren β -Untereinheit über Adapterproteine an Aktinfilamente gebunden ist (Tietze et al., 2020). Dadurch wird die Polymerisation und Depolymerisation des Aktins reguliert. Dies induziert mechanosensitive Proteine, wie MRTF-A, die nun in den Zellkern translozieren und die Expression von Genen beeinflussen. Dieser Mechanismus spielt sowohl im physiologischen als auch pathologischen Kontext eine große Rolle. So konnten verschiedene Studien bereits eine erhöhte MRTF-A-Expression bzw. -Aktivität als Reaktion auf eine feste ECM in verschiedenen Zellarten wie murinen Brustepithelzellen oder Osteosarkomzellen beweisen (Dai et al., 2019; Hadden et al., 2017; Johnson et al., 2014; O'Connor et al., 2015).

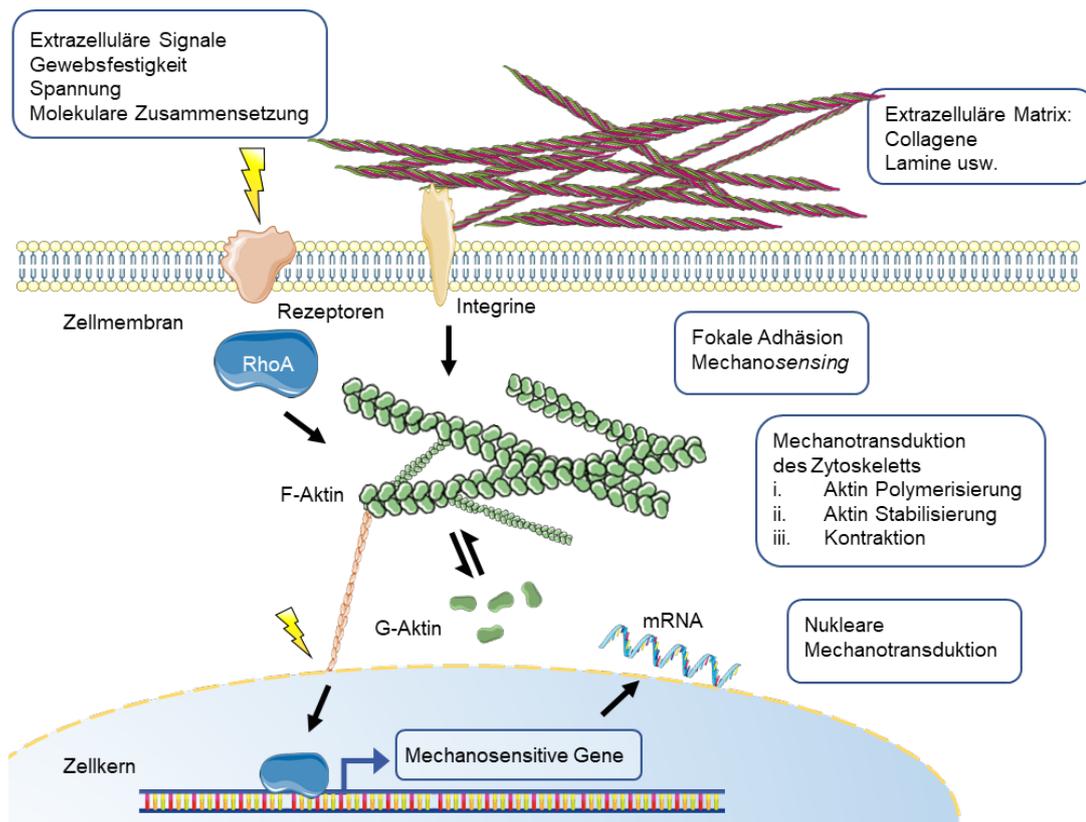


Abbildung 3: Schematische Darstellung ausgewählter Aspekte der Mechanotransduktion. Lebende Zellen sind stetigen mechanischen Stimuli, u.a. durch ihre umgebende ECM ausgesetzt. Mechanosensitive Proteine wie Integrine erkennen diese. Im Zellinneren führen eine Vielzahl mechanotransduktorischer Pfade über das Zytoplasma in den Nukleus. Dabei spielt das Aktinzytoskelett eine zentrale Rolle. Über die Expression mechanosensitiver Gene wird die Expression von Proteinen beeinflusst. Neben dieser *outside-in*-Kaskade sind insbesondere Integrine auch für *inside-out* Prozesse relevant, bei welchen reziprok die umgebende Matrix beeinflusst wird.

Für die gesunde Zelle stellt die Mechanotransduktion ein wichtiges Informationssystem dar, mit dessen Hilfe sie u.a. über ihre Position und Geometrie Auskunft erhält. In vielen Studien konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass strukturelle und mechanische Veränderungen der ECM aktiv zur Tumorgenese beitragen können (Ingber et al., 1981; Lee & Chaudhuri, 2018). So wurde 1964 gezeigt, dass die Implantation eines soliden Metall- oder Plastik-Teils in den Körper eine Tumorformation auslösen kann. Dieser Effekt wurde nicht beobachtet, wenn das gleiche Material in Pulverform verwendet wurde (Bischoff & Bryson, 1964). Seitdem haben Forschende den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Festigkeit der ECM und Tumorgenese weiter untersucht, wobei Paszek *et al.* 2005 eine wegweisende Studie veröffentlichten. Darin konnten sie nicht nur zeigen, dass Brusttumoren fester sind als gesundes Brustgewebe, sondern wiesen

auch eine erhöhte Rho-GTPase-Aktivität in diesen nach (Paszek et al., 2005). Rho GTPasen sind funktionell eng mit den Integrinen verwoben, mediiieren die Integrin-vermittelte mechano-sensitiven Signalkaskade in der Zelle und steuern deren Kontraktilität (Fritz et al., 1999; Schwartz & Shattil, 2000). Außerdem konnten sie mittels verschiedener 3D-Kulturen nachweisen, dass eine feste Matrix auch *in vitro* einen malignen Phänotyp in Brustepithelzellen induziert und dieser ebenfalls mit einer erhöhten Rho-Aktivität einhergeht (Paszek et al., 2005). Der Einfluss von Festigkeit auf Zellen wurde seitdem in diversen Studien unter Nutzung von 3D-Zellkultur untersucht. Die Induktion eines undifferenzierten, malignen Phänotyps von Brustepithelzellen durch eine feste Matrix wurde auch nach Paszek *et al.* vielfach nachgewiesen und weitergehend untersucht (Carey et al., 2017; Chaudhuri et al., 2014; Provenzano et al., 2008; Stowers et al., 2017). Der gleiche Effekt wurde jedoch auch in Zellen anderen Ursprungs, wie beispielsweise in Osteosarkomzellen, untersucht und nachgewiesen (Dai et al., 2019; Miyazawa et al., 2018).

1.3.2 3D-Kulturen von Brustepithel

Wie in 1.2 beschrieben, gehört das Mammakarzinom aufgrund seiner hohen Prävalenz, Sterblichkeit und Heterogenität zu den großen Herausforderungen von Medizin und Forschung. Letztere untersucht dabei nicht nur bereits entartete Zellen, sondern auch gesundes Brustepithel, um grundlegende biologische Mechanismen genau zu verstehen und Anhaltspunkte für die maligne Entartung der Zellen zu gewinnen. Dafür stellt die dreidimensionale Zellkultur eine wertvolle Methode dar. Während Brustepithelzellen in 2D-Kultur adhärent wachsen, rekonstruiert die 3D-Zellkultur die grundlegende Struktur und Funktion des Brustepithels *in vivo*. Die ersten, die Brustepithelzellen dreidimensional kultivierten, waren Emerman und Pitelka 1977. Für ihre Studie kultivierten sie primäre Brustepithelzellen auf Collagen-Gelen und stellten so fest, dass die Zellen, welche auf Glas oder Plastik aufgebracht wurden, adhärent auf der Oberfläche wuchsen, während solche auf schwimmenden Collagen-Gelen dreidimensionale, polarisierte Strukturen bildeten (Emerman & Pitelka, 1977). In nachfolgenden Studien wurde dieser Prozess näher untersucht und festgestellt, dass Brustepithelzellen unter der Voraussetzung des Vorhandenseins von ECM-Proteinen, in sphärische Azini mit hohlem Lumen differenzieren (Barcellos-Hoff et al., 1989; Debnath et al., 2003). Über den Verlauf von 14 Tagen differenzieren Brustepithelzellen, wie MCF10A, in einer Reihe spezifischer Events. In den frühen Stadien der Kultur formieren sich die Zellen zu Clustern, welche von ECM-Proteinen umgeben sind. Nach 5 bis 8 Tagen sind bereits zwei Zellpopulationen innerhalb eines MCF10A Azinus zu unterscheiden: zum einen polarisierte Zellen am äußeren Rand, welche in direktem Kontakt mit der ECM stehen, und zum anderen unpolarisierte Zellen

im Inneren (Hebner et al., 2008). Die basoapikale Polarisierung wird dabei durch apikale Schlussleisten (*tight junctions*) und basale Hemidesmosomen erreicht (Vidi et al., 2013). Ab Tag 8 der Morphogenese gehen die inneren Zellen in Apoptose, was durch eine Expression von Caspase-3 nachgewiesen werden kann. Ab dem Zeitpunkt bleibt eine stabile, hohle Struktur – der Azinus - erhalten. Der Terminus „Azinus“ hat sich dabei als Begriff für epitheliale dreidimensionale Sphäroide etabliert und beschreibt das *in vitro* Korrelat der kleinsten funktionellen Einheit der Brustdrüse, dem Drüsenendstück. Dies ist der Ort der Milchproduktion. Per Definitionem weist ein Azinus ein hohles Lumen auf, wobei dessen partielle oder komplette Füllung als Hinweis auf einen malignen Prozess gedeutet wird (Debnath & Brugge, 2005). Somit kann mit Hilfe der 3D-Kultur bereits phänotypisch zwischen benignem und malignem Brustepithel unterschieden werden und Auslöser sowie Einflüsse der malignen Transformation von Brustepithelzellen untersucht werden (Petersen et al., 1992). Gefüllte, maligne Azini werden aufgrund dessen auch terminologisch unterschieden und häufig nicht als Azini sondern als Sphäroide bezeichnet. Der Einsatz von ECM-Proteinen in der 3D-Kultur von Brustepithelzellen ist essentiell für die MCF10A Aziniformation. Dabei hat sich die Nutzung einer Basalmembranmatrix aus dem aufgereinigten Sekret der murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkomzellen etabliert. Die unter dem Handelsnamen Matrigel™ erwerbliche Matrix enthält verschiedene Komponenten der Basalmembran wie Laminin-111, Collagen IV, Proteoglykane und Entaktin. Als gelierte Matrix ermöglicht es sowohl das vollständige Einbetten der Zellen als auch die Aussaat dieser auf einem Matrigel-Bett und bietet so die Grundlage für eine regelhafte Azinigenese (Debnath et al., 2003; Petersen et al., 1992). Bei der Nutzung von primären Zellen in 3D-Kultur hat sich der Terminus „Organoid“ als Äquivalent zum Azinus der Zelllinien durchgesetzt. Die Organoide werden dabei aus einer Reihe polarisierter luminaler Epithelzellen gebildet, die von kontraktilen Myoepithelzellen umgeben werden. Im Gegensatz zu MCF10A Azini ist ihre Entwicklung zum Zeitpunkt der Kultivierung bereits abgeschlossen (siehe Abbildung 4).

Die 3D-Kultur von Brustepithelzellen ermöglicht es, die Verhältnisse *in vivo* erfolgreich nachzuahmen und stellt damit ein physiologisch relevantes Modell zur Erforschung von Brustkrebs dar.

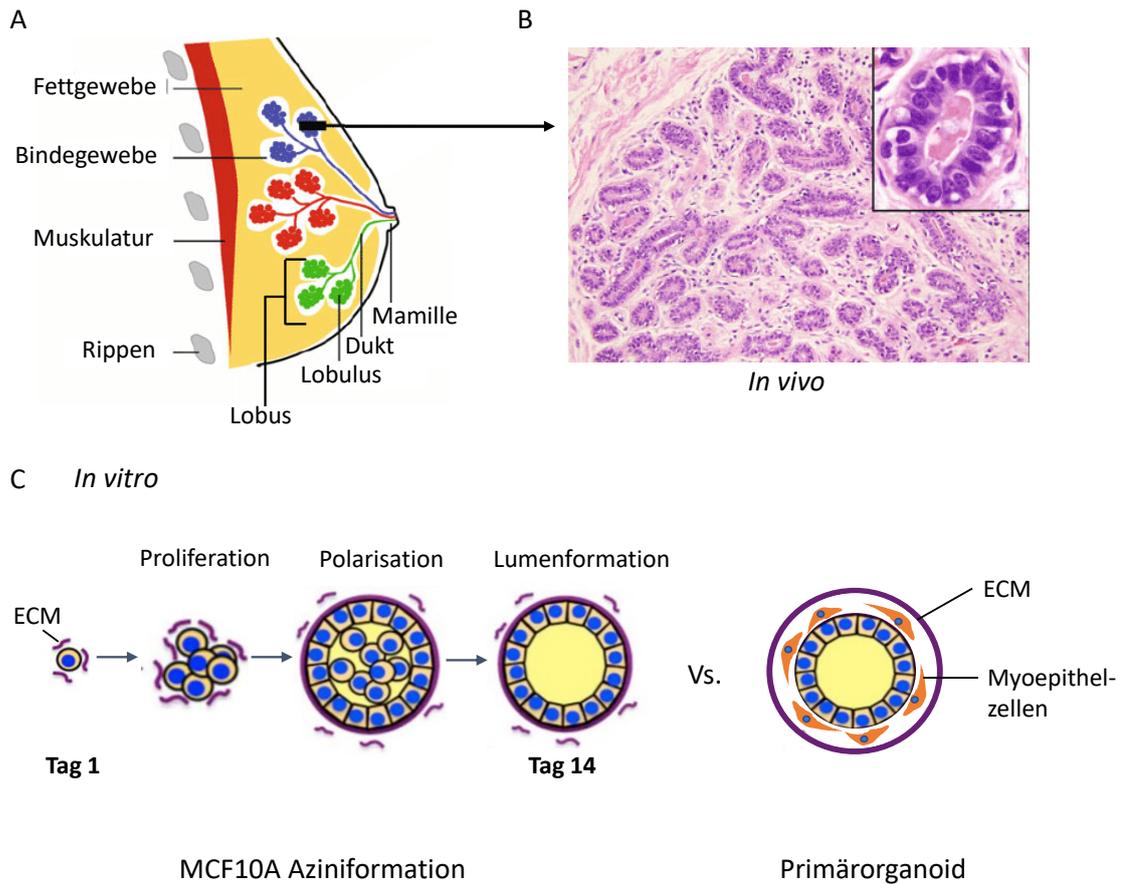


Abbildung 4: Makroskopische sowie mikroskopische Darstellung der Brustdrüse *in vitro* und *in vivo*. A Schematische Darstellung der Anatomie der weiblichen Brustdrüse. Die Drüsenlappen (Lobi glandulae mammariae) der Mamma bestehen aus zahlreichen Drüsenläppchen (Lobuli ~), welche wiederum aus dem Drüsenendstück samt umliegendem Bindegewebe bestehen. B Mikroskopische Abbildung eines Drüsenläppchens gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin. Vergrößert ist ein exemplarisches Drüsenendstück abgebildet. C Schematische Darstellung der MCF10A Aziniformation sowie Primärorganoid *in vitro*. Über den Verlauf von 14 Tagen differenzieren die MCF10A Zellen in 3D-Kultur in einer Reihe von spezifischen Events an deren Ende ein hohler, stabiler Azinus entsteht. Die Primärorganoid sind in ihrer Entwicklung abgeschlossen. Sie werden von einer Reihe kontraktiler Myoepithelzellen umgeben. Modifiziert nach Vidi *et al.* 2013 und Lee *et al.* 2018 (Vidi *et al.*, 2013) (Lee & Chaudhuri, 2018).

2. Zielstellung

Interaktionen zwischen Epithelzellen und ihrer Umgebung haben einen entscheidenden Anteil an der Entstehung und Progression solider Tumoren, so auch beim Mammakarzinom, zu dessen bekannten Risikofaktoren eine erhöhte Brustdichte bzw. Gewebefestigkeit gehört (Boyd et al., 1998). Mittels verschiedener Ansätze konnte eine erhöhte Matrixfestigkeit bereits *in vitro* mit einer gestörten Aziniformation von Brustepithelzellen in Verbindung gebracht werden (Paszek et al., 2005). Die Rolle MRTF-A's, dessen Aktivität als Mechanosensor in Abhängigkeit von der umgebenden Festigkeit variiert, bleibt dabei bisher ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit ist es nun, die wechselseitigen Effekte einer erhöhten Gewebefestigkeit sowie einer variierenden MRTF-A-Aktivität auf humane und murine Brustepithelzellen zu untersuchen. Der Faktor Gewebefestigkeit soll durch verschiedene Matrices, welche sowohl die Festigkeit der gesunden Brust (ca. 200 Pascal) als auch die von Tumorgewebe (> 3000 Pascal) widerspiegeln, analysiert werden. Dazu werden verschiedene trägerbasierte Systeme, wie Matrigel-, Collagen-I-, sowie Polyacrylamidgele untersucht.

Die dabei eingenommene Rolle von MRTF-A soll durch Überexpressions- und Inhibierungsstudien analysiert werden. Eine Überexpression MRTF-A's soll im Mausmodell untersucht werden. Zur Inhibierung des MRTF-SRF-Signalweges wird der Inhibitor CCG 203971 genutzt.

Um ein möglichst breites Bild über die regulatorischen Eigenschaften von MRTF-A zu erhalten, ist die Verwendung von MCF10A Brustepithelzellen, humanen Brustkrebszelllinien sowie primären murinen Mammaorganoiden angestrebt.

Die Effekte von MRTF-A und der Gewebefestigkeit werden primär anhand der Größe, Hohlkugelbildung und Protrusionsneigung der dreidimensionalen Azini analysiert. Immunfärbungen unterstützen diese Analysen und werden zum Nachweis der Expression von MRTF-A, Zielgenen und Markerproteinen herangezogen. Expressionsunterschiede werden auf Protein- und mRNA-Ebene quantifiziert. Zudem steht ein Luziferase-Reporter-Assay zur Bestimmung der transkriptionellen MRTF-A-Aktivität zur Verfügung.

Die Arbeit zielt damit darauf ab, den Einfluss von MRTF-A auf azinare Strukturen um den Einfluss der Gewebefestigkeiten zu erweitern. Potentiell kann die Arbeit erste Hinweise liefern, in welchem Kontext der Einsatz von MRTF-A-Inhibitoren zur Behandlung von entarteten Brustepithelzellen angezeigt ist.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Reagenzien

Tabelle 2: Equipment

| Verwendung | Gerät | Hersteller |
|--------------------------|--|---|
| Agarosegel Dokumentation | Gel Stick | Intas Science Imaging |
| Eismaschine | Eismaschine CB640 | Brema |
| Gewebezerkleinerung | Mcllwain Tissue Chopper | Cavey Laboratory Engineering Co. Ltd |
| Inkubation | Thermomixer comfort Wippschüttler | Eppendorf Assistent |
| Mikroplatten-Reader | Clariostar GloMax 96 Microplate Luminometer /Dual Injectors | BMG Labtech Promega |
| Mikroskope | EVOS XL Core Mikroskop EVOS FL Mikroskop Zeiss Axio Observer 7 Mikroskop mit Apotome | Thermo Scientific Carl Zeiss Jena GmbH |
| Mischer | Lab dancer Magnetic Stirrer Model L-71 Magnetic Stirrer R1000 MR Hei-Standard Vortex-Genius 3 | IKA Labinco Carl Roth GmbH Heidolph IKA |
| PCR Equipment | LightCycler 480 II real-time PCR System T3000 Thermocycler | Roche Biometra |
| pH-Meter | LE409 | Mettler Toledo |
| Rheometer | Modular Compact Rheometer, MCR 502 | Anton Paar |
| Spannungsquellen | Consort EV261 peqPOWER | Peqlab Peqlab |
| Sonifizierer | UTR200 | Hielscher |
| Spektralphotometer | Nanodrop 2000c | Thermo Scientific |
| Vakuumpumpen | Mini-Vac eco 90-6030 | Peqlab |
| Waagen | Kern ABS Kern 572 | Kern&Sohn GmbH Kern&Sohn GmbH |
| Western Blot Detektion | ODYSSEY CLx | LI-CORE |
| Zellkultur | HERAcell 150 HERAsafe Wasserbad Casy Cell Counter | Thermo Scientific Thermo Scientific GFL OMNI Life Science |
| Zentrifugen | Optima TK Ultrazentrifuge Allegra 6KR Centrifuge Allegra X-15-R Centrifuge Centrifuge 5417C Centrifuge 5417R PerfectSpin 24R Refrigerated | Beckman Coulter Beckman Coulter Beckman Coulter Beckman Coulter Eppendorf Peqlab |

| | | |
|--|--|-------------------|
| | Microcentrifuge Sprout Mini-Centrifuge Universal 320 | Biozym Hettich |
|--|--|-------------------|

Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien

| Chemikalie/Reagenz | Katalognummer | Hersteller |
|--|---------------|----------------------------------|
| 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Tris) | 9140/AE15 | Carl Roth GmbH |
| 3-Aminopropyl-trimethoxysilan (3-APTMES) | 2328 | Carl Roth GmbH |
| Acrylamid (40 %) (AC) | A3553 | Sigma-Aldrich |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung | A124 | Carl Roth GmbH |
| Agarose Standard | 3810 | Carl Roth GmbH |
| Albumin Fraktion V, fettsäurefrei (BSA) | 0052.2 | Carl Roth GmbH |
| Albumin-Fraktion vom Rinderserum (BSA) | A7906 | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumpersulfat (APS) | A3678 | Sigma-Aldrich |
| Bis-Acrylamid-Lösung (1 %) (Bis-AC) | M-7279 | Sigma-Aldrich |
| Bromophenol blue | A512.1 | Carl Roth GmbH |
| Desoxynucleotides, Solution Mix | N0447 | New England Biolabs |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | D8418 | Sigma-Aldrich |
| dNTP Solution Mix | N0447S | New England Biolabs |
| Essigsäure | 27225 | Sigma-Aldrich |
| Ethanol, rein | 493511 | Sigma-Aldrich |
| Ethidiumbromid, 1 % | 2218 | Promega/Roth |
| Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) | 8040 | Carl-Roth-GmbH |
| Glutaraldehyd | 820.603 | Sigma-Aldrich |
| Glycerol, 86 % | 3187 | Carl Roth GmbH |
| Glycin | 4043 | Carl Roth GmbH |
| 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethan-sulfonische Säure (HEPES) | H0887 | Sigma-Aldrich |
| Isopropanol | 33539 | Sigma-Aldrich |
| b-Mercaptoethanol | M3148 | Sigma-Aldrich |
| Methanol, rein | 7342 | Sigma-Aldrich/Roth |
| Milchpulver, fettfrei | T145 | Carl Roth GmbH |
| Natriumchlorid (NaCl) | 9265 | Carl Roth GmbH |
| Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 % | 1057 | Carl Roth GmbH |
| Natriumhydroxid (NaOH) | A1551 | Sigma-Aldrich |
| N-Hydroxysuccinimide (NHS) | H7377 | Sigma-Aldrich |
| Paraformaldehyd (PFA) | 0335 | Sigma-Aldrich/Roth |
| N,N,N,N-Tetra-methyl-ethylene-diamin (TEMED) | T9281 | SERVA Elektrophoresis GmbH |
| Salzsäure (HCl), 37 % | 100317 | Sigma-Aldrich |
| Sucrose | S1888 | Sigma-Aldrich |
| ThermoPol Reaction Buffer (10x) | B9004S | New England Biolabs |
| Toluol | 179418 | Sigma-Aldrich |
| Triton X-100 | 3051 | Carl Roth GmbH |
| Tween 20 | 9127 | Carl Roth GmbH |

Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien für die Zellkultur

| Chemikalie/Reagenz | Katalognummer | Hersteller |
|--|---------------|---|
| Antibiotic-Antimycotic (Penicillin/Streptomycin) | 15240-062 | Thermo Scientific/Gibco |
| CCG1423 | S7719 | Selleckchem |
| CCG203971 | 5277 | Tocris Bioscience |
| CCG222740 | S6673 | Selleckchem |
| Doxycyclin | 631311 | Thermo-Scientific |
| Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco DMEM), high glucose | D249 | Invitrogen/Gibco |
| Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco DMEM/F12) | 11320074 | Sigma-Aldrich |
| Epidermal Growth Factor (EGF) | E9644 | Sigma-Aldrich |
| Fetales Kälberserum (FCS) | A11-151 | Life Technologies/PAA |
| FibriCol® | 5133 | Advanced Biomatrix |
| Fibronektin | 10838039001 | Sigma-Aldrich |
| Gentamycin | 15750060 | Thermo Scientific |
| Hydrokortison | H4001 | Sigma-Aldrich |
| Insulin-Lösung | I9278 | Sigma-Aldrich |
| Insulin-Transferin-Selenium (ITS) | I1884 | Sigma-Aldrich |
| L-Glutamin | 25030-081 | Life Technologies/Gibco |
| Matrigel | 354230 | Corning |
| Opti-MEM reduced serum medium (Gibco) | 31985076 | Thermo Scientific |
| Dulbecco's modified Eagle medium (PAN DMEM/F12), mit D-Valin statt L-Valin | P04-03800 | PAN-Biotech |
| Polyethylenimin (PEI)-Lsg. | | Zur Verfügung gestellt von Dr. Anurag Kumar Singh |
| Pferdeserum | H1138 | Sigma-Aldrich |
| PuraMatrix™ Peptidhydrogel | 354250 | Corning |
| Prolaktin | SRP4688 | Sigma-Aldrich |
| Red-Cell-Lysis-Puffer | R7757 | Sigma-Aldrich |
| RPMI-Medium | 21875-034 | Thermo Scientific |
| 0,5% Trypsin-EDTA | 15400-054 | Thermo Scientific |
| 4-Hydroxy-Tamoxifen | T176-10MG | Sigma-Aldrich |

Tabelle 5: Vorgefertigte Lösungen, Assays und Kits

| Chemikalie/Reagenz | Katalognummer | Hersteller |
|---|---------------|-------------------|
| Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay | G7571 | Promega |
| Dual-Glo Luciferase Assay Kit | E1980 | Promega |
| Dynamo Color Flash SYBR green qPCR Kit | F416L | Thermo Scientific |
| Micro BCA Protein Assay Kit | 23225 | Thermo Scientific |
| NucleoSpin RNA XS Kit | 740902.50 | Macherey-Nagel |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | 12165 | Qiagen |

| | | |
|-------------------------|----------|-------------------|
| QIAGEN Plasmid Mini Kit | 12125 | Qiagen |
| QIAGEN RNeasy Mini Kit | 74106 | Qiagen |
| Verso cDNA Kit | AB-1453A | Thermo Scientific |

Tabelle 6: Enzyme

| Name | Katalognummer | Hersteller |
|--------------------|---------------|---------------------|
| Collagenase I | 17104019 | Thermo Scientific |
| Collagenase IV | C4-BIOC | Sigma-Aldrich |
| Dispase | D4818 | Sigma-Aldrich |
| DNase I | D5025 | Sigma-Aldrich |
| Taq DNA Polymerase | M0267X | New England Biolabs |
| Trypsin | T7418 | Sigma-Aldrich |
| Proteinase K | P8107S | New England Biolabs |

Tabelle 7: Größenstandards für Gelelektrophorese und Western Blots

| Name | Katalognummer | Hersteller |
|----------------------------------|---------------|-------------------|
| GeneRuler 100 bp DNA ladder | SM0241 | Thermo Scientific |
| GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder | SM0323 | Thermo Scientific |
| GeneRuler 1kb DNA ladder | SM0313 | Thermo Scientific |
| Precision Plus Protein Standards | 1610374 | BIO-RAD |

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

| Name | Katalognummer | Hersteller |
|---|----------------------|-----------------------|
| Ibidi μ -Slide 8 well | 80826 | Ibidi |
| Immobilon-FL PVDF Membran | IPFL00010 | Merck Millipore |
| Kryoröhrchen | 479-6840 | VWR |
| Menzel Deckgläser | 10275224 | Sigma-Aldrich |
| Matrigen Softslip™ 12 (18 mm coverslips), Easy Coat™, 4 kPa | SS12-EC-4 PK | cell guidance systems |
| Matrigen Softslip™ 12 (18 mm coverslips), Easy Coat™, 0,2 kPa | SS12-EC-0.2 PK | cell guidance systems |
| Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml) | 606180/607107/760107 | Greiner BIO-ONE |
| Plastikware (Zellkulturschalen etc.) | 657160/665102/651160 | Greiner BIO-ONE |
| Parafilm | PC00.1 | Carl Roth GmbH |

3.1.2 Zusammensetzung von Lösungen

Tabelle 9: Puffer und Lösungen

| Verwendungszweck Name | Zusammensetzung |
|---|--|
| Immunfluoreszenz Blockierungslösung | 0,05 % Triton-X 1 % BSA in <i>phosphate buffered saline</i> (PBS) |

| | |
|--|--|
| Permeabilisierungslösung | 10 % fetales Kalbsserum (FCS) in PBS |
| Glycinlösung | 0,5 % Triton-X 100 in PBS |
| Fixierung | 100 mM Glycin in PBS |
| | 2 %/1 % PFA in PBS (pH=7) |
| Western blot <i>Radioimmunoprecipitation Assay</i> (RIPA)-Lyse-Puffer | 1 % Triton X-100 0,1 % SDS 2 mM EDTA 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 200 µg/ml Pefablock 0,5 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Antipain 0,7 µg/ml Pepstatin 10 µg/ml Aprotinin |
| Lämmli-Puffer (Loading dye) | 375 mM Tris-HCl (pH 6,8) 6 Vol.-% SDS 4,8 Vol.-% Glycerol 9 % b-Mercaptoethanol 0,03 % Bromphenolblau |
| Sammelgel | 5 % Acrylamid/Bisacrylamid 127 mM Tris-HCl 4,5 Vol.-% Glycerol 0,1 Vol.-% SDS 0,1 Vol.-% APS 0,1 Vol.-% TEMED |
| Trenngel | 9 % Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris-HCl 0,1 Vol.-% SDS 0,1 Vol.-% APS 0,1 Vol.-% TEMED |
| Laufpuffer | 25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 Vol.-% SDS |
| Transferpuffer | 25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,05 Vol.-% SDS 20 Vol.-% Methanol |
| TBS (pH 7,5) | 20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl |
| TBST | 0,1 Vol.-% Tween 20 in TBS |

| | |
|--|--|
| Blockierungslösung | 5 % fettfreies Milchpulver in TBST |
| Zellkultur | |
| Phosphate Buffer Saline (PBS, pH 7,4) | 2,7 mM KCl 137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ |
| Hank's balanced Salt Solution (HBSS, pH 7-7,4) | 140 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 0,4 mM MgSO ₄ 0,5 mM MgCl ₂ 0,25 mM Na ₂ HPO ₄ 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 0,1% D-Glucose 4 mM NaHCO ₃ |
| MCF10A-Kultivierungsmedium | 5% Pferdeserum 100 ng/ml Cholera toxin 20 ng/ml EGF 0,5 µg/ml Hydrokortison 10 µg/ml Insulin 1x Antibiotic-Antimycotic (100x) in DMEM/F12 (1:1) |
| Assay-Medium | 2% Pferdeserum 100 ng/ml Cholera toxin 0,5 µg/ml Hydrokortison 10 µg/ml Insulin 1x Antibiotic-Antimycotic (100x) in DMEM/F12 (1:1) |
| MCF7-Kultivierungsmedium | 10% FCS 10 µg/ml Insulin 1x Antibiotic-Antimycotic (100x) in DMEM |
| T47D/MDA-MB-468-Kultivierungsmedium | 10 % FCS 1x L-Glutamin (100x) 1x Antibiotic-Antimycotic (100x) In RPMI |
| Gefriermedium | 60 % Kultivierungsmedium 30 % FCS 10 % DMSO |
| Genotypisierung | |
| Lyse-Puffer (pH 8,0) | 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) 5 mM EDTA (pH 8,0) 200 mM NaCl 0,2 % SDS |

| | |
|--|---|
| Tris-Lösung | 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) |
| TAE-Puffer (10x) | 400 mM Tris 10 mM EDTA 50 mM Natrium-Acetat |
| Extraktion und Kultivierung von Primärzellen Organoid-Medium | 0,01 % ITS 5 % FCS 0,05 mg/ml Gentamycin 1x Antibiotic-Antimycotic (100x) 1x L-Glutamin (100x) in DMEM/F12 (PAN) |
| Collagenase-Lösung | 2 mg/ml Collagenase Type IV 2 mg/ml Trypsin 5,0 % FCS 5,0 µg/ml Gentamycin |

3.1.3 Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper

Tabelle 10: Plasmide

| Name | Beschreibung | Referenz |
|-----------|---|---|
| p3D.A-Luc | Die Firefly-Luziferase-Expression wird durch eine dreifache SRF-Bindungsstelle, welche vor einer TATA-Box in pGL3 liegt, kontrolliert. | Zur Verfügung gestellt von Prof. Guido Posern (Geneste et al., 2002; Sotiropoulos et al., 1999) |
| pRL-TK | Die Renilla-Luziferase-Expression steht unter Kontrolle des Herpes Simplex Virus-Thymidinkinasepromotors. Es handelt sich um ein Kontrollplasmid. | Promega GmbH |

Tabelle 11: Oligonukleotide für qRT-PCR

| Name | Nucleotidsequenz (5' – 3'; fw; rev) |
|-------------|--|
| ACTA2 | CGGTGCTGTCTCTATGCC; AGCAGTAGTAACGAAGGAATAGCCA |
| ALAS | CTGCAAAGATCTGACCCCTC; CCTCATCCACGAAGGTGATT |
| GAPDH | ACCCAGAAGACTGTGGATGG; TTCTAGACGGCAGCTCAGGT |
| Integrin α5 | CTTCGGTTTACAGTCCCTCATC; GTTGAGTCCCGTAACTCTGGTC |
| MRTF-A | GAGCCAGACTAGCCGATGAC; CACAGAACCCTGGGACTCAT |

Tabelle 12: Primer für die Genotypisierung

| Name | Nukleotidsequenz (5'-3') |
|-----------|--------------------------|
| Flox #172 | GGCAACGTGCTGGTTATTGT |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| Flox #38 | GGA ^{CTCCACAGGCAGGATATT} |
| Cre #9 | AACATGCTTCATCGTCGG |
| Cre #10 | TTCGGATCATCAGCTACACC |

Tabelle 13: Primäre Antikörper für Western blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

| Primärer Antikörper | Beschreibung | Hersteller | Eingesetzte Verdünnung |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|
| Anti-Integrin α 5 | Rabbit polyclonal | Millipore, Ab1928 | WB 1:500 |
| Anti- α SMA | Mouse monoclonal (1A4) | Sigma, A5228 | WB 1:500 |
| Anti-E-Cadherin | Mouse monoclonal (36) | BD, 610181 | IF 1:200 |
| Anti-MRTF-A | Rabbit polyclonal | Cell signaling, 14760 | WB 1:500 |
| Anti-GAPDH | Rabbit monoclonal | Sigma, G9545 | WB 1:1000 |
| Anti-Tubulin | Mouse monoclonal (DM1A) | Sigma, T9026 | WB 1:500 |
| DAPI, 20 mg/ml | Bindet doppelsträngige DNA | Sigma, 10236276001 | IF 1:10000 |
| Phalloidin-Atto 488 | Bindet Aktinfilamente | Sigma, 49409 | IF 1:100 |
| Phalloidin-Atto 647N | Bindet Aktinfilamente | Sigma, 65906 | IF 1:100 |
| Anti-Laminin V | Rabbit polyclonal | Abcam, ab14509 | IF 1:200 |

Tabelle 14: Sekundäre Antikörper für Western blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

| Sekundärer Antikörper | Hersteller & Katalognummer | Eingesetzte Verdünnung |
|----------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Alexa 488-goat anti-mouse IgG | Molecular Probes, A11001 | IF 1:200 |
| Alexa 546-donkey anti-rabbit IgG | Invitrogen, 10040 | IF 1:200 |
| IRDye680RD-goat anti-mouse IgG | LI-COR, 926-68070 | WB 1:15000 |
| IRDye680RD-goat anti-rabbit IgG | LI-COR, 926-68071 | WB 1:15000 |
| IRDye680CW-goat anti-mouse IgG | LI-COR, 926-32210 | WB 1:15000 |

3.1.4 Zelllinien und Mäuse

Tabelle 15: Zelllinien

| Zelllinie | Herkunft | Charakteristika |
|---------------|--|--|
| MCF10A | Homo sapiens, Brustdrüse, fibrozystische Mastopathie | Epithelial, benigne |
| MCF7 | Homo sapiens, Brustdrüse, Adenokarzinom, pleurale Metastasierung | Epithelial, maligne, Östrogenrezeptor (ER) positiv, Progesteronrezeptor (PR) positiv, HER2 negativ |
| T47D | Homo sapiens, Brustdrüse, duktales Karzinom, pleurale Metastasierung | Epithelial, maligne, ER positiv, PR positiv, HER2 negativ |

| | | |
|-------------------|--|---|
| MDA-MB-468 | Homo sapiens, Brustdrüse, Adenokarzinom, pleurale Metastasierung | Epithelial, maligne, ER negativ, PR negativ, HER2 negativ |
|-------------------|--|---|

Tabelle 16: Mäuse

Alle Mäuse wurden in der Zentralen Tierhaltung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gezüchtet bzw. gehalten (Züchterlaubnis 2-1482). Die Entnahme von Ohrlochstanzen zur Genotypisierung (zentrales Aktenzeichen 42502-3-796 MLU) und die Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation zur Entnahme von Organen und Zellen *post mortem* (internes Tötungszeichen I2M13) wurden durch geschultes Personal (Theresa Porzucek, Dr. Ines Block) entsprechend den genehmigten Verfahren durchgeführt.

| Maus | Charakteristika |
|--|---|
| NMRI (Naval Medical Research Institute) | Wildtyp; Charles River Laboratories |
| R26: MRTF-A fl/wt | Hintergrund: C57BL/6Ncr; Transgene Mäuse, bei denen konstitutiv aktives MRTF-A (Variante $\Delta 3-5$ mit erhöhter Aktivität) in den Rosa26-Locus kloniert wurde. Aufgrund einer eingefügten <i>STOP</i> -Kassette (CAG-loxP-stop-loxP) wird die konstitutive MRTF-A $\Delta 3-5$ Expression unterbunden. |
| R26: CreERT2 ki/wt | Hintergrund: C57BL/6Ncr; Transgene Mäuse bei denen die Expression einer Cre-Rekombinase durch die Gabe von Tamoxifen initiiert wird. |
| R26: CreERT2 ki/wt x R26: MRTF-A fl/wt | Hintergrund: C57BL/6Ncr; Transgene Mäuse bei denen die Expression der Cre-Rekombinase durch die Injektion von Tamoxifen (<i>in vivo</i>) oder durch Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen (<i>in vitro</i> Organoidkultur) initiiert werden. Als Folge wird konstitutiv aktives MRTF-A (Variante $\Delta 3-5$ mit erhöhter Aktivität) exprimiert aufgrund des Verlustes der <i>STOP</i> -Kassette (siehe R26: MRTF-A fl/wt) |

3.2 Methoden

3.2.1. 2D-Kultivierung von Zelllinien

Alle unter 3.1.4. charakterisierten Zelllinien wurden im jeweiligen Kultivierungsmedium (siehe 3.1.2.) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank fand, nach optischer Kontrolle der Konfluenz, ein Passagieren der Zelllinien alle zwei bis drei Tage statt. Nach Abnahme des Mediums wurden die adhärennten Zellen einmalig mit 37 °C warmen PBS gewaschen und mit Hilfe einer zweifach-konzentrierten EDTA-Trypsin-Lösung abgelöst. Nach 5 - 20 Minuten im Brutschrank wurde der Zellsuspension Kultivierungsmedium zugesetzt und die Zellen neu ausgesät (Verhältnis 1:3 – 1:8). Die verbleibende Zellsuspension wurde für alle folgendem Experimente verwendet.

Zur Kryopräservation der Zelllinien wurden diese, nach Behandlung mit Trypsin, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 3 Minuten bei 900 RPM zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Gefriermedium (siehe 3.1.2.) resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Suspensionen wurden langsam mit Hilfe eines Isopropanol gefüllten Containers (*Mr. Frosty*, Nalgene) über Nacht bei – 80 °C eingefroren und anschließend dauerhaft bei -150 °C gelagert. Es erfolgte eine Auftaukontrolle.

3.2.2. 3D-Kultivierung von Zelllinien

Die 3D-Kultivierung der Zelllinien erfolgte auf verschiedenen Matrices, deren Herstellung im Folgenden beschrieben wird. Die Zellzahl in der vorliegenden Zellsuspensionen wurde mittels des CASY Zellzählers bestimmt. Gemäß den Herstellerangaben, wurden 100 µl der Zellsuspension in einem CASY-Röhrchen mit 10 ml CASY-Tone gemischt und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden zur Erhaltung der 3D Strukturen ausschließlich in Assay-Medium (siehe Tab. 9) ausgesät und kultiviert. Bei allen Experimenten wurde das Zellkulturmedium alle zwei bis drei Tage erneuert.

a) Herstellung von Polyacrylamidgele

Die Herstellung der Polyacrylamidgele erfolgte auf chemisch modifizierten Deckgläschen. Dazu wurde die Gläschen zunächst mit NaOH (0,1 M) und darauf mit 3-APTMS überschichtet. Nachdem sie mit deionisiertem Wasser gespült wurde, wurde für 30 Minuten Glutaraldehyd (0,5 % in Wasser) kovalent gebunden. Die Gläschen wurden dreimalig mit deionisiertem Wasser gewaschen, woraufhin die Deckgläschen getrocknet wurden. Fertig beschichtete Deckgläschen wurden entweder direkt genutzt oder für einige Wochen bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Polymerisation der Polyacrylamidgele wurde unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zunächst wurde eine gesättigte NHS-Lösung in Toluol hergestellt. Anschließend wurden Acrylamid, Bis-Acrylamid, Wasser und APS in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Um verschiedene Festigkeiten herzustellen, wurden die Bis-Acrylamid-Anteile variiert (siehe Tabelle 17), wobei das Gesamtvolumen konstant blieb.

Tabelle 17: Volumina der Reagenzien in µl zur Polyacrylamidgel-Herstellung verschiedener Festigkeiten

| | „Supersoft“ | „Soft“ | „Stiff“ | „Superstiff“ |
|-----------------|-------------|--------|---------|--------------|
| Bis-AC (%) | 0,005 % | 0,01 % | 0,2 % | 0,4 % |
| Wasser (steril) | 594, 15 | 589 | 393 | 188 |
| AC | 192,9 | 192,9 | 192,9 | 192,9 |
| Bis- AC | 5,15 | 10,29 | 205,8 | 411,6 |

| | | | | |
|---------------|------|------|------|------|
| APS | 8 | 8 | 8 | 8 |
| TEMED | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NHS | 228 | 228 | 228 | 228 |
| Gesamtvolumen | 1029 | 1029 | 1029 | 1029 |

Nach einer raschen Zugabe von NHS und TEMED, wurde die Lösung gevortext und daraufhin je 140 µl auf eine mit Parafilm ausgekleidete Petrischale pipettiert. Nun wurde je ein Deckgläschen, mit der reaktiven Seite nach unten, mit Hilfe einer Pinzette, auf den Tropfen gelegt, um durch das Gewicht des Glases ein regelmäßiges, flaches Gel zu erhalten. Nach ungefähr 20 min war die Polymerisation erfolgt. Daraufhin wurden die Deckgläschen samt daran haftendem Polyacrylamidgel in eine 12-well-Mikrotiterplatte überführt und mit 1 ml PBS pro Well dreimal für je 5 Minuten gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Fibronectin (5 µg/µl in PBS) bedeckt und bei 4 °C über Nacht in einer 12-Well Platte gelagert. Die Gele wurden mit einer sterilen, fettsäure-freien BSA-Lösung für 30 Minuten überschichtet, einmalig mit PBS gewaschen und anschließend wurden 100.000 Zellen pro Well ausgesät.

b) Herstellung von Matrigel-/FibriCol®-Gele

Bei FibriCol® handelt es sich um eine vorgefertigte Collagen-I-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml und, laut Anbieter, einer Festigkeit von 4000 Pascal. Da das Collagen I in Salzsäure gelöst ist, erfolgt eine Vorbehandlung zum Ausgleich des pH-Wertes. So wurden 8 Teile FibriCol®, 1 Teil 10-faches PBS, 0,5 Teile NaOH (0,1 M) und 0,5 Teile steriles Wasser auf Eis in einem Mikroreaktionsgefäß gemischt. Dadurch wurde ein pH-Wert von 7,2 bis 7,6 erreicht.

Als vergleichbares Gel mit geringerer Festigkeit wurde Matrigel™ eingesetzt. Dieses besteht aus Komponenten der Basalmembran (Laminin-111, Collagen IV, Proteoglykanen und Entaktin). Matrigel wird aus dem aufgereinigten Sekret der murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkomzellen gewonnen und weist, mit einer Proteinkonzentration von ungefähr 10 mg/ml, eine Festigkeit von ca. 100 Pascal auf. Anschließend wurden das vorbereitete FibriCol® und Matrigel entweder pur genutzt oder in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt (siehe Tab. 18).

Tabelle 18: Genutzte Mischverhältnisse von FibriCol® und Matrigel und deren Bezeichnung

| | Matrigel | Mc | MC | mC | Collagen |
|-------------------------|----------|------|------|------|----------|
| Anteil Matrigel | 100 % | 75 % | 50 % | 25 % | - |
| Anteil FibriCol® | - | 25 % | 50 % | 75 % | 100 % |

Für die Versuche wurden 55 µl der jeweiligen Matrix mit der Pipettenspitze in einem Well verteilt, sodass der Boden gleichmäßig bedeckt war. Dabei wurden spezielle 8-Kammer-Platten (µ-Slide 8-Well; Ibidi) mit einer Kammer-Fläche von 1 cm² genutzt. Daraufhin wurden die

Kammern für ungefähr 60 Minuten zum Polymerisieren in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Anschließend wurden entweder 5000 Zellen pro Well ausgesät oder es erfolgte eine Beschichtung der Gele mit Collagen IV. Dazu wurde die Collagen-IV-Lösung mit sterilem HBSS 1:10 verdünnt und die Gele mit 150 µl dieser Lösung pro Well beschichtet. Nach 90 min im Brutschrank wurde diese abgenommen, dreimalig mit HBSS gewaschen und anschließend die Zellen ausgesät.

c) Herstellung von PuraMatrix™-basierten Gelen

PuraMatrix™ besteht aus 16 Aminosäuren (Arg, Ala, Asp) langen Peptiden (10 mg/ml), die unter physiologischen Bedingungen ein dreidimensionales Hydrogel mit einer Porengröße von 50-200 nm bilden.

Um verschiedene Festigkeiten herzustellen, wurde die PuraMatrix™ -Lösung zuerst mittels einer Sucrose-Lösung (13 bzw. 20 %) verdünnt. Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Zellsuspension. Dafür wurde diese bei 900 RPM 3 Minuten zentrifugiert und in Sucrose (10 %) wieder aufgenommen. Vor dem Hintergrund, dass keine Salzionen mehr in der Zellsuspension vorhanden sein sollen, wurden die Zellen nochmals für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in Sucrose (13 %) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Sucrose (13 %; angereichert mit 2 mg/ml Matrigel) verdünnt, um eine finale Konzentration von 12500 Zellen/ml zu erhalten. Nun wurden rasch 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl der verdünnten PuraMatrix™-Lösung vermengt und in ein Well einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Polymerisation der Lösung wurde anschließend durch langsames Zugeben von 150 µl Zellkulturmedium initiiert. Nach ca. 30 Minuten wurden 2/3 des Mediums abgenommen und durch 200 µl frisches Medium ersetzt

d) Verwendung von Matrigen Softslip®-Gelen

Bei den Softslips der Firma Matrigen handelt es sich um Deckgläschen, welche mit einem synthetisch hergestellten Polyacrylamidgel überzogen wurden. Durch Adaption des bis-Acrylamidanteils können die Gele verschiedene Festigkeiten zwischen 0,2 und 50 kPa aufweisen. Für die Experimente wurden Gele mit 200 Pascal (weich) und solche mit 4000 Pascal (fest) ausgewählt. Aufgrund von freien Chinongruppen an der Oberfläche der Gele (EasyCoat™) können diese mit Proteinen beschichtet werden. Für die Experimente erfolgte eine Beschichtung mit Matrigel. Dazu wurde PBS mit 2 % Matrigel angereichert und jedes Gel mit 1 ml dieser Lösung in einer 12-Well Platte überschichtet. Im Brutschank inkubierte die Lösung für mindestens 30 Minuten. Anschließend wurde diese abgesaugt und 100.000 Zellen pro Well in Assay-Medium ausgesät.

3.2.3 Gewinnung von Primärzellen

Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation durch Frau Dr. Ines Block (internes Tötungszeichen I2M13). Anschließend wurden die Brustdrüsen zwei, drei und vier beidseits entnommen und erkennbare Lymphknoten exzidiert. Zur Validierung des Genotyps wurden Ohrproben genommen. Das Gewebe wurde in sterile HBSS-Lösung gelegt und schließlich unter der Sicherheitswerkbank mit Hilfe des McIlwain-Tissue-Choppers bei maximaler Geschwindigkeit sowie Stärke und einer Scheibendicke von 100 µm zerkleinert. Das Schneiden wurde jeweils, bei um 90° gedrehtem Tisch, wiederholt. Das folgende Protokoll zur Gewinnung der Primärzellen ist an den Arbeiten von Sleeman *et al.* und Smalley *et al.* angelehnt (Sleeman *et al.*, 2006; Smalley, 2010). Das zerkleinerte Brustgewebe einer Maus wurde nun in 10-15 ml Collagenase-Lösung überführt und anschließend für 30-40 Minuten, bei gelegentlichem Schütteln, im Brutschrank inkubiert. Darauffolgend wurde die Lösung zentrifugiert, in 5 ml PAN-Medium mit FCS (10 %) resuspendiert und anschließend wieder zentrifugiert. Um Blutbestandteile, wie Erythrozyten, zu entfernen, wurde das Pellet 1-2x in 2 ml Red-Cell-Lysis-Puffer aufgenommen und nach 5 Minuten wieder zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 8 ml PAN-Medium mit 10% FCS und Zentrifugation. Das Pellet wurde in 3 ml PAN-Medium mit 10% FCS resuspendiert, die gesamte Lösung in ein Well einer 6-well-Mikrotiterplatte pipettiert und diese für 40 Minuten in den Brutschrank gestellt. Schließlich wurde die Zellsuspension unter Ausschluss adhärenter Fibroblasten wieder aufgenommen und zentrifugiert. Nach Resuspension in 3 ml PAN-Medium, erfolgte die Zugabe von DNase I (1µg/ml), welche für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert wurde. Abschließend wurde die Zellsuspension ein letztes Mal zentrifugiert und schließlich das Pellet in Organoid-Medium, welchem 2 % Matrigel zugesetzt wurde, aufgenommen. Nun folgte die Aussaat der Organoide auf die vorbereitete 3D-Matrix. Eine Behandlung mit 0,25 µM 4-OH-Tamoxifen oder 20 µM CCG203971 erfolgte 16-24 Stunden nach der Aussaat. Die Organoide verblieben für fünf bis sechs Tage in Kultur, wobei alle ein bis zwei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Das Zentrifugieren erfolgte bei allen Schritten bei 250 RFC für drei Minuten.

3.2.4 Western Blot

Zur Isolation von Proteinen wurden die Zellen einmalig mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 350 µl RIPA-Lyse-Puffer für eine kleine Zellkulturflasche (T25) bzw. von 100 µl für eine 6-well-Mikrotiterplatte. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die

Zellen abgeschabt und die Zellysate in Mikroreaktionsgefäße überführt. Abschließend erfolgte das Sonifizieren der Proben für ein bis zwei Minuten bei 20 °C.

Zur Quantifizierung der Proteinmenge in den Lysaten wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay), unter Nutzung des *Micro BCA Protein Assay Kits* den Herstellerangaben folgend angewandt.

Die für den Western Blot benötigten SDS-Polyacrylamid-Gele wurden, wie im Abschnitt 3.1.2 aufgeführt, hergestellt. Die sonifizierten Lysate wurden bis zur Nutzung bei -20 °C aufbewahrt und schließlich auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde Lämmli-Puffer hinzugegeben und die Proben für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Vor dem Laden erfolgte ein einmaliges Zentrifugieren der Proben bei 15000 RPM für 30 Sekunden. Die Taschen der Gele wurden mit maximal 60 µl Lysat beladen und die Proteine bei 130 V für ungefähr 70 Minuten aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran für 90 Minuten bei 100 V. Nach Ende des Transfers wurde die Membran ggf. geschnitten und für eine Stunde bei RT in Blockierungslösung (siehe Tab. 9) inkubiert. Die primären Antikörper in Blockierungslösung (siehe Tab. 13) wurden über Nacht bei 4 °C auf die Membran aufgebracht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBST für je 10 Minuten gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 14) in Blockierungslösung inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurde das Signal mittels des Odyssey CLx-Systems von LiCor detektiert. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe der Software Image Studios von LiCor.

3.2.5 RNA-Isolation und qRT-PCR

Die Isolation von RNA aus Zellen bzw. Organoiden erfolgte gleichermaßen wie die in 3.2.4. beschriebene Extraktion von Proteinen. Statt RIPA-Lyse-Puffer wurde jedoch RLT-Puffer (aus dem *Qiagen RNeasy Mini Kit*) verwendet. Die Lysate wurden nicht sonifiziert und bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

Im ersten Schritt erfolgte die Aufreinigung der RNA mit Hilfe des *Qiagen RNeasy Mini Kits*. Dazu wurde das Protokoll des Herstellers befolgt, jedoch zusätzlich ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde die Membran der Trennsäule mit rDNase in 10-fach Puffer (beide Bestandteil des *NucleoSpin XS RNA Kits*) für 15 Minuten inkubiert. Die RNA-Konzentration wurde schließlich mit Hilfe des Nanodrops gemessen. Die RNA wurden ggf. bei -80 °C aufbewahrt. Es folgte anschließend ein Verdünnen dieser mit RNase-freiem Wasser, um 1 µg RNA in jedem cDNA Syntheseansatz zu erhalten. Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des *Verso cDNA Synthesis Kits* entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung von Oligo dt Primern durchgeführt.

Mittels der cDNA wurde, unter Verwendung des *DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kits* und den Herstellerangaben folgend, eine quantitative PCR durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurde 5 ng cDNA eingesetzt sowie die im Abschnitt 3.1.3 aufgeführten Primer. Die qRT-PCR wurde von dem LightCycler 480 ausgeführt. Die Berechnung der relativen Genexpression wurde mit Hilfe der 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode nach Livak und Schmittgen durchgeführt (Livak & Schmittgen, 2001). Als konstitutiv exprimierte Kontrollgene wurden ALAS und GAPDH bestimmt und zur Normalisierung verwendet.

3.2.6 Genotypisierung

Die Genotypisierung von murinen Proben erfolgte entweder aus Exzisionen des Ohrs oder aus fünf Tage kultivierten Brustepithelorganoiden. Im ersten Schritt wurden die Proben in 400 μ l Lyse-Puffer mit 2 μ l Proteinase K vollständig lysiert. Nach zehn-minütigem Zentrifugieren bei 14000 RPM, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und mit 400 μ l eiskaltem Isopropanol versetzt. Die Proben wurden erneut 10 min bei 14000 RPM zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das gewonnene DNA-Präzipitat wurde bei RT getrocknet und vorsichtig in 20 μ l Tris-Lösung (siehe Tab. 9) resuspendiert. Zuletzt wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des Nanodrops gemessen.

Die DNA wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l verdünnt. Anschließend wurden die PCR zum Nachweis der Wap-Cre- und der geflochtenen MRTF-A-Kassette durchgeführt. Der jeweilige Reaktionsansatz mit zugehörigem Temperatur-Protokoll sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Reaktionsansatz und Temperaturprogramm zum Nachweis der Wap-Cre und MRTF-A-Kassette

| Reagenzien | Nachweis MRTF-A | Nachweis Wap-Cre |
|--------------------------------|---|--|
| | Volumen in μ l | |
| DNA | 3,0 | 3,0 |
| Dest. water | 12,8 | 13,3 |
| 10X Thermo Pol Puffer | 2 | 2 |
| dNTPs | 0,5 | 0,5 |
| Forward primer (siehe Tab. 11) | 0,5 | 0,5 |
| Reverse primer (siehe Tab. 11) | 0,5 | 0,5 |
| DMSO | 0,5 | |
| Taq DNA Polymerase | 0,2 | 0,2 |
| Temperaturprogramm | 94 °C 5 Minuten, 34x [94 °C 30 sec, 57 °C 30 sec, 68 °C 90 sec], 68 °C 5 Minuten, 4°C | 95°C 3 min, 35X [95°C 30 sec, 56°C 30 sec, 68°C 40 sec], 68°C 5 min, 4°C |

| | | |
|-----------------------|--|--------|
| erwartete Bandengröße | Mit Stop-Kassette: 1500 bp Ohne Stop-Kassette: 600 bp | 500 bp |
|-----------------------|--|--------|

Als Negativkontrolle fand Wasser Verwendung, währenddessen als Positivkontrolle eine bekannt positive DNA-Probe genutzt wurde.

Für die abschließende Gel-Elektrophorese wurden 1%ige Agarose Gele (1g Agarose/100 ml TAE-Puffer + 2 µl Ethidiumbromid) verwendet. Die PCR-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, geladen und für 35 Minuten bei einer Spannung von 90 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde die *GeneRuler 1kb DNA ladder* verwendet. Die Detektion des Ethidiumbromidsignals erfolgte mittels des *Gel sticks*.

3.2.7 Immunfluoreszenz

Die immunfluoreszente Anfärbung von Zellen bzw. Organoiden erfolgte in den zuvor beschriebenen 8-Kammer-Platten (µ-Slides; Ibidi). Die Zellen/Organoide wurden, nach Abnahme des Mediums, mit PFA in PBS (2 %) für 20 Minuten bei RT fixiert. Nach einem Waschschriff mit 400 µl PBS wurden die Zellen in 200 µl Triton X-100 (2 %) pro Well für 10 Minuten bei 4 °C permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimalig für je 10 Minuten mit Glycinlösung gewaschen und für mindestens 1 Stunde bei RT mit Blockierungslösung bedeckt. Die Zellen wurden über Nacht in 60 bis 80 µl Antikörperlösung (siehe Abschnitt 3.1.4) pro Well bei 4 °C inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde abgenommen und die Zellen drei Mal für je 20 Minuten bei RT mit Blockierungslösung gespült. Die Zellen wurden nun mit dem sekundären Antikörper, Phalloidin und DAPI in Blockierungslösung (siehe Tab. 13, 14) inkubiert. Nach 60 min bei RT wurde die Antikörperlösung entfernt und die Kammern erneut dreimalig mit PBS bei RT für je 5 min gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit 400 µl PFA in PBS (1 %) pro Well bedeckt und so bei 4 °C gelagert. Für die Mikroskopie wurden der Zeiss Axio Observer 7 genutzt. Die Analyse der Bilder erfolgte mit der Fiji Software (Schindelin et al., 2012).

3.2.8 Luziferase-Assay

Zur Bestimmung der MRTF-SRF-Aktivität wurde das *Dual-Luciferase® Reporter-Assay System Kit*, das SRF-Reporter-Plasmid (p3D.A-Luc) und das SRF-unabhängige Renilla-Luziferase-Plasmid (pRL-TK) verwendet (siehe Abschnitt 3.1.4).

Zunächst wurden 300.000 Zellen pro Well in eine 12-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und am darauffolgenden Tag nach einem Mediumwechsel transfiziert. Gegebenenfalls erfolgte die Zugabe von Inhibitoren (siehe Tabelle 4). In einem Mikroreaktionsgefäß wurden pro Well 50 µl

Opti-MEM mit 1 µg DNA gemischt (200 ng pRL-TK + 800 ng p3D.A-Luc). In einem zweiten Mikroreaktionsgefäß wurden pro Well 50 µl Opti-MEM mit 3 µl PEI vermischt. Nach einer Wartezeit von 5 Minuten bei RT wurden beide Lösungen vermengt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Zuletzt wurden in jedes Well 100 µl dieses Gemisches pipettiert.

Nach 24 bis 30 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen in 200 µl pro Well 1x *Passive Lysis Buffer* aus dem *Dual-Luciferase® Reporter-Assay System* Kit lysiert. Die 12-well-Mikrotiterplatte wurde bei -20 °C gelagert. Zur Messung der Luziferase-Aktivität wurden den Herstellerangaben folgend 30 µl des Lysates in ein Well einer *non-binding* 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und die biolumineszenten Signale mit Hilfe der GloMax 96 Mikroplatten Luminometers bestimmt. Zur Auswertung erfolgte die Normalisierung der Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität.

3.2.9 Cell Viability Assay

Zur Bestimmung metabolisch-aktiver Zellen wurde der *Cell Titer Glo Cell Viability Assay* Kit verwendet. Den Herstellerangaben folgend, wurden die Zellen in einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät. Anschließend wurden die Inhibitoren sowie 20 µl der *Cell Titer Glo* Reagenz zugegeben. Nach 2 Stunden im Inkubator erfolgte die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe des Clariostar Mikroplatten-Readers.

3.2.10 Rheometrische Messungen

Die Messung der Festigkeit der Polyacrylamidgele, deren Herstellung unter 3.2.2. beschrieben ist, erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Mario Beiner des Fraunhofer IMWFs. Mit Hilfe des Rheometers wird dabei der Widerstand der Matrix gegenüber mechanischem Stress gemessen und als Verlust- sowie Speichermodul ausgegeben. Aus diesen beiden Größen lässt sich das Elastizitätsmodul, eine etablierte Größe zur Beschreibung der Festigkeit eines Gewebes, in Pascal berechnen.

Dazu wurden die Polyacrylamidgele auf Deckgläschen (25 x25 mm) hergestellt und in PBS gelagert. Die Gele wiesen eine Dicke von 0,7 bis 1,4 Millimeter auf. Das Rheometer wurde anschließend auf 37 °C erwärmt und pro Messung je ein Polyacrylamidgel zwischen die parallelen Platten des Gerätes gelegt. Der mechanische Widerstand der Gele wurde nun bei 37 °C unter konstanter Dehnung (*strain*) in einem Frequenzbereich (*frequency sweep*) von 0,1 bis 100 rad/sec gemessen. Dabei wurde bei den festeren Gelen („*superstiff*“ und „*stiff*“), eine Kraft von 3 Newton angewandt, währenddessen die weichen Gele („*supersoft*“ und „*soft*“) mit 1 Newton gemessen wurden. Des Weiteren erfolgte die Messung der weichen Gele in einem

Frequenzbereich von 100 bis 0,1 rad/sec, da sich diese zum Ende der Messung auf Grund der fehlenden Luftfeuchtigkeit stark zusammenzogen und härteten. Die Messwerte wurden mit dem Programm Anton Paar RheoCompass™ ausgegeben. Unter der Annahme einer Poissonzahl von 0,5 ließ sich das gesuchte Elastizitätsmodul (E) mit folgender Gleichung berechnen: $E = G \times 2(1+0,5)$. Dabei entspricht die Größe G dem Speichermodul (siehe auch (Chaudhuri et al., 2014)).

3.2.11 Statistische Auswertung & Darstellung

Die dargestellten Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen, biologischen Replikaten. Dabei werden die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit Microsoft Excel unter Nutzung des ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test. Ein Effekt wurde als signifikant ab einem $p \leq 0,05$ angenommen und mit einem * gekennzeichnet. Die dargestellten Abbildungen entstanden unter Nutzung von Graphiken von <https://smart.servier.com/>.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung geeigneter Zellmodelle

4.1.1 Rekombinante MCF10A Zelllinie

Durch die Studie von Seifert & Posern konnte die bedeutende Rolle von MRTF-A, und dessen präziser Regulierung, für die zweiwöchige Azinigenese in MCF10A Brustepithelzellen nachgewiesen werden (Seifert & Posern, 2017). Ziel dieser Arbeit war es nun, diese Kenntnisse um den Einfluss der Gewebefestigkeit auf die Azinigenese und MRTF-A-Expression weitergehend zu untersuchen. Für erste Untersuchungen stand eine stabile rekombinante MCF10A Zelllinie (genannt MCF10A FI_Mal_HA) zur Verfügung, bei der Doxycyclin-abhängig die Expression des murinen MRTF-A (MAL, *full length* + *HA-tag*) induziert werden kann. Als Kontrolle (genannt MCF10A leer) stand eine Leervektor-Kontrolle (pCW57.1, Addgene) zur Verfügung. Im ersten Schritt wurde nun die Induzierbarkeit durch Doxycyclin untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst in 2D für 24 bzw. 48 Stunden mit und ohne Doxycyclin (Konzentrationsbereich 0 bis 50 µg/ml) kultiviert und die Effekte auf die MRTF-A-Proteinexpression und die Vitalität der Zellen untersucht (Abbildung 4). Auf Proteinebene konnte eine graduelle Zunahme der MRTF-A-Proteinmenge mit steigender Doxycyclin-Konzentration für die MCF10A FI_Mal_HA Linie gezeigt werden, wobei für die MCF10A leer Linie keine starke Veränderung der Proteinkonzentration detektiert wurde (Abbildung 5 A und B). Bereits eine Induktion von MCF10A FI_Mal_HA mit 0,5 µg/ml Doxycyclin ist suffizient, um eine circa 5-fach erhöhte Expression zu erreichen. Diese Erhöhung würde ausreichen, um die während der Azinigenese in Wildtyp MCF10A Zellen detektierten MRTF-A Schwankungen nachzuahmen (Seifert & Posern, 2017). Ab 10 µg/ml Doxycyclin wurde eine bis zu 10-fach erhöhte Expression detektiert, wobei die Zellvitalität signifikant um 31% abnahm (Abbildung 5C). Ob diese Abnahme an metabolisch aktiven Zellen auf zytotoxischen Effekten des Doxycyclins beruht oder durch eine MRTF-A induzierte Apoptose verursacht wurde, ist nicht bekannt.

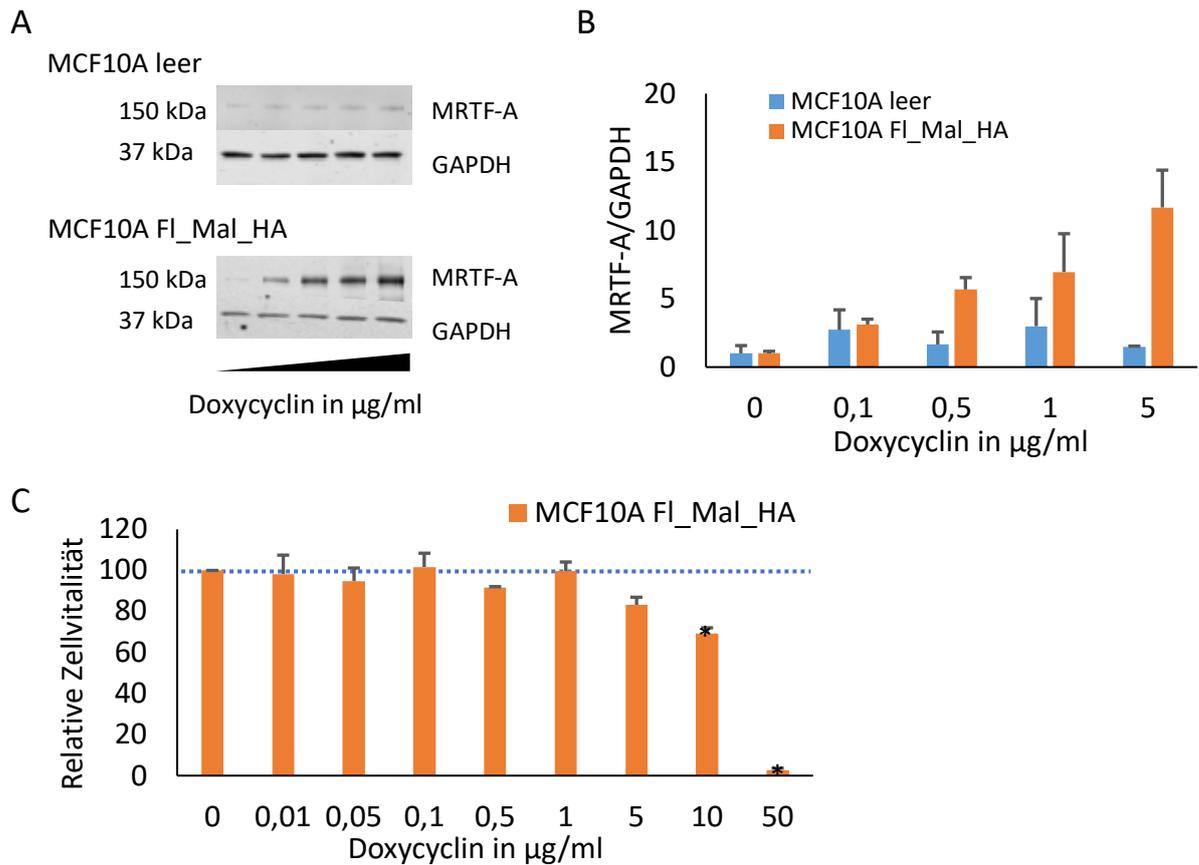


Abbildung 5: Induktion von MRTF-A und Effekte auf die Zellvitalität von rekombinanten Zelllinien in 2D-Kulturen. Die MCF10A FI_Mal_HA Zelllinie wurde für 24 h (n=3) und die MCF10A leer Zelllinie wurde für 48 h (n=2) mit Doxycyclin in den abgebildeten Konzentrationen kultiviert. Veränderungen der MRTF-A-Proteinexpression relativ zur GAPDH-Expression wurden mittels Western Blot visualisiert (**A**) und quantifiziert (**B**). **C** Die Abnahme der relativen Zellvitalität von 100% (blau-gestrichelte Linie) der MCF10A FI_Mal_HA Zellen in Abhängigkeit von einer steigenden Doxycyclinkonzentration wurde ermittelt. Eine signifikante Abnahme wurde ab 10 µg/ml Doxycyclin detektiert. *p<0.05. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD.

Um die Funktionalität der rekombinanten Zelllinien auch im 3D-Kontext zu überprüfen, wurden diese auf Matrigel ausgesät und die MRTF-A-Expression für 48h mit Doxycyclin verschiedener Konzentrationen induziert. Dabei wurde, auf Grundlage der Versuche in 2D (Abbildung 5), ein Konzentrationsbereich von 0,1 bis 5 µg/ml Doxycyclin gewählt. Es bestätigte sich die Induktion von MRTF-A mit steigender Doxycyclin-Konzentration. So konnte durch eine Behandlung mit 5 µg/ml Doxycyclin eine etwa 4-fach erhöhte MRTF-A-Proteinmenge erreicht werden (Abbildung 6 A und B). Des Weiteren wurde die Auswirkung der MRTF-A Expression auf die Aziniformation beurteilt. Innerhalb der 48-stündigen Behandlung zeigen sich nur minimale Unterschiede in der Azinigröße (Abbildung 6 C und D), wie in diesem frühen Stadium zu erwarten war. Die Analyse

der vollständigen 14-tägigen Azinigenese gestaltete sich schwierig, da die MCF10A FI_Mal_HA Zelllinie nicht reproduzierbare Ergebnisse im 3D-Kultur zeigte und mehrfach eine Apoptose-Induktion in Abwesenheit von Doxycyclin beobachtet wurde. Erste Quantifizierungen der MRTF-A mRNA-Expression mittels qRT-PCR im 2D-Kulturmodell, weisen auf eine stark heterogene und erhöhte *leaky* Expression hin, wobei die MRTF-A mRNA-Expression in MCF10A FI_Mal_HA Zellen um das 2,5- bis 40-fache im Vergleich zu MCF10A leer oder MCF10A Wildtyp Zellen erhöht war (Daten nicht dargestellt). Daher wurde von einer weiteren Arbeit mit diesem Zellmodell abgesehen.

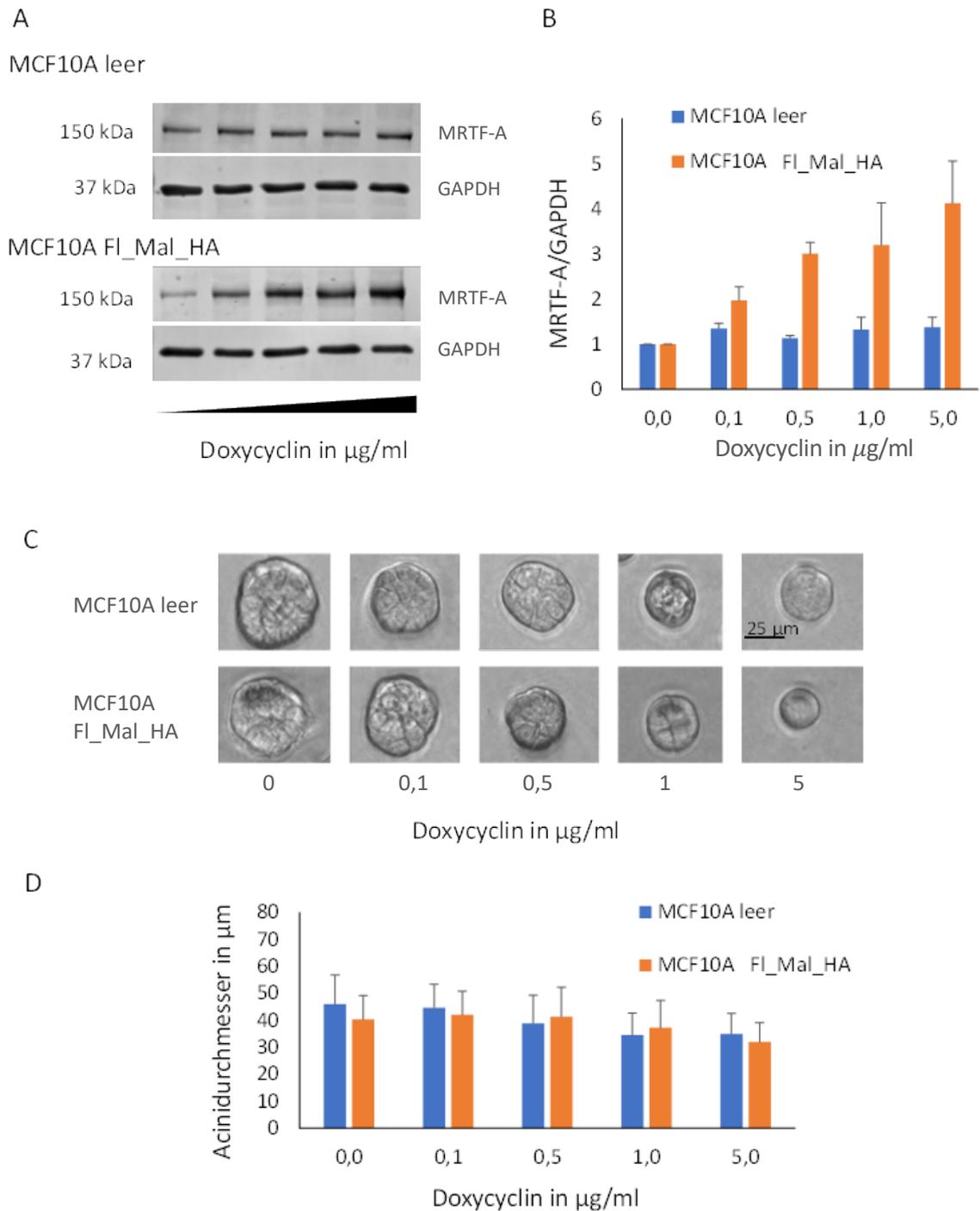


Abbildung 6: Induktion von MRTF-A und Effekte auf die Azinimorphologie in rekombinanten Zelllinien in 3D-Kultur. **A** Beide MCF10A Zelllinien wurden auf Matrigel ausgesät und für 48 h mit Doxycyclin (Konzentrationen von 0 – 5 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Mittels Western Blot konnte eine Induktion von MRTF-A mit steigender Doxycyclin-Konzentration gezeigt werden. **B** Die Quantifizierung der Signale im Western Blot zeigt eine Überexpression von MRTF-A in MCF10A FI_Mal_HA nach Behandlung mit Doxycyclin. In der Kontrollzelllinie MCF10A leer bleibt die MRTF-A-Expression konstant. **C** Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen von 48h alten Azini mit Doxycyclin-Behandlung. **D** Quantifizierung der Größe der Azini in μm . Für jede Bedingung wurden min. 30 Azini vermessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

4.1.2 Brustkrebszelllinien

Bereits 2009 konnte gezeigt werden, dass MRTF-A bei der Metastasierung von Brustkrebs eine wichtige Rolle spielt. So wurde in MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen, dass eine Verminderung der MRTF-A-Expression die Motilität und Invasivität dieser Brustkrebszellen reduziert (Medjkane et al., 2009). Vor diesem Hintergrund sollte der Zusammenhang zwischen MRTF-A und Gewebefestigkeit nicht nur in benignem Brustepithel, wie in den in 4.1.1 beschriebenen MCF10A, sondern auch in malignen Zellen untersucht werden. Im ersten Schritt wurden drei potentiell geeignete Brustkrebszelllinien auf ihre MRTF-A-Expression in 2D-Kultur hin geprüft. Die Zelllinien MCF7, T47D und MDA-MB-468 wurden unter 3.1.4 näher charakterisiert. Sowohl MCF7 als auch T47D zeigen auf Proteinebene eine geringere MRTF-A-Expression im Vergleich zu MCF10A Zellen (Abbildung 7 A). Im nächsten Schritt wurde die Fähigkeit zur Sphäroidbildung in 3D-Kultur untersucht. Ausgesät auf Matrigel, konnte beobachtet werden, dass nur MCF7 und T47D Sphäroide bilden (Abbildung 7 B). Damit bieten nur diese zwei Zelllinien ein geeignetes Modell, um die Effekte von Festigkeit und MRTF-A im dreidimensionalen Kontext zu analysieren.

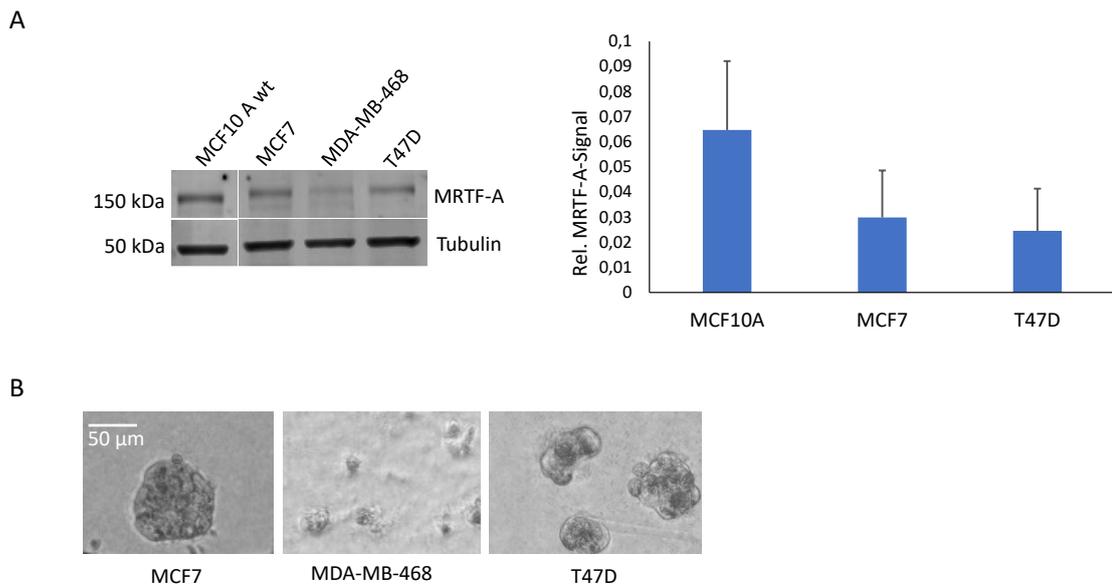


Abbildung 7: Analyse der MRTF-A-Expression und Sphäroidbildung in MCF7, MDA-MB-468 und T47D. **A** Repräsentativer Western Blot aus Zellen in 2D-Kultur und Quantifizierung des MRTF-A-Signals normalisiert zum Tubulin-Signal. Die MRTF-A-Expression in MCF7 und T47D ist nicht signifikant geringer als in MCF10A. **B** Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen von 14 Tage alten Sphäroiden auf Matrigel. Nur MDA-MB-468 zeigen keine Sphäroidbildung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

4.2 Etablierung geeigneter MRTF-Inhibitoren

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von Gewebefestigkeit auf die Azinogenese in Brustepithel und die dabei inhärente Rolle von MRTF-A hin zu untersuchen. Die rekombinante MCF10A-Zelllinie, welche eine induzierbare Überexpression von MRTF-A aufweist, erwies sich als nicht funktional (siehe 4.1.1). Vor diesem Hintergrund wurde die Nutzung von MRTF-SRF-Inhibitoren etabliert. Die Entwicklung verschiedener solcher Inhibitoren wurde im Kapitel 1.1.3 beschrieben. Hier sollen nun diese MRTF-SRF-Inhibitoren getestet werden, um deren Funktionalität in 2D-Kultur zu überprüfen.

4.2.1 CCG 1423

Um die Wirkung von CCG 1423 in MCF10A nachzuvollziehen, wurden die Zellen für 48 Stunden mit dem Inhibitor behandelt. In zweidimensionaler Kultur, wurde die Zellvitalität sowie die Expression von MRTF-A und seinen Downstream-Effektoren auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Der Anteil an metabolisch aktiven MCF10A Zellen nahm mit zunehmender Konzentration signifikant um bis zu 60 % ab (Abbildung 8 A). Die Toxizität von CCG 1423 ist also nicht zu vernachlässigen. Weder im Western Blot noch in der qRT-PCR konnte eine signifikante Reduzierung von MRTF-A oder ausgewählten *downstream*-Proteinen des MRTF-SRF-Signalweges wie Integrin $\alpha 5$ und α *smooth muscle actin* (SMA) detektiert werden (Abbildung 8 B, C). Dies könnte zum einen auf die kurze Zeit der Behandlung zurückzuführen sein. Zum anderen könnte die Protein- bzw. mRNA-Expression durch den Inhibitor nicht beeinträchtigt sein, da dieser vor allem die Aktivität des MRTF-SRF-Signalweges beeinflusst. Nichtsdestotrotz wurde von einer weiteren Nutzung dieses Inhibitors abgesehen.

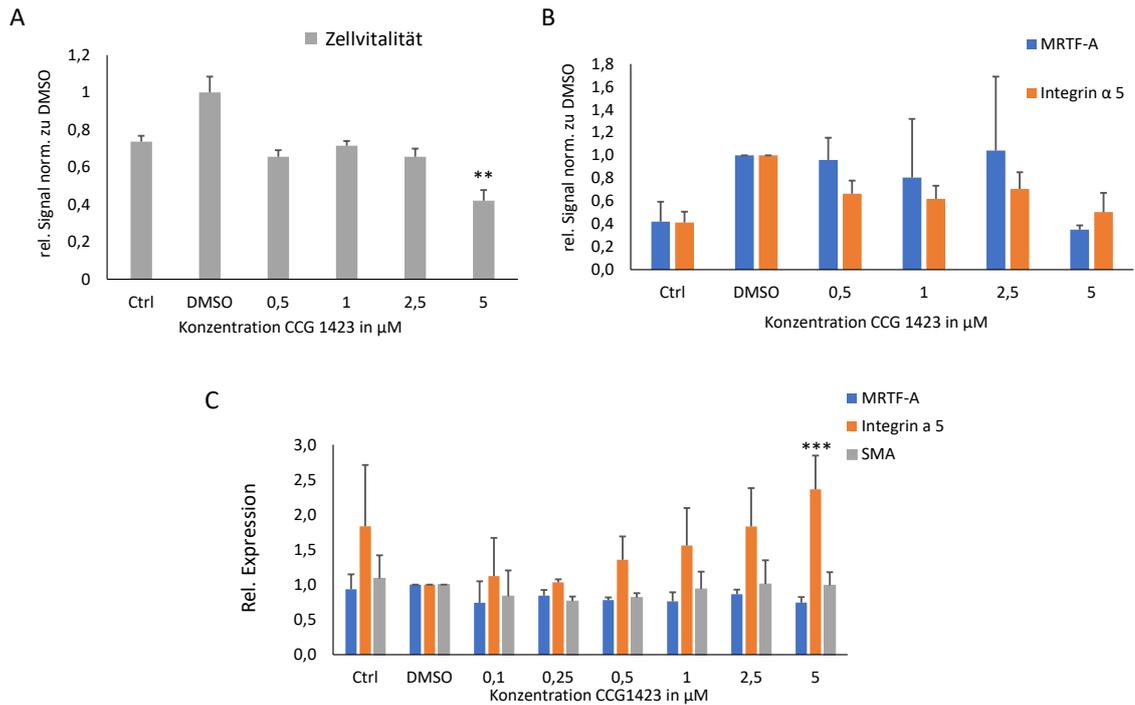


Abbildung 8: Untersuchungen zur Wirkung von CCG 1423. MCF10A Zellen wurden für 48h in 2D mit dem Inhibitor behandelt. **A** Auswirkung von CCG 1423 verschiedener Konzentrationen auf die Zellvitalität. Die Behandlung mit 5 μM CCG 1423 führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität. **B** Quantifizierung von drei unabhängigen Western Blots. Es lässt sich keine signifikante Reduzierung der MRTF-A-/Integrin α 5-Proteinmenge durch die Behandlung mit CCG 1423 feststellen. **C** Quantifizierung von drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Signale wurden zuerst zu ALAS und GAPDH normalisiert und anschließend zu DMSO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2.2 CCG 222740

Wie auch CCG 1423, wurde dieser Inhibitor der zweiten Generation auf seine Wirkung in MCF10A hin untersucht. Dazu wurde die Zellvitalität, sowie die Expression von MRTF-A und dessen Effektoren auf Protein-sowie mRNA-Ebene analysiert. Es zeigte sich bei dem Einsatz gleicher Konzentrationen eine verringerte Toxizität. So wurden nach Behandlung mit 5 μM CCG 222740 45 % weniger lebende Zellen gemessen (Abbildung 9 A). Jedoch konnte weder mittels Western Blot noch mittels qRT-PCR eine signifikante Inhibierung von MRTF-A, Integrin α 5 oder α SMA gezeigt werden (Abbildung 9 B, C). Auf Grund dessen wurde CCG 222740 nicht für weitere Experimente genutzt.

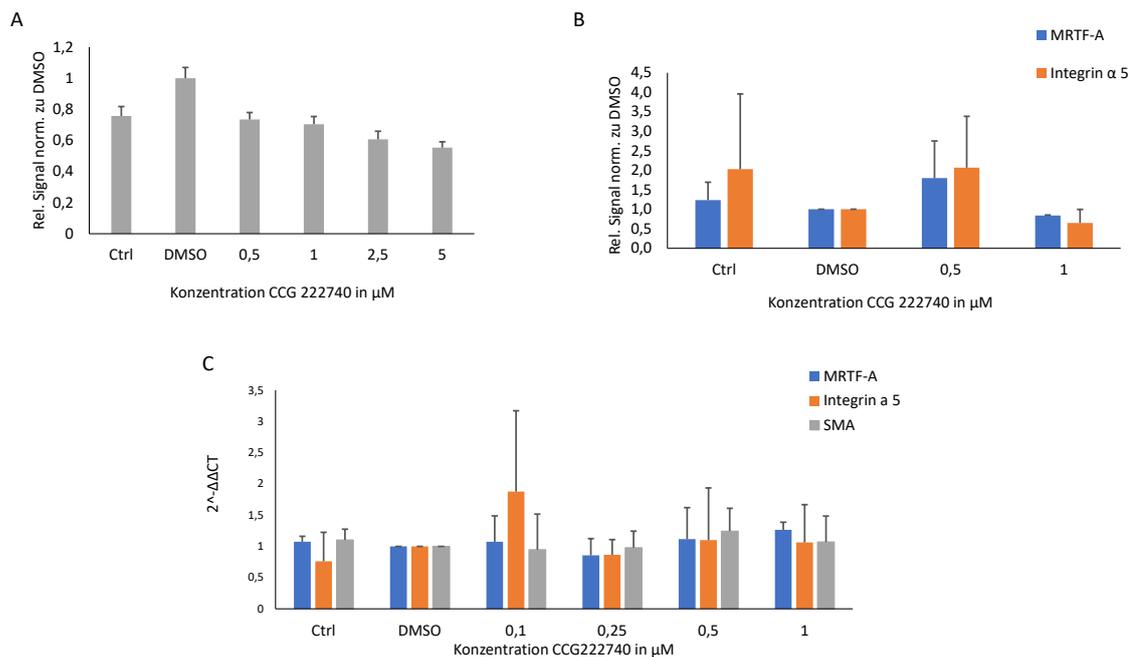


Abbildung 9: Untersuchungen zur Wirkung von CCG 222740. MCF10A Zellen wurden für 48h in 2D mit dem Inhibitor behandelt. **A** Auswirkung von CCG 222740 verschiedener Konzentrationen auf die Zellvitalität. **B** Quantifizierung von drei unabhängigen Western Blots. Es lässt sich keine signifikante Reduzierung der MRTF-A-/Integrin α 5-Proteinmenge durch die Behandlung mit CCG 222740 feststellen. **C** Quantifizierung von drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Signale wurden zuerst zu ALAS und GAPDH normalisiert und anschließend zu DMSO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

4.2.3 CCG 203971

Zur Analyse der Wirkung von CCG 203971 wurde dieser, wie zuvor die anderen Inhibitoren, in MCF10A getestet. Es zeigt sich eine, im Vergleich mit CCG 1423 und CCG 222740, stark verminderte Toxizität. So wurden nach Behandlung der MCF10A mit 20 μ M des Inhibitors nur knapp 30 % weniger lebendige Zellen in Kultur gemessen (Abbildung 10 A). Mittels Western Blot konnte eine signifikante Reduktion von MRTF-A und Integrin α 5 bei dieser hohen Konzentration gezeigt werden (Abbildung 10 B). In der Auswertung der qRT-PCRs zeigte sich eine widersprüchliche Tendenz. Während bei höheren Konzentrationen des Inhibitors ein Trend in Richtung einer verminderten MRTF-A mRNA-Expression erkennbar ist, gibt es eine signifikante Erhöhung der Expression von α SMA und Integrin α 5 (Abbildung 9 C). Inwiefern es sich dabei um eine kompensatorische Überexpression der beiden Effektoren handelt, bleibt zu spekulieren. Auf Grund der Ergebnisse der Western Blots und der geringen Toxizität von CCG 203971, wurde im nächsten Schritt ein Luziferase-Assay zur Analyse der MRTF-A-Aktivität durchgeführt (siehe 3.2.8). Dies zeigt, bei Behandlung der Zellen für 30 Stunden, eine

Verminderung der MRTF-SRF-Aktivität bereits bei geringeren Konzentrationen des Inhibitors (Abbildung 10 D). Für weitere Experimente wurde die Konzentration von CCG 203971 auf 20 μM festgelegt.

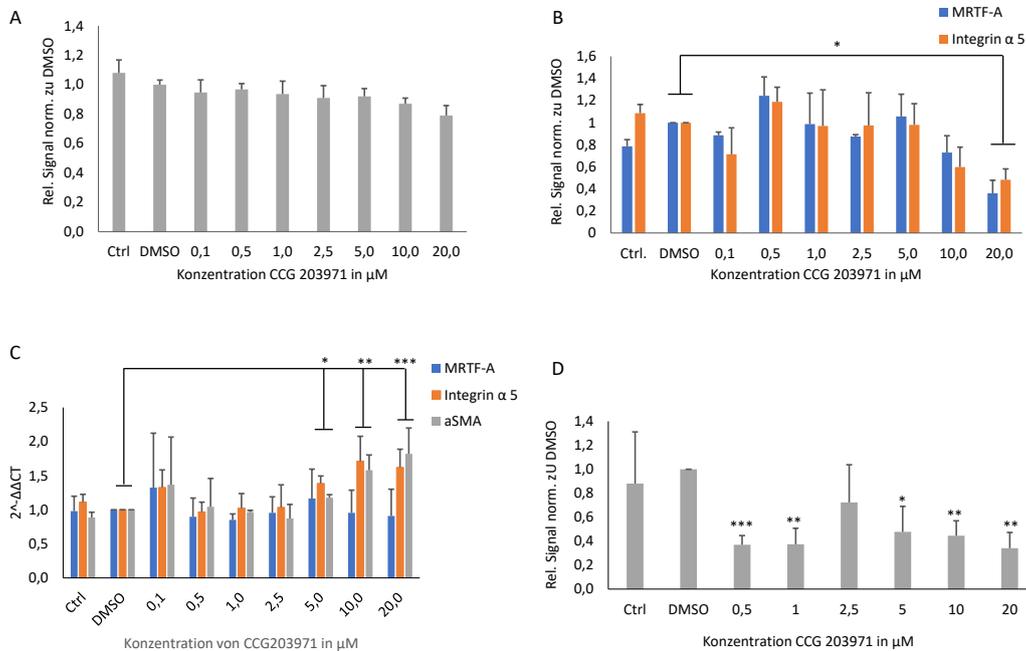


Abbildung 10: Untersuchungen zur Wirkung von CCG 203971. MCF10A Zellen wurden für 48h in 2D mit dem Inhibitor behandelt. **A** Auswirkung von CCG 203971 verschiedener Konzentrationen auf die Zellvitalität. Diese ist auch bei hohen Konzentrationen nicht signifikant vermindert. **B** Quantifizierung von drei unabhängigen Western Blots. Es lässt sich eine signifikante Reduzierung von MRTF-A-/Integrin α 5 durch die Behandlung mit 20 μM CCG 203971 feststellen. **C** Quantifizierung von drei unabhängigen qRT-PCRs. Die Signale wurden zuerst zu ALAS und GAPDH normalisiert und anschließend zu DMSO. Bei Zugabe von 5, 10 sowie 20 μM des Inhibitors stellt sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von Integrin α 5 und α SMA ein. **D** Quantifizierung von drei unabhängigen Luciferase-Assays. Gezeigt ist das Verhältnis der Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität normalisiert zu DMSO. Eine signifikante Verringerung der Aktivität zu DMSO stellte sich auch bei geringeren Konzentrationen ein. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3 Analyse der festigkeitsabhängigen Azinigenese von MCF10A

Bereits in verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich der Phänotyp von Brustepithelzellen unter dem Einfluss von Gewebefestigkeit verändert (Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005; Provenzano et al., 2008). Mit Hilfe verschiedener 3D-Kulturen, stellten Paszek *et al.* 2005 heraus, dass ein sehr festes Gewebe Rho-abhängig zu mehr Zellproliferation führt sowie die Lumentstehung behindert (Paszek et al., 2005). Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, verschiedene Matrices, welche eine veränderliche Festigkeit

ausweisen, auf ihre Tauglichkeit in 3D-Kultur zu testen und die Auswirkungen auf die Azinigenese zu untersuchen.

4.3.1 Matrices unterschiedlicher Festigkeit aus Polyacrylamid

Polyacrylamidgele werden aus Acrylamid und Bisacrylamid hergestellt, wobei durch Anpassung des Bisacrylamidanteils verschiedene Festigkeiten erreicht werden können. Diese synthetischen Gele zeichnen sich dadurch aus, dass sie definierte chemische und physikalische Eigenschaften haben, wodurch eine geringe Variabilität zwischen den Chargen sichergestellt wird. Des Weiteren ist ein Überzug mit der gewünschten Extrazellulärmatrix (ECM) möglich. So konnte, unter Nutzung von Polyacrylamidgele, bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Festigkeit mesenchymale Eigenschaften in murinen Brustepithelzellen induziert (EMT) (Leight et al., 2012). Die Herstellung der Polyacrylamidgele wurde unter 3.2.2 genau beschrieben. Nach Beschichtung der Gele mit Fibronectin, wurden MCF10A Zellen auf diesen ausgesät und 14 Tage kultiviert. Um die Festigkeit der Gele zu überprüfen wurden die Gele rheometrisch vermessen (siehe 3.2.10). Die vom Rheometer ausgegebene Größe des Speichermoduls G zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Gelen. Sowohl die intermediären („intermediate“) als auch weichen Gele („soft“) härteten während der Messung durch die geringe Luftfeuchtigkeit aus (Abbildung 11 A). Dies erklärt den Anstieg der Festigkeit ab einer Frequenz von ca. 10 rad/s. Die Mittelwerte der Messungen von 0,1 bis 10 rad/s wurden in das Elastizitätsmodul E umgerechnet. Dabei wurde die Gleichung $E = G \times 2 (1+0,5)$ angewandt. Es zeigt sich dabei, dass die festen Gele („stiff“) ein Elastizitätsmodul von ca. 14000 Pascal aufweisen, währenddessen die weichen Gele („soft“) bei ungefähr 200 Pascal liegen (Abbildung 11 B). Damit umfassen die Gele die gewünschte Spannbreite an Festigkeiten (siehe Einleitung). Weiterhin erfolgte eine Auswertung der Morphologie anhand von Phasenkontrastaufnahmen. Dabei fällt auf, dass die MCF10A auf den weichen Gelen keine regelrechte Aziniformation durchlaufen. Vielmehr entstehen große spheroidale Aggregate, welche weder eine Lumenformation noch polarisierte Zellen aufweisen. Dies bestätigt sich in der Quantifizierung der Größe der Azini bzw. Aggregate (Abbildung 11 D). Auf Grund dieser Beobachtungen wurde von einer weiteren Nutzung der Polyacrylamidgele abgesehen.

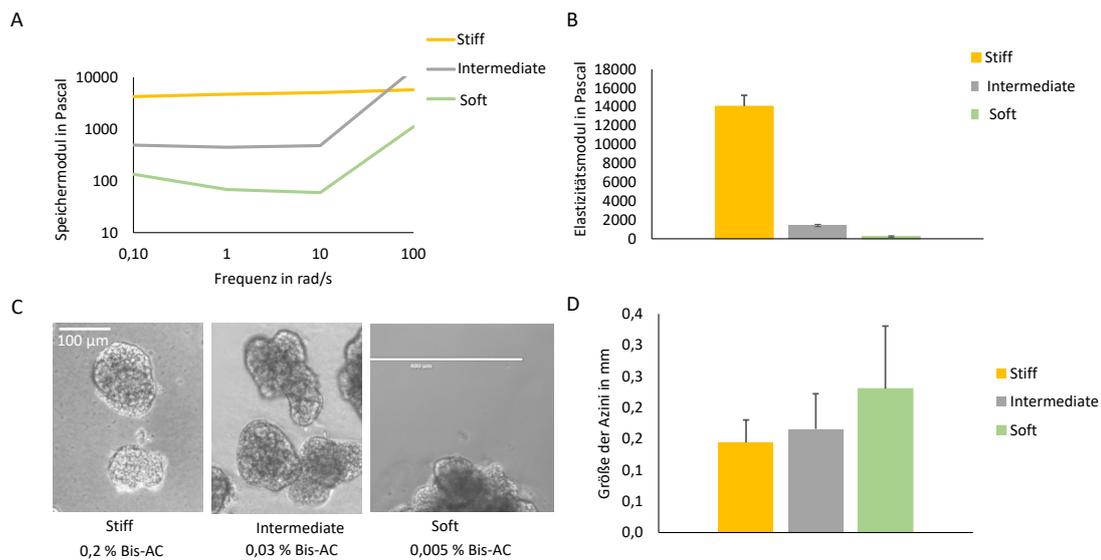


Abbildung 11: Rheometrische und morphologische Untersuchungen von MCF10A auf Polyacrylamidgelen. **A** Messwerte des Speichermoduls G' von verschiedenen Polyacrylamidgelen in Pascal. **B** Darstellung des mittleren Elastizitätsmoduls E in Pascal. **C** Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von 14 Tage alten Azini auf Polyacrylamidgelen. Die MCF10A Zellen bilden keine regelhaften Azini auf den weicheren Gelen (*intermediate* und *soft*). **D** Quantifizierung der Größe der Azini bzw. Aggregate in mm. Es zeigt sich eine Zunahme des Durchmessers mit sinkender Festigkeit. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

4.3.2 PuraMatrix™

Das unter 3.2.2 beschriebene Peptidhydrogel PuraMatrix™ kann durch Verdünnung verschiedene Festigkeiten annehmen und dabei Zellen in sich einschließen. Da es sich, wie bei den Polyacrylamidgelen, um ein synthetisches Hydrogel handelt, lässt es sich reproduzierbar charakterisieren. So wurden in einer PuraMatrix™-basierten 3D-Kultur bereits Prostata- sowie Leber-Karzinomzellen untersucht (Hainline et al., 2019; Song et al., 2015). Des Weiteren wurde die Morphologie von Brustkrebszellen in verschiedenen 3D-Matrices verglichen. Ummantelt von PuraMatrix™, zeigten MDA-MB-435S dabei eine Umkehr ihres malignen Phänotyps (Mi & Xing, 2015).

Bei der Herstellung der PuraMatrix™-basierten Gele wurde als ECM-Protein Matrigel eingesetzt (siehe 3.2.2). Die MCF10A Zellen wurden in die Gele eingeschlossen und für 14 Tage kultiviert. Leider zeigte sich, unabhängig von der eingesetzten Verdünnung, keine regelhafte Aziniformation. Die Zellen bildeten unregelmäßig begrenzte, apolare Aggregate und zeigten vermehrt Apoptose. Dies war auch durch Adaption des Herstellungsprozesses, zum Beispiel unter Nutzung eines höheren Matrigelanteils, nicht veränderlich. Daraus ergibt sich, für das genutzte Zellmodell, eine mangelnde Tauglichkeit von PuraMatrix™.

4.3.3 Matrices unterschiedlicher Festigkeit aus Matrigel/Collagen I-Mischungen

Auch natürliche Hydrogele werden vielfach in 3D-Kulturen eingesetzt. Matrigel, ein murines Basalmembran-Extrakt (BM-Extrakt), wird dabei standardmäßig für Brustepithelkulturen genutzt. Erst durch seine BM-Proteine, wie Laminin und Collagen IV, wird die Azinifomation *in vitro* ermöglicht. Aus diesem Grund wird es in allen 3D-Kulturen als Mediumzusatz (2%ig) eingesetzt. Ferner können Zellen im gelierten Matrigel eingebettet werden oder auf einem dünnen Matrigel-Bett ausgesät werden. Beide Methoden ermöglichen den Zellen zu proliferieren und die 14-tägige Azinifomation regelhaft zu durchlaufen. Als Nachteile Matrigels sind dabei die Variabilität zwischen den Chargen sowie die unpräzise und variierende Zusammensetzung zu nennen (Vidi et al., 2013). Mit Hilfe von Collagen I-basierten Hydrogelen, welche mit steigender Konzentration eine zunehmende Festigkeit aufweisen, stellten Paszek *et al.* 2005 heraus, dass bereits bei einer geringen Zunahme der Festigkeit signifikante Unterschiede in der Morphologie von MCF10A-Azini zu beobachten sind (Paszek et al., 2005). Auch konnte in MCF10A eine zunehmende Expression von mesenchymalen Genen auf Collagen-I-Gelen gezeigt werden (Carey et al., 2017).

Vor diesem Hintergrund wurden für die Experimente, wie in 3.2.2 beschrieben, verschiedene Mischungen aus Matrigel und Collagen I als Gelbett verwendet. Matrigel stellt dabei, mit einem Elastizitätsmodul von 200 Pascal, eine weiche Matrix dar. Mit zunehmendem Collagen-Anteil nimmt die Festigkeit des Gelbettes stetig zu. Das reine Collagen-I-Gel weist eine Festigkeit von ca. 4000 Pascal auf und gleicht damit der erhöhten Festigkeit einer malignen Brustdrüse (siehe Einleitung). Die auf die Matrices ausgesäten MCF10A wurden an Tag 4, 8 und 14 in Kultur analysiert und anhand ihrer Morphologie ausgewertet, wobei das Augenmerk auf die Ausbildung von zellulären Ausläufern, sogenannten Protrusionen, gelegt wurde. Dabei überwinden die auswachsenden Zellen die Basalmembran. Auf Grund dessen wird die Bildung von Protrusionen im Sinne einer gesteigerten Invasivität gewertet. An Tag 4 in Kultur ist zu beobachten, dass die Azinigröße mit zunehmendem Collagen-I-Gehalt der Matrix leicht zunimmt (Abbildung 12 A). Jedoch bilden die Azini mit steigender Festigkeit Protrusionen aus. So weisen auf dem Collagen-I-Gelbett bereits rund 20 % der Azini solche Fortsätze auf (Abbildung 12 B, C). Die Beobachtungen bestätigten sich an Tag 8 und 14 in Kultur (Melcher et al., 2022). In Immunfluoreszenzfärbungen zeigen sich die Protrusionen als zelluläre Ausstülpungen. Das Aktinzytoskelett sowie die Basalmembran wurden mit Phalloidin und Laminin V nachgewiesen (Abbildung 12 C). Die Bildung der Protrusionen bei hohem Collagen-Anteil der Matrix könnte für die festigkeitsabhängige Induktion eines invasiven Phänotyps sprechen.

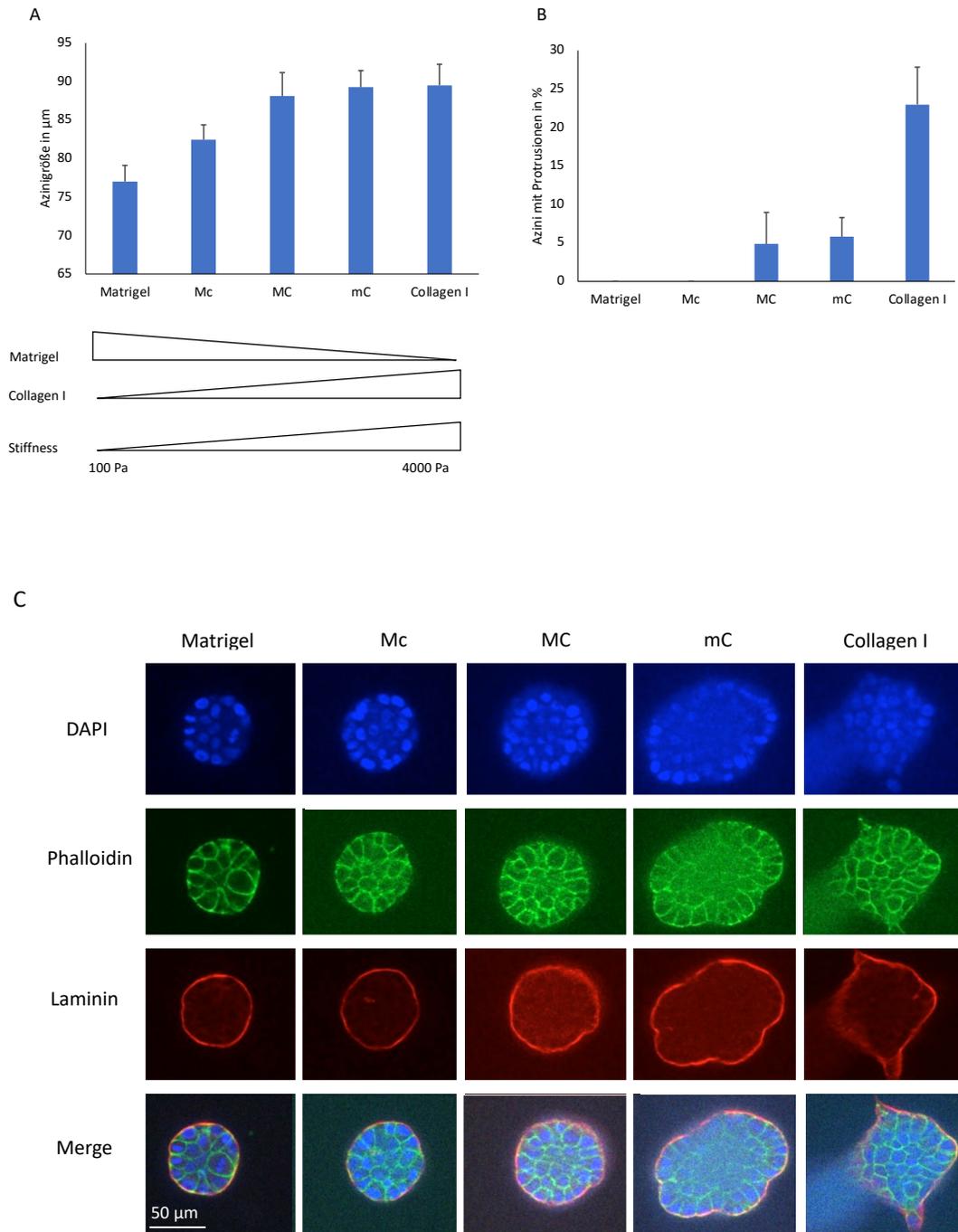


Abbildung 12: MCF10A für 4 Tage auf Matrigel/Collagen-I-Gelen mit variierender Zusammensetzung. **A** Quantifizierung der Azinigröße in μm . Mit steigendem Collagen-I-Gehalt nimmt die Größe nicht signifikant zu. **B** Quantifizierung der Ausbildung von Protrusionen an Azini in %. Mit steigendem Collagen-I-Gehalt treten zunehmend Protrusionen auf. **C** Immunfluoreszenzfärbungen von repräsentativen Azini. Die Aufnahmen erfolgten unter gleichen Bedingungen mit einem 20x Objektiv und Apoptom. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

4.3.4 Übersichtung mit Collagen IV

Da Collagen I in der Brustdrüse nicht Teil der Basalmembran ist, welche die Azini umgibt, sondern vor allem das Stroma bildet, welches die Milchgänge und Läppchen umschließt, könnte dies die Aziniformation beeinflussen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde ein Gelbett aus reinem Matrigel oder reinem Collagen I mit einer Collagen-IV-Schicht überzogen (Abbildung 13 A). Collagen IV ist ein natürlicher Teil der Basalmembran und eignet sich demnach gut, um die physiologische Umgebung der Azini nachzubilden. An Tag 4 der Aziniformation von MCF10A zeigt sich, dass die Azini, die auf einem Collagen-I-Gelbett wuchsen, unwesentlich größer sind als solche, die auf Matrigel ausgesät wurden. Des Weiteren entwickelten ca. 16 % der Azini auf Collagen I Protrusionen (Abbildung 13 B). Sowohl mit als auch ohne Collagen-IV-Beschichtung induziert die Collagen-I-Matrix die Bildung von Protrusionen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der protrusive Phänotyp als Folge der Festigkeit der Matrix entsteht.

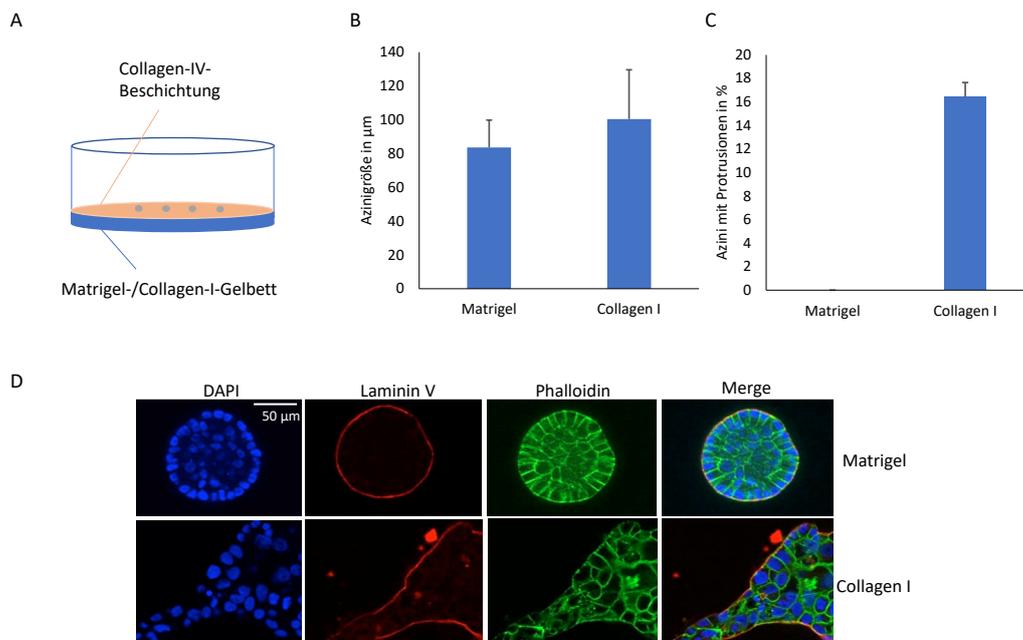


Abbildung 13: MCF10A für 4 Tage auf Matrigel- oder Collagen-I-Gelen mit Collagen-IV-Beschichtung. **A** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. **B** Quantifizierung der Azinigröße in μm . **C** Analyse der Ausbildung von Protrusionen an Azini in %. Auf der Collagen-I-Matrix weisen 16 % der Azini Protrusionen auf. **D** Immunfluoreszenzfärbungen von repräsentativen Azini. Die Aufnahmen erfolgten unter gleichen Bedingungen mit einem 20x Objektiv und Apoptom. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

4.3.5 Matrigen SoftSlip

Um auch mittels einer synthetischen Matrix die These der festigkeits-induzierten Ausbildung von protrusiven Azini bestätigen zu können, wurde die Verwendung von Matrigen Softslips gewählt. Wie in 3.2.2 beschrieben, handelt es sich dabei um kommerzielle Polyacrylamidgele mit definierter Festigkeit. Für die Experimente wurden weiche Gele (200 Pascal) mit festen Gelen (4000 Pascal) verglichen. Die MCF10A Zellen wurden, nach Beschichtung der Gele mit Matrigel, ausgesät und an Tag 4, 8 und 14 der Aziniformation analysiert.

An Tag 4 zeigt sich ein, mit den Matrigel/Collagen-I-Gelen, vergleichbares Bild. Während sich die Größe der Azini zwischen den weichen und festen Gelen kaum unterscheidet, weisen rund 23 % der Azini auf festen Gelen Protrusionen auf. Solche Azini, die auf weichen Gelen wuchsen, bildeten im gleichen Zeitraum keine zellulären Ausstülpungen aus (Abbildung 14 A und B). Die repräsentativen Immunfluoreszenzaufnahmen illustrieren diesen markanten Unterschied.

Die Bildung von Protrusionen konnte somit an Azini, welche auf Collagen-I-Gelen, Collagen-IV-beschichteten Collagen-I-Gelen sowie Softslips mit einer Festigkeit von 4000 Pascal wuchsen, beobachtet werden. Damit zeigt sich eine Kontinuität der Beobachtungen über verschiedene Matrices hinweg. Dies spricht für die Induktion eines invasiven, protrusiven Phänotyps in Azini durch eine erhöhte Festigkeit.

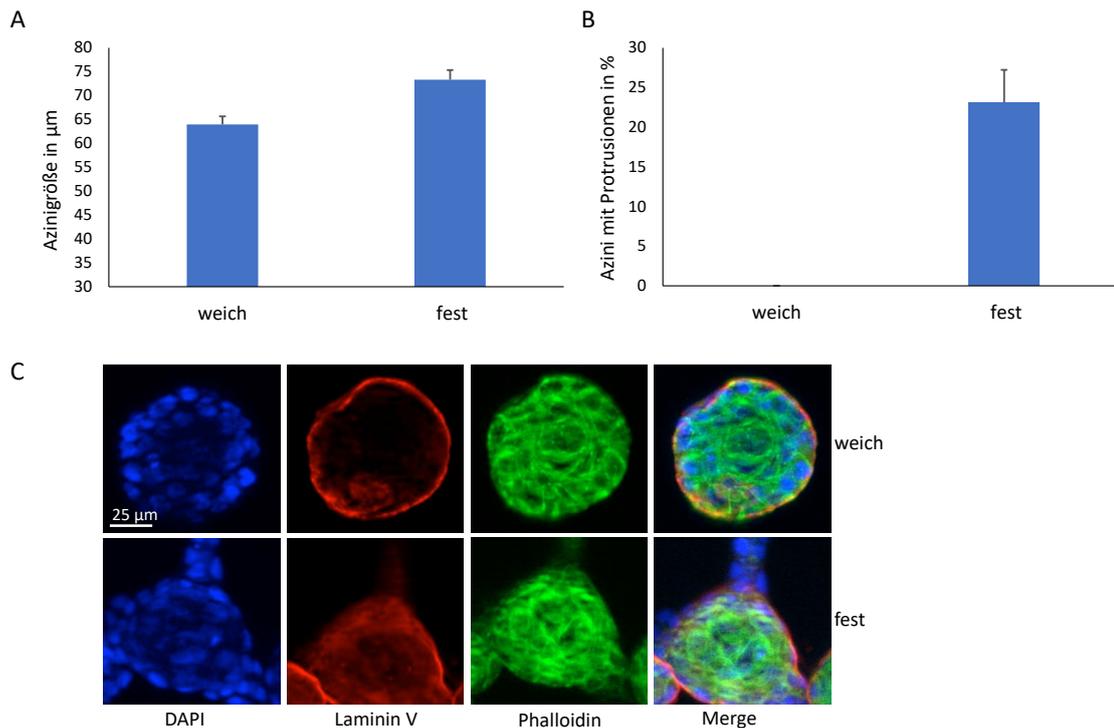


Abbildung 14: MCF10A für 4 Tage auf Matrigen SoftSlips mit geringer („weich“, 200 Pascal) und hoher („fest“, 4000 Pascal) Festigkeit. **A** Quantifizierung der Azinigröße in μm . Die Azini wuchsen auf festen Gelen nicht signifikant größer. **B** Analyse der Ausbildung von Protrusionen an Azini in %. Auf den festen Polyacrylamidgelen weisen 23 % der Azini Protrusionen auf. **C** Immunfluoreszenzfärbungen von repräsentativen Azini. Die Aufnahmen erfolgten unter gleichen Bedingungen mit einem 20x Objektiv und Apoptom. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

4.4 Analyse der Rolle von MRTFs in festigkeitsabhängiger Azinigenese

MRTF-A ist als Mechanotransduktor bekannt, dessen Aktivität sich in Abhängigkeit von mechanischen Einflüssen, wie beispielsweise einer erhöhten Matrixfestigkeit, verändert (Dai et al., 2019). Im Zuge dessen, sollte nun mit Hilfe des etablierten Matrigel-Collagen-I-Modells die Wechselwirkung zwischen MRTF-A und einer erhöhten Matrixfestigkeit analysiert werden. Dies gestaltete sich schwierig, da die Herstellung von Proteinextrakten aus Aziniszellen, die in Matrigel bzw. Collagen I wachsen, kaum möglich war. Nichtsdestotrotz konnte mit Hilfe des Luziferase-Reporter-Assays die Aktivität des MRTF-SRF-Signalweges in Azini bestimmt werden (Sotiropoulos et al., 1999). Zwar war dies aufgrund der transienten Transfektion nur in einem sehr begrenzten Zeitraum der Azinigenese möglich (Tag 2 und 3), jedoch konnte so ein Einblick in das Zusammenspiel zwischen MRTF-A und Festigkeit gewonnen werden. Es zeigte sich, dass sowohl an Tag 2 als auch an Tag 3 der Aziniformation eine erhöhte MRTF-A-Aktivität in Azini, welche auf Collagen I wuchsen, im Vergleich zu Solchen auf weicher Matrix (Matrigel),

nachweisbar war (Abbildung 15 A). Dieser Trend bestätigte sich in den verwendeten SoftSlips. Verglichen mit Azini auf weichen Gelen, wiesen MCF10A Azini auf festen SoftSlips eine höhere MRTF-A-Aktivität auf (Abbildung 15 B). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass bei der Ausbildung des beobachteten festigkeitsabhängigen Phänotyps MRTF-A eine entscheidende Rolle spielt.

Dies wurde durch ein weiteres Experiment unterstrichen. Hierbei wurden MCF10A Azini an Tag 12 mit 20 μ M des, unter 4.2.3 getesteten, Inhibitors CCG 203971 behandelt. Nach zwei Tagen erfolgte eine morphologische Analyse. Dabei war festzustellen, dass die Azini, welche mit CCG 203971 behandelt wurden, eine verringerte Tendenz zur Protrusionsbildung aufwiesen (Abbildung 15 D). Es ließen sich keine Effekte auf die Größe der Azini feststellen (Abbildung 15 C). Dies liegt wahrscheinlich in der bereits abgeschlossenen Aziniformation an Tag 12 begründet. Der partielle Rückgang der Protrusionen war in der Matrix, welche zu 75 % aus Collagen I besteht, signifikant. Hier bildeten 28 % der Azini mit physiologischer MRTF-Aktivität zelluläre Ausläufer aus. Im Gegensatz dazu wiesen nur rund 9 % der mit Inhibitor behandelten Azini Protrusionen auf. Diese partielle Wiederherstellung des regelhaften Phänotyps durch den Inhibitor spricht dafür, dass die Ausbildung von Protrusionen auf fester Matrix MRTF-abhängig stattfindet.

Um zu untersuchen, inwiefern das beobachtete Auswachsen der Zellen über die Basalmembran im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) stattfindet, wurde eine Analyse von EMT-Markern mittels qRT-PCR durchgeführt. Dafür wurden Azini, welche für 14 Tage auf weichen oder festen SoftSlips wuchsen, lysiert. Die Analyse der mRNA-Expression des MRTF-Zielgens α SMA zeigte einen signifikanten Anstieg zwischen weicher und fester Matrix (Abbildung 15 E). Die Expression des EMT-Markerproteins Vimentin zeigte einen nicht-signifikanten etwa dreifachen Anstieg auf fester Matrix. Die Analyse weiterer EMT-Markerproteine wie Twist zeigte keine Unterschiede zwischen den Matrices (Daten nicht dargestellt). Hierbei ist zu bedenken, dass für die qRT-PCR alle Azini der Population analysiert wurden, wobei nur etwa 20 % dieser Azini Protrusionen ausbildeten (siehe 4.3.3). Dies könnte etwaige Expressionsunterschiede schwer detektierbar machen. Ein Nachweis der lokalen Erhöhung von EMT-Markern mittels Immunofluoreszenz blieb ergebnislos (Daten nicht dargestellt). Nichtsdestotrotz können die Ergebnisse als ersten Hinweis auf einen Verlust der epithelialen Eigenschaften der azinaren Epithelzellen interpretiert werden.

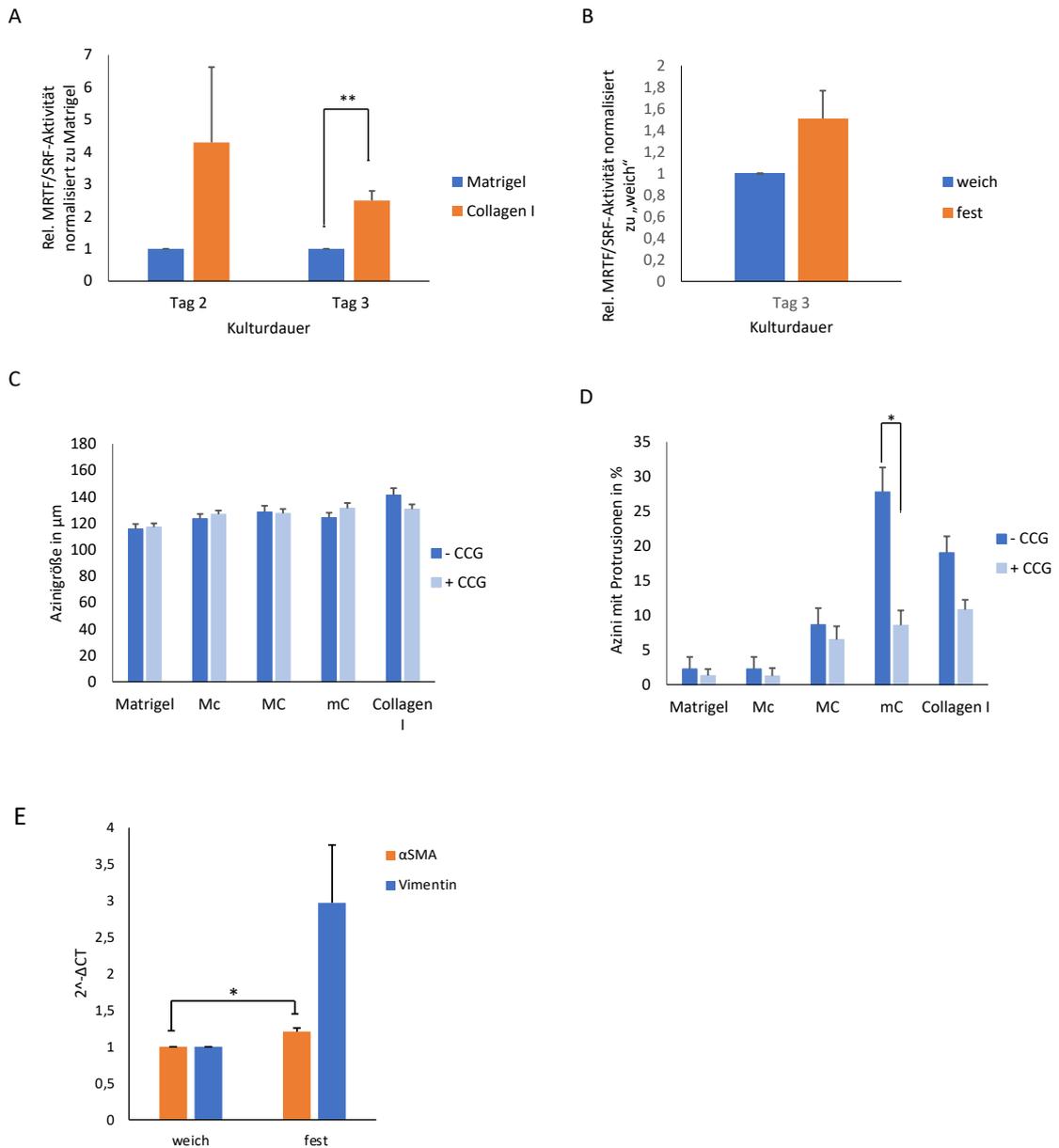


Abbildung 15: Analyse der Rolle MRTF-A's in der festigkeitsabhängigen MCF10A Azinigenese
A Analyse der MRTF-SRF-Aktivität mittels drei unabhängiger Luziferase-Reporter-Assays auf Matrigel bzw. Collagen I. Gezeigt ist das Verhältnis der Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität normalisiert zu Matrigel. An Tag 3 der Aziniformation zeigt sich eine signifikante Erhöhung der MRTF-Aktivität auf Collagen I im Vergleich zu Matrigel. **B** Analyse der MRTF-SRF-Aktivität mittels drei unabhängiger Luziferase-Reporter-Assays auf weichen und festen SoftSlip-Gelen. **C** Analyse der MCF10A Azinigröße an Tag 14 mit bzw. ohne Behandlung mit 20 μ M CCG 203971. **D** Analyse der Protrusionsbildung von MCF10A Azini an Tag 14 mit bzw. ohne Behandlung mit 20 μ M CCG 203971. Es zeigt sich eine partielle Reduktion der Protrusionsbildung bei Inhibitorzugabe. **E** Relative mRNA-Expression von α SMA und Vimentin normalisiert zu GAPDH und ALAS. Azini wuchsen für 14 Tage auf weichen bzw. festen SoftSlips. n=4. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * $<0,05$; ** $<0,01$

4.5 Analyse der festigkeitsabhängigen Sphäroidbildung in Brustkrebszelllinien

Zur Überprüfung dieser Beobachtungen wurden die Experimente auch mit Brustkrebszelllinien durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Zelllinien in Abschnitt 4.1.2 analysiert und MCF7 und T47D ausgewählt. Diese wurden, wie zuvor die MCF10A, auf ein Gelbett aus Matrigel, Collagen I oder verschiedenen Mischungen dieser zwei Matrices ausgesät. Die Auswertung der Sphäroidbildung zeigte starke Unterschiede zwischen den zwei Zelllinien auf. Während die MCF7 Zellen schon an Tag 4 in Kultur auf Collagen-I-Gelen Protrusionen ausbildeten, zeigen die T47D Zellen nach 14-tägiger Kultur keine morphologischen Veränderungen (Abbildung 16). Auffallend ist weiterhin, dass – im Vergleich zu MCF10A - insgesamt weniger MCF7 Zellen Protrusionen bildeten. Zum Vergleich: während an Tag 4 mehr als 20 % der MCF10A Azini auf Collagen I Protrusionen aufwiesen, ist dies bei nur 3 % der MCF7 Sphäroide der Fall. Eine Analyse der MCF7 Sphäroide zu späteren Zeitpunkten gestaltete sich, bedingt durch die Größe und Unregelmäßigkeit dieser, als sehr schwierig. Nichtsdestotrotz konnte mittels der MCF7 Sphäroide auch in einer Brustkrebszelllinie ein festigkeitsabhängiger Phänotyp nachgewiesen werden.

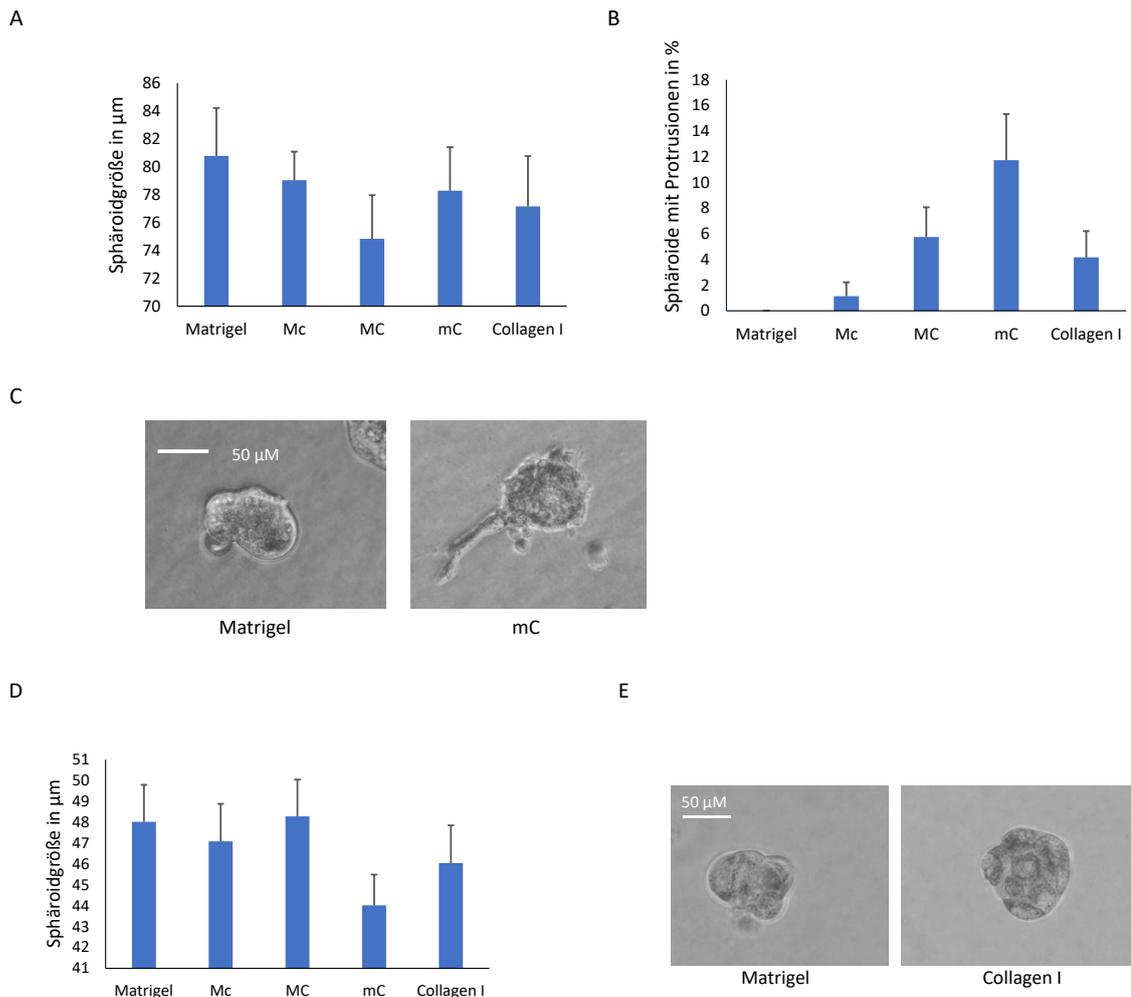


Abbildung 16: MCF7 und T47D für 4 bzw. 14 Tage auf Matrigel/Collagen-I-Gelen mit variierender Zusammensetzung. **A** MCF7 - Quantifizierung der Sphäroidgröße in μm **B** MCF7 - Analyse der Ausbildung von Protrusionen in %. Auf der Collagen-I-Matrix weisen ca. 3 % der Sphäroide Protrusionen auf. **C** Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von MCF7 Sphäroiden an Tag 4. **D** T47D - Quantifizierung der Sphäroidgröße in μm an Tag 14. Es bildeten sich keine Protrusionen aus. **E** Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von T47D Sphäroiden an Tag 14 in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

4.6 Analyse von Primärorganoiden in Abhängigkeit von Matrixfestigkeit und MRTF-Aktivität

Das Arbeiten mit Zelllinien unter 3D-Bedingungen stellt eine etablierte Methode dar, welche die Bedingungen *in vivo* gut rekapituliert. Nichtsdestotrotz handelt es sich um ein artifizielles Instrument, da nur ein ausgewählter und immortalisierter Zelltypus analysiert wird. Um den Einfluss von Matrixfestigkeit auf Brustepithelzellen nicht nur in Zelllinien zu untersuchen, wurde der experimentelle Ansatz auf murine Primärzellen ausgeweitet. Zwar werden dafür hauptsächlich luminale Epithelzellen in Kultur genommen, diese sind jedoch weiterhin von ihrer

natürlichen Nische aus Myoepithelzellen und Fibroblasten umgeben. Die Extraktion der Brustepithelzellen aus Mäusen wird unter 3.2.3 genau beschrieben.

4.6.1 Untersuchungen bei basaler MRTF-A-Aktivität

In MCF10A zeigte sich eine, von der Matrixfestigkeit abhängige, Veränderung der Aziniformation. So konnte auf verschiedenen Gelen, welche eine hohe Festigkeit von ca. 4000 Pascal aufweisen, die Ausbildung von Protrusionen an Azini beobachtet werden. Vor diesem Hintergrund wurden die extrahierten murinen Organoide auf reinem Matrigel oder reinen Collagen-I-Gelen ausgesät. Dafür wurden NMRI-Mäuse verwendet, welche nicht genetisch verändert sind und somit eine physiologische MRTF-A-Expression aufweisen. Die Analyse der Primärzellen erfolgte nach 5 Tagen in Kultur. Es zeigt sich, dass die Größe der Organoide durch die verschiedenen Matrices nur leicht variiert. Jedoch waren die Organoide, welche auf einem reinen Collagen-I-Gelbett wuchsen, weniger wahrscheinlich hohl und zeigten signifikant mehr Protrusionen (Abbildung 17 A-C). So bildeten nur ca. 7 % der Organoide auf Matrigel Protrusionen auf. Auf Collagen I erhöhte sich der Anteil dieser auf rund 50 %. Sowohl die primären Organoide als auch die MCF10A-Azini weisen somit auf einer festen Matrix einen invasiveren Phänotyp auf.

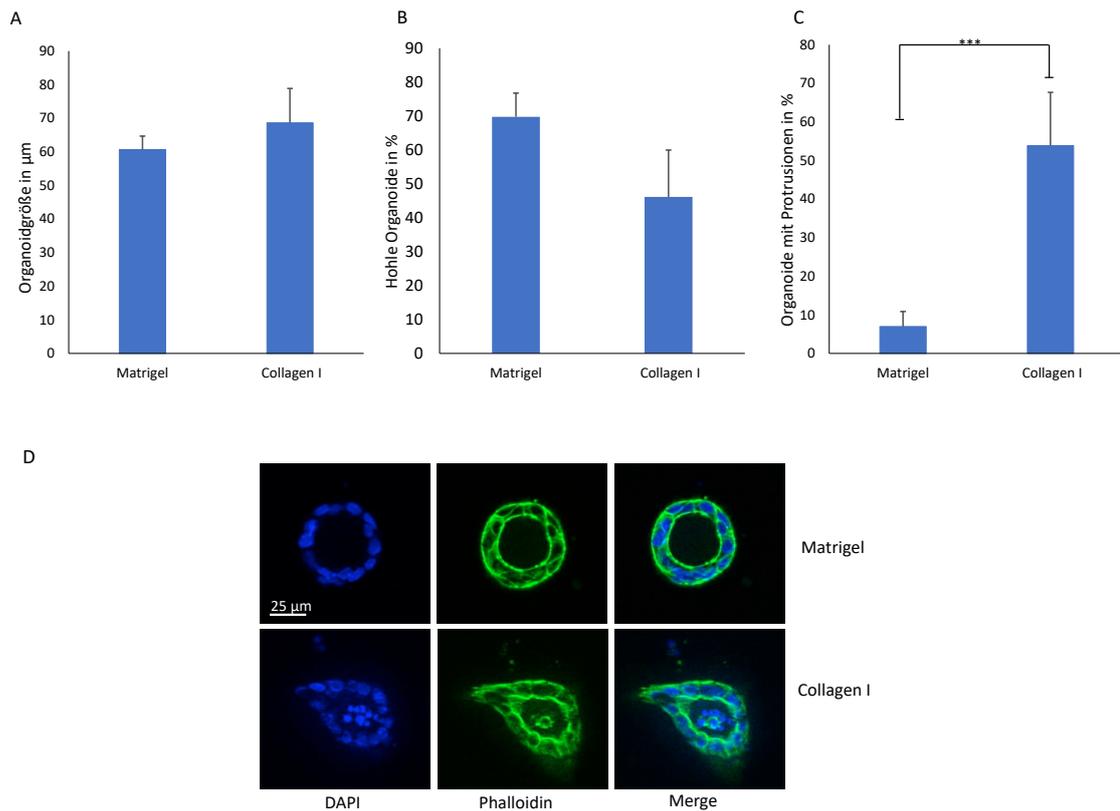


Abbildung 17: Primäre NMRI-Organoiden auf Matrigel oder Collagen I. n=6 **A** Quantifizierung der Organoidgröße in μm . **B** Quantifizierung des Anteils an hohlen Organoiden in %. **C** Quantifizierung der Ausbildung von Protrusionen an Organoiden in %. Auf Collagen I ist ein signifikanter Anstieg an Protrusionen festzustellen. **D** Immunfluoreszenzfärbungen von repräsentativen Organoiden. Die Aufnahmen erfolgten unter gleichen Bedingungen mit einem 20x Objektiv und Apoptom. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. ***p<0,001

4.6.2 Untersuchungen bei MRTF-A-Überexpression

Neben den NMRI-Mäusen standen für das Projekt zwei transgene Black-6-Zuchtlinien zur Verfügung. Dabei wurde mit dem Cre/loxP-System gearbeitet, um eine *Knock-In*-Maus zu generieren. In die Rosa 26 CreERT2-Zuchtlinie wurde am Locus Rosa 26 eine Cre-Rekombinase-Sequenz eingebracht. Diese wurde mit der modifizierten Ligandenbindungsdomäne von Östrogen-Rezeptoren fusioniert, sodass nur bei Vorhandensein von Tamoxifen die Cre-Rekombinase aktiviert wird (Feil et al., 1997). In die zweiten Zuchtlinie wurde am Rosa 26 Locus eine Stop-Kassette vor dem MRTF-A-Gen eingefügt, die von zwei LoxP-Stellen flankiert wird. Bei der MRTF-A Gensequenz handelt es sich um eine konstitutiv aktive MRTF-A-Variante, die aufgrund des Fehlens der RPEL-Motive (Exon 3-5) sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus vorliegt. Werden die beiden Zuchtlinien verpaart, erhält man unter anderem Nachkommen, welche beide Modifizierungen am Rosa 26 Locus tragen (MRTF-A fl/wt, CreERT2 ki/wt). Wird

den Organoiden aus diesen Mäusen *in vitro* Tamoxifen zugegeben (siehe 3.2.3), aktiviert dieses die Cre-Rekombinase. Das Enzym schneidet spezifisch an der LoxP-Stelle und entfernt damit die Stop-Kassette. In Folge wird MRTF-A überexprimiert. Als Kontrolle wurden Nachkommen ohne CreERT2-Gen eingesetzt (MRTF-A fl/wt, CreERT2 wt/wt).

Die extrahierten Brustepithelorganoide wurden, wie im Experiment zuvor, auf reines Matrigel, einer Mischung aus Matrigel und Collagen I (MC) oder reinem Collagen I ausgesät. Ab dem folgenden Tag erfolgte die Zugabe von 0,25 μ M 4-OH-Tamoxifen sowohl in den Knock-In-Organoiden als auch in den Kontrollen. Die Analyse der Organoide erfolgte an Tag 5 in Kultur. Aufgrund der geringeren Effektivität von Tamoxifen bei der Aktivierung der Cre-Rekombinase *in vitro*, wurde 4-OH-Tamoxifen verwendet, wobei es sich um einen aktiveren Metaboliten von Tamoxifen handelt.

Die Behandlung der Organoide mit 0,25 μ M 4-OH-Tamoxifen führte in beinahe allen Zellen zu einer Entfernung der Stop-Kassette, was sich in der Stärke der 600 bp großen Bande der fl-PCR (Abbildung 18 A) zeigt. Des Weiteren waren die mit 4-OH-Tamoxifen behandelten, und dementsprechend einer starken MRTF-A-Überexpression ausgesetzten, Organoide unabhängig von der Matrix weniger hohl. Beinahe alle Organoide wiesen ein gefülltes Lumen auf. Außerdem bildeten die mit 4-OH-Tamoxifen behandelten Organoide insgesamt weniger Protrusionen aus (Abbildung 18 D). Zwar lässt sich hier eine Tendenz zur vermehrten Protrusionsbildung bei fester Matrix (Collagen I) erkennen, jedoch kam es nicht zu einer generellen, matrix-unabhängigen Verstärkung der Protrusionsbildung. Insgesamt zeigt sich ein differenziertes Bild bei einer Überexpression von MRTF-A in Primärorganoiden. Die Überexpression von MRTF-A hat große Auswirkungen auf die Organoidmorphologie. Dabei sind die Prozesse der Lumenfüllung und Protrusionsbildung wahrscheinlich voneinander abzugrenzen.

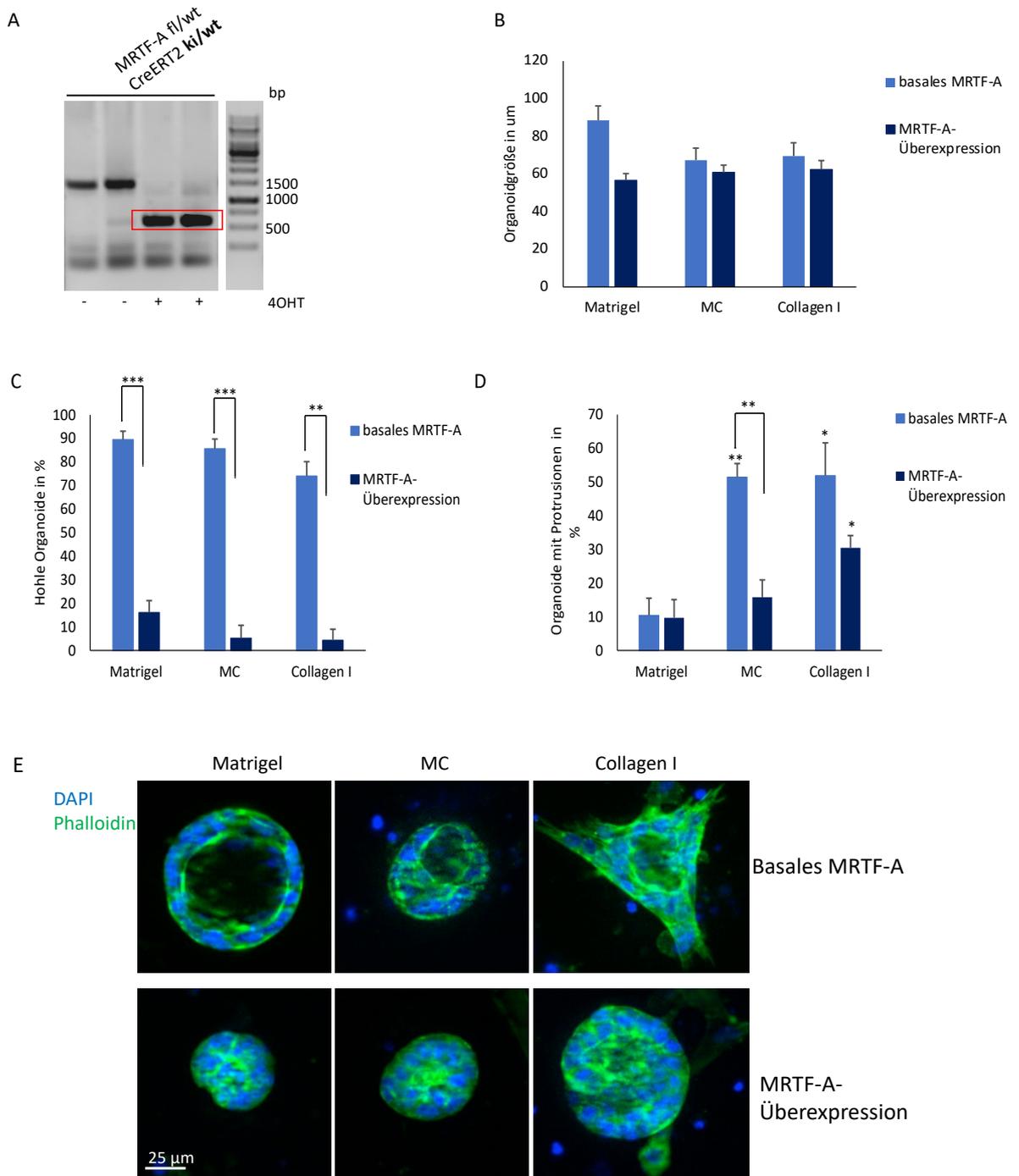


Abbildung 18: Primäre Organoide auf Matrigel, einem 1:1 Matrigel/Collagen-I-Gemisch (MC) oder Collagen I nach Behandlung mit 0,25 µM 4-OH-Tamoxifen für 5 Tage. **A** Genotypisierung der behandelten Organoide nach 5 Tagen. In der fl-PCR lässt sich ein starkes Signal des 600 bp großen PCR-Produktes in den MRTF-A fl/wt; CreERT2 ki/wt Organoiden nachweisen. Dies beweist indirekt eine effiziente MRTF-A-Überexpression. **B** Quantifizierung der Organoidgröße, **C** des Anteils an hohlen Organoiden und **D** des Anteils an Organoiden mit Protrusionen. n=4. **E** Immunfluoreszenzfärbungen von repräsentativen Organoiden. Die Aufnahmen erfolgten unter gleichen Bedingungen mit einem 20x Objektiv und Apoptom. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***<0,001

4.6.3 Untersuchungen bei MRTF-A-Inhibierung

Um die Effekte einer verminderten MRTF-A-Aktivität zu untersuchen, wurden die murinen Organoide mit einem MRTF-A-Inhibitor behandelt. Dabei wurde aufgrund der Untersuchungen in 4.2 eine Konzentration von 20 μM des Inhibitors CCG 203971 gewählt. Die Organoide der Kontrollgruppe wurden mit der entsprechenden Konzentration DMSO behandelt. Für die Experimente wurden die nicht transgenen NMRI-Mäuse genutzt. An Tag 5 analysiert zeigt sich, dass die Größe der Organoide wenig variiert. Gleichzeitig gab es mehr gefüllte Organoide auf Collagen I, wenn diese mit dem Inhibitor behandelt wurden. Ein interessantes Bild ergibt sich bei der Auswertung der Protrusionsbildung. In beiden Gruppen bildeten die Organoide mit zunehmendem Collagen-I-Anteil der Matrix mehr Protrusionen aus. Jedoch fällt, in der mit CCG 203971 behandelten Gruppe, eine signifikante Reduktion an protrusiven Organoiden auf (Abbildung 19 A). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Inhibierung der MRTF-A-Aktivität die pro-invasiven Effekte einer festeren Matrix partiell aufheben kann. Es zeigen sich ähnliche Effekte des Inhibitors wie in MCF10A Azini. Eine Inhibierung von MRTF-A reduziert sowohl in Azini als auch in Primärorganoiden partiell die festigkeits-induzierte Bildung von Protrusionen.

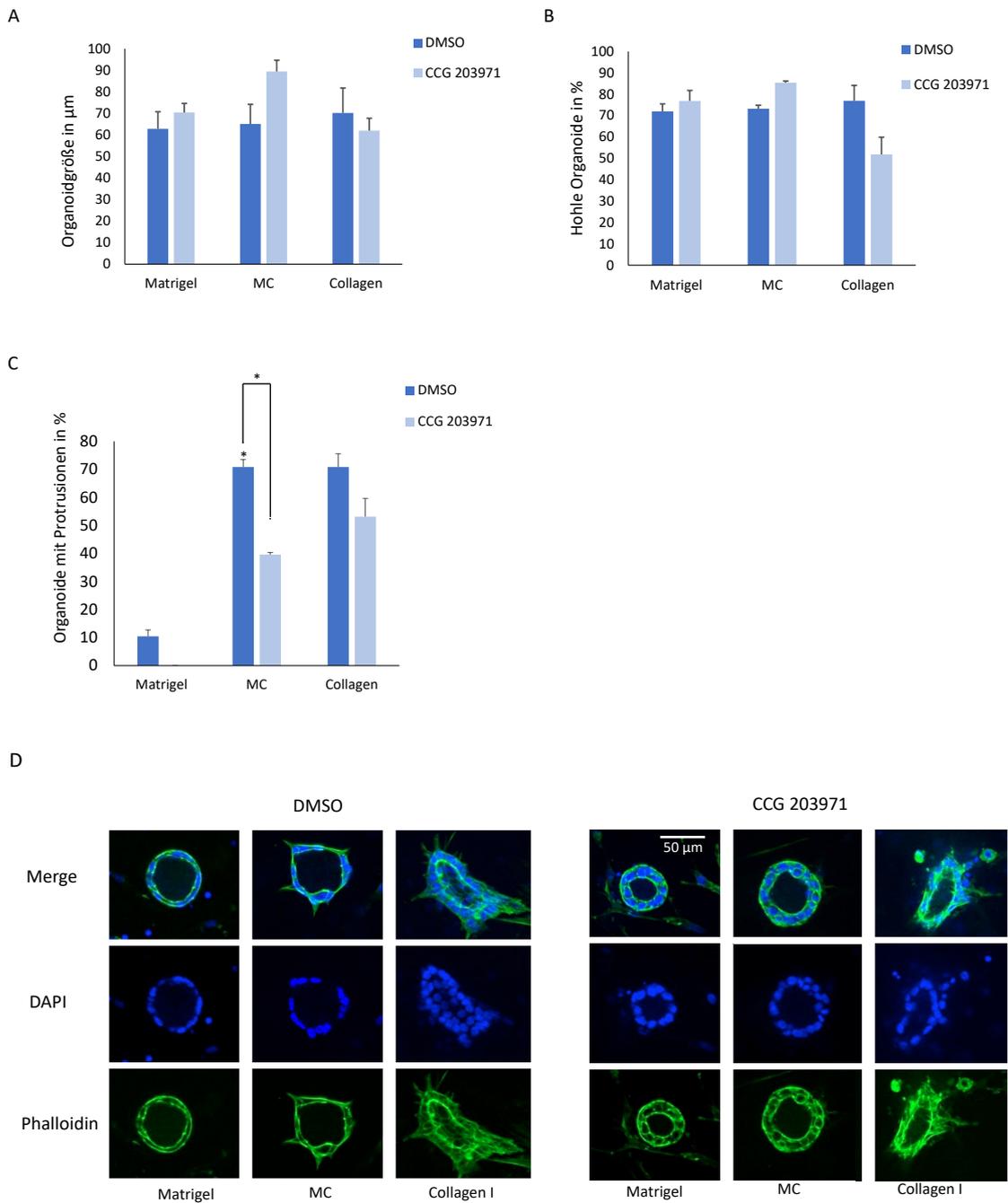


Abbildung 19: Primäre NMRI-Organoiden auf Matrigel, einem 1:1 Matrigel/Collagen-I-Gemisch (MC) oder Collagen I nach Behandlung mit 20 µM CCG 203971 (n=3) oder DMSO (n=2) für 5 Tage. **A** Quantifizierung der Organoidgröße, **B** des Anteils an hohlen Organoiden und **C** des Anteils an Organoiden mit Protrusionen. Die mit CCG 203971 behandelten Organoiden zeigen eine Reduktion der Protrusionsbildung auf allen Matrices. **D** Immunfluoreszenzfärbungen von repräsentativen Organoiden. Die Aufnahmen erfolgten unter gleichen Bedingungen mit einem 20x Objektiv und Apoptom. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. *p<0,05

5. Diskussion

Die Festigkeit des umgebenden Gewebes spielt bei der Entstehung und dem Progress solider Tumoren eine entscheidende Rolle (Paszek & Weaver, 2004). Dieser Zusammenhang wurde für verschiedene Krebsentitäten nachgewiesen, wobei die Gewebefestigkeit besonders bei Brustkrebs von großer Bedeutung ist. So stellt diese einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms dar (Boyd et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit sollten nun mittels drei-dimensionaler Zellkultur die Effekte verschiedener Gewebefestigkeiten auf die Bildung und Aufrechterhaltung von Azini aus Brustepithelzellen untersucht werden. Des Weiteren sollte die Wechselwirkung zwischen Gewebefestigkeit und MRTF-A-Aktivität analysiert werden.

Etablierung eines *in vitro* Verfahrens zur Untersuchung der Azinimorphologie

Um der Fragestellung nachzugehen, wurden verschiedene Matrices auf ihre Tauglichkeit in diesem Ansatz hin überprüft. Dabei war von Bedeutung, dass sie eine regelhafte Aziniformation ermöglichen und ein Elastizitätsmodul von ca. 200 bis 4000 Pascal aufweisen, um die Festigkeit der gesunden sowie malignen Brust zu imitieren. Es wurden zu Beginn Polyacrylamidgele getestet (siehe 4.3.1). Aufgrund ihrer synthetischen Herstellung, weisen diese eine hohe Homogenität auf und ermöglichen, mittels Rheometer nachgemessen, eine präzise Einstellung der Festigkeit. So konnten Paszek *et al.* mittels ECM-überzogenen Polyacrylamidgelen zeigen, dass Gele, die die geringe Festigkeit der gesunden Brust aufweisen, eine regelhafte 14-tägige Aziniformation unterstützen, an deren Ende hohle, stabile Azini entstehen. Gele mit einer erhöhten Festigkeit hingegen störten die Lumenbildung und Polarisierung von MCF10A Azini (Paszek et al., 2005). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit leider nicht reproduziert werden, vermutlich aufgrund methodischer Unzulänglichkeiten. Besonders auf weichen Gelen bildeten sich unregelmäßige, nicht polarisierte Aggregate. Diese zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Lumenbildung. Dadurch ist davon auszugehen, dass die 14-tägige Aziniformation nicht regelhaft stattfinden konnte. Somit war kein valider Vergleich der Effekte verschiedener Festigkeiten möglich. Da mittels rheometrischer Messung nachgewiesen wurde, dass die Festigkeit im gewünschten Bereich liegt, ist dies als Grund für die Untauglichkeit der Polyacrylamidgele auszuschließen. Zu diskutieren bleiben daher eine, trotz vielfältiger Waschschriffe, verbliebene Zytotoxizität des Acrylamids oder Fehler in der Umsetzung des Protokolls (Cretu et al., 2010). Aufgrund dessen wurde von einer weiteren Nutzung der Polyacrylamidgele abgesehen.

Eine ähnliche Problematik war auch bei der Verwendung von PuraMatrix™ zu beobachten. Dieses synthetische Peptidhydrogel weist durch Verdünnung verschiedene Festigkeiten auf und inkorporiert Zellen sowie beliebige ECM-Proteine. Zwar wurde eine Aziniformation in

PuraMatrix™ bisher nicht beschrieben, jedoch wurden schon diverse Krebszelllinien, wie beispielsweise die Brustkrebszelllinie MDA-MB-435S, in PuraMatrix™ drei-dimensional kultiviert (Mi &Xing, 2015). Die Kultivierung von MCF10A Azini in PuraMatrix™ gelang nicht. Stattdessen bildeten sich, ähnlich wie bei der Verwendung von Polyacrylamidgelen, große, unregelmäßige Aggregate. Diese wiesen weder eine Polarität noch eine Lumenbildung auf. Dadurch ist davon auszugehen, dass eine Aziniformation, trotz Vorhandensein der benötigten ECM-Proteine durch das Einbringen von Matrigel, in PuraMatrix™ nicht möglich ist. Ob dies an der methodischen Umsetzung des Protokolls von Abu-Yousif *et al.* oder an der generellen Tauglichkeit des Peptidhydrogels für die Aziniformation liegt, konnte nicht abschließend geklärt werden (Abu-Yousif *et al.*, 2009). Hebner *et al.*, welche die drei-dimensionale Kultur von Brustepithelzellen genau charakterisierten, halten die Verwendung von neuen, synthetischen inkorporierenden Matrices jedoch grundsätzlich für möglich (Hebner *et al.*, 2008).

Eine natürliche Matrix, welche sich als Träger für 3D-Kulturen bereits etabliert hat, ist Collagen I. Trotz des natürlichen Ursprungs, sind die kommerziell erwerblichen Collagen-I-Lösungen gut charakterisierbar und weisen eine hohe Homogenität auf (Hebner *et al.*, 2008). Das verwendete FibriCol® hat, laut Herstellerangaben, ein Elastizitätsmodul von ca. 4000 Pascal, was der erhöhten Festigkeit der malignen Brust entspricht. Durch die nötige Anpassung des pH-Wertes ist zu vermuten, dass die Festigkeit, im Vergleich zur reinen Lösung, etwas vermindert ist. Nichtsdestotrotz ist anzunehmen, dass diese in einem Bereich zwischen 3000 und 4000 Pascal liegt und damit genau dem Wertebereich der Messungen von Paszek *et al.* für Brusttumoren entspricht (Paszek *et al.*, 2005). Als weiche Matrix, welche den Vergleich zur festen Collagen-I-Matrix ermöglicht, wurde Matrigel ausgewählt. Als natürliche Basalmembran-Matrix unterstützt Matrigel, wie in 1.3.2 beschrieben, die Aziniformation *in vitro* und spiegelt außerdem mit ca. 100 Pascal die geringe Festigkeit der gesunden Brustdrüse wider (Hughes *et al.*, 2010).

Analyse der festigkeitsabhängigen Azinigenese und der Rolle MRTF-A's

Die auf Matrigel-Collagen-I-Gemischen ausgesäten MCF10A zeigten starke morphologische Veränderungen in Abhängigkeit von der Matrix (siehe 4.3.3). So bildeten die MCF10A Azini, welche auf Gelen mit 75%igen Collagen-I-Anteil (mC) oder reinem Collagen I wuchsen, zelluläre Ausläufer, sogenannte Protrusionen. Im Gegensatz dazu formten MCF10A auf reinem Matrigel polarisierte, glatt begrenzte Azini mit zentralem Lumen. Dies war über den gesamten 14-tägigen Verlauf der Aziniformation zu beobachten. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch die Studie von Carey *et al.*, die in MCF10A Azini auf Collagen I einen invasiveren epithelialen Phänotyp sowie die Expression von mesenchymalen Genen nachwies (Carey *et al.*, 2017). Auch Paszek *et al.* nutzten Matrigel-Collagen-I-Gele und zeigten, dass eine Zunahme des Collagen-Anteils mit einer Störung des Aufbaus von MCF10A Azini einherging und zu mehr

Zellproliferation führte (Paszek et al., 2005). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die Bildung von Protrusionen an MCF10A Azini einen invasiven Phänotyp anzeigt. Zwar konnten nur erste Hinweise auf eine Expression von mesenchymalen Genen im Sinne einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) gefunden werden, jedoch weisen die Azini, welche auf Collagen I wuchsen, eine erhöhte MRTF-A-Aktivität im Vergleich zu Solchen, die auf Matrigel wuchsen, auf. Dieses Ergebnis wird von verschiedenen Studien gestützt, die ebenso eine erhöhte MRTF-A-Aktivität bei fester ECM feststellten (Dai et al., 2019; O'Connor et al., 2015). Außerdem kann dies indirekt als Hinweis auf eine mesenchymale Genexpression gewertet werden, da in vorangegangenen Arbeiten bereits eine Korrelation zwischen einer erhöhten MRTF-A-Aktivität und EMT-Induktion gezeigt werden (Dai et al., 2019; Nalluri et al., 2022). Dies lässt den Schluss zu, dass ein zunehmender Collagen I-Gehalt der Matrix einen invasiven Phänotyp in MCF10A Azini induziert. Allerdings war zu klären, inwiefern dieser Effekt auf die erhöhte Festigkeit der Collagen-I-Gele zurückzuführen ist. Als natürliche Matrix kommt Collagen I auch in der Brustdrüse vor. Dort bildet es einen Großteil des inter- und intralobulären Stromas und ist somit nicht in direktem Kontakt zu den Drüsenendstücken, welche das *in vivo* Korrelat zu den Azini in 3D-Kultur darstellen. Diese sind ausschließlich von einer dünnen Basalmembran umgeben, welche hauptsächlich aus Collagen IV und Laminin aufgebaut ist. Daraus lässt sich die Limitation der Matrigel-Collagen-I-Matrices ableiten, welche in der physiologisch nicht relevanten Präsentation von Collagen I an den Drüsenendstücken bzw. Azini liegt. Darin begründet sich auch die bereits etablierte Nutzung von Collagen-I-Gelen für die Untersuchung und Induktion von Ducti bzw. Ductili in sogenannten „*branching assays*“ (Keely et al., 1995; Wozniak et al., 2003). Vor diesem Hintergrund galt es auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Protrusionen weniger um invasive, auswachsende Zellen, sondern mehr um abzweigende Milchgänge handelt. Des Weiteren war zu beweisen, dass die zellulären Ausläufer durch die erhöhte Festigkeit des Collagen I induziert wurden. Da die Drüsenendstücke *in vivo* von einer Collagen-IV-haltigen Basalmembran umgeben sind, wurde zuerst versucht dieses *in vitro* nachzuahmen. Dazu wurden die Matrigel-Collagen-I-Gele mit einer dünnen Schicht aus Collagen IV beschichtet, sodass die MCF10A Zellen nur mit diesem in Kontakt waren, jedoch trotzdem dem mechanischen Stimulus durch die darunter befindliche Matrix ausgesetzt waren (siehe 4.3.4). Dass sich hierbei, gleichsam zu den Experimenten ohne Collagen IV, Protrusionen nur an den Azini, welche auf Collagen-I-Gelen wuchsen, ausbildeten, deutet darauf hin, dass dieser Effekt durch die Festigkeit der Matrix bedingt ist. Zur weiteren Bestätigung dieser Theorie wurden kommerzielle Polyacrylamidgele mit definierter Festigkeit eingesetzt (Matrigen SoftSlips; siehe 4.3.5.). Die weichen (200 Pascal) und festen (4000 Pascal) Gele wurden mit Matrigel beschichtet, um den MCF10A Zellen eine physiologisch relevante Umgebung aus

Collagen IV und Laminin zu präsentieren. In Folge bildeten solche Azini, welchen auf festen Gelen wuchsen, Protrusionen aus. In diesen konnte weiterhin eine erhöhte MRTF-A-Aktivität im Vergleich zu Azini, die auf weichen Gelen wuchsen, nachgewiesen werden. Letztere differenzierten zu glatt begrenzten Azini mit zentralem Lumen. Diese Beobachtungen belegen die Induktion eines protrusiven azinaren Phänotyps durch eine feste Matrix in 3D-Kultur und lassen daher den Schluss zu, dass sich auch mit dem Matrigel-Collagen-I-Modell die Auswirkungen der Festigkeit auf die Aziniformation valide untersuchen lassen. Dies wird durch die Studie von Paszek *et al.* unterstützt (Paszek et al., 2005).

Analyse von Brustkrebszelllinien und Primärorganoiden

Nach Etablierung des Matrigel-Collagen-I-Modells, sollte dieses genutzt werden, um die Zusammenhänge zwischen Gewebefestigkeit und MRTF-A auch in verschiedenen Brustkrebszelllinien sowie murinen Primärorganoiden zu untersuchen.

Eine Festigkeits-induzierte Veränderung der Azinuzmorphologie wurde bisher ausschließlich in benignen Brustepithelzellen nachgewiesen (Carey et al., 2017; Paszek et al., 2005). Welche Auswirkungen eine erhöhte Festigkeit auf bereits entartete Brustepithelzellen hat, ist demnach noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass Tumoren häufiger in festem Brustgewebe, welches mit einem erhöhten Collagen-I-Gehalt korreliert, auftreten (Guo et al., 2001; McCormack & Santos Silva, 2006; Provenzano et al., 2009). Außerdem konnte im Zellmodell eine erhöhte MRTF-A-Expression mit einer gesteigerten Migration und Invasion von Brustkrebszellen in Verbindung gebracht werden (Medjkane et al., 2009). Um zu überprüfen, inwiefern sich eine erhöhte Festigkeit *in vitro* auf Brustkrebszelllinien auswirkt, wurden im ersten Schritt zwei Zelllinien ausgewählt (siehe 4.1.2). Zwar weisen sowohl MCF7 als auch T47D eine, verglichen mit MCF10A, geringere basale MRTF-A-Expression in 2D auf, jedoch sind die Zellen beider Linien in der Lage Sphäroide in 3D-Kultur zu bilden. In Abgrenzung zu den benignen MCF10A Azini, weisen die Sphäroide keine Lumenbildung auf Matrigel auf (Petersen et al., 1992). Die MCF7-Zelllinie entstammt von einem humanen Adenokarzinom der Brust, währenddessen die Zellen der T47D-Zelllinie duktales Ursprungs sind. Beide Brustkrebszelllinien weisen einen übereinstimmenden Hormonrezeptorstatus (ER+, PR+) sowie HER2/neu-Status (HER-) auf (siehe 3.1.4). Ausgesät auf Matrigel-Collagen-I-Gelen zeigte sich ein differenziertes Bild zwischen MCF7 und T47D. Während erstere einen protrusiven Phänotyp vergleichbar mit den Beobachtungen in MCF10A ausbildeten, ließen sich keine morphologischen Veränderungen in den T47D Sphäroiden beobachten. Im Vergleich zu MCF10A Azini, bildeten an Tag 4 weniger MCF7 Sphäroide Protrusionen aus. Eine Analyse zu späteren Zeitpunkten war aufgrund der Größe und Unregelmäßigkeit der MCF7 Sphäroide nicht möglich. Die T47D Sphäroide zeigten im gesamten 14-tägigen Beobachtungsverlauf keine morphologischen Veränderungen. Die vergleichbaren

Ergebnisse zwischen MCF10A und MCF7 werden von ersten Analysen, die Hinweise auf eine stark erhöhte MRTF-A-Aktivität in MCF7 auf einer festen Matrix geben, untermalt (Daten nicht dargestellt). Die Untersuchung der Effekte einer erhöhten Festigkeit auf Brustkrebszelllinien *in vitro* bedarf weiterer, detaillierterer Studien. Nichtsdestotrotz konnte die vorliegende Studie in MCF7 einen festigkeits-induzierten invasiven Phänotyp herausstellen. Der Unterschied in den Beobachtungen zu T47D ist in dem Ursprung der Zellen zu vermuten. Die MCF7 Zellen stammen von einem Adenokarzinom der Brust. Bei diesem sind die Drüsenendstücke bzw. Sphäroide Ort der Tumorgenese, worin sich womöglich die Unterschiede zu den dukталen T47D Sphäroiden begründen.

Zur Untersuchung von primären Brustepithelzellen *in vitro*, wurde das Brustgewebe von Mäusen, wie in 3.2.3 beschrieben, entnommen, die darin enthaltenen azinaren Strukturen isoliert und auf verschiedenen 3D-Matrices ausgesät. Im Vergleich zur Nutzung immortalisierter Zelllinien, stellt dies ein physiologisch relevanteres Modell dar. Die Organoiden repräsentieren ihr Ursprungsgewebe unverfälscht und sind weder genetisch noch phänotypisch durch eine Immortalisierung verändert (Mroue & Bissell, 2013; Vidi et al., 2013). Außerdem sind die luminalen Epithelzellen weiterhin von ihrer natürlichen Nische aus Myoepithelzellen und Fibroblasten umgeben. Die primären Organoiden unterscheiden sich auch in ihrem Entwicklungszeitpunkt von MCF10A Azini (siehe 1.3.2). Während letztere, im Rahmen der Experimente, über den Verlauf ihrer Formation hinweg verschiedenen Stimuli, wie einer erhöhten Festigkeit, ausgesetzt werden, sind die primären Organoiden in ihrer Entwicklung bereits zum Zeitpunkt der Entnahme abgeschlossen. Damit erfolgt die Beobachtung *in vitro* bereits an fertig ausgebildeten Organoiden. Auch eine erhöhte Festigkeit des Brustgewebes *in vivo* wirkt auf die ausdifferenzierten Drüsenendstücke, was mit Hilfe der primären Organoiden *in vitro* nachvollzogen werden kann.

Zunächst wurden genetisch unveränderte primäre Organoiden von NMRI-Mäusen (siehe 3.1.4), vergleichbar mit den vorherigen Experimenten, auf Matrigel, einem 1:1 Gemisch aus Matrigel und Collagen I oder purem Collagen I ausgesät. Nach 5 Tagen in Kultur konnten phänotypische Unterschiede zwischen den Organoiden, welche auf Matrigel und solchen, die auf dem Matrigel-Collagen-I-Gemisch oder reinem Collagen I wuchsen, beobachtet werden. Letztere waren weniger wahrscheinlich hohl und bildeten außerdem signifikant mehr Protrusionen aus. Die Beobachtung eines festigkeitsabhängigen Phänotyps von primären Organoiden ist neu. Zwar wurden primäre Organoiden bereits auf Collagen I kultiviert, jedoch diente dies meist der Untersuchung des *branchings* (Hamamoto et al., 1988; Simian et al., 2001). Die Induktion eines malignen Phänotyps durch eine hohe Festigkeit, wie Paszek *et al.* ihn wegweisend in MCF10A nachwies (Paszek et al., 2005), konnte nun erstmals auf primäre Organoiden übertragen

werden. Auffallend ist hierbei, dass zwei Prozesse voneinander zu unterscheiden sind. Einerseits zeigt sich eine Tendenz der Organoide auf Matrigel-Collagen-I bzw. reinem Collagen I häufiger gefüllt zu sein. Dies entspricht der etablierten Theorie, dass die Füllung des epithelialen Lumens kennzeichnend für die Entstehung eines frühen epithelialen Tumors, wie beispielsweise eines DCIS, ist (Harris et al., 2014). Es geht mit den Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen einher, welche den Lumenverlust von MCF10A Azini im Rahmen einer Tumorgenese beobachteten (Chaudhuri et al., 2014; Debnath & Brugge, 2005; Paszek et al., 2005). Die Entwicklung und Erhaltung einer hohlen, polarisierten Struktur ist demnach entscheidend für die Form und Funktion von epithelialen Zellen (Bissell & Radisky, 2001). Verschiedene Studien untersuchten die molekularen Hintergründe für die Lumenformation und -erhaltung in Brustepithelzellen. So stellten Muthuswamy *et al.* 2001 heraus, dass eine Aktivierung des *epithelial growth factor receptor* (EGFR) ErbB2/HER2 in vorgebildeten MCF10A Azini Proliferation reinitialisiert, wodurch gefüllte multi-azinare Strukturen entstehen, die Charakteristika eines Krebsfrühstadiums aufweisen (Muthuswamy et al., 2001). Debnath *et al.* konnten ein Jahr später nachweisen, dass der Verlust des Lumens auf die Kombination aus verminderter Apoptose und erhöhter Proliferation zurückzuführen ist (Debnath et al., 2002). Neben der Betrachtung des Lumens der Organoide, fiel als weiterer Prozess die Bildung von Protrusionen auf Collagen-I-haltigen Gelen auf. Diese zellulären Ausläufer konnten in der vorliegenden Arbeit bereits in MCF10A auf Collagen-I-Gelen sowie festen Polyacrylamidgelen beobachtet werden. Während Protrusionen an MCF10A Azini auf festen Gelen in der Studie von Paszek *et al.* zwar erkennbar sind, jedoch nicht benannt werden, taucht der Terminus in der Arbeit von Carey *et al.* erstmals auf (Carey et al., 2017; Paszek et al., 2005). Der Arbeitsgruppe gelang es, die Induktion eines invasiven epithelialen Phänotyps in MCF10A Azini auf Collagen-I-Gelen nachzuweisen. Des Weiteren konnten sie diesen mit einer mesenchymalen Genexpression im Sinne einer EMT in Verbindung bringen (Carey et al., 2017). Dabei wird die Bildung von Protrusionen auch hier klar vom *branching*, das beispielsweise von Brownfield *et al.* untersucht wurde, abgegrenzt (Brownfield et al., 2013). Ähnliche Beobachtungen wurden in der kürzlich erschienenen Studie von Gau *et al.* gemacht (Gau et al., 2022). Mit Hilfe von Brustkrebszelllinien konnte dort gezeigt werden, dass eine verminderte MRTF-Aktivität mit einer verminderten Bildung protrusiver Strukturen korreliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die Bildung von Protrusionen unabhängig von der Füllung des Lumens auftritt. Dabei bleibt fraglich, inwiefern die zwei Prozesse voneinander abzugrenzen sind (siehe Abbildung 20). Sowohl die Füllung des epithelialen Lumens als auch die Bildung von Protrusionen werden in der Literatur mit der Tumorgenese von Epithelzellen in Verbindung gebracht. Während ersteres als Frühzeichen einer

Tumorbildung gewertet wird, scheint die Protrusionsbildung eher im Sinne einer gesteigerten Invasivität aufzutreten. Zur genauen Differenzierung der beiden Prozesse bedarf es jedoch weiterer Studien.

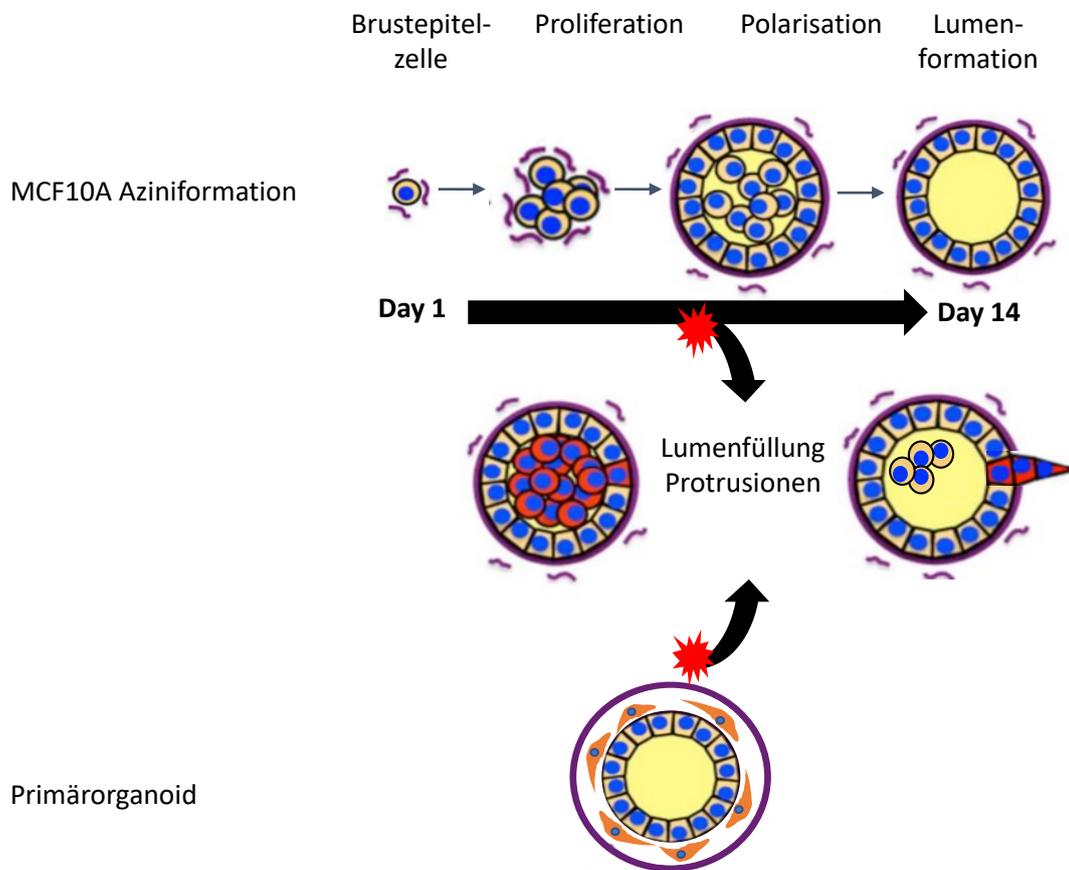


Abbildung 20: Schematische Abbildung der MCF10A Aziniformation und Primärorganoiden *in vitro* sowie der Folgen einer Störung dieser. Während MCF10A im Laufe von 14 Tagen zu hohlen, polarisierten Azini differenzieren, handelt es sich bei den Primärorganoiden um bereits ausdifferenzierte hohle Strukturen. Eine Störung beider Systeme, im Sinne einer erhöhten Matrixfestigkeit oder erhöhten MRTF-A-Aktivität führt zu einer Füllung des Lumens sowie Protrusionsbildung.

Modifiziert nach Lee und Chaudhuri (Lee & Chaudhuri, 2018)

Um die Wechselwirkung zwischen dem festigkeitsinduzierten Phänotyp von Primärorganoiden und der MRTF-A-Expression bzw. -Aktivität zu untersuchen, wurden zwei Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz erfolgte eine Überexpression von MRTF-A in Organoiden mittels einer Cre/loxP-Maus. Wie unter 4.6.2 beschrieben, ermöglicht die Zugabe von 4-OH-Tamoxifen zu MRTF-A fl/wt, CreERT2 ki/wt Organoiden *in vitro* eine konstitutionelle Aktivierung von MRTF-A. Diese konnte indirekt, über den Nachweis einer effektiven Entfernung der Stop-Kassette in der Genotypisierung, nachgewiesen werden. Nach 5 Tagen in Kultur zeigte sich matrix-übergreifend

ein deutlicher Rückgang an hohlen Organoiden. Während bei physiologischer MRTF-A-Aktivität ca. 60 % der Organoide auf Matrigel hohl sind, waren es nach Induktion durch 4-OH-Tamoxifen auf allen Matrices nur ca. 10 % (Abbildung 18). Zudem ließ sich eine festigkeitsabhängige Protrusionsbildung feststellen. Allerdings wiesen weniger Organoide Protrusionen nach MRTF-A-Aktivierung auf. Diese Beobachtungen stellen den Zusammenhang zwischen Lumenfüllung und Protrusionsbildung in Frage. Gleichzeitig scheint MRTF-A in beiden Prozessen eine individuelle Rolle zu spielen. Zu vermuten ist, dass die starke MRTF-A-Überexpression die Proliferation im Sinne eines pathogenen Mechanismus erhöht, welches zu einer Füllung der Primärorganoiden führt. So wurde eine Hyperproliferation auch in der Studie von Seifert *et al.* bei erhöhter MRTF-A-Aktivität gesehen (Seifert & Posern, 2017). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Medjkane *et al.* scheint dies jedoch nicht mit einer Zunahme der Invasivität, respektive Protrusionsbildung, einherzugehen (Medjkane *et al.*, 2009). Außerdem bleibt fraglich, wieso eine vermehrte Proliferation in diesem Fall ausschließlich Lumen-gerichtet wirkt und nicht zu einem Auswachsen von Zellen, im Sinne einer Protrusionsbildung, führt. Durch frühere Studien ist bekannt, dass über den MRTF-SRF-Signalweg auch eine Regulierung von Apoptose erfolgt (Shaposhnikov *et al.*, 2012). Somit bleibt auch zu diskutieren, inwieweit durch die Überexpression MRTF-A's eine Deregulierung der Apoptose eine Rolle spielen könnte. Dies erfordert detailliertere Studien zur Differenzierung zwischen Lumenfüllung und Protrusionsbildung, ebenso wie zur Untersuchung der molekularen Folgen einer MRTF-A-Überexpression in Primärorganoiden.

In einem zweiten Ansatz wurden die Primärorganoiden mit dem MRTF-Inhibitor CCG 203971 behandelt, um die Auswirkungen einer verminderten MRTF-A-Aktivität *in vitro* zu untersuchen. Dieser bewirkte in drei-dimensional kultivierten MCF10A Azini einen partiellen *rescue* des protrusiven Phänotyps auf Collagen-I-Gelen. Um die Effekte des Inhibitors in Primärorganoiden zu analysieren, wurden genetisch unveränderte NMRI-Mäuse genutzt. Die extrahierten Organoiden wurden wie zuvor auf reinem Matrigel, einem Matrigel-Collagen-I-Gemisch oder reinem Collagen I ausgesät. Nach 5-tägiger Kultur der Organoiden mit CCG 203971 bzw. DMSO als Vehikelkontrolle zeigen sich besonders in der Analyse der Protrusionen Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Größe der Organoiden blieb nahezu gleich. Auch konnten nur geringe Unterschiede in der Füllung des Lumens zwischen den Gruppen festgestellt werden. Matrixübergreifend bildeten die Primärorganoiden, welche mit CCG 203971 behandelt wurden, jedoch weniger Protrusionen als die Organoiden der Kontrollgruppe. Von Letzteren wiesen ca. 70 % Protrusionen auf dem Collagen I-Matrigel-Gemisch auf. Durch Zugabe des Inhibitors verringerte sich dieser Anteil signifikant um ca. 30 %. Damit bestätigen sich die Ergebnisse aus den Experimenten mit MCF10A Azini (Vergleich Abbildung 15 vs. 19). Der Einsatz des Inhibitors vermindert die festigkeitsinduzierte Ausbildung eines invasiven Phänotyps in Brustepithelzellen.

Erstmals kann so die Wirkung des MRTF-Inhibitors CCG 203971 auf Brustepithelzellen humanen und murinen Ursprungs bewiesen werden. Damit werden Studien, die eine anti-migratorische Wirkung des Inhibitors in verschiedenen Krebszellen feststellten, indirekt unterstützt (Bell et al., 2013; Haak et al., 2017). CCG 203971 stellte sich als effektives Tool für die Untersuchung MRTF-A-abhängiger Prozesse in drei-dimensionalen Kultursystemen heraus. Daraus ergibt sich ein interessantes Bild für die klinische Anwendung des Inhibitors. *In vitro* ist dieser in der Lage die pro-invasiven Effekte einer hohen Gewebefestigkeit zu vermindern. Zwar wurde die Rolle von MRTF-A in Brustkrebs bisher klinisch wenig evaluiert, jedoch gibt es erste Studien, die eine MRTF-A-Expression mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen korrelieren. (Hua & Yang, 2022; Seifert & Posern, 2017). Bestätigt sich in weiteren Studien der Zusammenhang zwischen Gewebefestigkeit, MRTF-A-Aktivität und Invasivität bzw. Mortalität des Mammakarzinoms *in vitro* sowie *in vivo*, könnte auch der klinische Einsatz des MRTF-Inhibitors CCG 203971 relevant werden.

Fazit

Die vorliegende Arbeit konnte einen Einblick in die Auswirkungen verschiedener Gewebefestigkeiten auf humane sowie murine Brustepithelzellen geben. Entsprechend der Studie von Seifert *et al.* erfolgte, bei physiologischer Regulation der MRTF-A-Aktivität, eine regelhafte Aziniformation auf weicher Matrix. Eine erhöhte Festigkeit induzierte morphologische Veränderungen an Azini, welche basierend auf vorangegangenen Studien (Carey et al., 2017; Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005; Provenzano et al., 2008), im Sinne einer gesteigerten Invasivität gewertet wurden. Es wurde weiterhin eine erhöhte MRTF-A-Aktivität in Azini, welche auf festen Matrices wuchsen, festgestellt. Die morphologischen Veränderungen der Azini auf festen Matrices konnte durch den MRTF-Inhibitor CCG 203971 zumindest teilweise aufgehoben werden. Dies spricht für eine MRTF-A-medierte Signalkaskade. Gleiche Effekte zeigten sich bei der Untersuchung von murinen Primärorganoiden. Eine erhöhte Festigkeit ging auch hier mit einer Verringerung an hohlen Strukturen sowie der Ausbildung von Protrusionen einher (siehe Abbildung 21). Mit Hilfe einer MRTF-A-überexprimierenden Mauslinie sowie der Nutzung des MRTF-Inhibitors wurde die Rolle von MRTF-A dabei nähergehend untersucht. Die Effekte einer MRTF-A-Überexpression, welche nur in Primärorganoiden untersucht wurden, sind zum jetzigen Zeitpunkt schwer einzuordnen. Die ausgeprägte MRTF-A-Überexpression durch 4-OH-Tamoxifen reduzierte den Anteil an hohlen Organoiden matrixübergreifend drastisch. Eine Verminderung der MRTF-A-Aktivität ging mit einem Rückgang der invasiven Strukturen einher, wobei es keine Auswirkungen auf die Lumenfüllung der Primärorganoiden gibt. Dies gleicht den Ergebnissen der mit Inhibitor behandelten MCF10A Azini.

6. Literaturverzeichnis

- Abu-Yousif, A. O., Rizvi, I., Evans, C. L., Celli, J. P., and Hasan, T. (2009). PuraMatrix Encapsulation of Cancer Cells. *JoVE*, e1692.
- Alowami, S., Troup, S., Al-Haddad, S., Kirkpatrick, I., and Watson, P. H. (2003). Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. *Breast Cancer Res* 5, R129-135.
- Barcellos-Hoff, M. H., Aggeler, J., Ram, T. G., and Bissell, M. J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 105, 223-235.
- Bell, J. L., Haak, A. J., Wade, S. M., Kirchhoff, P. D., Neubig, R. R., and Larsen, S. D. (2013). Optimization of novel nipecotic bis(amide) inhibitors of the Rho/MKL1/SRF transcriptional pathway as potential anti-metastasis agents. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 3826-3832.
- Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q., and Geiger, B. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 677-695.
- Bischoff, F., and Bryson, G. (1964). CARCINOGENESIS THROUGH SOLID STATE SURFACES. *Prog Exp Tumor Res* 5, 85-133.
- Bissell, M. J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46-54.
- Boyd, N. F., Huszti, E., Melnichouk, O., Martin, L. J., Hislop, G., Chiarelli, A., Yaffe, M. J., and Minkin, S. (2014). Mammographic features associated with interval breast cancers in screening programs. *Breast Cancer Res* 16, 417.
- Boyd, N. F., Lockwood, G. A., Byng, J. W., Tritchler, D. L., and Yaffe, M. J. (1998). Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 1133-1144.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394-424.
- Brownfield, D. G., Venugopalan, G., Lo, A., Mori, H., Tanner, K., Fletcher, D. A., and Bissell, M. J. (2013). Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules. *Curr Biol* 23, 703-709.
- Carey, S. P., Martin, K. E., and Reinhart-King, C. A. (2017). Three-dimensional collagen matrix induces a mechanosensitive invasive epithelial phenotype. *Sci Rep* 7, 42088.
- Cen, B., Selvaraj, A., Burgess, R. C., Hitzler, J. K., Ma, Z., Morris, S. W., and Prywes, R. (2003). Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol* 23, 6597-6608.
- Chaudhuri, O., Koshy, S. T., Branco da Cunha, C., Shin, J. W., Verbeke, C. S., Allison, K. H., and Mooney, D. J. (2014). Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater* 13, 970-978.
- Collins, L. C., Tamimi, R. M., Baer, H. J., Connolly, J. L., Colditz, G. A., and Schnitt, S. J. (2005). Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. *Cancer* 103, 1778-1784.
- Cretu, A., Castagnino, P., and Assoian, R. (2010). Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels. *J Vis Exp*.
- Dai, J., Qin, L., Chen, Y., Wang, H., Lin, G., Li, X., Liao, H., and Fang, H. (2019). Matrix stiffness regulates epithelial-mesenchymal transition via cytoskeletal remodeling and MRTF-A translocation in osteosarcoma cells. *J Mech Behav Biomed Mater* 90, 226-238.

Debnath, J., and Brugge, J. S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 5, 675-688.

Debnath, J., Mills, K. R., Collins, N. L., Reginato, M. J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S. (2002). The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 111, 29-40.

Debnath, J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S. (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30, 256-268.

Denkert, C., Loibl, S., Müller, B. M., Eidtmann, H., Schmitt, W. D., Eiermann, W., Gerber, B., Tesch, H., Hilfrich, J., Huober, J., *et al.* (2013). Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol* 24, 2786-2793.

Descot, A., Hoffmann, R., Shaposhnikov, D., Reschke, M., Ullrich, A., and Posern, G. (2009). Negative regulation of the EGFR-MAPK cascade by actin-MAL-mediated Mig6/Errfi-1 induction. *Mol Cell* 35, 291-304.

Descot, A., Rex-Haffner, M., Courtois, G., Bluteau, D., Menssen, A., Mercher, T., Bernard, O. A., Treisman, R., and Posern, G. (2008). OTT-MAL is a deregulated activator of serum response factor-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 28, 6171-6181.

Elston, C. W., and Ellis, I. O. (2002). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology* 41, 151-152, discussion 152-153.

Emerman, J. T., and Pitelka, D. R. (1977). Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro* 13, 316-328.

Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N., and Treisman, R. (2014). Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes Dev* 28, 943-958.

Evelyn, C. R., Wade, S. M., Wang, Q., Wu, M., Iñiguez-Lluhí, J. A., Merajver, S. D., and Neubig, R. R. (2007). CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling. *Mol Cancer Ther* 6, 2249-2260.

Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 752-757.

Foster, C. T., Gualdrini, F., and Treisman, R. (2017). Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes Dev* 31, 2361-2375.

Fritz, G., Just, I., and Kaina, B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 81, 682-687.

Gau, D., Chawla, P., Eder, I., and Roy, P. (2022). Myocardin-related transcription factor's interaction with serum-response factor is critical for outgrowth initiation, progression, and metastatic colonization of breast cancer cells. *FASEB Bioadv* 4, 509-523.

Geneste, O., Copeland, J. W., and Treisman, R. (2002). LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J Cell Biol* 157, 831-838.

Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., and Senn, H. J. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24, 2206-2223.

Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., and Senn, H. J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736-1747.

Guettler, S., Vartiainen, M. K., Miralles, F., Larijani, B., and Treisman, R. (2008). RPEL motifs link the serum response factor cofactor MAL but not myocardin to Rho signaling via actin binding. *Mol Cell Biol* 28, 732-742.

Guo, Y. P., Martin, L. J., Hanna, W., Banerjee, D., Miller, N., Fishell, E., Khokha, R., and Boyd, N. F. (2001). Growth factors and stromal matrix proteins associated with mammographic densities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 243-248.

Haak, A. J., Appleton, K. M., Lisabeth, E. M., Misek, S. A., Ji, Y., Wade, S. M., Bell, J. L., Rockwell, C. E., Airik, M., Krook, M. A., *et al.* (2017). Pharmacological Inhibition of Myocardin-related Transcription Factor Pathway Blocks Lung Metastases of RhoC-Overexpressing Melanoma. *Mol Cancer Ther* 16, 193-204.

Hadden, W. J., Young, J. L., Holle, A. W., McFetridge, M. L., Kim, D. Y., Wijesinghe, P., Taylor-Weiner, H., Wen, J. H., Lee, A. R., Bieback, K., *et al.* (2017). Stem cell migration and mechanotransduction on linear stiffness gradient hydrogels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 5647-5652.

Hainline, K. M., Gu, F., Handley, J. F., Tian, Y. F., Wu, Y., de Wet, L., Vander Griend, D. J., and Collier, J. H. (2019). Self-Assembling Peptide Gels for 3D Prostate Cancer Spheroid Culture. *Macromol Biosci* 19, e1800249.

Hamamoto, S., Imagawa, W., Yang, J., and Nandi, S. (1988). Morphogenesis of mouse mammary epithelial cells growing within collagen gels: ultrastructural and immunocytochemical characterization. *Cell Differ* 22, 191-201.

Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., *et al.* (2010). American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 28, 2784-2795.

Harris, J. R., Lippman, M. E., Morrow, M., and Kent Osborne, C. (2014). *Diseases of the breast: Fifth edition: Wolters Kluwer Health Adis (ESP)*.

Hayashi, K., Watanabe, B., Nakagawa, Y., Minami, S., and Morita, T. (2014). RPEL proteins are the molecular targets for CCG-1423, an inhibitor of Rho signaling. *PLoS One* 9, e89016.

Hebner, C., Weaver, V. M., and Debnath, J. (2008). Modeling morphogenesis and oncogenesis in three-dimensional breast epithelial cultures. *Annu Rev Pathol* 3, 313-339.

Hinkel, R., Trenkwalder, T., Petersen, B., Husada, W., Gesenhues, F., Lee, S., Hannappel, E., Bock-Marquette, I., Theisen, D., Leitner, L., *et al.* (2014). MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2. *Nat Commun* 5, 3970.

Hua, Y., and Yang, M. (2022). The prognostic value of MKL1 in predicting breast cancer immune infiltrates and chemosensitivity. *Bosn J Basic Med Sci* 22, 382-394.

Hughes, C. S., Postovit, L. M., and Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* *10*, 1886-1890.

Ingber, D. E., Madri, J. A., and Jamieson, J. D. (1981). Role of basal lamina in neoplastic disorganization of tissue architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 3901-3905.

Janmey, P. A., and Miller, R. T. (2011). Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J Cell Sci* *124*, 9-18.

Johnson, L. A., Rodansky, E. S., Haak, A. J., Larsen, S. D., Neubig, R. R., and Higgins, P. D. (2014). Novel Rho/MRTF/SRF inhibitors block matrix-stiffness and TGF- β -induced fibrogenesis in human colonic myofibroblasts. *Inflamm Bowel Dis* *20*, 154-165.

Kalita, K., Kuzniewska, B., and Kaczmarek, L. (2012). MKLs: co-factors of serum response factor (SRF) in neuronal responses. *Int J Biochem Cell Biol* *44*, 1444-1447.

Kalluri, R., and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* *119*, 1420-1428.

Keely, P. J., Fong, A. M., Zutter, M. M., and Santoro, S. A. (1995). Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci* *108* (Pt 2), 595-607.

Knöll, B., and Beck, H. (2011). The cytoskeleton and nucleus: the role of actin as a modulator of neuronal gene expression. *e-Neuroforum* *2*, 1-5.

Koch-Institut, R. (2016). Brustkrebs (Mammakarzinom). Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV.

Leal, A. S., Misek, S. A., Lisabeth, E. M., Neubig, R. R., and Liby, K. T. (2019). The Rho/MRTF pathway inhibitor CCG-222740 reduces stellate cell activation and modulates immune cell populations in *Kras*(G12D); *Pdx1-Cre* (KC) mice. *Sci Rep* *9*, 7072.

Lee, J. Y., and Chaudhuri, O. (2018). Regulation of Breast Cancer Progression by Extracellular Matrix Mechanics: Insights from 3D Culture Models. *ACS Biomater Sci Eng* *4*, 302-313.

Leight, J. L., Wozniak, M. A., Chen, S., Lynch, M. L., and Chen, C. S. (2012). Matrix rigidity regulates a switch between TGF- β 1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* *23*, 781-791.

Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Wengler, W., *et al.* (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* *139*, 891-906.

Li, S., Chang, S., Qi, X., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2006). Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Mol Cell Biol* *26*, 5797-5808.

Li, S., Wang, D. Z., Wang, Z., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2003). The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9366-9370.

Liao, X. H., Wang, N., Liu, L. Y., Zheng, L., Xing, W. J., Zhao, D. W., Sun, X. G., Hu, P., Dong, J., and Zhang, T. C. (2014). MRTF-A and STAT3 synergistically promote breast cancer cell migration. *Cell Signal* *26*, 2370-2380.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* *25*, 402-408.

Ma, Z., Morris, S. W., Valentine, V., Li, M., Herbrick, J. A., Cui, X., Bouman, D., Li, Y., Mehta, P. K., Nizetic, D., *et al.* (2001). Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet* *28*, 220-221.

Martinac, B. (2014). The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim Biophys Acta* 1838, 682-691.

McCormack, V. A., and dos Santos Silva, I. (2006). Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1159-1169.

Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E., and Treisman, R. (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat Cell Biol* 11, 257-268.

Melcher, M.-L., Block, I., Kropf, K., Singh, A. K., and Posern, G. (2022). Interplay of the transcription factor MRTF-A and matrix stiffness controls mammary acinar structure and protrusion formation. *Cell Communication and Signaling* 20, 158.

Mercher, T., Coniat, M. B., Monni, R., Mauchauffe, M., Nguyen Khac, F., Gressin, L., Mugneret, F., Leblanc, T., Dastugue, N., Berger, R., and Bernard, O. A. (2001). Involvement of a human gene related to the *Drosophila* *spen* gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5776-5779.

Mi, K., and Xing, Z. (2015). CD44(+)/CD24(-) breast cancer cells exhibit phenotypic reversion in three-dimensional self-assembling peptide RADA16 nanofiber scaffold. *Int J Nanomedicine* 10, 3043-3053.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342.

Miyazawa, A., Ito, S., Asano, S., Tanaka, I., Sato, M., Kondo, M., and Hasegawa, Y. (2018). Regulation of PD-L1 expression by matrix stiffness in lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 2344-2349.

Mokalled, M. H., Johnson, A., Kim, Y., Oh, J., and Olson, E. N. (2010). Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development* 137, 2365-2374.

Moran, M. S., Schnitt, S. J., Giuliano, A. E., Harris, J. R., Khan, S. A., Horton, J., Klimberg, S., Chavez-MacGregor, M., Freedman, G., Houssami, N., *et al.* (2014). Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 88, 553-564.

Morita, T., Mayanagi, T., and Sobue, K. (2007). Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* 179, 1027-1042.

Mouilleron, S., Langer, C. A., Guettler, S., McDonald, N. Q., and Treisman, R. (2011). Structure of a pentavalent G-actin*MRTF-A complex reveals how G-actin controls nucleocytoplasmic shuttling of a transcriptional coactivator. *Sci Signal* 4, ra40.

Mroue, R., and Bissell, M. J. (2013). Three-dimensional cultures of mouse mammary epithelial cells. *Methods Mol Biol* 945, 221-250.

Muthuswamy, S. K., Li, D., Lelievre, S., Bissell, M. J., and Brugge, J. S. (2001). ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol* 3, 785-792.

Nalluri, S. M., Sankhe, C. S., O'Connor, J. W., Blanchard, P. L., Khouri, J. N., Phan, S. H., Virgi, G., and Gomez, E. W. (2022). Crosstalk between ERK and MRTF-A signaling regulates TGF β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Physiol* 237, 2503-2515.

O'Connor, J. W., Riley, P. N., Nalluri, S. M., Ashar, P. K., and Gomez, E. W. (2015). Matrix Rigidity Mediates TGFbeta1-Induced Epithelial-Myofibroblast Transition by Controlling Cytoskeletal Organization and MRTF-A Localization. *J Cell Physiol* 230, 1829-1839.

Ohuchi, N., Suzuki, A., Sobue, T., Kawai, M., Yamamoto, S., Zheng, Y. F., Shiono, Y. N., Saito, H., Kuriyama, S., Tohno, E., *et al.* (2016). Sensitivity and specificity of mammography and adjunctive ultrasonography to screen for breast cancer in the Japan Strategic Anti-cancer Randomized Trial (J-START): a randomised controlled trial. *Lancet* 387, 341-348.

Olson, E. N., and Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 353-365.

Paszek, M. J., and Weaver, V. M. (2004). The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 325-342.

Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., *et al.* (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254.

Pawłowski, R., Rajakylä, E. K., Vartiainen, M. K., and Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *Embo j* 29, 3448-3458.

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R., and Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9064-9068.

Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 16, 588-596.

Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., and Keely, P. J. (2009). Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* 28, 4326-4343.

Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Knittel, J. G., Yan, L., Rueden, C. T., White, J. G., and Keely, P. J. (2008). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* 6, 11.

Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.

Scalia-Wilbur, J., Colins, B. L., Penson, R. T., and Dizon, D. S. (2016). Breast Cancer Risk Assessment: Moving Beyond BRCA 1 and 2. *Semin Radiat Oncol* 26, 3-8.

Scharenberg, M. A., Chiquet-Ehrismann, R., and Asparuhova, M. B. (2010). Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1911-1914.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682.

Schmitz, S. (2020). Die Geschichte der Zellkultur_Kap. 1 aus Der Experimentator Zellkultur 4. Aufl. In, pp. 1-22.

Schwartz, M. A. (2010). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a005066.

Schwartz, M. A., and Shattil, S. J. (2000). Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 25, 388-391.

Seifert, A., and Posern, G. (2017). Tightly controlled MRTF-A activity regulates epithelial differentiation during formation of mammary acini. *Breast Cancer Res* 19, 68.

Shaposhnikov, D., Descot, A., Schilling, J., and Posern, G. (2012). Myocardin-related transcription factor A regulates expression of Bok and Noxa and is involved in apoptotic signalling. *Cell Cycle* 11, 141-150.

Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., and Bissell, M. J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128, 3117-3131.

Sleeman, K. E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C. M., and Smalley, M. J. (2006). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* 8, R7.

Smalley, M. J. (2010). Isolation, culture and analysis of mouse mammary epithelial cells. *Methods Mol Biol* 633, 139-170.

Song, H., Han, Y. Z., Cai, G. H., Tang, F. S., Yang, Z. H., Ao, D. S., and Zhou, A. (2015). The effects of self-assembling peptide RADA16 hydrogel on malignant phenotype of human hepatocellular carcinoma cell. *Int J Clin Exp Med* 8, 14906-14915.

Song, Z., Liu, Z., Sun, J., Sun, F. L., Li, C. Z., Sun, J. Z., and Xu, L. Y. (2016). The MRTF-A/B function as oncogenes in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 35, 127-138.

Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., and Treisman, R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98, 159-169.

Stowers, R. S., Allen, S. C., Sanchez, K., Davis, C. L., Ebel, N. D., Van Den Berg, C., and Suggs, L. J. (2017). Extracellular Matrix Stiffening Induces a Malignant Phenotypic Transition in Breast Epithelial Cells. *Cell Mol Bioeng* 10, 114-123.

Sun, Y., Boyd, K., Xu, W., Ma, J., Jackson, C. W., Fu, A., Shillingford, J. M., Robinson, G. W., Hennighausen, L., Hitzler, J. K., *et al.* (2006). Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Mol Cell Biol* 26, 5809-5826.

Tietze, S., Hofmann, A., Wolk, S., and Reeps, C. (2020). Grundlagen der zellulären Mechanotransduktion. *Gefäßchirurgie* 25, 244-248.

Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M., and Christofori, G. (2012). EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 22, 194-207.

Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46, 567-574.

Trembley, M. A., Velasquez, L. S., de Mesy Bentley, K. L., and Small, E. M. (2015). Myocardin-related transcription factors control the motility of epicardium-derived cells and the maturation of coronary vessels. *Development* 142, 21-30.

Vacek, P. M., and Geller, B. M. (2004). A prospective study of breast cancer risk using routine mammographic breast density measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 715-722.

Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B., and Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316, 1749-1752.

Vidi, P. A., Bissell, M. J., and Lelièvre, S. A. (2013). Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. *Methods Mol Biol* *945*, 193-219.

Voogd, A. C., Nielsen, M., Peterse, J. L., Blichert-Toft, M., Bartelink, H., Overgaard, M., van Tienhoven, G., Andersen, K. W., Sylvester, R. J., and van Dongen, J. A. (2001). Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin Oncol* *19*, 1688-1697.

Wang, D., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., Krieg, P. A., and Olson, E. N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* *105*, 851-862.

Wang, D. Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schrott, G., Richardson, J. A., Nordheim, A., and Olson, E. N. (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14855-14860.

Weinl, C., Riehle, H., Park, D., Stritt, C., Beck, S., Huber, G., Wolburg, H., Olson, E. N., Seeliger, M. W., Adams, R. H., and Nordheim, A. (2013). Endothelial SRF/MRTF ablation causes vascular disease phenotypes in murine retinæ. *J Clin Invest* *123*, 2193-2206.

Weissbach, J., Schikora, F., Weber, A., Kessels, M., and Posern, G. (2016). Myocardin-Related Transcription Factor A Activation by Competition with WH2 Domain Proteins for Actin Binding. *Mol Cell Biol* *36*, 1526-1539.

Wirtz, D., Konstantopoulos, K., and Searson, P. C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer* *11*, 512-522.

Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M., Bilous, M., Fitzgibbons, P., *et al.* (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* *31*, 3997-4013.

Wozniak, M. A., Desai, R., Solski, P. A., Der, C. J., and Keely, P. J. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol* *163*, 583-595.

Xu, Y., Luo, Y., Liang, C., Xing, W., and Zhang, T. (2018). A regulation loop between Nrf1alpha and MRTF-A controls migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Mol Med* *42*, 2459-2468.

Yoshio, T., Morita, T., Tsujii, M., Hayashi, N., and Sobue, K. (2010). MRTF-A/B suppress the oncogenic properties of v-ras- and v-src-mediated transformants. *Carcinogenesis* *31*, 1185-1193.

Yu-Wai-Man, C., Spencer-Dene, B., Lee, R. M. H., Hutchings, K., Lisabeth, E. M., Treisman, R., Bailly, M., Larsen, S. D., Neubig, R. R., and Khaw, P. T. (2017). Local delivery of novel MRTF/SRF inhibitors prevents scar tissue formation in a preclinical model of fibrosis. *Sci Rep* *7*, 518.

7. Thesen

1. Eine Collagen-I-Matrix in 3D Kultur von MCF10A Azini stört deren regelhafte Formation und induziert einen protrusiven azinaren Phänotyp.
2. Dieser Effekt ist nicht liganden-abhängig, sondern durch die hohe Festigkeit des Collagens induziert.
3. MCF10A Azini auf fester Matrix weisen eine erhöhte MRTF-A-Aktivität auf. Eine künstliche Verminderung der MRTF-A-Aktivität mittels Inhibitor verhindert partiell die Bildung von Protrusionen auf fester Matrix.
4. Eine hohe Matrixfestigkeit führt auch in murinen Primärganoiden zur Ausbildung von Protrusionen.
5. Eine MRTF-A-Überexpression in Primärganoiden führt zu einer matrix-übergreifenden Füllung der Organoide. Außerdem kann eine festigkeitsabhängige Protrusionsbildung beobachtet werden.
6. Eine Inhibierung der MRTF-A-Aktivität in Primärganoiden reduziert die Protrusionsbildung, vergleichbar zu den Effekten in MCF10A Azini, matrixübergreifend.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Marie-Luise Doll

Hamburg, 17.08.2023

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich die Gelegenheit nutzen um Danke zu sagen.

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Guido Posern für die Bereitstellung des spannenden Themas. Danke für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die stetige Betreuung und Beratschlagung während der gesamten Zeit im Labor und auch danach.

Ich danke dem Promotionskolleg Medizin Halle (HaPKoM) für die Förderung und den Austausch.

Danke an Herrn Prof. Mario Beiner für das Ermöglichen der rheometrischen Messungen im Fraunhofer IMWF.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ines Block. Danke, dass du mich so gut angeleitet hast, mir immer mit Rat und Tat beiseite standest und so vieles erklärt hast. Danke für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, die vielen gemeinsamen Lachen, Kaffeepausen und Bürotage.

Danke möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe sagen. Danke Karo und Anja für die liebevolle Unterstützung bei allen Laborfragen. Danke Igor für das gemeinsame Brainstorming und die geteilte Liebe für Zucker. Danke Marina, dass du meine Freundin geworden bist und wir durch alle Hoch's und Tief's gemeinsam gegangen sind. Danke außerdem an Laurin, Anurag, Jens und Ines. Ihr alle habt mich so herzlich in die Gruppe aufgenommen und den Start im Labor leicht gemacht.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken. Ohne eure Unterstützung wären weder das Studium noch die Doktorarbeit überhaupt möglich gewesen. Danke, dass ihr immer an mich glaubt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem besten Freund und Partner Jonathan bedanken. Danke für all die Liebe, die Unterstützung und Motivation. Danke für all die Drücker und Dusseligkeiten.