

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Die Bedeutung von Stroma-regulierten Genen für
die Progression des Mammakarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Theresia Lange

geboren am 29.07.1992 in Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

PD Dr. rer. nat. Leticia Oliveira-Ferrer, Hamburg

Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert, Erlangen

03.03.2020

15.10.2020

Für meine Familie

Referat

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Basierend auf immunhistochemischen Kriterien oder Genexpressionsanalysen kann eine Einteilung in verschiedene Subtypen erfolgen. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Subtypen bedingen verschiedene therapeutische Strategien. Die Entwicklung von Resistenzen ist jedoch ein limitierender Faktor des Behandlungserfolges. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, sechs unterschiedliche Mammakarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer Resistenzentwicklungen gegen das Antiöstrogen Fulvestrant zu untersuchen. Außerdem sollte der Einfluss stromaler Zellen für die Entstehung von Resistenzen untersucht werden.

Es wurden Wachstumsanalysen, sowie Protein- und Genanalysen mit konditioniertem Medium Carcinom-assoziiierter Fibroblasten durchgeführt.

Bei MCF-7-Zellen wurde gezeigt, dass sezernierte Faktoren stromaler Zellen die Tumorzelle gegen Fulvestrant desensibilisieren können, indem die IGFBP5-Expression gesenkt und dadurch die Bcl-3-Expression erhöht wird. Zellen des Tumorstromas können eine proliferationsfördernde oder eine proliferationshemmende Wirkung auf Tumorzellen haben. Das Protein Bcl-3 beeinflusst das Wachstum sowie die Resistenzentstehung bei Tumorzellen (Leyh 2015).

Bcl-3 konnte bei einigen Zelllinien durch CAF-CM gesteigert werden. Gleichzeitig konnte durch CAF-CM das IGFBP5-Level gesenkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin-6 (IL-6) als Bestandteil des konditionierten Mediums einen Teil der CAF-CM-Effekte ebenfalls ausübt. Auf das Zellwachstum wirkt IL-6 jedoch inhibierend. Dies kann möglicherweise an den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen liegen. Folglich gilt es den Stellenwert von Bcl-3 und IGFBP5, sowie weitere mögliche Faktoren die zu einer Resistenzentstehung beitragen, zu erforschen. Die enorme Bedeutung von Carcinom-assoziierten Fibroblasten als stromale Zellen wurde in dieser Arbeit belegt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Klassifikation.....	2
1.2 Das Tumormikromilieu.....	4
1.2.1 Komponenten des Tumormikromilieus.....	5
1.2.2 Tumor-Stroma-Interaktion und Resistenzentwicklung.....	6
1.3 IGFBP5/Bcl-3 und Fulvestrantresistenz.....	7
2. Zielstellung.....	11
3. Material und Methoden.....	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Zellkultur-Zusätze.....	12
3.1.2 Antikörper für Western-Blot-Analyse.....	12
3.1.3 Primer.....	13
3.1.4 siRNA.....	14
3.2 Methoden.....	14
3.2.1 Zellkultur.....	14
3.2.2 siRNA-Transfektion.....	15
3.2.3 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Q-RT-PCR.....	16
3.2.4 Proteinanalyse.....	17
3.2.5 ATP-basierter Zellwachstumsassay.....	19
4. Ergebnisse.....	21
4.1 Einfluss von CAF-CM auf das Wachstum von Brustkrebszellen.....	21

4.1.1 Wachstumsanalysen mit 6 verschiedenen Brustkrebszellen	21
4.2 Einfluss von CAF-CM auf die Expression von Bcl-3 und anderer CAF-CM-responsiver Gene.....	28
4.3 Effekt von CAF-CM auf die IGFBP5-RNA-Expression	32
4.4 Bedeutung von IGFBP5	33
4.4.1 Mögliche inverse Korrelation zwischen IGFBP5- und Bcl-3- RNA-Expression.....	33
4.4.2 Einfluss von IGFBP5 auf die Bcl-3-Expression	35
4.4.3 Bedeutung von IGFBP5 für die Effekte von CAF-CM auf Expression weiterer Proteine.....	36
4.5 Einfluss von Bcl-3 auf das Zellwachstum.....	37
4.6 Bedeutung von IL-6 für die Effekte von CAF-CM auf Brustkrebszellen	39
4.6.1 Einfluss von IL-6 auf die CAF-CM-responsiven Proteine.....	39
4.6.2 Einfluss von IL-6 auf das zelluläre Wachstum	41
5. Diskussion	43
5.1 Wachstumsreaktionen von Brustkrebszelllinien auf Carcinom-assoziierte Fibroblasten in Gegenwart und Abwesenheit von Fulvestrant	43
5.2 Einfluss von CAF-CM auf die Bcl-3-Expression	44
5.3 Einfluss von CAF-CM auf die Proteinexpression weiterer Gene	45
5.4 Einfluss von CAF-CM auf die IGFBP5-Expression	46
5.5 Zusammenhang zwischen der IGFBP5 und Bcl-3-Expression	47
5.6 Einfluss von Bcl-3 auf das Zellwachstum.....	48
5.7 Einfluss von IL-6 auf die Proteinexpression.....	48
5.8 Einfluss von IL-6 auf das Zellwachstum	49
5.9 Ausblick.....	50
6. Zusammenfassung	52
Literaturverzeichnis	54
Thesen.....	64
Lebenslauf	IX

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	cellular homolog of murine thymoma virus Akt8 oncoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl-3	B-cell lymphoma 3-encoded protein
BRCA -1/-2	Breast cancer gene 1/-2
CA IX	Carbonic anhydrase 9
CAFs	Carcinom-assoziierte Fibroblasten
CE	cytosolischer Extrakt
CM	konditioniertes Zellkulturmedium
CSC	Cancer stem cell
CXCL 12	CXC-Motiv-Chemokin 12
DNA	deoxyribonucleicacid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ERK-1/2	Extracellular-signal-regulated kinase-1/2
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Her2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HIF-1 α	Hypoxie-induzierte Faktor-1-alpha
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IGF -1/-2	Insulin-like growth factor 1/2
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IL	Interleukin
ITGB-1	Integrin β 1
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KE	Kernextrakt
KLHL4	Kelch Like Family Member 4
Ktrl.	Kontrolle
Luc	Luciferase
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MSC	mesenchymal stem cell
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NK-Cell	natürliche Killerzelle
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PME	Plasmamembranextrakt
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
Raf	Rat Fibrosarcoma

Ras	Rat Sarcoma
RLU	relative light units
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Reverse Transkription quantitative Polymerase Chain Reaction
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SEPP1	Selenoprotein P
SERD	selective estrogen receptor downregulator
SERM	selective estrogen receptor modulator
siRNA	small interfering RNA
Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNBC	Triple-negative breast cancer
TNF α	Tumornekrosefaktor α
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Aktuelle Analysen der WHO zeigen, dass die Anzahl der Krebsneuerkrankungen insgesamt weltweit stetig zunimmt. Gründe dafür sind zum einen das Wachstum und Altern der Bevölkerung, aber auch die zunehmende Bedeutung von bereits bekannten Risikofaktoren, wie zum Beispiel Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel (IARC). Nach Schätzungen der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) gab es im Jahr 2018 weltweit 18,1 Millionen Krebsneuerkrankungen und 9,6 Millionen Krebstodesfälle. Für Frauen steht Brustkrebs als Todesursache bei Krebserkrankungen weltweit an erster Stelle. 2,1 Millionen Brustkrebsneuerkrankungen und 521900 Todesfälle durch Brustkrebs wurden für das Jahr 2018 weltweit registriert (Bray et al. 2018). Auf Deutschland entfallen davon ca. 69000 Neuerkrankungen pro Jahr. Die Mortalität in Deutschland beträgt etwa 18000 Fälle pro Jahr (Koch-Institut).

Brustkrebs macht rund ein Viertel der Krebsneuerkrankungen bei Frauen weltweit aus (Bray et al. 2018). Allein dies verdeutlicht die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der molekularbiologischen Strukturen und Zusammenhänge.

1.1.2 Ätiologie

Die „Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie“ definiert jährlich Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Dies sind nicht beeinflussbare Risikofaktoren, wie beispielsweise das Alter. Bei Frauen ab einem Alter von 50 Jahren ist das Risiko an Brustkrebs zu erkranken erhöht. Auch die Brustdicke beeinflusst das Risiko für ein Mammakarzinom. Weiterhin erhöhen Kinderlosigkeit oder die Geburt eines Kindes nach dem 30. Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken. Des Weiteren steigern hormonelle Faktoren, wie eine beginnende Regelblutung vor dem 12. Lebensjahr und ein spätes Einsetzen der Menopause, die Erkrankungswahrscheinlichkeit (Ritte et al. 2013; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2012). Bei etwa 5-10% der Patientinnen lässt sich eine genetische Veränderung des Tumorsuppressorgens BRCA-1 oder -2 nachweisen. Dies führt zu einem erhöhten Risiko für Erkrankungen an einem Mammakarzinom oder Ovarialkarzinom (Koch-Institut; Antoniou et al. 2003). Zum anderen spielen modifizierbare Risikofaktoren, wie zum Beispiel die Lebensweise, eine erhebliche Rolle: erhöhtes Übergewicht, wenig körperliche Bewegung, sowie Rauchen und Alkohol erhöhen das Brustkrebsrisiko (Cummings et al. 2009). Ebenso gibt es Hinweise, dass Hormonersatztherapien in der Postmenopause die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen können (Sæther et al. 2012).

Um die Entstehung eines Brusttumors nachzuvollziehen, soll zunächst der Aufbau und die Struktur der Brustdrüse kurz erläutert werden: Das Drüsengewebe setzt sich aus 15-20 Drüsenlappen zusammen, über welche das Drüsensekret über einen Ausführungsgang, der an der Brustwarze mündet, sekretiert wird. Zwischen dem Drüsengewebe befindet sich bindegewebiges Stroma und Fettgewebe (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Je nach Ursprungsgewebe eines Tumors unterscheidet man duktale Karzinome, deren histologisches Aussehen dem Milchgangsepithel ähnelt, von lobulären Karzinomen, welche den Zellen eines Drüsenläppchens gleichen.

1.1.3 Klassifikation

Ein Tumor kann nach verschiedenen Parametern klassifiziert werden. Nach der histologischen Klassifizierung des Tumors durch den Pathologen kann die Einteilung nach weiteren Kriterien erfolgen: zunächst mittels der aktuellen TNM-Klassifikation. „T“ beschreibt die Ausdehnung des Tumorherdes. „N“ steht für die befallenen regionären Lymphknoten. „M“ gibt das Vorhandensein von Fernmetastasen an. Ergänzungen zur TNM-Klassifikation sind zum einen das histopathologische Grading, bei dem mit den Kennzeichnungen G1-G3 der Unterschied des Tumorgewebes zum Normalgewebe bewertet wird, wobei G1 für gut differenziert, G2 für mäßig differenziert und G3 für eine schlechte Differenzierung des Gewebes spricht. Zum anderen wird nach einer operativen Behandlung das Residualgewebe, auch als Resttumor bezeichnet, bestimmt (Krebsinformationsdienst und Krebsforschungszentrum 2014).

Das Mammakarzinom ist eine sehr heterogene Erkrankung. Es wurden mittels unterschiedlicher Methoden verschiedene Subtypen klassifiziert. Zum einen wird der Hormonrezeptorstatus bestimmt. Die (Über-)Expression des Östrogenrezeptors (ER α), des Progesteronrezeptors (PR) und des Her2-Rezeptors (Her2) kann durch immunhistochemische Färbung beurteilt werden.

Etwa 70% der Mammakarzinome exprimieren den Östrogen- und Progesteronrezeptor. Sie werden als Hormonrezeptor-positiv bezeichnet. Patientinnen mit einem ER α -positiven Mammakarzinom zeigen eine bessere klinische Prognose, verglichen mit einem Hormonrezeptor-negativen Tumor. Der Progesteronrezeptor dient als Indikator für einen intakten Signalweg über den Östrogenrezeptor. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass der Progesteronrezeptor bei gleichzeitiger Expression des Östrogenrezeptors die 5-Jahresüberlebensrate verbessert und eine prognostische Aussagekraft für den Erfolg einer endokrinen Therapie bei ER α -positiven Patientinnen hat (Bardou et al. 2003). Eine Möglichkeit der Behandlung stellt die endokrine Therapie mit Antiöstrogenen oder Aromatase-Inhibitoren dar. Tamoxifen ist das gebräuchlichste Medikament der Gruppe der SERMs („selective estrogen receptor modulators“). Es blockiert die Östrogenrezeptoren der Tumorzelle und hemmt somit die proliferative Wirkung des Östrogens. SERDs („selective estrogen receptor

downregulators“), wie zum Beispiel Fulvestrant, blockieren ebenfalls die Funktion des ER, aber bewirken zusätzlich eine Herunterregulierung der Östrogenrezeptorexpression. Es wurde gezeigt, dass eine Einnahme von Tamoxifen über 5 Jahre bei Patientinnen mit einem ER α -positiven Tumor die Rezidivrate um durchschnittlich 39% reduziert und die Mortalität während der ersten 15 Jahre um ein Drittel senkt (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2011; Coates et al. 2007).

Aromatase-Inhibitoren senken das Östrogenlevel durch Hemmung des Enzyms Aromatase, welches die Umwandlung von Testosteron in Östrogen katalysiert. Die Wirkung der Medikamente besteht in der Blockierung der Umwandlung der androgenen Vorstufen in Östrogen nach der Menopause vor allem in Muskel- und Fettgewebe. Aromatase-Inhibitoren können prämenopausal die ovarielle Östrogenproduktion nicht komplett unterdrücken, daher wird die Therapie bei prämenopausalen Patientinnen nur unter zusätzlicher ovarieller Suppressionstherapie durchgeführt (Stocco 2008). Es wurde gezeigt, dass Aromatase-Inhibitoren als adjuvante Therapie bei postmenopausalen Patientinnen das Rezidivrisiko reduzieren konnten (The Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group 2008; Coates et al. 2007). Frauen im prämenopausalen Alter können auch von sogenannten GnRH-Analoga, welche die ovarielle Produktion von Geschlechtshormonen unterdrücken, profitieren.

In 20-25% der Karzinome ist Her2, welches zu der Her (human epidermal receptor)-Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehört, überexprimiert. Sie zeigen eine schlechtere klinische Prognose hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens (Révillion et al. 1998). Her2+/ER α -/PR- Tumoren sind oft schlechter differenziert und werden meist erst in einem fortgeschrittenem Stadium als hormonrezeptorpositive Tumoren diagnostiziert (Brown et al. 2008). Brustkrebspatientinnen mit einem solchen Tumor profitieren meist von einer Therapie mit einem Her2-blockierenden Medikament, wie dem monoklonalen Anti-Her2-Antikörper Trastuzumab.

Exprimiert der Tumor weder den Östrogen-/Progesteronrezeptor noch den Her2-Rezeptor, so wird er als „tripel-negativ“ bezeichnet. Etwa 15% der invasiven Mammakarzinome lassen sich diesem Subtyp zuordnen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung eines „tripel-negativen“ Tumors ist signifikant früher im Vergleich zu Hormonrezeptor-positiven Tumoren. Außerdem geht dieser Subtyp mit einem höheren Grading, einer schlechteren Prognose und einer verringerten Überlebensrate einher (Bauer et al. 2007). Da der Tumor keinen Östrogen-/Progesteron- sowie keinen Her2-Rezeptor exprimiert, ist nur eine Behandlung mittels Chemotherapie, neben der Bestrahlung, möglich (Clarke et al. 2008).

Da die aktuell verwendeten klinischen Parameter (Alter, Tumorgöße, Nodalstatus, histologisches Grading) und immunhistochemischen Marker (ER α , PR, Her2) nicht gänzlich der

Heterogenität der Tumoren gerecht werden, suchte man nach neuen Möglichkeiten zur Klassifizierung (Prat und Perou 2011). Basierend auf Genexpressionsanalysen sind derzeit fünf molekulare Subtypen des Mammakarzinoms bekannt. Sie werden bezeichnet als „Luminal A und B“, „basal-like“, „Her2-enriched“ und „normal-like“. Die molekularen Subtypen decken sich teilweise mit der immunhistochemischen Einteilung - die meisten luminalen Tumoren sind ER α -positiv, viele basale Subtypen zählen zu den „tripel-negativen“ und beim Großteil der „Her2-enriched“ lässt sich auch immunhistochemisch eine Überexprimierung des Her2-Rezeptors nachweisen (Prat und Perou 2011).

Die verschiedenen Gruppen unterscheiden sich in Inzidenz, Altersverteilung und ihrer Häufigkeit des Auftretens in verschiedenen ethnischen Gruppen (Carey et al. 2006). Im Hinblick auf die klinische Prognose wurde festgestellt, dass das Gesamtüberleben sowie das Tumor-spezifische-Überleben bei Patientinnen mit einem Tumor vom basalen oder Her2+/ER α -negativen- Subtyp signifikant schlechter war, verglichen mit Luminal A-Patientinnen (Sorlie et al. 2001; Carey et al. 2006). In einer weiteren Studie konnte die Arbeitsgruppe von C. Sotiriou ebenfalls zeigen, dass die luminalen Subtypen einen signifikanten Vorteil sowohl im Rezidiv-freien Überleben als auch im Brustkrebs-spezifischen Überleben haben (Sotiriou et al. 2003).

Um das individuelle Risiko eines Patienten abzuschätzen und eine optimale Therapie zu finden, kommen zunehmend molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Zum Beispiel können Genexpressions- oder Mutationsanalysen genauere Aussagen zur Prognose liefern und auch bei der Suche nach neuen therapeutischen Angriffspunkten helfen (Prat et al. 2015; Yuan et al. 2017)

Der Therapieerfolg bei Brustkrebs ist jedoch limitiert durch die Entstehung von Resistenzen. Dies kann durch verschiedene Mechanismen geschehen. Bedeutend dafür sind u.a. das Tumorstroma und die dazugehörigen Zellen. In den folgenden Abschnitten soll daher zunächst näher auf das Tumorstroma eingegangen werden. Anschließend wird der Stellenwert von Fibroblasten, als stromale Zellen, für die Entwicklung von endokrinen Resistenzen betrachtet.

1.2 Das Tumormikromilieu

Tumorzellen sind durch bestimmte Fähigkeiten gekennzeichnet. Sie können beispielsweise ungehemmt proliferieren, eine Resistenz gegenüber Wachstums-Suppressoren entwickeln, den Zelltod umgehen, Angiogenese induzieren sowie Invasivitäts- und Metastasierungseigenschaften aufweisen (Hanahan und Weinberg 2011). Es ist bereits bekannt, dass Tumorzellen in der Lage sind, ein breites Repertoire an stromalen Zellen zu rekrutieren, welche das sogenannte Tumormikromilieu bilden und sowohl zur Tumorgenese, Metastasierung als auch zur Entstehung von Resistenzen gegen Therapien beitragen können (Correia und Bissell 2012). Nachdem der Fokus in den vergangenen Jahren hauptsächlich auf der

Erforschung und Charakterisierung der Tumorzellen lag, ist nun das Tumorstroma näher in den Mittelpunkt gerückt. Stroma bezeichnet das lockere Gewebe, welches ein Organ oder eine Struktur umgibt. Es besteht aus verschiedenen Elementen, wie bindegewebigen Fasern, Zellen und Blutgefäßen. Schon länger gibt es Hinweise, dass das Tumorwachstum nicht nur durch die maligne Tumorzelle selbst, sondern auch durch das Tumorstroma bestimmt wird (Kalluri 2003). Die Interaktion zwischen Tumorzellen und ihrem assoziierten Stroma stellt eine wichtige Verbindung dar, welche den Krankheitsbeginn, die Progression und die Prognose der Erkrankung beeinflusst. Das sogenannte Tumormikromilieu kann außerdem die Sensitivität der Tumorzellen gegen Medikamente beeinflussen. Der Einfluss des Tumormikromilieus auf die Metastasierung ist ein dynamischer Prozess, da das Stroma sich während der Tumorprogression fortwährend ändert und den Bedürfnissen der Tumorzelle anpasst (Junttila und Sauvage 2013). So haben Tumorzellen die Möglichkeit, sich eine geeignete Nische zu suchen und darin bei optimalen Bedingungen zu proliferieren (Quail und Joyce 2013).

1.2.1 Komponenten des Tumormikromilieus

Verschiedene Zellen tragen zur Funktion des Tumor-assoziierten Mikromilieus bei. Dazu gehören Makrophagen, welche aus Knochenmark oder Milz einwandern, zu Tumor-assoziierten-Makrophagen differenzieren und entweder die Tumorprogression unterstützen oder hemmen können (Biswas et al. 2013). Außerdem Endothelzellen und perivaskuläre Zellen, welche für die Angiogenese und Vaskularisierung eines Tumors zuständig sind und somit auch zur Progression beitragen (Mao et al. 2013). Eine weitere große Rolle spielen inflammatorische Immunzellen. Es wurde gezeigt, dass Gewebe, welches einer chronischen Entzündung ausgesetzt ist, eine höhere Tumorzinzidenz aufweist (Grivennikov et al. 2010). Im Tumorstroma können sich sowohl Zellen des erworbenen, als auch des angeborenen Immunsystems befinden.

Ein wichtiger Schritt für die Tumorprogression ist es, einer Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen. Dies geschieht entweder durch Inhibierung von Effektorimmunzellen oder durch Stimulierung von immunsuppressiven Zellen, wie zum Beispiel MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) und regulatorischen T-Zellen. Beide Zelltypen fördern die T-Zell-Dysfunktion, welches wiederum die Tumorprogression begünstigt (Lindau et al. 2013; Schreiber et al. 2011). Regulatorische T-Zellen steuern normalerweise die Aktivierung von T- und B-Zellen und spielen somit eine wichtige Rolle für die Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten (Gasteiger et al. 2013). Wie die MDSCs unterdrücken auch sie die tumorabhängige Antigenpräsentation und behindern die Funktion von zytotoxischen T-Zellen (Boehmer und Daniel 2013; Quail und Joyce 2013).

Ein Fokus dieser Arbeit sind Carcinom-assoziierte-Fibroblasten (CAFs). Fibroblasten synthetisieren und sezernieren die Extrazelluläre Matrix (EZM), exprimieren Matrix-

Metalloproteasen (MMPs), regulieren die epitheliale Differenzierung und produzieren Wachstumsfaktoren (Su et al. 2012). Fibroblasten sind Zellen mit einem spindelförmigen Aussehen (Kalluri 2016). Sie nehmen den größten Anteil der Zellen des Tumorstromas bei Brusttumoren ein (Sappino et al. 1988) und es bestätigt sich immer mehr, dass sie einen wichtigen Beitrag zur Tumorprogression leisten (Tlsty und Hein 2001; Elenbaas und Weinberg 2001). CAFs entstehen z.B. durch Interaktion mit Karzinomzellen, die Proteine sezernieren, welche normale Fibroblasten aktivieren können. CAFs können auch aus verschiedenen anderen Zellen entstehen. Zum einen aus ortsansässigen Fibroblasten, zum anderen auch aus verschiedenen mesenchymalen Zelltypen wie zum Beispiel Endothelzellen, Perizyten, Adipozyten und mesenchymalen Stammzellen. Als CAFs unterscheiden sie sich von den normalen Fibroblasten unter anderem durch Sezernierung von Tumor-fördernden Zytokinen, zum Beispiel IL-6 und SDF-1/CXCL12, welche u.a. die Proliferation von MCF-7 Brustkrebszellen anregen (Polanska und Orimo 2013). CAFs spielen eine bedeutende Rolle für die Tumorprogression, indem sie die Extrazelluläre Matrix verändern, sowie die Proliferation, Invasivitätseigenschaften, Migration und Metastasierung von Tumorzellen beeinflussen. CAFs erhöhen dadurch die Malignität der Tumorzellen und induzieren die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Mueller und Fusenig 2004). Es wurde in Co-Kulturversuchen gezeigt, dass CAFs eine Tamoxifen- und Fulvestrant-Resistenz induzieren können (Martinez-Outschoorn et al. 2014). Den Fibroblasten kommt also eine entscheidende Rolle bei der Progression des Mammakarzinoms zu. Aber auch bei anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem Prostatakarzinom, spielt die Wirkung von Fibroblasten eine große Rolle (Olumi et al. 1999; Paraiso und Smalley 2013).

1.2.2 Tumor-Stroma-Interaktion und Resistenzentwicklung

Der protektive Einfluss des Stromas (insbesondere CAFs und die extrazelluläre Matrix) ermöglicht Tumorzellen das Überleben während einer Therapie und kann zu genetischen Veränderungen der Tumorzelle führen, welche dann zur Resistenzbildung beitragen kann (Meads et al. 2009). Endokrine Resistenzen gegen Medikamente können entweder schon vor der Therapie existieren oder aber während der Behandlung erworben werden. Faktoren die zu einer Resistenzentstehung führen können sind beispielsweise eine sehr dichte EZM. Eine Einbettung der Tumorzellen in eine dichte EZM wirkt wie eine physikalische Barriere gegen Medikamente und mindert somit die Effektivität von Wirkstoffen. Aber auch die Interaktion von Tumorzellen mit Proteinen der EZM sowie von stromalen Zellen sezernierte Faktoren erlauben es Tumorzellen, Medikamente besser zu tolerieren. Es ist noch eine Reihe weiterer Mechanismen bekannt, wie es zu einer Resistenzentstehung bei Mammakarzinomzellen kommen kann. Neben der großen Bedeutung des Tumorstromas allgemein, spielen vor allem die CAFs eine wichtige Rolle (Paraiso und Smalley 2013). Die Carcinom-assoziierten

Fibroblasten sezernieren verschiedene Faktoren, welche vor allem die PI3-Kinase aktivieren (Osborne und Schiff 2011). Eine übermäßige Aktivität dieses Signalweges sowie des Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signalweges wird u.a. für die Entwicklung von endokrinen Resistenzen verantwortlich gemacht (Ciruelos Gil, Eva Maria 2014). Phosphoryliertes AKT- oder phosphorylierte ERK1/2-Proteine fördern das Überleben der Tumorzellen durch Aktivierung des Östrogenrezeptors, welcher dann östrogenunabhängig als Transkriptionsfaktor im Zellkern wirken kann. Diese Signalwege werden in der Regel über Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) aktiviert. Dies sind Transmembranproteine, welche durch eine extrazelluläre Ligandenbindung eine intrazelluläre Signalkaskade einleiten.

Auch Integrine sind neben den RTKs wichtige Moleküle in der Membran von Tumorzellen. Integrine interagieren mit EZM-Komponenten. Insbesondere Integrin $\beta 1$ kommt eine Bedeutung bei der Entstehung einer endokrinen Resistenz zu. Nach einer Aktivierungssignal über Integrin $\beta 1$ kommt es ebenfalls zur Aktivierung der PI3K/AKT- und Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Wege. Integrin $\beta 1$ fördert außerdem die Resistenzentstehung von Brustkrebszellen gegen Her2-Inhibitoren (Huang et al. 2011). Somit hat es für ER α -positive -und Her2-positiven - Brustkrebszellen eine große Bedeutung für die Entstehung von Resistenzen (Dittmer und Leyh 2015). Es ist bekannt, dass eine Inhibierung von Integrin $\beta 1$ eine signifikante Reduzierung des Tumolvolumens bewirken kann und die Sensitivität für eine Bestrahlung (Park et al. 2008) und die Sensitivität von Her2-positiven Tumorzellen für Trastuzumab/Pertuzumab erhöht (Weigelt et al. 2010).

Die Carbon Anhydrase IX (CA IX) ist wichtig für das Wachstum von Brustkrebszellen. Ein klassischer Aktivator der CA IX ist der Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF-1 α). Es wurde gezeigt, dass CAF-CM die HIF-1 α -Expression in ER α -positiven-Zellen unter normoxischen Bedingungen induziert (Ansari et al. 2018; Ward et al. 2015).

Das Signal-transducer-and-activator-of-transcription-Protein 3 (Stat 3) ist ein Mitglied der STAT-Proteinfamilie. Es wird durch die Januskinase (JAK) phosphoryliert, in den Zellkern transportiert und wirkt dort als Transkriptionsaktivator. Es ist ein wichtiges Signalmolekül in der Signalkaskade über Interleukin-6 und bedeutend für die IGFBP5-Funktion (Kojima et al. 2012). STAT-3 wird beispielsweise durch IL-6 aktiviert. Es wurde aber auch eine mögliche Aktivierung über den MAPK-Signalweg gezeigt (Tkach et al. 2013). STAT 3 spielt eine Rolle bei der Brustkrebsprogression indem es Resistenzmechanismen gegen Apoptose induziert (Gritsko et al. 2006).

1.3 IGFBP5/Bcl-3 und Fulvestrantresistenz

In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei weitere Proteine mit einer Antiöstrogenresistenz, spezifisch gegen Fulvestrant, in Verbindung gebracht. Das ist zum einen das Insulin-growth-

factor-binding-protein 5 (IGFBP5) und zum anderen das B-cell-lymphoma-Protein 3 (Bcl-3) (Leyh et al. 2015). IGFBP5 gehört zu der Familie der Insulin-like growth factor-binding Proteine, deren primäre Funktion die Regulation der Aktivität der Wachstumsfaktoren Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und -2 (IGF-2) sind. Eine Bindung von IGFBP5 an diese Wachstumsfaktoren hindert diese daran, an ihren Rezeptor IGF1R zu binden und damit die PI3K/AKT- und Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signalwege zu aktivieren (Güllü et al. 2012; Pollak 2008). Dies wird als IGF-abhängiger Effekt von IGFBP5 bezeichnet (Zesławski et al. 2001). Die Expression von IGFBPs kann durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst werden, z.B. durch p53, Wachstumsinhibitoren, Antiöstrogene und den Transforming Growth Factor β (TGF- β), wodurch dann die Aktivität der IGFs reguliert werden kann (Firth und Baxter 2002). Neben der IGF-abhängigen Wirkweise können IGFBPs auch IGF-unabhängig wirken (Tripathi et al. 2009; Baxter 2014).

Der IGF-Signalweg ist wichtig für die Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung und Apoptose (Akkiprik et al. 2008). Wood und Yee haben gezeigt, dass IGFBP5 in normalen Brustepithelzellen bei Erwachsenen gar nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird (Wood und Yee 2000). Mittlerweile hat man herausgefunden, dass IGFBP5 eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms einnimmt. Speziell für die Metastasierung von Mammakarzinomzellen scheint IGFBP5 bedeutend, da es die Zellmigration stimulieren kann (Akkiprik et al. 2008; Pekonen et al. 1992; Nishidate et al. 2004). Wir haben zeigen können, dass ein IGFBP5-knockdown bei MCF-7-Zellen über eine erhöhte Expression von Bcl-3 eine Fulvestrantresistenz hervorruft (Leyh et al. 2015). Es scheint also, dass ein niedriger IGFBP5-Level eine Antiöstrogenresistenz begünstigt.

Das Protein Bcl-3 (B-cell lymphoma 3 protein) wurde zuerst als Protoonkogen bei Patienten, die an einer chronischen B-Zell-Leukämie erkrankt waren, identifiziert. Weitere Forschung ergab, dass Bcl-3 auch für die Progression von soliden Tumoren eine Rolle spielt. Später fand man heraus, dass dieses Protein mit den NF- κ B-Untereinheiten p50 und p52 interagiert. Es ist im Kern lokalisiert, bildet Komplexe mit diesen Untereinheiten und kann so die Transkription regulieren (Ohno et al. 1990; Schuster et al. 2013). Bcl-3 gehört zur Klasse der atypischen Inhibitoren von Kappa-B. Diese Proteinfamilie unterdrückt die NF- κ B-Aktivierungskaskade indem sie direkt an die Transkriptionsfaktoren binden. Durch Interaktion mit den Untereinheiten und der Bildung von Hetero- oder Homodimeren kann Bcl-3 sowohl als Aktivator, als auch als Repressor fungieren (Franzoso et al. 1992; Bours et al. 1993). NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei biologischen Vorgängen wie dem Entzündungsgeschehen, der Zellproliferation und Apoptose (Viatour et al. 2004b). Neuere Daten zeigen, dass die Aktivität von Bcl-3 durch Phosphorylierung entscheidend beeinflusst wird. Fördernd für seine Aktivatorfunktion wirken u.a. der PI3K/AKT- und der Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Weg (Wang et al. 2017b). Es wurde

gezeigt, dass die Expression von Bcl-3 durch verschiedene Zytokine, beispielsweise IL-4, IL-6 oder Tumornekrosefaktor α (TNF α) heraufreguliert werden kann (Brenne et al. 2009; Rebollo et al. 2000; Brocke-Heidrich et al. 2006). Bcl-3 wurde bisher bei unterschiedlichen Tumoren untersucht und scheint eine Rolle unter anderem bei nasopharyngealen Karzinomen (Thornburg et al. 2003), bei Endometriumkarzinomen (Pallares et al. 2004) sowie dem kolorektalen Karzinom (Puvvada et al. 2010) zu spielen. Auch für die Progression von Brustkrebs scheint das Protein bedeutend. Cogswell et al. beispielsweise zeigten, dass Bcl-3 signifikant in Brusttumoren erhöht ist (Cogswell et al. 2000; Choi et al. 2010). Es gibt außerdem Hinweise, dass Bcl-3 die Progression von Mammakarzinomen fördert. Es ist mit einer erhöhten pulmonalen Metastasierung bei Brusttumoren assoziiert (Chen et al. 2016). Und die Arbeitsgruppe um Viatour et al. zeigte, dass Bcl-3 das Tumorwachstum *in vivo* induzieren kann (Viatour et al. 2004a). In einer *in silico*-Kaplan-Meier-Analyse konnten wir für ein Kollektiv von 229 endokrin-behandelten Brustkrebspatientinnen zeigen, dass eine höhere Bcl-3-RNA-Expression signifikant mit einer ungünstigeren Prognose korreliert (Leyh et al. 2015).

Zwei hauptsächliche Effekte von Bcl-3 auf die Progression von Tumoren sind bisher beschrieben. Dies ist zum einen die Modulation der Apoptose und zum anderen eine Steigerung der Proliferation (Kashatus et al. 2006; Ahmed und Milner 2009; Choi et al. 2010; Westerheide et al. 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass Bcl-3 ER α -positive Tumorzellen gegen das Antiöstrogen Fulvestrant desensibilisieren kann (Leyh et al. 2015).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der IGFBP5- und Bcl-3-Expression und wie diese durch Faktoren, die CAFs oder auch mesenchymale Stammzellen (MSCs) sezernieren, beeinflusst werden, ist in der Abbildung 1 illustriert. In MCF-7-Zellen bewirken von CAF oder MSC sezernierte Faktoren eine Reduzierung der Expression von IGFBP5. Dieses bewirkt zum einen aufgrund der IGF-abhängigen Funktion eine erhöhte Freisetzung von IGF und damit eine Aktivierung des IGF1R mit anschließender Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Zum anderen wird IGF-unabhängig die supprimierende Aktivität von IGFBP5 auf Bcl-3 gemindert und dadurch die Bcl-3-Expression erhöht, was dann Zellen gegen Fulvestrant desensibilisiert. Die erhöhte Bcl-3-Expression ist auch verantwortlich für die erniedrigte Expression des Selenoprotein P 1 (SEPP) und Kelch-Like-Family-Member Proteins 4 (KLHL4) sowie für die erhöhte Expression der Carbonic anhydrase IX (CAIX).

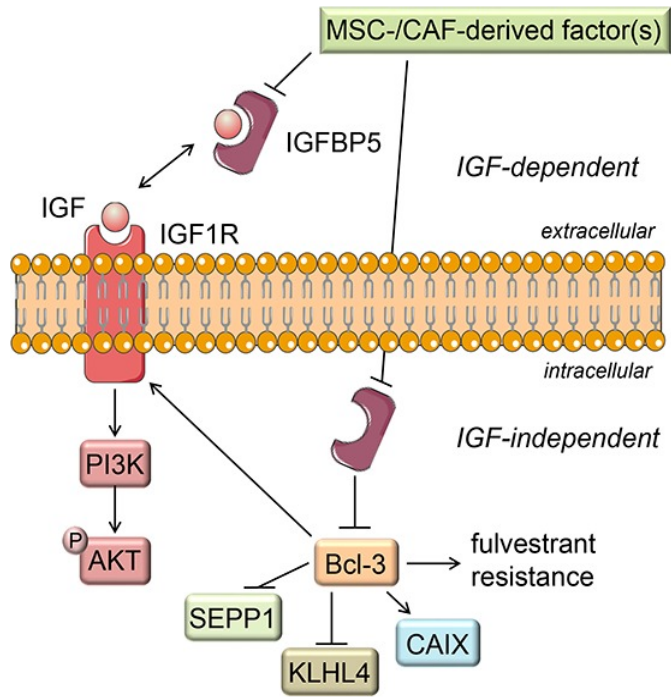


Abb. 1: Potenzieller Mechanismus der Fulvestrantresistenzentstehung durch CAFs und MSCs (aus Leyh et al. 2015)

2. Zielstellung

Bei Brustkrebs wird die Tumorprogression unter anderem durch die Entwicklung endokriner Resistenzen beeinflusst. Dies geschieht durch den Einfluss stromaler Zellen wie beispielsweise CAFs. An MCF-7-Zellen wurde gezeigt, dass CAFs Tumorzellen gegen das Antiöstrogen Fulvestrant desensibilisieren können. Dieser Desensibilisierung liegen verschiedene Effekte zugrunde. Dies ist zum einen die Bcl-3-Erhöhung und gleichzeitig eine IGFBP5-Herunterregulierung in MCF-7-Zellen.

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von stromalen Zellen auf die Gen- und Proteinexpressionen sowie das Wachstum von 6 verschiedenen Brustkrebszelllinien zu untersuchen. Dazu wurden Versuche mit Zugabe von konditioniertem Medium von Fibroblasten sowie Fulvestrant an 3 ER α -positiven- und 3 ER α -negativen Zelllinien durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob man eine generelle Aussage hinsichtlich der Reaktion einer Subgruppe auf stromale Zellen treffen kann.

Anschließend sollte evaluiert werden ob die Effekte von stromalen Zellen auf Brustkrebszellen unterschiedlicher Charakteristik die gleichen sind, sich ähneln oder unterscheiden. Des Weiteren galt es herauszufinden, welche Faktoren der stromalen Zellen diese Effekte auslösten. Zusätzlich galt es die Rolle von IGFBP5 und Bcl-3 in den Zelllinien zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Laborchemikalien wurden von Appllichem (Darmstadt, DE) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

3.1.1 Zellkultur-Zusätze

Tab. 1: Herstellerfirmen der Zellkultur-Zusätze

	Hersteller
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fulvestrant	LKT Laboratories bezogen von Biomol, Hamburg, DE

3.1.2 Antikörper für Western-Blot-Analyse

Tab. 2: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
α -Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
α -Bcl-3	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
α -E-Cadherin	Maus	1:5000	BD Biosciences
α -ER α (HC-20)	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
α -p44/42 (Erk1/2)	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
α -Phospho-p44/42 (Erk-1/2) (Thr202/ Tyr204)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

α -IGF1R β	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
α -Integrin β 1 (CD29)	Kaninchen	1:2000	Abcam, Cambridge, GB
α -Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7)	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
α -Stat3 (79D7)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
α -CAIX	Kaninchen	1:25	Zur Verfügung gestellt von Silvia Pastorekova (Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slowakei)

Tab. 3: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRP	1:2000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Maus-HRP	1:2000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

3.1.3 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG (Operon, Ebersberg, DE) bezogen.

Tab. 4: Sequenzen der für die qPCR verwendeten Primer

Zielgen	Forward Primersequenz 5'→3'	Reverse Primersequenz 5'→3'
Bcl-3	GAAGCACATGCACCTACCCA	GGACTGGTGCCTGAGAATGC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGTATGGGATTTC
HPRT	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	TGAGCACACAGAGGGCTACAA
IGFBP5	CCAATTGTGACCGCAAAGG	CGGGAAGGTTTGCCTGCT

3.1.4 siRNA

Alle verwendeten siRNAs wurden von Eurofins MWG (Operon, Ebersberg, DE) bezogen.

Tab. 5: Sequenzen der verwendeten siRNAs

siRNA	siRNA-Sequenz 5' → 3'
siLuc	CUU ACG CUG AGU ACU UCG A
siIGFBP5	GCA GAU CUG UGA AUA UGA A
siBcl-3	UGG UCU UCU CUC CGC AUC A

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Verwendet wurden folgende Brustkrebszelllinien: MCF-7, BT-474, T-47D, SK-BR-3, MDA-MB-231, BT-20. Alle Zelllinien wurden mittels SNP-Analyse authentifiziert.

Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 + GlutaMAX Medium (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, DE) bei 37°C und 5% CO₂ ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert. Für alle Versuche wurde dieselbe FCS-Charge benutzt.

Tab. 6: Charakterisierung der Zelllinien (Holliday und Speirs 2011)

Zelllinie	Östrogen-rezeptor	Progesteron-rezeptor	Her2-Überexprimierung	Molekulare Klassifikation
MCF-7	+	+	-	Luminal A
T47D	+	+	-	Luminal A
BT474	+	+	+	Luminal B
SKBR-3	-	-	+	Her2
MDA-MB-231	-	-	-	Basal-like/Claudin-low
BT20	-	-	-	Basal

Die zur Herstellung des CAF-CM verwendeten, immortalisierten 19TT-Fibroblasten stammen aus einem invasiven duktalem Mammakarzinom und wurden uns von Prof. Dr. John Martens, Rotterdam, zur Verfügung gestellt (Martens et al. 2003). Die Fibroblasten wurden in dem selben Medium und Serum gezüchtet wie die Brustkrebszellen. Die Herstellung von CAF-CM erfolgte

durch Abnahme des Zellüberstandes von konfluenten Kulturen der Fibroblasten mit anschließender Zentrifugation zur Entfernung von nicht-adhärenenten Zellen und Zelltrümmern. CAF-CM wurde bei -20°C gelagert. Zur Behandlung der Brustkrebszellen mit CAF-CM wurden 20% CAF-CM mit 80% frischem Medium/Serum vermengt.

3.2.2 siRNA-Transfektion

Alle siRNAs, die hier verwendet wurden, sind in Tabelle 5 aufgelistet. 24 Stunden vor jedem Versuch wurde das Medium gewechselt. Die Transfektion der Zellen mit verschiedenen siRNAs erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten 175 cm² - Zellkulturflasche (TPP, Trasadingen, CH) zunächst mit einer 0,025% Trypsin/EDTA-Lösung (Lonza, Basel, CH) für vier bis sechs Minuten inkubiert, das Trypsin mit Medium/Serum anschließend inaktiviert und die Zellen in einer Zentrifuge (Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 1000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden sie mit RPMI ohne FCS gewaschen und erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl RPMI ohne FCS in einer Konzentration von ca. 8 Millionen Zellen/ml resuspendiert. Für eine Elektroporation wurden 250 µl der Zellsuspension mit 5 µl siRNA in einer MicroPulser-Elektroporations-Küvette gemischt und mit dem Bio-Rad „GenePulserX-Cell“ bei 250 V und 800 µF elektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden sofort für 30 Minuten auf Eis gekühlt, danach in 10 ml Medium/FCS in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser (Nunc/Thermo Electron LED, Langenselbold, DE) ausgesät und im Brutschrank bei 37°C, 100%-Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Begasung und unter Lichtausschluss (IG150, Jouan/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert.

Für Proteinanalysen wurde am Tag 2 nach Transfektion das Medium in den 10 cm Zellkulturschalen ausgetauscht und entweder durch 20 % CAF-CM/80% frisches Medium/FCS (CAF-CM-Ansatz) oder durch frisches Medium/FCS ohne CAF-CM-Zugabe (Kontrollansatz) ersetzt. Am Tag 3 nach Mediumwechsel wurden die Zellen geerntet und die Proteine, wie weiter unten ausgeführt, isoliert.

Für RNA-Analysen, für die weit weniger Zellen als für die Proteinanalysen notwendig sind, wurden die Zellen am Tag 2 nach Transfektion trypsinisiert, in Medium/FCS resuspendiert und die Zellzahl wie folgt bestimmt: 10µl der Zellsuspension wurden mit 10µl Trypanblau gemischt, davon 10µl in eine Einmalzählkammer pipettiert und danach die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Cell Countess, Invitrogen) ermittelt. Zur Herstellung von jeweils drei technischen Replikaten wurden in 6-Kavitäten Platten (TPP, Trasadingen, CH) 500.000 Zellen pro Kavität ausgesät. Davon wurden drei Proben mit CAF-CM behandelt und drei ohne CAF-CM inkubiert. Am Tag 3 nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit RNA-Lyse-Puffer („*lysis*

buffer“ des „*High Pure RNA Isolation Kit*“, Roche, Basel, CH) lysiert und die RNA, wie unten beschrieben, isoliert und die Expression bestimmter Gene per Q-RT-PCR gemessen.

3.2.3 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Q-RT-PCR

Nach Zellyse wurde die RNA mittels des High Pure RNA Isolation Kits von Roche (Basel, CH) laut Anleitung des Herstellers isoliert.

Die RNA-Konzentration wurde nach einer 1:50-Verdünnung der Proben durch Absorptionsmessung bei Wellenlängen von 230, 260, 280 und 320 nm mit einem Ultraspec 1000-Photometer (Pharmacia Biotech/GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SE) bestimmt.

Für die Synthetisierung von cDNA aus mRNA wurden 1µg Gesamt-RNA mit 1µl von 10mM dNTPs (Eppendorf, Hamburg, DE), sowie 0,5µl RNAsin Plus RNase Inhibitor (40 U/µl; Promega, Madison, USA), 1µl *Random*-Hexamer-Primer (100 ng/µl; Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe, Freiburg, DE) und 1µl RNase-freiem Wasser gemischt. Nach Inkubation bei 65°C für 5 Minuten wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt. Nachdem jeweils 4µl 5x-Puffer und 2µl DTT hinzugefügt wurden, konnte die Anlagerung der Primer an die RNA bei 25°C für 2 Minuten erfolgen. Schließlich konnte durch Zugabe von 0,5µl Superscript II-Reverse-Transkriptase (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) die cDNA-Synthese durch Inkubierung bei 25°C für 10 Minuten und 45°C für 50 Minuten erfolgen. Gestoppt wurde die Reaktion durch Erhöhung der Temperatur auf 70°C für 15 Minuten. Die fertige cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Die cDNA wurde in einer Verdünnung von 1:10 verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt jeweils 2µl cDNA, 0,63µl der jeweiligen spezifischen Primer (2µM; Eurofins MWG Operon, Ebersberg, DE), 5µl des SYBR Green Fluorescein-Mix (ABgene/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 1,75µl Nuklease-freies Wasser. Zur Amplifizierung wurde ein Bio-Rad MyiQ-Cycler (Bio-Rad, München, DE) verwendet. Nach Aktivierung der Polymerase für 15 Minuten bei 95°C wurden 40 Zyklen durchlaufen. In jedem Zyklus erfolgte zu Beginn die Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten, gefolgt vom „Annealing“ der Primer für 1 Minute bei 60°C und der anschließenden DNA-Synthese bei 72°C für 1 Minute. Zur Überprüfung der Qualität der qPCR-Reaktion wurde von den Reaktionsprodukten eine Schmelzkurve aufgenommen. Als Referenzgene wurden die Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT) benutzt. Die Ergebnisse wurden mit der „iQ5 Optical System“-Software Version 2.1 (Bio-Rad, München, DE) analysiert. Zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression wurde die komparative C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)-Methode benutzt.

3.2.4 Proteinanalyse

Für jede Proteinisolierung wurden die Zellen von je einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser geerntet. Dazu wurden diese mit 1ml PBS gewaschen, in 1ml Medium/FCS abgeschabt und anschließend in einer Zentrifuge pelletiert, danach erneut mit 1ml PBS gewaschen und abzentrifugiert. Die Isolierung der nukleären Proteinfraction erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Lindemann et al. 2001 (Lindemann et al. 2001). Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in 100-400µl Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA) resuspendiert und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen in einer Spritze mit einer 20 G-Kanüle lysiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand (Ü1) von dem Pellet getrennt. Das Pellet wurde in Puffer C (1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 400 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,9)) resuspendiert. Das in Puffer C resuspendierte Pellet wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Kernproteine enthielt, wurde abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Weiterverarbeitung des Überstandes (Ü1) begann mit erneuter Zentrifugation bei 8500rpm für 10 Minuten. Das entstandene Pellet mit den mitochondrialen Proteinen wurde verworfen, der Überstand für 1 Stunde bei 13000rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand, welcher nun die cytosolischen Proteine enthielt, abgenommen. Das Pellet mit dem Plasmamembranproteinen wurde in 50µl Puffer C Plasmamembran (1 mM DTT, 0,5 mM K-EDTA (pH 7,25), 5 mM HEPES (pH 7,9)) gelöst.

Alle Proteinextrakte wurden bei -80°C eingefroren.

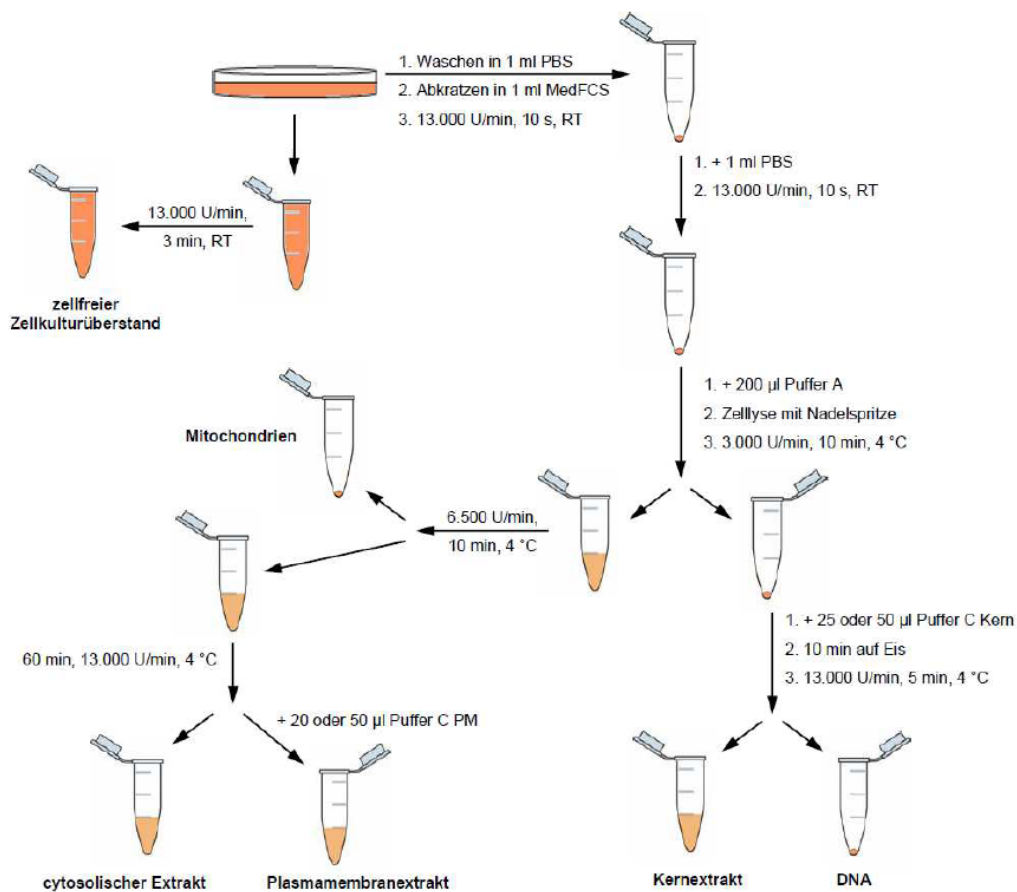


Abb. 2: Schema zur Isolierung von Proteinextrakten aus adhären gewachsenen Zellen aus Zellkulturschalen (aus Vogel 2012)

Die Proteinmenge der zellulären Extrakte wurde mit Hilfe des „Quant-iT Protein Assay Kit“ und dem Qubit 1.0 Fluorometer (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Es wurden jeweils 1-2µl der Proteinextrakte eingesetzt und Doppelbestimmungen durchgeführt.

SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen wurden wie beschrieben mit einigen Modifizierungen (Dittmer et al. 2006) durchgeführt. Während für die nukleäre und die zytosolische Proteinfraction je 10µg Protein auf das Gel aufgetragen wurden, wurden von den Plasmamembranextrakten je 5µg verwendet. Die entsprechenden Volumina der Lysate wurden mit einem 4x Sample-Puffer (5 ml H₂O (bidest.), 20 ml 10% SDS, 19,5 ml Glycerin, 6,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,0), 5,75 ml 0,4% Bromphenolblau, 2,5 ml β-Mercaptoethanol) verdünnt. Alle Proben wurden für 3 Minuten bei 99°C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970). Die Proben wurden dafür auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Die Gele bestanden aus einem 10% Trenngel überschichtet mit einem 4% Sammelgel. Für die Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine wurden als Marker 5µl des PageRuler Prestained Protein Ladder (Pierce/Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Zunächst erfolgte die Konzentrierung der Proben im Sammelgel bei 70V für 30 Minuten, anschließend folgte dann die Auftrennung bei 150V für 60 Minuten.

Nach der Elektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf eine zuvor in Methanol und Transferpuffer (192 mM Glycin, 20% Methanol, 25 mM Tris-Base) aktivierte „Immobilon“-PVDF-Membran (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) bei 120V und 4°C für eine Stunde. Vor einer Antikörperinkubierung wurde die Membran erneut aktiviert und mit 2% Milchpulver in Waschpuffer (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)) für 10 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Der Inkubation mit dem primären Antikörper in Waschpuffer mit 0,2% Milchpulver für 1 Stunde bei Raumtemperatur schloss sich dreimaliges Waschen der Membran in Waschpuffer für jeweils 5 Minuten an. Danach wurde mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in Waschpuffer mit 0,2% Milchpulver für erneut 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dem folgte ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für jeweils 20 Minuten.

Es folgte die Entwicklung in der Dunkelkammer mittels Darstellung der Peroxidaseaktivität durch Chemolumineszenz. Dazu wurde das Pierce ECL Western Blotting Substrat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers frisch angesetzt und auf die Membran gegeben. Der Nachweis der Chemolumineszenz erfolgte durch Schwärzen eines Hyperfilms ECL (GE Healthcare Europe, Freiburg, DE) an den lumineszierenden Stellen. Die zur Darstellung der Banden notwendige Exposition des Films variierte je nach Signalstärke zwischen 5 Sekunden und 30 Minuten.

Die Membranen wurden zur Überprüfung der gleichen Beladung mit Proteinen mit Fast Green in einer Konzentration von 0,4 g/200 ml (50% Methanol, 40% Wasser, 10% Eisessig) gefärbt. Auf eine Überprüfung der gleichen Beladungen mit Housekeeping-Proteinen wie Beta-Actin wurde verzichtet, da diese keine zuverlässige Aussage erlaubt (Dittmer et al. 2006).

3.2.5 ATP-basierter Zellwachstumsassay

Um das Zellwachstum zu bestimmen, wurde die Masse an lebenden Zellen anhand der Gesamt-ATP-Menge bestimmt. Die ATP-Menge wurde mit dem Via Light plus Kit (Lonza, Basel, CH), einem Lumineszenz-basierenden Assay gemessen. In diesem Assay ist das ATP der limitierende Faktor für die Luziferase-katalysierte Reaktion, wodurch die Lumineszenz ein Maß für die ATP-Konzentration wird. Der Zellüberstand wurde abgenommen, verworfen und anschließend in jede Kavität eine Mischung von 100µl PBS und 50µl Lysepuffer pipettiert. Die vollständige Zelllyse erfolgte durch 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln. 75µl der jeweiligen Probe wurden mit 50µl des AMR plus Reagenz (Luciferase-Lösung mit Luciferin, aus „Vialight Plus Kit“), welches sowohl das Enzym Luciferase als auch

sein Substrat Luciferin enthält, gemischt. Das emittierte Licht wurde mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Detection Systems, Pforzheim, DE) gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von CAF-CM auf das Wachstum von Brustkrebszellen

4.1.1 Wachstumsanalysen mit 6 verschiedenen Brustkrebszellen

MCF-7-Brustkrebszellen ($ER\alpha^+$)

Die Untersuchung des Wachstums von MCF-7-Zellen unter der Einwirkung von 20% CAF-CM (konditioniertes Medium von TT19 Fibroblasten), Fulvestrant und Fulvestrant mit 20% CAF-CM erfolgte am Tag 5 und Tag 7. Erwartungsgemäß konnte Fulvestrant die Zellproliferation sowohl am Tag 5 als auch am Tag 7 signifikant inhibieren. Nach 5 Tagen Inkubation ließ sich in Gegenwart von Fulvestrant 27% der Zellmasse im Vergleich zur Kontrolle nachweisen, nach 7 Tagen sogar nur 11% (Abb. 3). Der Einfluss von CAF-CM auf das Wachstum in Abwesenheit von Fulvestrant war gering. In Abwesenheit von Fulvestrant konnte das Wachstum durch den Einfluss von CAF-CM statistisch signifikant um das 1,3-fache am Tag 5 gegenüber der Kontrollbedingung gesteigert werden. Am Tag 7 nahm das Zellwachstum jedoch wieder auf das 0,8-fache im Vergleich zur Kontrolle ab. In Anwesenheit von Fulvestrant erlangten die Zellen unter dem Einfluss von CAF-CM einen signifikanten Wachstumsanstieg um das 2,5-fache am Tag 5 und um das 4,8-fache am Tag 7 im Vergleich zu Fulvestrant ohne CAF-CM. Während also CAF-CM kaum Einfluss auf das Wachstum der MCF-7-Zellen in Abwesenheit von Fulvestrant hatte, erhöhte CAF-CM das Wachstum in Gegenwart von Fulvestrant deutlich. Dies lässt den Schluss zu, dass CAF-CM MCF-7 Brustkrebszellen gegenüber dem Antiöstrogen Fulvestrant desensibilisiert.

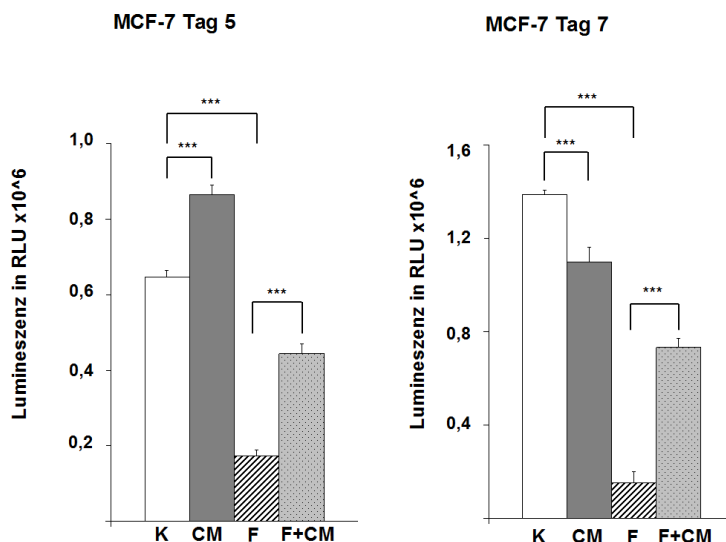


Abb. 3: Wachstums-Assay mit MCF-7 Zellen: Wirkung von 20% CAF-CM, Fulvestrant, sowie 20% CAF-CM + Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,005, RLU = relative light units, K = Kontrolle, CM = CAF-CM, F = Fulvestrant, F + CM = Fulvestrant + CAF-CM

T47D-Brustkrebszellen ($ER\alpha^+$)

Das Wachstum von T47D-Zellen wurde ebenfalls am Tag 5 und 7 nach Aussaat ausgewertet. T47D-Zellen zeigten eine geringere Fulvestrantsensibilität als MCF-7-Zellen. Das Wachstumslevel konnte durch Fulvestrant nach einer Inkubation von 5 Tagen nur um das 0,8-fache gesenkt werden, am Tag 7 um das 0,6-fache. Unter dem Einfluss von CAF-CM zeigte diese Zelllinie eine deutliche Wachstumssteigerung in Abwesenheit von Fulvestrant um das 1,8-fache am Tag 5 und um das 2,5-fache am Tag 7. In Gegenwart von Fulvestrant bewirkte CAF-CM eine Wachstumssteigerung um das 1,3-fache (Tag 5) bzw. um das 1,4-fache (Tag 7). Da T47D-Zellen auch in Abwesenheit von Fulvestrant auf CAF-CM mit erhöhter Wachstumsaktivität reagierten, ist der Wachstumsimpuls durch CAF-CM Fulvestrant-unabhängig.

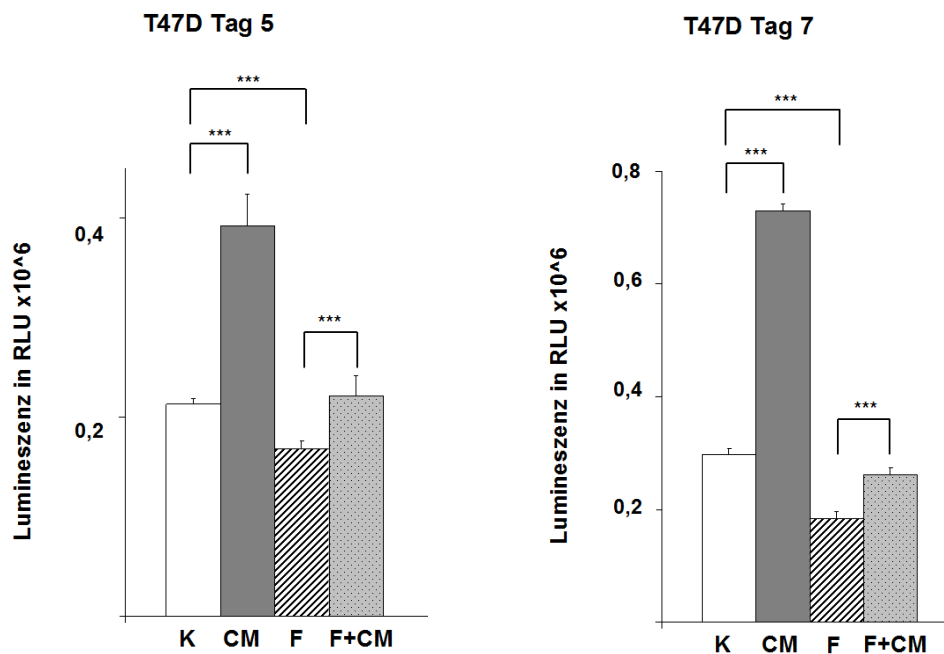


Abb. 4: Wachstums-Assay mit T47D Zellen: Wirkung von 20% CAF-CM, Fulvestrant, sowie 20% CAF-CM + Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,005, RLU = relative light units, K = Kontrolle, CM = CAF-CM, F = Fulvestrant F + CM = Fulvestrant + CAF-CM

BT474-Brustkrebszellen ($ER\alpha^+$, $Her2^+$)

Aufgrund des langsameren Wachstums der BT474-Zellen im Vergleich zu MCF-7- und T47D-Zellen wurde das Zellwachstum der BT474-Zellen am Tag 5 und am Tag 11 gemessen. In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass der wachstumsinhibierende Effekt von Fulvestrant auf BT474-Zellen deutlich schwächer ist als bei MCF-7 Zellen. Innerhalb einer Inkubationszeit von 5 Tagen hatte Fulvestrant keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der BT474-Zellen. Eine Inkubationszeit von 11 Tagen reduzierte das Wachstum um das 0,6-fache der Kontrolle. Unter dem Einfluss von CAF-CM zeigten BT474-Zellen ein signifikant 1,2-fach gesteigertes Wachstum innerhalb von 5 Tagen. Auch in Gegenwart von Fulvestrant konnte CAF-CM im gleichen Zeitraum eine Wachstumssteigerung um das 1,2-fache, im Vergleich zu allein mit Fulvestrant behandelten Zellen, bewirken. Nach 11 Tagen Inkubation war ein wachstumsfördernder Effekt von CAF-CM weder in An- noch in Abwesenheit von Fulvestrant erkennbar.

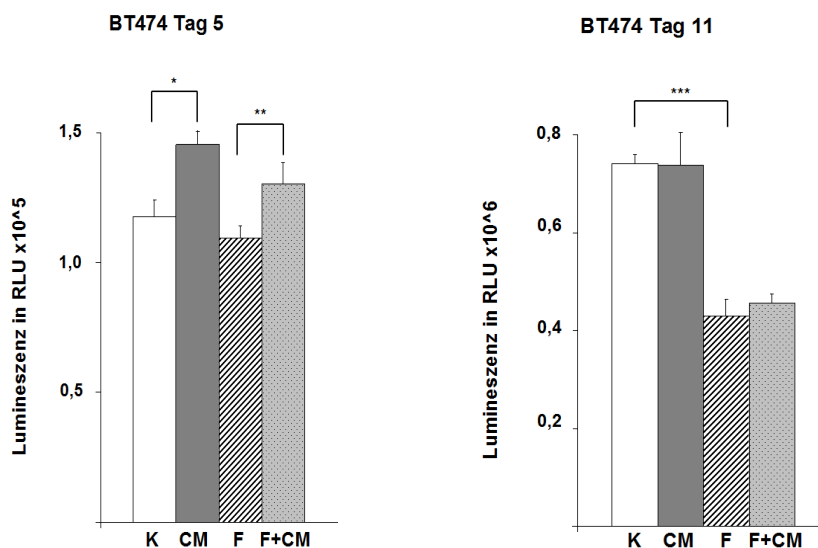


Abb. 5: Wachstums-Assay mit BT474 Zellen: Wirkung von 20% CAF-CM, Fulvestrant, sowie 20% CAF-CM + Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,005; RLU = relative light units, K = Kontrolle, CM = CAF-CM, F = Fulvestrant, F + CM = Fulvestrant + CAF-CM

SKBR3-Brustkrebszellen ($Her2^+$)

Die Ergebnisse des Wachstumsassays mit der $ER\alpha$ -negativen, $Her2$ -positiven SKBR3-Zelllinie, dargestellt in Abbildung 6, zeigen erwartungsgemäß keinen wachstumsinhibierenden Effekt durch Fulvestrant. Interessanterweise steigerte Fulvestrant sogar das Wachstum innerhalb von 8 Tagen. Am Tag 8 war die Zellpopulation um das 1,2-fache signifikant höher als unter der Kontrollbedingung. CAF-CM hatte einen starken, statistisch signifikanten hemmenden Effekt

auf das Wachstum. Das galt sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Fulvestrant. Damit zeigte CAF-CM auf SKBR3-Zellen einen negativen Effekt auf das Brustkrebszellwachstum.

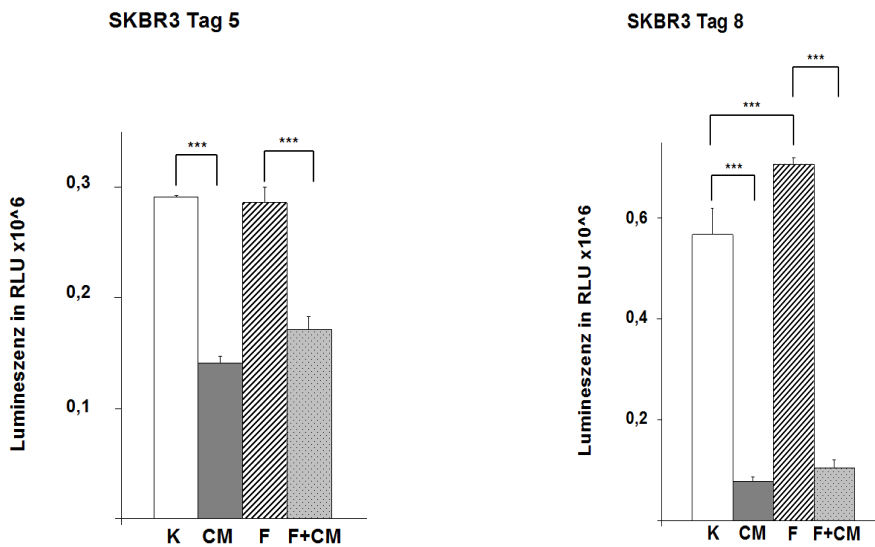


Abb. 6: Wachstums-Assay mit SKBR3 Zellen: Wirkung von 20% CAF-CM, Fulvestrant, sowie 20% CAF-CM + Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,005$, RLU = relative light units, K = Kontrolle, CM = CAF-CM, F = Fulvestrant, F + CM = Fulvestrant + CAF-CM

MDA-MB-231-Brustkrebszellen (tripel-negativ)

Da MDA-MB-231-Zellen eine hohe Zellteilungsrate haben, wurde schon am Tag 3 des Experiments eine Auswertung vorgenommen, eine weitere am Tag 5. Erwartungsgemäß zeigte Fulvestrant keinen Effekt auf das Zellwachstum dieser ER α -negativen Zelllinie (Abb. 7). CAF-CM allein und in Kombination mit Fulvestrant hatten innerhalb einer Inkubationszeit von 3 Tagen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Wachstum. Innerhalb von 5 Tagen konnte eine geringfügige, jedoch signifikante Wachstumsabnahme um das 0,9-fache unter dem Einfluss von CAF-CM im Vergleich zur Kontrollbedingung beobachtet werden. D.h. CAF-CM hat kaum Einfluss auf das bereits starke Wachstum der MDA-MB-231-Zellen.

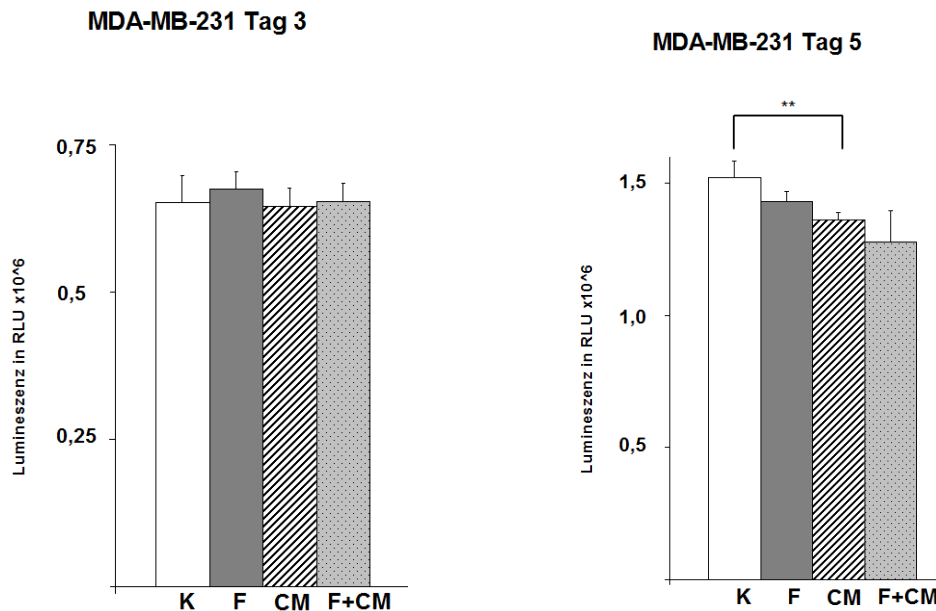


Abb. 7: Wachstums-Assay mit MDAMB231 Zellen: Wirkung von 20% CAF-CM, Fulvestrant, sowie 20% CAF-CM + Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,005, RLU = relative light units, K = Kontrolle, CM = CAF-CM, F = Fulvestrant, F + CM = Fulvestrant + CAF-CM

BT20-Brustkrebszellen (tripel-negativ)

Die Auswertung des Wachstums der ER α -negativen Zelllinie BT20 erfolgte am Tag 5 und am Tag 7. Wie bei den tripel-negativen MDA-MB-231-Zellen hatte Fulvestrant keinen Effekt auf das Wachstum von BT20-Zellen (Abb. 8). Durch CAF-CM erhielten BT20-Zellen eine geringe Wachstumsstimulation, welche nur am Tag 7 sichtbar war. Die Zellmasse war zu diesem Zeitpunkt statistisch signifikant um das 1,2-fache höher als unter Kontrollbedingungen.

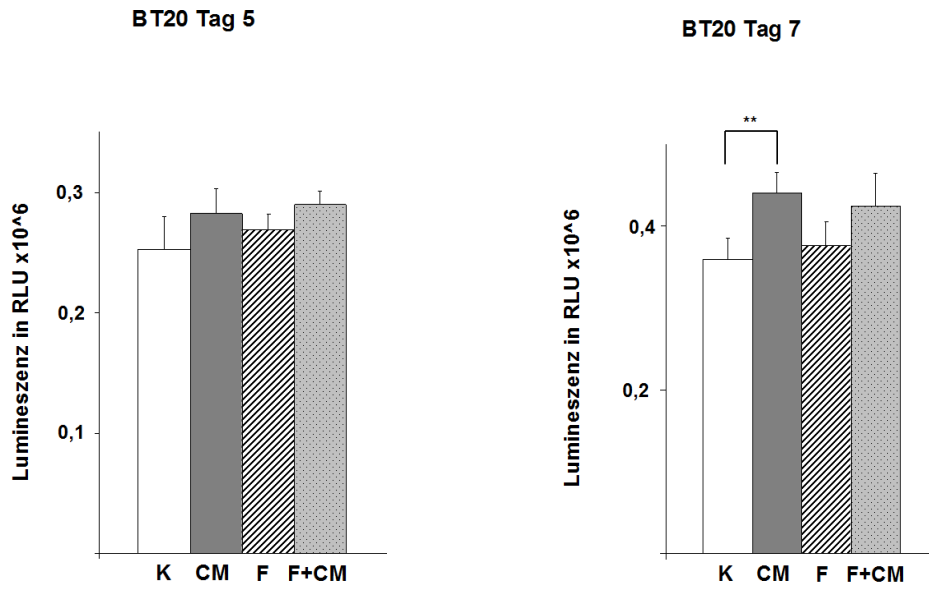


Abb. 8: Wachstums-Assay mit BT20 Zellen: Wirkung von 20% CAF-CM, Fulvestrant, sowie 20% CAF-CM + Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,005, RLU = relative light units, K = Kontrolle, CM = CAF-CM, F = Fulvestrant, F + CM = Fulvestrant + CAF-CM

Die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen mit den sechs verschiedenen Brustkrebszelllinien sind in Tab. 7 zusammengefasst. Fulvestrant hatte, wie erwartet, einen wachstumshemmenden Effekt nur auf die ER α -positiven Brustkrebszelllinien MCF-7, T47D und BT474, wobei T47D- und BT474-Zellen wesentlich weniger sensibel auf Fulvestrant reagierten als MCF-7-Zellen. Die geringe Fulvestrant-Sensitivität der BT474-Zellen geht wahrscheinlich auf die Expression von Her2 in diesen Zellen zurück, die eine Her2-getriebene Proliferation in Gegenwart von ER α -blockierenden Substanzen ermöglicht (Ross-Innes et al. 2012).

Tab. 7: Ergebnisse zur Wachstumsanalyse aller 6 untersuchten Zelllinien

Subtyp (IHC)	Zelllinie	CAF-CM-Effekt auf Wachstum	CAF-CM-Effekt auf Wachstum in Gegenwart von Fulv	Fulv-Sensitivität
ER α _{positiv}	MCF-7	+/-	++	++
ER α _{positiv}	T47D	++	+	+
ER α _{positiv} Her2 _{positiv}	BT474	+/.	+	+
Her2 _{positiv}	SKBR-3	-	-	.
TN	MDA-MB-231	-	.	.
TN	BT20	(+)/+	(+)	.

+ = signifikante Zunahme, (+) = nicht-signifikante Zunahme, - Abnahme, . = keine Änderung, +/- oder +/. = abhängig vom Tag der Analyse, IHC= Immunhistochemie, TN = tripel-negativ, Fulv = Fulvestrant

Auffällig ist der starke Effekt von CAF-CM auf MCF-7-Zellen nur in Gegenwart von Fulvestrant, der für eine durch CAF-CM induzierte Desensibilisierung gegenüber Fulvestrant spricht. Bemerkenswert ist auch der positive Effekt von CAF-CM auf das Wachstum von T47D im Gegensatz zum stark negativen Effekt von CAF-CM auf das Wachstum von SKBR3-Zellen bis hin zur fehlenden oder kaum vorhandenen Beeinflussung des Wachstums von MDA-MB-231 und BT20-Zellen durch CAF-CM. Diese Daten zeigen, dass unterschiedliche Brustkrebszellen sehr unterschiedlich auf das konditionierte Medium von Carcinom-assoziierten Fibroblasten reagieren.

4.2 Einfluss von CAF-CM auf die Expression von Bcl-3 und anderer CAF-CM-responsiver Gene

Mit MCF-7-Zellen wurde gezeigt, dass CAF-CM die Expression oder den Phosphorylierungsstatus einer Reihe von Proteinen beeinflusst (Leyh et al. 2015). Eine erhöhte Expression unter CAF-CM-Einfluss wurde für Bcl-3, Integrin β 1, IGF1R und CAIX nachgewiesen, ein höherer Phosphorylierungsstatus für AKT und STAT3. Um zu testen, ob CAF-CM die Proteinexpression auch in den anderen getesteten Zelllinien verändert, wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Außerdem wurde ein Antikörper gegen ER α und gegen Her2 eingesetzt, um den ER α - und Her2-Status der 6 Brustkrebszelllinien zu bestätigen.

Zunächst wurden die Untersuchungen in Abwesenheit von CAF-CM durchgeführt. Diese Analysen ergaben, dass das Bcl-3-Proteinlevel bei den SKBR3-, MDA-MB-231- und BT20-Zelllinien am höchsten von allen 6 Zelllinien ist (Abb. 9A). Ergänzend zu dieser Untersuchung wurde auch die Bcl-3-RNA-Expression mittels qPCR gemessen. Die höchsten Bcl-3-mRNA-Level wurden in SKBR3- und BT474-Zellen ermittelt, die niedrigsten in MDA-MB-231- und BT20-Zellen. Folglich spiegeln die Bcl-3-RNA-Level nicht die Bcl-3-Proteinlevel wieder. Da die Spezifität des Anti-Bcl-3-Antikörpers durch Experimente mit Bcl-3-spezifischer siRNA nachgewiesen wurde (Leyh et al. 2015), kann man schließen, dass die Bcl-3-Proteinexpression auch posttranslational in Brustkrebszellen reguliert wird. Diese Annahme wird durch eine 2017 publizierte Studie bestätigt, die zeigt, dass die Proteinstabilität von Bcl-3 durch Phosphorylierung moduliert werden kann, u.a. durch aktiviertes AKT und ERK2 (Wang et al. 2017a).

Große Unterschiede ließen sich auch in der Expression der anderen untersuchten Proteine nachweisen. So zeigte Integrin β 1 die stärkste Expression in MDA-MB-231-Zellen, gefolgt von BT20- und BT474-Zellen. Im Gegensatz dazu war bei SKBR3-Zellen keine Proteinexpression von Integrin β 1 nachweisbar. Der IGF1-Rezeptor ist bei 5 der 6 Zelllinien annähernd gleich stark exprimiert, während SKBR3-Zellen den IGF1R nicht exprimieren. CAIX ist stark exprimiert in MCF-7- und BT20-Zellen, nicht aber in T47D, BT474- und SKBR3-Zellen. AKT ist besonders stark phosphoryliert und damit aktiviert in BT20-Zellen, gefolgt von BT474-, SKBR3- und T47D-Zellen. Basale STAT3-Phosphorylierung ist vor allem in MDA-MB-231 und BT20-Zellen zu beobachten. Die Kinasen ERK1/2 zeigten hingegen die höchste Aktivierungsstufe in MCF-7-Zellen und die niedrigste in BT474-Zellen.

Folglich weisen die 6 Zelllinien ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster für die untersuchten Proteine auf.

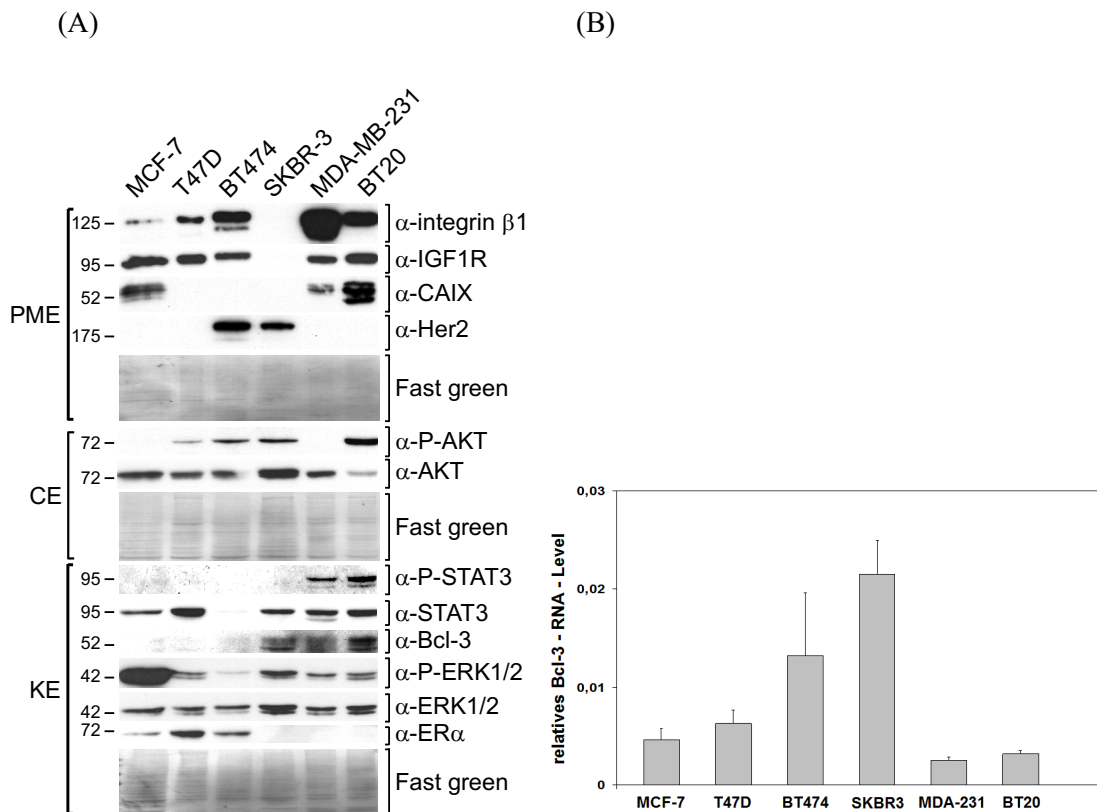


Abb. 9: (A) Westernblot-Analyse zur Expression von ausgewählten Proteinen in den verschiedenen Brustkrebszelllinien, (B) Relatives Bcl-3-mRNA-Level bei den verschiedenen Brustkrebszelllinien, PME = Plasmamembranextrakt, CE = cytosolischer Extrakt, KE = Kernextrakt.

Als nächstes wurde der Effekt von CAF-CM auf die Expression der ausgewählten Proteine bei den verschiedenen Brustkrebszellen untersucht (Abb. 10).

Bei MCF-7-Zellen kann eine durch CAF-CM induzierende Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges festgestellt werden, erkennbar an dem stärkeren Level von P-AKT im zytosolischen Extrakt. In BT474-Zellen führte CAF-CM ebenfalls zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Bei T47D-Zellen war eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges durch CAF-CM nicht detektierbar, ebenso nicht in MDA-MB-231- und BT20-Zellen. Die Aktivität des Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signalweges wurde unter dem Einfluss von CAF-CM bei MCF-7-Zellen nicht erhöht, sondern eher erniedrigt, wie anhand des Levels von P-ERK1/2 zu erkennen ist. Eine geringere Aktivität dieses Signalweges bei CAF-CM-Behandlung ist auch bei BT474 -Zellen zu beobachten. Im Gegensatz dazu wird bei SKBR3- und MDA-MB-231-Zellen der Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signalweg durch Zugabe von CAF-CM aktiviert.

Ein erhöhtes P-STAT3-Level, welches bei 5 der 6 untersuchten Zelllinien (außer BT20-Zellen) in Gegenwart von CAF-CM beobachtet wurde deutet auf eine erhöhte Aktivität des

JAK2/STAT3-Signalweges hin. In BT474- und SKBR3-Zellen wurde zusätzlich auch die Gesamt-Expression von STAT3 durch CAF-CM erhöht. In den Extrakten der Plasmamembran fällt bei CAF-CM-behandelten MCF-7-Zellen eine Zunahme der Expression von Integrin $\beta 1$, dem IGF1-Rezeptor sowie von CAIX auf. Ebenfalls ist eine Zunahme der Expression von Integrin $\beta 1$ und IGF1R bei SKBR3-Zellen zu beobachten, bei MDA-MB-231 nur von Integrin $\beta 1$. Im Gegensatz dazu sind bei T47D-Zellen der IGF1-Rezeptor und Integrin $\beta 1$ sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter CAF-CM-Einfluss annähernd gleich stark exprimiert. Die Expression des IGF1R und auch der CAIX sind in MDA-MB-231-Zellen nach CAF-CM-Behandlung sogar reduziert. Bei MCF-7-, BT474- und SKBR3-Zellen zeigten die Westernblot-Ergebnisse eine erhöhte Expression von Bcl-3 unter dem Einfluss von CAF-CM. Bei den anderen drei Zelllinien ergaben sich keine nennenswerten Veränderungen in der Bcl-3-Expression durch CAF-CM.

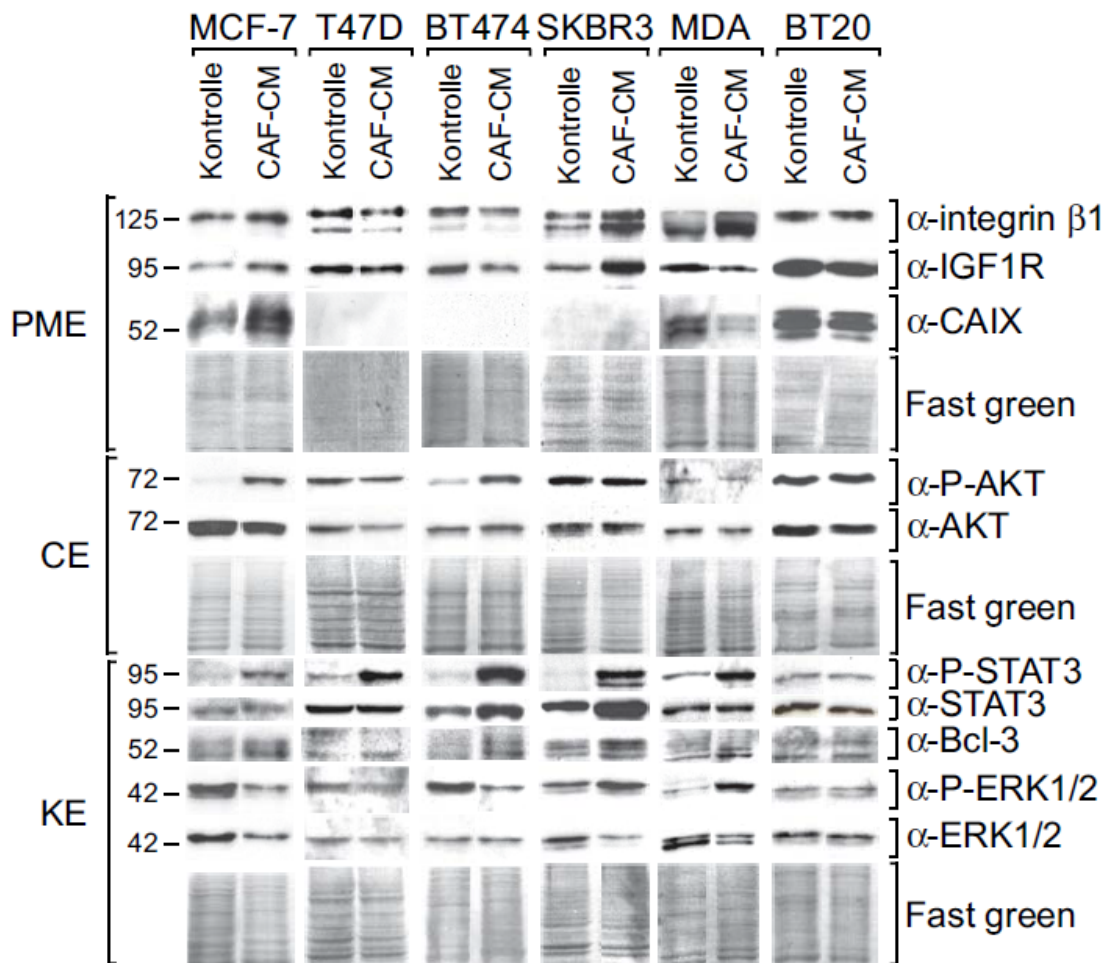


Abb. 10: Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Wirkung von 20% CAF-CM auf MCF-7-, T47D-, BT474-, SKBR3-, MDA-MB-231 (MDA)- und BT20-Zellen. PME = Plasmamembranextrakt, CE = cytosolischer Extrakt, KE = Kernextrakt.

In Abbildung 11 ist zu sehen, dass auch die Bcl-3-mRNA-Expression durch den Einfluss von CAF-CM erhöht wird und zwar signifikant bei 4 der 6 untersuchten Zelllinien (MCF-7, T47D,

SKBR3 und BT20), zum Beispiel um das 2-fache bei MCF-7-Zellen und um das 2,3-fache bei T47D-Zellen. Damit steigerte CAF-CM in MCF-7- und SKBR3-Zellen sowohl das Bcl-3-RNA- als auch das Bcl-3-Proteinlevel, während es in T47D- und BT20-Zellen nur das Bcl-3-RNA-Level ansteigen ließ. Wiederum zeigt sich, dass eine Veränderung der Bcl-3-RNA-Expression nicht zwangsläufig zu einer Veränderung der Bcl-3-Proteinexpression führen muss.

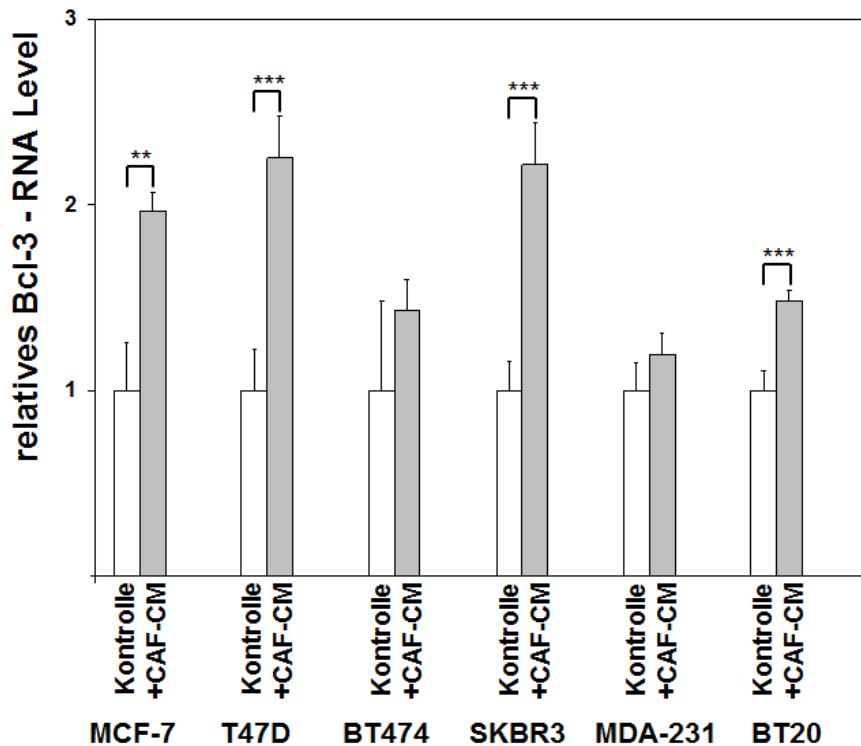


Abb. 11: Effekt von CAF-CM auf die Bcl-3-mRNA-Expression in den 6 Zelllinien

Die Werte zeigen das arithmetische Mittel von 3 Werten \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,005$

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Reaktionen der verschiedenen Zelllinien auf CAF-CM sehr heterogen sind. Die größte Gemeinsamkeit, die an dieser Stelle hervorgehoben werden kann, ist die Erhöhung des P-STAT3-Levels bei 5 der 6 untersuchten Zelllinien, die Steigerung der Bcl-3-RNA-Expression in 4 Zelllinien, die Erhöhung in der Bcl-3-Proteinexpression in 3 Zelllinien und der Anstieg von Integrin $\beta 1$ in 3 Zelllinien.

Tab. 8: Ergebnisse zur Proteinanalyse aller 6 untersuchten Zelllinien

Effekte von CAF-CM									
Subtyp (IHC)	Zelllinie	BCL-3-RNA	BCL-3	P-STAT3	P-ERK1/2	P-AKT	IGF1R	Integrin β 1	CAIX
ER α positiv	MCF-7	+	+	+	—	+	+	+	+
ER α positiv	T47D	+	.	+
ER α positiv Her2positiv	BT474	+	+	+	—	+	.	.	.
Her2positiv	SKBR-3	+	+	+	+	.	+	+	.
TN	MDA-MB-231	.	.	+	+	.	—	+	—
TN	BT20	+

+ = signifikante Zunahme, (+) = nicht-signifikante Zunahme, - Abnahme, . = keine Änderung, IHC = Immunhistochemie, TN = tripel-negativ

4.3 Effekt von CAF-CM auf die IGFBP5-RNA-Expression

Neben einer Erhöhung der Expression einiger Gene bewirkte CAF-CM auch eine Senkung in der Expression anderer Gene. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang IGFBP5, das in MCF-7-Zellen invers zu Bcl-3 exprimiert wird und die Bcl-3-Expression unterdrückt (Leyh et al. 2015).

Es sollte nun untersucht werden, inwieweit CAF-CM die IGFBP5-Expression in den 6 Zelllinien beeinflusst. CAF-CM reduzierte das IGFBP5-RNA-Level auf 17% im Vergleich zur Kontrolle in MCF-7-Zellen. Bei T47D-Zellen erzeugte CAF-CM eine statistisch signifikante Herunterregulierung auf 55% und bei BT474- und SKBR3-Zellen auf 30% des Kontrollwertes. Bei BT20-Zellen zeigte CAF-CM nur tendenziell einen reduzierenden Effekt auf die IGFBP5-Expression, während bei MDA-MB-231-Zellen CAF-CM das in diesen Zellen sehr niedrige IGFBP5-Level (Vgl. Abb. 13) erhöhte. Die Ergebnisse zeigen, dass CAF-CM das IGFBP5-Level in 4 der 6 Zelllinien signifikant senkt. In drei von diesen Zelllinien (MCF-7, T47D und SKBR3) wurde parallel ein Anstieg in der Bcl-3-mRNA-Expression beobachtet (Vgl. Abb. 11).

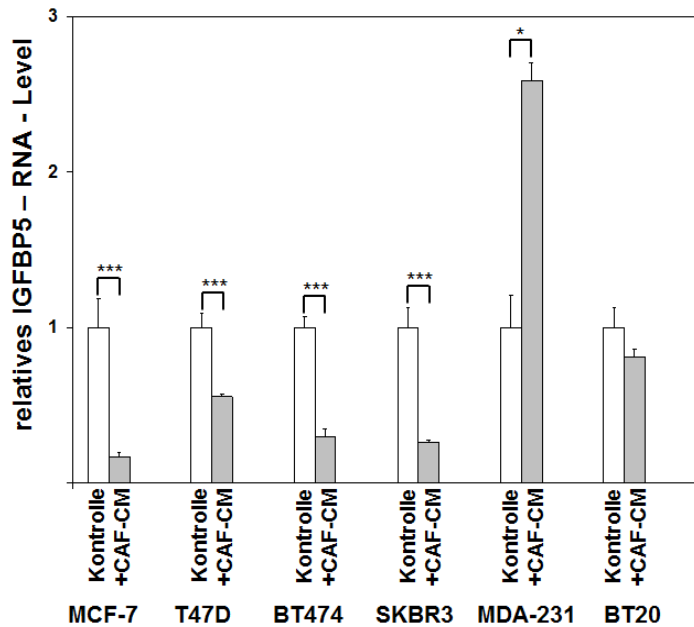


Abb. 12: Der Effekt von CAF-CM auf die IGFBP5-mRNA-Expression in den 6 Zelllinien

Werte zeigen das arithmetische Mittel von 3 Werten \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test * $<$ 0,05, ** $<$ 0,01, *** $<$ 0,005

4.4 Bedeutung von IGFBP5

4.4.1 Mögliche inverse Korrelation zwischen IGFBP5- und Bcl-3- RNA-Expression

Um den bei MCF-7-Zellen gezeigten inversen Zusammenhang zwischen der IGFBP5- und Bcl-3-Expression bei den anderen hier verwendeten Zelllinien zu untersuchen, wurden zunächst die relativen IGFBP5- und Bcl-3-mRNA-Level der 6 verschiedenen Zelllinien mittels Q-RT-PCR gemessen. Die Daten für Bcl-3 sind bereits in Abb. 9B dargestellt, die für IGFBP5 in Abb. 13. Für beide mRNAs lassen sich stark unterschiedliche Level in den Zelllinien feststellen. Das Bcl-3-mRNA-Level ist bei SKBR3-Zellen am höchsten und bei MDA-MB-231 Zellen am niedrigsten (Abb. 9B), während T47D-Zellen die höchsten IGFBP5-mRNA-Level zeigten und MDA-MB-231-Zellen kaum IGFBP5-mRNA produzieren (Abb. 13). In Abb. 14 sind die RNA-Expressionen der beiden Gene gegenüber gestellt. Es war keine inverse Korrelation zwischen beiden Genen erkennbar.

IGFBP5-Level

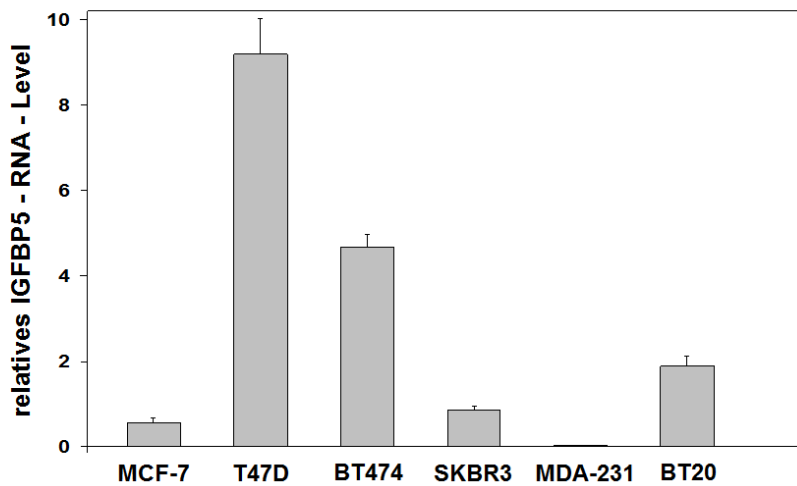


Abb. 13: Relatives IGFBP5-mRNA-Level bei den verschiedenen Brustkrebszelllinien

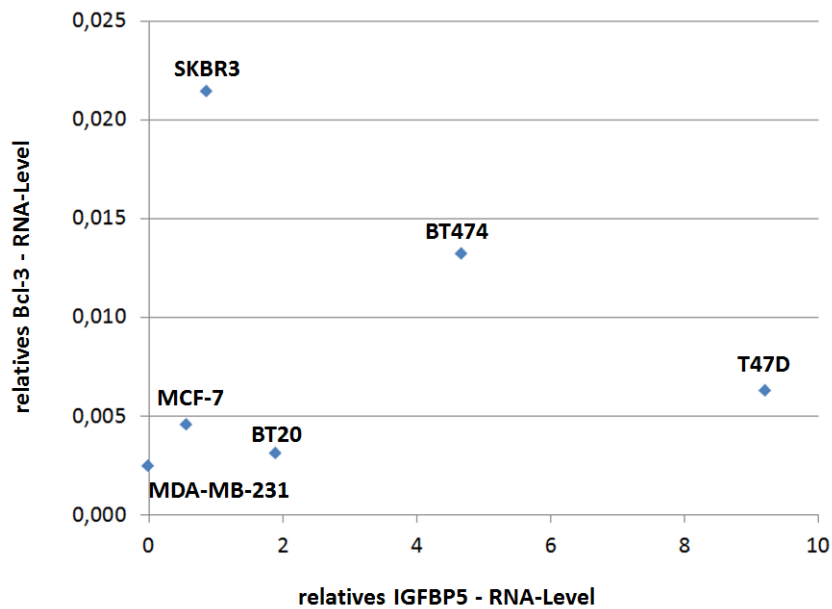


Abb. 14: Fehlende Korrelation zwischen der IGFBP5- und Bcl-3-Expression.

Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass die Expression von Bcl-3 und IGFBP5 auch von anderen Faktoren abhängig ist. Um einen Zusammenhang zwischen der Bcl-3- und IGFBP5-Expression innerhalb einer Zelllinie zu untersuchen, wurde die IGFBP5-Expression durch eine IGFBP5-spezifische siRNA (siIGFBP5) unterdrückt.

4.4.2 Einfluss von IGFBP5 auf die Bcl-3-Expression

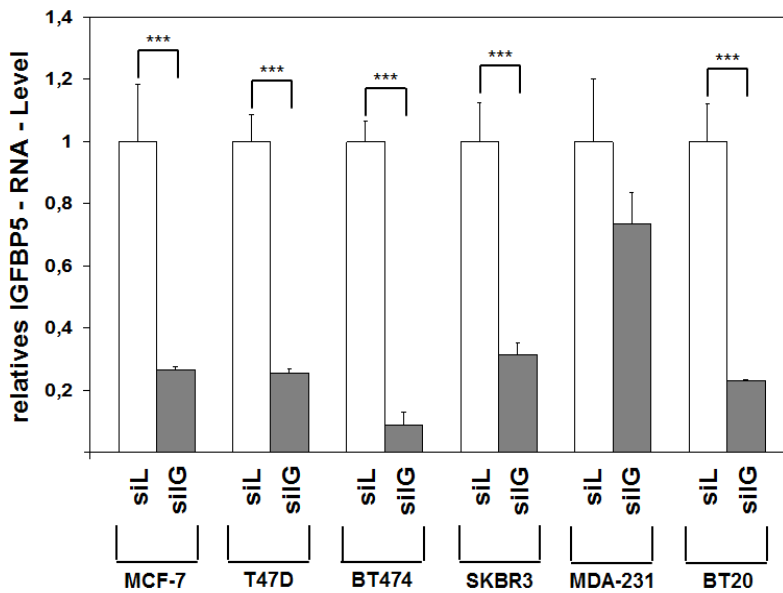


Abb. 15: Effekt der IGFBP5-spezifischen siRNA siIGFBP5 auf die IGFBP5-RNA-Expression in den verschiedenen Zelllinien, siL = si Luciferase, siIG = si IGFBP5

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass der Knockdown mit siIGFBP5 in allen Zellen außer in MDA-MB-231-Zellen, welche kaum IGFBP5 produzieren (Vgl. Abb. 13), die IGFBP5-Expression statistisch signifikant senken konnte.

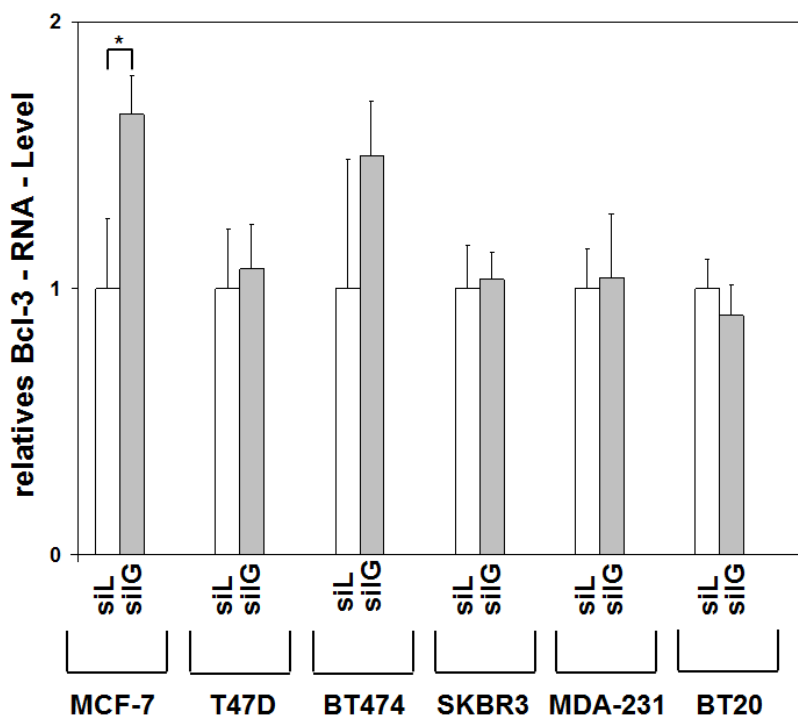


Abb. 16: Effekt der IGFBP5-spezifischen siRNA siIGFBP5 auf die Bcl-3-RNA-Expression in den verschiedenen Zelllinien, siL = si Luciferase, siIG = si IGFBP5

Um nun herauszufinden, ob IGFBP5 die Bcl-3-Expression in den verschiedenen Zellen reguliert, wurden die Bcl-3-Level unter dem Knockdown von IGFBP5 gemessen. Bei der MCF-7-Zelllinie steigt das Bcl-3-RNA-Level bei der Herunterregulierung von IGFBP5 statistisch signifikant auf das ~1,7-fache an und auch bei BT474-Zellen ist eine tendenzielle Zunahme des Bcl-3-RNA-Levels durch den Knockdown von IGFBP5 zu erkennen (um das 1,5-fache im Vergleich von siLuc zu siIGFBP5) (Abb. 16).

Anhand dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Bcl-3-Expression nur bei MCF-7- und BT474-Zellen von IGFBP5 reguliert wird.

4.4.3 Bedeutung von IGFBP5 für die Effekte von CAF-CM auf Expression weiterer Proteine

Vier der sechs Zelllinien zeigten eine Reduzierung des IGFBP5-mRNA-Levels unter dem Einfluss von CAF-CM (Abb. 12). Die Häufigkeit dieses Ereignisses warf die Frage auf, ob CAF-CM einige seiner Effekte auf die Expression der untersuchten Proteine über die Senkung des IGFBP5-Levels bewirkt. Um eine Senkung des IGFBP5-Levels in Abwesenheit von CAF-CM zu erzielen, wurden die Zellen mit siIGFBP5 transfiziert. Kontroll-Zellen wurden mit der Kontroll-siRNA siLuc behandelt. MDA-MB-231-Zellen wurden von dieser Untersuchung ausgeschlossen, da ein siIGFBP5-Effekt auf die ohnehin kaum nachweisbare IGFBP5-Expression nicht erkennbar war (Abb. 15).

Bei MCF-7-Zellen konnte die durch CAF-CM-induzierte Aktivierung von AKT und der Anstieg der Bcl-3- und der CAIX-Expression durch siIGFBP5 nachgeahmt werden (Abb. 17). Bei BT474-Zellen erhöhte siIGFBP5 die Expression von Bcl-3, STAT3 und ERK1/2, nicht jedoch von P-STAT3 und P-ERK1/2. Bei SKBR3-Zellen wurde mit siIGFBP5 das Bcl-3-Level sowie das STAT3-, aber nicht das P-STAT3-Level hochreguliert. Auf BT-20-Zellen bewirkte siIGFBP5 eine Senkung der STAT3-Expression und STAT3-Phosphorylierung und eine Erhöhung der P-ERK1/2-Expression. Zusätzlich wurde in vier Zelllinien (MCF-7, BT474, T47D und SKBR3) eine Reduktion des Integrin β 1-Levels durch siIGFBP5 beobachtet, die entweder beide Isoformen des Proteins betraf (BT474-Zellen) oder nur die N-glykosylierte Form. Solche negativen Effekte waren nicht mit CAF-CM induziert worden. Unter CAF-CM zeigte sich eine Herunterregulierung bei T47D- und BT474-Zellen, bei den anderen Zelllinien jedoch eine Hochregulierung von Integrin β 1.

Diese Daten bestätigen zum einen den negativen Effekt von IGFBP5 auf die Bcl-3-Protein-Expression in MCF-7-, BT474- und SKBR3-Zellen und zeigen zum anderen, dass einige CAF-CM-Effekte durch Senkung von IGFBP5 erklärt werden können, z. B. die erhöhte STAT3-Expression in BT474- und SKBR3-Zellen.

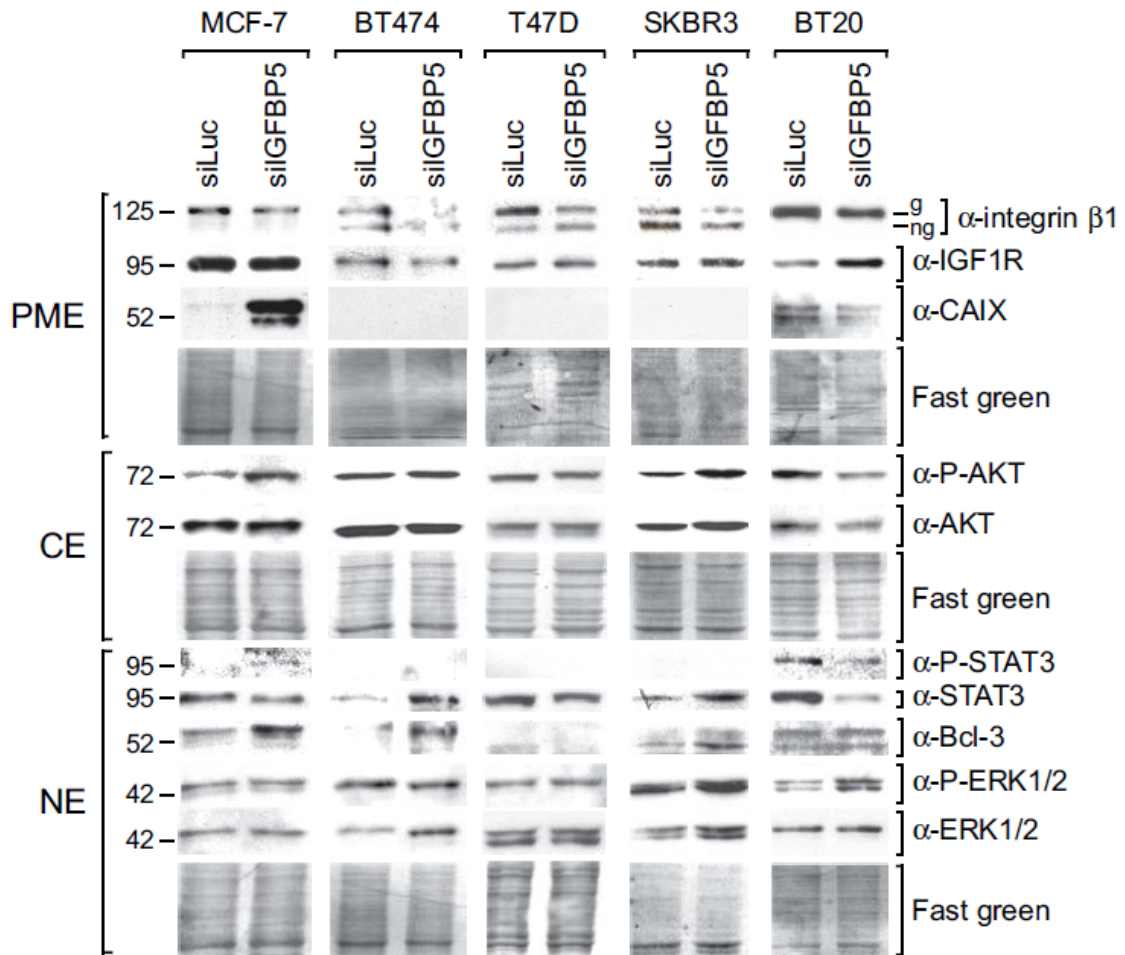


Abb. 17: Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Wirkung von siIGFBP5 auf fünf der sechs Zelllinien. PME = Plasmamembranextrakt, CE = cytosolischer Extrakt, KE = Kernextrakt, g = glykosyliert, ng = nicht glykosyliert

4.5 Einfluss von Bcl-3 auf das Zellwachstum

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Bcl-3-Proteinexpression in drei Zelllinien (MCF-7, BT474 und SKBR3) durch CAF-CM induziert wird und basal in drei Zelllinien (SKBR3, MDA-MB-231 und BT20) stark exprimiert ist. Nachdem frühere Untersuchungen in unserem Labor gezeigt haben, dass Bcl-3 einen Einfluss auf das Wachstum von MCF-7-Zellen insbesondere in Gegenwart von Fulvestrant hat (Leyh et al. 2015) sollte nun getestet werden, inwieweit Bcl-3 auch als Wachstumsfaktor bei den anderen Zelllinien fungiert. Dazu wurde eine Bcl-3-spezifische siRNA benutzt. Das Wachstum wurde sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Fulvestrant untersucht.

Das Zellwachstum von MCF-7-Zellen nahm unter dem Einfluss von siBcl-3 in Gegenwart und Abwesenheit von Fulvestrant signifikant ab (Abb. 18). Bei den siBcl-3-behandelten Zellen ohne Fulvestrant wurde im Vergleich zur Kontrolle (siLuc-behandelte Zellen) nach 5 Tagen

Inkubationszeit eine Zellmasse von 20% gemessen. In Gegenwart von Fulvestrant und siBcl-3 zeigten sich eine Reduktion auf 10% im Vergleich zur Kontrolle. T47D-Zellen zeigten tendenziell die gleichen Effekte wie MCF-7-Zellen unter siBcl-3, jedoch waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Bei BT474-Zellen war kein signifikanter Effekt unter siBcl-3 auf das Zellwachstum zu erkennen. SKBR3- und BT-20-Zellen zeigen, ähnlich wie MCF-7-Zellen, in der Tendenz ein Bcl-3-abhängiges Wachstum (Abb. 19). Auf MDA-MB-231-Zellen scheint eine Herunterregulierung von Bcl-3 keinen Wachstumseffekt zu haben.

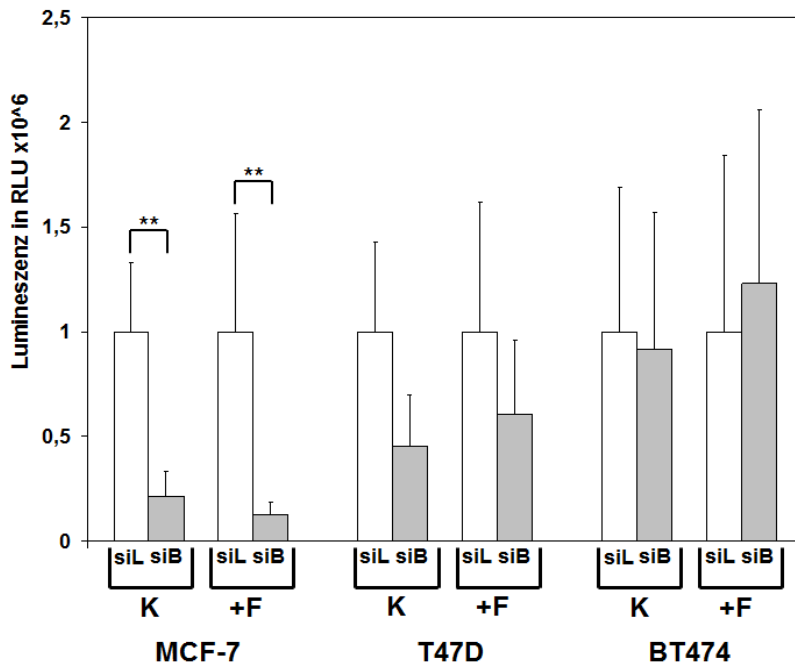


Abb. 18: Wachstums-Assay mit MCF-7-, T47D- und BT474 Zellen: Wirkung von siBcl-3 (siB) in Gegenwart und Abwesenheit von Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,005, RLU = relative light units, siL = si Luciferase, siB = si Bcl-3, K = Kontrolle, F = Fulvestrant

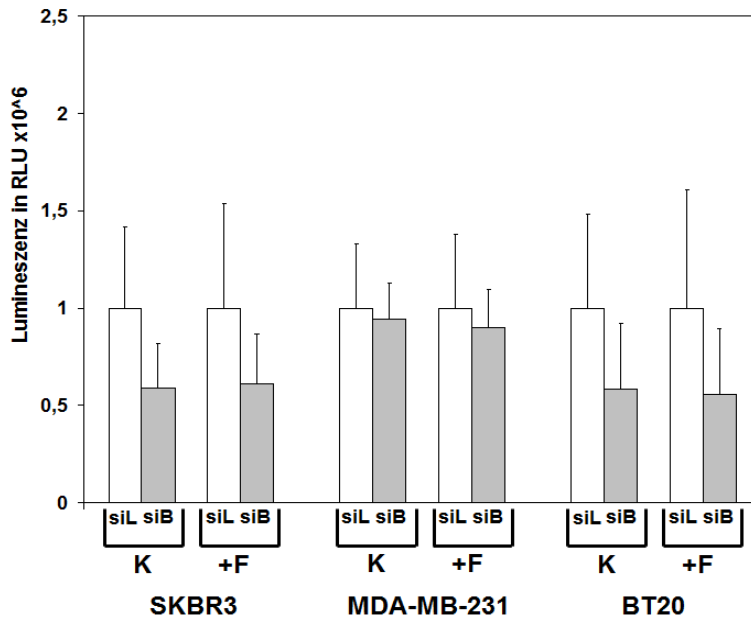


Abb. 19: Wachstums-Assay mit SKBR3-, MDA-MB-231- und BT20-Zellen: Wirkung von siBcl-3 (siB) in Gegenwart und Abwesenheit von Fulvestrant, n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test * $<$ 0,05, ** $<$ 0,01, *** $<$ 0,005, RLU = relative light units, siL = si Luciferase, siB = si Bcl-3, K = Kontrolle, F = Fulvestrant

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass 4 der 6 Zelllinien signifikant oder tendenziell ein Bcl-3-abhängiges Wachstum zeigen. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine Erhöhung des Bcl-3-Levels zu der zum Teil durch CAF-CM induzierten Wachstumssteigerung beiträgt.

4.6 Bedeutung von IL-6 für die Effekte von CAF-CM auf Brustkrebszellen

4.6.1 Einfluss von IL-6 auf die CAF-CM-responsiven Proteine

Ein Hauptfaktor in CAF-CM ist Interleukin-6 (IL-6) (Dittmer et al. 2019). Es war daher von Interesse zu untersuchen, inwieweit dieses Zytokin die beobachteten Effekte von CAF-CM nachahmen kann. Zunächst wurde die Wirkung von IL-6 auf die Expression der CAF-CM-responsiven Proteine mittels Westernblot-Analyse getestet.

In den Westernblot-Analysen in Abb. 20 ist zu erkennen, dass IL-6 die Expression von Bcl-3 bei allen Zelllinien ausgenommen der MDA-MB-231-Zellen erhöht. Die P-STAT3-Expression wurde bei allen Zelllinien heraufreguliert. Das STAT3-Level wurde in 4 der 6 Zelllinien (außer T47D- und MDA-MB-231-Zellen) durch IL-6 gesteigert. Ein positiver Effekt von IL-6 wurde bei MCF-7-, SKBR3- und BT20-Zellen auch auf die IGF1R-Proteinexpression beobachtet, bei MCF-7-, BT20- und MDA-MB-231-Zellen zusätzlich auf die Integrin β 1-Expression. Das P-AKT-Level wurde in SKBR3- und BT20-Zellen durch IL-6 erhöht, was nicht mit CAF-CM bei diesen Zellen beobachtet wurde. Andererseits hatte IL-6 im Gegensatz zu CAF-CM keinen Effekt auf P-AKT in MCF-7- und BT474-Zellen. In MCF-7-Zellen wurde außerdem die

Expression der CA IX durch IL-6 angehoben. Außerdem reduzierte IL-6, ähnlich wie CAF-CM, die Expression von IGF1R und CAIX in MDA-MB-231-Zellen.

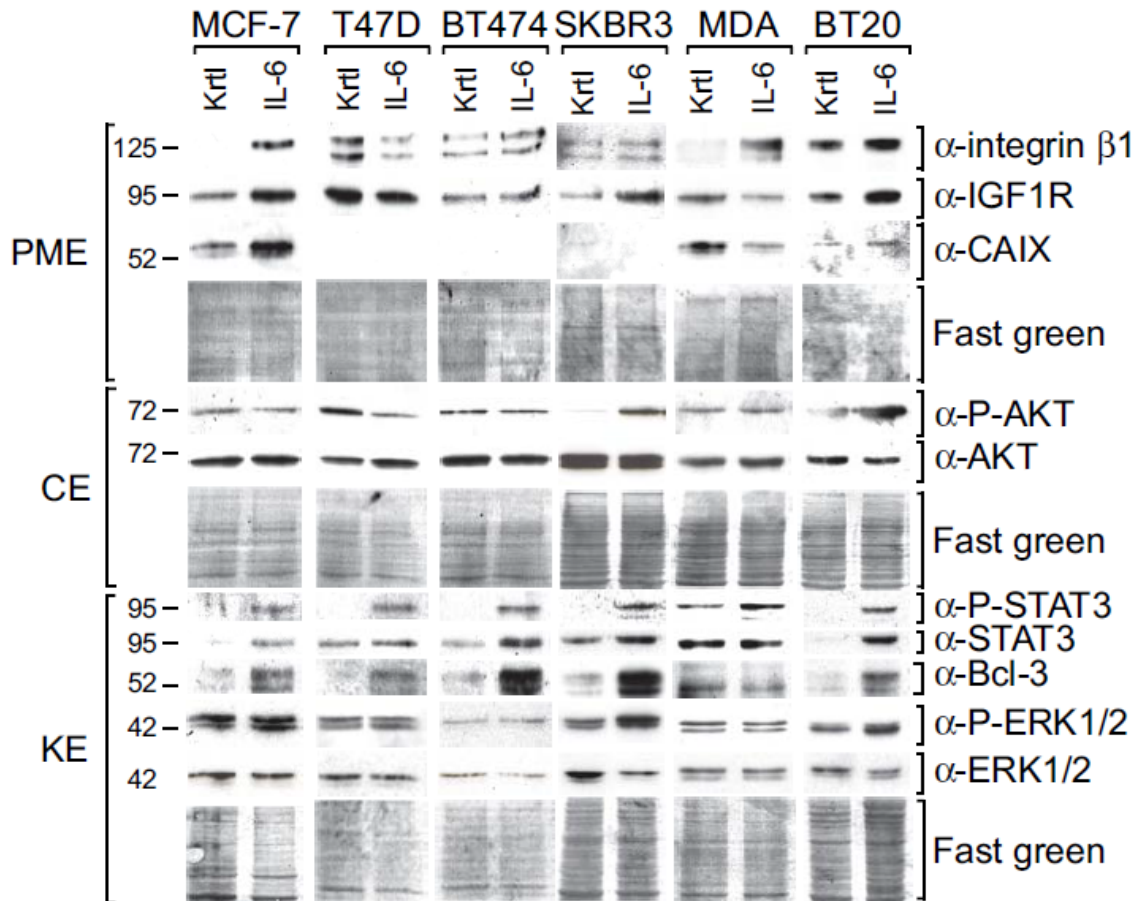


Abb. 20: Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Wirkung von IL-6 (300 ng/ml) auf die Expression von CAF-CM-responsiven Proteinen. PME = Plasmamembranextrakt, CE = cytosolischer Extrakt, KE = Kernextrakt, Ktrl = Kontrolle, IL-6 = Interleukin 6

Tab. 9: Gegenüberstellung der CAF-CM- und IL-6-Effekte auf die Proteinexpressionen. (Unterschiede zu CAF-CM sind umrahmt gekennzeichnet)

Effekte von CAF-CM								
Subtyp (IHC)	Zelllinie	BCL-3	P-STAT3	P-ERK1/2	P-AKT	IGF1R	Integrin β 1	CAIX
ER α _{positiv}	MCF-7	+	+	-	+	+	+	+
ER α _{positiv}	T47D	.	+
ER α _{positiv} Her2 _{positiv}	BT474	+	+	-	+	.	.	.
Her2 _{positiv}	SKBR-3	+	+	+	.	+	+	.
TN	MDA-MB-231	.	+	+	.	-	+	-
TN	BT20

Effekte von IL-6 (300ng/ml)								
Subtyp (IHC)	Zelllinie	BCL-3	P-STAT3	P-ERK1/2	P-AKT	IGF1R	Integrin β 1	CAIX
ER α _{positiv}	MCF-7	+	+	+	.	+	+	+
ER α _{positiv}	T47D	+	+
ER α _{positiv} Her2 _{positiv}	BT474	+	+
Her2 _{positiv}	SKBR-3	+	+	+	+	+	.	.
TN	MDA-MB-231	+	+	.	.	-	+	-
TN	BT20	+	+	+	+	+	+	+

+ = signifikante Zunahme, - = signifikante Abnahme, . = keine Änderung, TN = tripel-negativ

4.6.2 Einfluss von IL-6 auf das zelluläre Wachstum

Als nächstes wurden mögliche Effekte von IL-6 auf das Zellwachstum der verschiedenen Zelllinien getestet. IL-6 hat eine leicht reduzierende Wirkung auf das Wachstum von MCF-7-Zellen in Abwesenheit von Fulvestrant und einen schwach erhöhenden (bei 100 ng/ml) oder keinen Effekt (bei 300 ng/ml) auf das Wachstum in Anwesenheit von Fulvestrant. Bei T47D-

und BT474-Zellen war eine leichte Senkung des Wachstums durch IL-6 in allen Fällen zu beobachten. Ähnlich wie CAF-CM hatte auch IL-6 bei einer Konzentration von 300 ng/ml einen stark negativen Effekt auf das Zellwachstum von SKBR3-Zellen. Nach drei Tagen Inkubation war in Gegenwart von IL-6 nur 50% der Zellmasse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar. Auch 100 ng/ml IL-6 zeigte einen ähnlich wachstumsreduzierenden Effekt. In Gegenwart von Fulvestrant waren die wachstumsinhibierenden Effekte von IL-6 ähnlich wie in Abwesenheit des Antiöstrogens. MDA-MB-231-Zellen zeigten eine stark konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition nach Zugabe von IL-6, unabhängig davon, ob Fulvestrant an- oder abwesend war. BT-20 Zellen wurden durch IL-6 kaum oder gar nicht im Wachstum beeinflusst (Abb. 21).

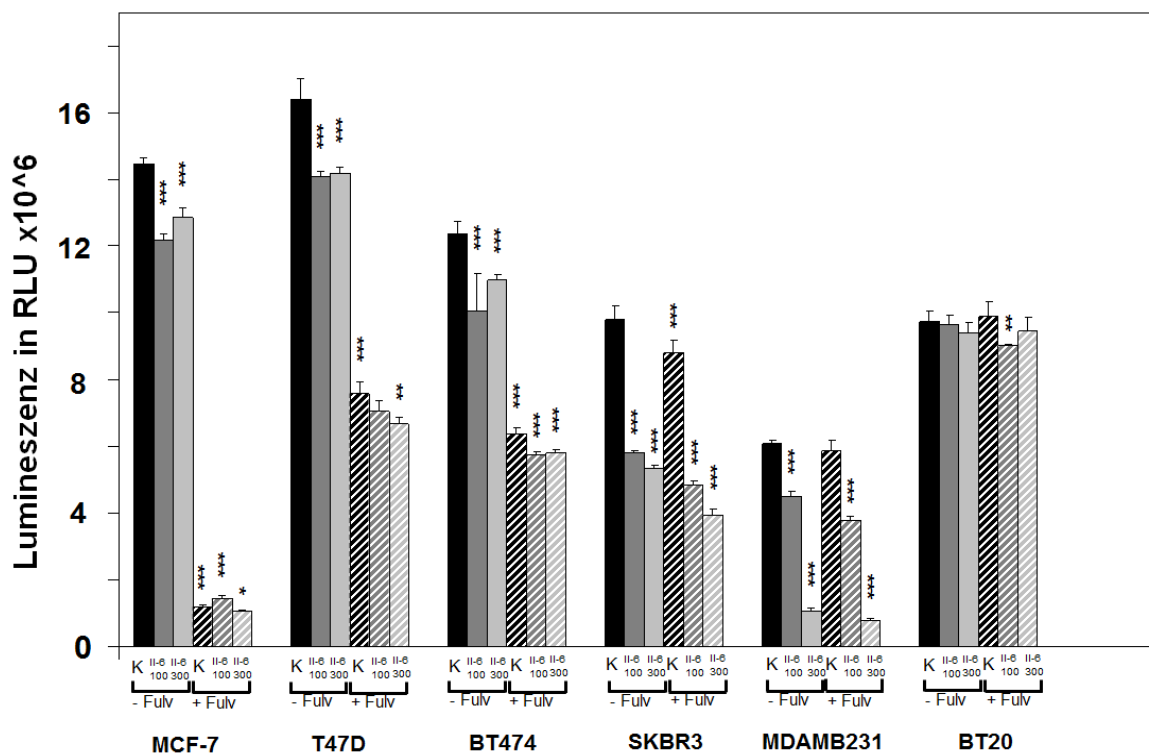


Abb. 21: Wachstums-Assay mit MCF-7-, T47D-, BT474-, SKBR3-, MDA-MB-231- und BT20-Zellen: Wirkung von IL-6 in An- und Abwesenheit von Fulvestrant und An- und Abwesenheit von IL-6 (100 oder 300 ng/ml), Kontrolle: n=6, Fulvestrant: n=6; alle übrigen Bedingungen: n=3, Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, P-Werte nach Student's t-Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,005, RLU = relative light units, K = Kontrolle, Fulv = Fulvestrant, IL-6 300 = Interleukin-6 (300 ng/ml), IL-6 100 = Interleukin-6 (100 ng/ml)

5. Diskussion

5.1 Wachstumsreaktionen von Brustkrebszelllinien auf Carcinom-assoziierte Fibroblasten in Gegenwart und Abwesenheit von Fulvestrant

ER α -positive Mammakarzinome können im Rahmen einer endokrinen Therapie mit Antiöstrogenen behandelt werden. SERMs (selective estrogen receptor modulator), wie z.B. Tamoxifen, blockieren die ER α -Aktivität (Jordan 2006). SERDs (selective estrogen receptor downregulator), z.B. Fulvestrant, blockieren den ER α und regulieren ihn zusätzlich in seiner Expression herunter (Dowsett et al. 2005). Der Erfolg einer endokrinen Therapie ist limitiert durch eine Resistenzentwicklung der Zellen gegen Antiöstrogene. Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Zellwachstum verschiedener Zelllinien in Gegenwart und Abwesenheit von CAF-CM und Fulvestrant zu untersuchen.

Die ausgewählten Brustkrebszelllinien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Hormonrezeptoreigenschaften und demnach auch in ihrer Fulvestrantsensibilität (Holliday und Speirs 2011). Wie vermutet reagierten nur die ER α -positiven Zellen sensibel auf das Antiöstrogen Fulvestrant, wobei T47D- und BT474-Zellen deutlich weniger im Wachstum durch Fulvestrant gehemmt wurden als MCF-7-Zellen. Bei BT474-Zellen ist dies vermutlich auf die erhöhte Her2-Expression zurückzuführen (vgl. Abb. 9A). T47D-Zellen scheinen unter Fulvestranteinfluss die ER α -Expression herunter zu regulieren und stattdessen den Her2/c-Src-Signalweg zu aktivieren (Kirkegaard et al. 2014).

Die Bedeutung des Tumormikromilieus für das Wachstum von Tumorzellen ist bereits intensiv erforscht. Ergebnisse von Shekhar et al. an verschiedenen Brustkrebszelllinien zeigen, dass Brustkrebszellen die Fähigkeit besitzen, Interaktionen mit stromalen Zellen, wie z.B. CAFs, einzugehen. Meist wird durch diese Tumor-Stroma-Interaktionen die Progression des Tumors gefördert (Quail und Joyce 2013; Kalluri 2016). Dies gilt insbesondere auch für die Entstehung von Chemo- und endokrinen Resistenzen (Paraiso und Smalley 2013; Dittmer und Leyh 2015; Kharaziha et al. 2012). Es gibt Hinweise, dass es durch Interaktion zwischen Brustkrebstumorzellen und CAFs zu einem Verlust der Tamoxifen-Sensitivität kommen kann, wenn die Tumorzellen Kontakt mit Fibroblasten hatten (Pontiggia et al. 2012). Dabei können einige von Fibroblasten sezernierte Faktoren die epitheliale Gestalt und hormonelle Sensitivität von Brustkrebszellen modulieren. Auch direkter Zell-Zell-Kontakt kann hier von Bedeutung sein (Shekhar et al. 2007).

Das Zellwachstum kann durch stromale Zellen auf verschiedene Arten beeinflusst werden. In direkten Co-Kulturversuchen wurde nachgewiesen, dass Fibroblasten das Zellwachstum von MCF-7- und anderen Brustkrebszellen stimulieren können (Shekhar et al. 2007). Allerdings bestehen in dieser Hinsicht große Unterschiede zwischen verschiedenen, aus Brustkrebs gewonnenen, Fibroblastenisolaten.

Versuche an MCF-7-Zellen mit konditioniertem Medium von Fibroblasten konnten die Ergebnisse zunächst nicht reproduzieren. Daher wurde vermutet, dass die Effekte einen direkten Zellkontakt zwingend benötigen und lösliche Faktoren das Wachstum eher nicht unterstützen können (Samoszuk et al. 2005). Die Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten keinen Wachstumsvorteil von MCF-7 Zellen in Gegenwart von CAFs oder CAF-CM, jedoch wurde das Wachstum durch CAFs oder CAF-CM stark gesteigert, wenn die Zellen gleichzeitig Fulvestrant ausgesetzt waren. Für diesen positiven Effekt auf das Wachstum war ein direkter Zellkontakt zwischen MCF-7-Zellen und CAFs also nicht notwendig (Leyh et al. 2015). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Effekte von CAF-CM auch auf weitere fünf Zelllinien zu untersuchen. Die Ergebnisse bestätigten zunächst, dass CAF-CM das Wachstum von MCF-7-Zellen in Gegenwart, aber nicht in Abwesenheit von Fulvestrant stimuliert. Ein tendenziell ähnliches Ergebnis wurde mit BT474-Zellen erzielt, wenn auch der Effekt von CAF-CM auf das Wachstum in Gegenwart von Fulvestrant weit geringer war. Des Weiteren übt CAF-CM einen positiven Wachstumsimpuls auf T47D-Zellen aus, jedoch unabhängig davon, ob Fulvestrant vorhanden ist oder nicht. Das Wachstum von BT20-Zellen wurden ebenfalls leicht durch CAF-CM stimuliert, während das Wachstum von MDA-MB-231- und SKBR3-Zellen durch CAF-CM gehemmt wurden, im Falle von SKBR3-Zellen sogar stark.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass CAF-CM heterogene Reaktionen bei den 6 Zelllinien unterschiedlicher Subgruppen hervorrief. Es wurde das Zellwachstum zum Teil stark positiv, aber auch negativ beeinflusst. Das Wachstum der ER α -positiven Zelllinien in Gegenwart von Fulvestrant wurde ebenfalls sehr unterschiedlich durch CAF-CM beeinflusst, so dass eine Desensibilisierung durch CAF-CM gegenüber Fulvestrant stark von der jeweiligen Zelllinie abhängt. Die Daten zeigen, dass trotz einiger Gemeinsamkeiten eine generelle Aussage über die Reaktion von Mammakarzinomzellen auf CAF-CM hinsichtlich einer Wachstumsförderung nicht getroffen werden kann.

5.2 Einfluss von CAF-CM auf die Bcl-3-Expression

Ergänzend zu den in der Einleitung erwähnten onkogenen Effekten von Bcl-3 ist beschrieben, dass es zur Resistenzentstehung bei Brustkrebszellen beitragen kann (Cogswell et al. 2000). Bcl-3 aktiviert den NF- κ B-Signalweg, dessen Bedeutung für die Resistenzentstehung beim Brustkrebs hinlänglich belegt ist (Saha et al. 2016; Cao et al. 2009).

Das basale Bcl-3-Level in dieser Arbeit war signifikant in den Her2-positiven Tumorzellen erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden in Her2-positiven Tumorgeweben gezeigt (Wakefield et al. 2013). In dieser Arbeit war das basale Bcl-3-RNA-Level in den Her2-positiven Zelllinien (BT474- und SKBR3-Zellen) am höchsten. Das Bcl-3-Proteinlevel war jedoch vor allem bei den tripel-negativen Zelllinien (MDA-MB-231- und BT20-Zellen) und den SKBR3-Zellen am stärksten. Aus bisher noch nicht bekannten Gründen scheint die Bcl-3-mRNA bei BT474-Zellen nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Proteinexpression zu führen. Vermutlich wird die Proteinexpression von Bcl-3 auch durch post-transkriptionale Mechanismen reguliert.

CAF-CM konnte bei 4 der 6 untersuchten Zelllinien (MCF-7-, BT474-, SKBR3- und BT20-Zellen), darunter sowohl ER α -positive als auch ER α -negative Zelllinien, die Bcl-3-RNA steigern. Eine erhöhte Proteinexpression unter dem Einfluss von CAF-CM war nur bei 3 der 6 Zelllinien (MCF-7-, BT474- und SKBR3-Zellen) zu sehen. Somit übt CAF-CM keinen einheitlichen Effekt auf die Bcl-3-Expression und damit auf das Bcl-3-vermittelte Zellwachstum aus. Allerdings lässt sich festhalten, dass die beobachteten Veränderungen nicht nur für eine einzelne Zelllinie gezeigt wurden, sondern dass die Veränderung der Bcl-3-Expression ein häufiges Ereignis bei der Interaktion von CAFs mit Brustkrebszellen zu sein scheint. Interessanterweise wird Bcl-3 schon als potenzieller Kandidat für therapeutische Interventionen bei Brustkrebs diskutiert (Wakefield et al. 2013). Damit würde die CAF-CM-induzierte Bcl-3-Expression auch therapeutisch von Bedeutung sein.

5.3 Einfluss von CAF-CM auf die Proteinexpression weiterer Gene

Außer auf Bcl-3 zeigte CAF-CM auch einen relevanten Einfluss auf die Expression anderer Proteine sowie auf deren Phosphorylierung. So führte die Inkubation mit CAF-CM zu einer Erhöhung des P-STAT3-Proteinlevels bei 5 der 6 Zelllinien. Sasser et al. beschrieben ebenfalls, dass stromale Zellen zu einer STAT3-Aktivierung in 3 ER α -positiven Brustkrebszellen (MCF-7-, BT474-, T47D-Zellen) führten (Sasser et al. 2007).

Das Integrin β 1-Proteinlevel wurde bei 3 der 6 Zelllinien heraufreguliert. Als typischer Vertreter der Integrine beeinflusst Integrin β 1 die Zell-Zell-Interaktion und ist an der Regulation der PI3K/AKT- und Ras/Raf/MEK/ERK1/2- Signalkaskaden beteiligt (Rathinam und Alahari 2010). STAT3, Integrin β 1 sowie ERK1/2 spielen für die Progression des Mammakarzinoms eine große Rolle (Jones et al. 2016; Yao et al. 2007; Huang et al. 2011; Yu et al. 2007). Es ist bekannt, dass Fibroblasten die Fibronektinkonzentration erhöhen, wodurch die Signalkaskade über Integrin β 1 stärker aktiviert wird. Neben den löslichen Faktoren von Fibroblasten beeinflusst vor allem Fibronektin die Entstehung einer Tamoxifenresistenz (Pontiggia et al. 2012). Bei der Entstehung einer endokrinen Resistenz spielt oft die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges eine Rolle (Osborne und Schiff 2011). Der PI3K-Signalweg wurde in den

Versuchen dieser Arbeit durch CAF-CM besonders stark bei nur 2 der 6 Zelllinien aktiviert. Es scheinen also noch weitere Signalkaskaden von Bedeutung zu sein.

Die sehr unterschiedlichen Veränderungen der Expressionsmuster der 6 Zelllinien nach Behandlung mit CAF-CM zeigen wie heterogen Brustkrebszellen auf stromale Zellen reagieren.

5.4 Einfluss von CAF-CM auf die IGFBP5-Expression

In der Einleitung wurden bereits die IGF-abhängigen Effekte von IGFBP5 erwähnt: die Interaktion von IGFBP5 mit IGF-1 und -2 und die folgende verminderte Aktivierung des IGF1-Rezeptors, wodurch der Signalweg über die MAP-Kinase und/oder die Phosphoinositide-3-Kinase weniger aktiviert wird. Wenn nun die Expression von IGFBP5 erniedrigt ist, kann es folglich zu einer verstärkten Aktivierung der Signalkaskaden über die MAP-Kinase und PI3-Kinase kommen.

Um den Effekt von CAF-CM auf IGFBP5 zu untersuchen, wurden zunächst die basalen IGFBP5-RNA-Level gemessen (vgl. Abb. 13). Dieses Level war sehr unterschiedlich bei den 6 verschiedenen Zelllinien. Trotzdem konnte CAF-CM das IGFBP5-RNA-Level bei folgenden 4 der 6 Zelllinien reduzieren: MCF-7, T47D, BT474, SKBR3. Bei diesen Zelllinien zeigte sich durch siIGFBP5 auch eine Herunterregulierung von Integrin $\beta 1$. Bei 2 der Zelllinien war dies auch mit CAF-CM zu sehen. Bei den anderen beiden Zelllinien spielen möglicherweise andere Faktoren eine Rolle, welche zu einer Erhöhung von Integrin $\beta 1$ führten. Bei BT20-Zellen zeigte sich eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Reduzierung des IGFBP5-Levels durch CAF-CM und bei MDA-MB-231-Zellen war die IGFBP5-Expression nach CAF-CM-Behandlung erhöht. Allerdings exprimieren MDA-MB-231-Zellen so wenig IGFBP5, dass eine IGFBP5-Expression kaum nachweisbar war. In der Literatur ist beschrieben, dass die IGFBP5-mRNA-Level in ER α -positiven Tumorgewebe höher sind als in ER α -negativen Geweben (Akkiprik et al. 2008). Die IGFBP5-Expression korreliert in Brustkrebsproben mit der ER α /PR-Positivität (Mita et al. 2007). In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigen die Resultate dieser Arbeit besonders hohe IGFBP5-Expressionswerte in den ER α -positiven T47D- und BT474-Zellen und niedrigere Werte in den ER α -negativen SKBR3-, BT20- und MDA-MB-231-Zellen. Nur MCF-7-Zellen exprimieren als ER α -positive Zellen relativ wenig IGFBP5. Trotz der unterschiedlichen basalen Expression reagierten die meisten untersuchten Zelllinien auf CAF-CM mit einer Reduktion der IGFBP5-RNA-Expression. Es scheint also, dass unabhängig von der jeweiligen basalen IGFBP5-Expressionshöhe die Verminderung der IGFBP5-Expression infolge der Interaktion zwischen Brustkrebszellen und CAFs ein übliches Ereignis ist. Interessanterweise ist ein niedriges IGFBP5-Level in ER α -positiven Tumoren mit einer besseren Prognose verbunden (Mita et al. 2007). Und Becker et al. zeigten bei MCF-7-Zellen, dass eine erhöhte IGFBP5-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Becker et al.

2012). Ein Grund für die Widersprüchlichkeit dieser Ergebnisse könnten die verschiedenen verwendeten Brustkrebszelllinien oder Gewebe sein. In der Literatur wurden die Versuche an MCF-7-Zellen oder ER α -positiven Tumorgeweben durchgeführt.

5.5 Zusammenhang zwischen der IGFBP5 und Bcl-3-Expression

Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Reduzierung der IGFBP5-Expression zu einer erhöhten Bcl-3-Expression in MCF-7-Zellen führt (Leyh et al. 2015). In dieser Arbeit konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Darüberhinaus konnte ein solcher Zusammenhang auch für BT474-Zellen gezeigt werden (vgl. Abb. 17). Eine inverse Veränderung in der IGFBP5- und Bcl-3-Expression nach CAF-CM-Behandlung konnte auch bei SKBR3-Zellen beobachtet werden. Allerdings konnte hier siIGFBP5 keine signifikante Erhöhung der Bcl-3-Expression bewirken, sodass in diesem Fall die beiden Ereignisse unabhängig voneinander sind.

Das bedeutet, nur in MCF-7-Zellen und BT474-Zellen wird Bcl-3 durch IGFBP5 reguliert, während in SKBR3-Zellen die Regulation von Bcl-3 durch andere Faktoren erfolgt.

In der Literatur wurden folgende mögliche IGFBP5-regulierende Faktoren bisher beschrieben: SNPs rs4442975 – dieser Single Nucleotide Polymorphismus interagiert mit dem IGFBP5-Promoter und beeinflusst die IGFBP5-Expression bei Mammakarzinomzellen (Ghousaini et al. 2014). Des Weiteren kann Cortisol die IGFBP5-Transkription senken (Gabbitas et al. 1996). Es wurde außerdem gezeigt, dass Vitamin D die IGFBP5-Expression in MCF-7-Zellen steigern kann. Möglicherweise trägt IGFBP5 daher zu dem antiproliferativen Effekt von Vitamin D in dieser Brustkrebszelllinie bei (Rozen et al. 1997).

Unsere Arbeitsgruppe konnte keinen Effekt von siSTAT3 auf die IGFBP5 Expression bei MCF-7-Zellen finden. Auch der Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) konnte IGFBP5 nicht herunterregulieren (Leyh et al. 2015).

Carcinom-assoziierte-Fibroblasten sezernieren des Weiteren große Mengen des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors Typ 1 (PAI-1). Dieser Protease-Inhibitor hat verschiedene Funktionen für z.B. die Migration, aber auch für die Tumorprogression. In der Arbeitsgruppe führten wir daher Versuche durch, in denen PAI-1 in CAFs mittels einer spezifischen siRNA herunterreguliert wurde. Durch den Knockdown änderte sich jedoch nichts an der Eigenschaft des CAF-CM, die IGFBP5-Expression in MCF-7-Zellen zu senken (Leyh et al. 2015). Neben den sezernierten Proteinen scheinen auch Mikrosvesikel (Kim et al. 2012; Camussi et al. 2010) eine Rolle für die Induktion einer IGFBP5-Herunterregulierung einzunehmen. Das Potenzial solcher Vesikel für die Progression des Mammakarzinoms ist Gegenstand aktueller Forschung in der Arbeitsgruppe.

5.6 Einfluss von Bcl-3 auf das Zellwachstum

In der Literatur ist bereits der Einfluss von Bcl-3 auf das Zellwachstum beschrieben (Viatour et al. 2004a). Leyh et al. zeigten einen Einfluss von Bcl-3 spezifisch auf das Wachstum von MCF-7-Zellen (Leyh et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit konnten 3 weitere Zelllinien identifiziert werden, welche ebenfalls ein Bcl-3-abhängiges Wachstum zeigten. Dies sind neben den MCF-7-Zellen die T47D-, SKBR3- und BT20-Zellen. Bcl-3 scheint daher von größerer Bedeutung für das Wachstum von Brustkrebszellen zu sein, als bisher angenommen.

5.7 Einfluss von IL-6 auf die Proteinexpression

Interleukin-6 (IL-6) übt verschiedene Funktionen, z.B. im Rahmen der B-Zell-Reifung oder einer Immunantwort als Akute-Phase-Protein aus (Heinrich et al. 1998). In der aktuellen Literatur gibt es Hinweise, dass IL-6 bei Tumoren als Wachstumsfaktor fungiert. Dazu zählt z.B. das Multiple Myelom (Kawano et al. 1988), das Prostata-Karzinom (Okamoto et al. 1997) oder das Gallengangskarzinom (Okada et al. 1994). Bezüglich des Mammakarzinoms wurde gezeigt, dass erhöhte IL-6-Level mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert sind (Knüpfer und Preiss 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass IL-6 die Zellmotilität fördert. Dies spielt eine wichtige Rolle für die Metastasierung von Tumorzellen (Arihiro et al. 2000).

IL-6 konnte genau wie CAF-CM die BCL-3-RNA und Proteinexpression erhöhen. In der aktuellen Literatur wurde eine Induzierung der Bcl-3-Expression durch IL-6 unter anderem bereits bei Zellen des Multiplen Myeloms beschrieben. Die Bcl-3-Heraufregulierung trägt wahrscheinlich zu den IL-6-vermittelten anti-apoptotischen Effekten in Multiplen-Myelomzellen bei (Brocke-Heidrich et al. 2006). IL-6 erhöhte die Bcl-3-Expression in dieser Arbeit bei 5 der 6 untersuchten Zelllinien. Weiterhin ist STAT3 eines der intrazellulären Ziele von IL-6 (Heinrich et al. 1998; Sasser et al. 2007; Casneuf et al. 2016). IL-6 steigerte in dieser Arbeit die P-STAT3-Expression bei 5 von 6 Zelllinien.

Anhand meiner Daten lässt sich festhalten, dass IL-6 einige Effekte von CAF-CM erklären kann. Es waren jedoch auch Veränderungen unter IL-6 zu beobachten, die unter dem Einfluss von CAF-CM nicht zu sehen waren. CAF-CM enthält neben verschiedenen Zytokinen und sezernierten Faktoren vor allem Interleukin-6 (Dittmer et al. 2019). Es scheinen aber noch eine Reihe anderer Faktoren oder deren Zusammenspiel mit IL-6 im CAF-CM eine bedeutende Rolle zu spielen. In der Literatur wird außerdem IL-10 erwähnt. Man hat gezeigt, dass es ebenfalls über eine STAT3-Aktivierung die Bcl-3-Expression in Makrophagen erhöhen kann (Kuwata et al. 2003). Weitere Untersuchungen dieser Faktoren wären ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Effekte von stromalen Zellen auf Tumorzellen.

5.8 Einfluss von IL-6 auf das Zellwachstum

Über die Wirkung von Interleukin-6 auf das Wachstum bei Brustkrebs ist bisher bekannt, dass es das Wachstum von MCF-7-Zellen steigerte (Sasser et al. 2007). Man weiß, dass IL-6 die Differenzierung verschiedener Tumorzellen beeinflussen kann. Nicht nur Brustkrebszellen, auch Melanomzellen und Lungenkarzinomzellen scheinen davon betroffen zu sein (Hölzel et al. 2013). Auf der anderen Seite haben Chiu et al. gezeigt, dass IL-6 bei ER α -positiven Brustkrebszellen die Proliferation über eine Induktion der Apoptose inhibierte (Chiu et al. 1996).

IL-6 reduzierte in den ATP-Assays dieser Arbeit das Wachstum von MCF-7-, T47D-, BT474-, SKBR3- und MDA-MB-231-Zellen. Erstaunlicherweise wirkte IL-6 bei BT20-Zellen gar nicht auf das Wachstum, führte aber auf Proteinebene zu zahlreichen Veränderungen.

CAF-CM zeigte in vielen Fällen eine gegenteilige Wirkung zu IL-6. Man kann sagen, dass die IL-6-Effekte auf das Wachstum nicht allgemein mit denen von CAF-CM übereinstimmen. Eine Ausnahme bilden die SKBR3-Zellen. Bei dieser Zelllinie hatte das konditionierte Medium der CAFs denselben wachstumsinhibierenden Effekt wie IL-6. IL-6 kann, im Gegensatz zu CAF-CM, keine Fulvestrant-Resistenz induzieren.

Die Proteinveränderungen unter dem Einfluss von CAF-CM und IL-6 waren sehr ähnlich. Beispielsweise erhöhten beide die Bcl-3- und STAT3-Expression, dennoch konnte IL-6 keine der wachstumsfördernden Wirkungen von CAF-CM nachahmen.

Entgegen der Annahme, dass IL-6 die Tumorprogression fördert (Sasser et al. 2007) zeigen diese Daten, dass IL-6 das Tumorwachstum bei allen untersuchten Zelllinien (außer bei MCF-7-Zellen mit IL-6 100 ng/ml zusammen mit Fulvestrant) verminderte. Dies kann möglicherweise an den hier verwendeten Konzentrationen von IL-6 liegen. Verwendet wurden Konzentrationen von 100 oder 300 ng/ml IL-6. Allerdings zeigen neuere ergänzende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass auch bei kleineren Konzentrationen, wie 10 ng/ml, keine wachstumsfördernden Effekte von IL-6 erzielt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Andere Arbeitsgruppen haben wachstumshemmende Wirkungen von IL-6 bei Konzentrationen von nur 5 ng/ml mit MCF-7-Zellen nachweisen können (Chiu et al. 1996). Es ist unklar, warum IL-6 in einigen Studien wachstumsfördernde und in anderen eine wachstumshemmende Wirkung auf Brustkrebszellen ausübt. Die Zusammensetzung des für das Wachstum verwendeten Serums, das je nach Herkunft des Serums sehr variieren kann, könnte eine Rolle spielen. Wachstumsfaktoren und Zytokine des Serums könnten die Wirkung von IL-6 beeinflussen.

5.9 Ausblick

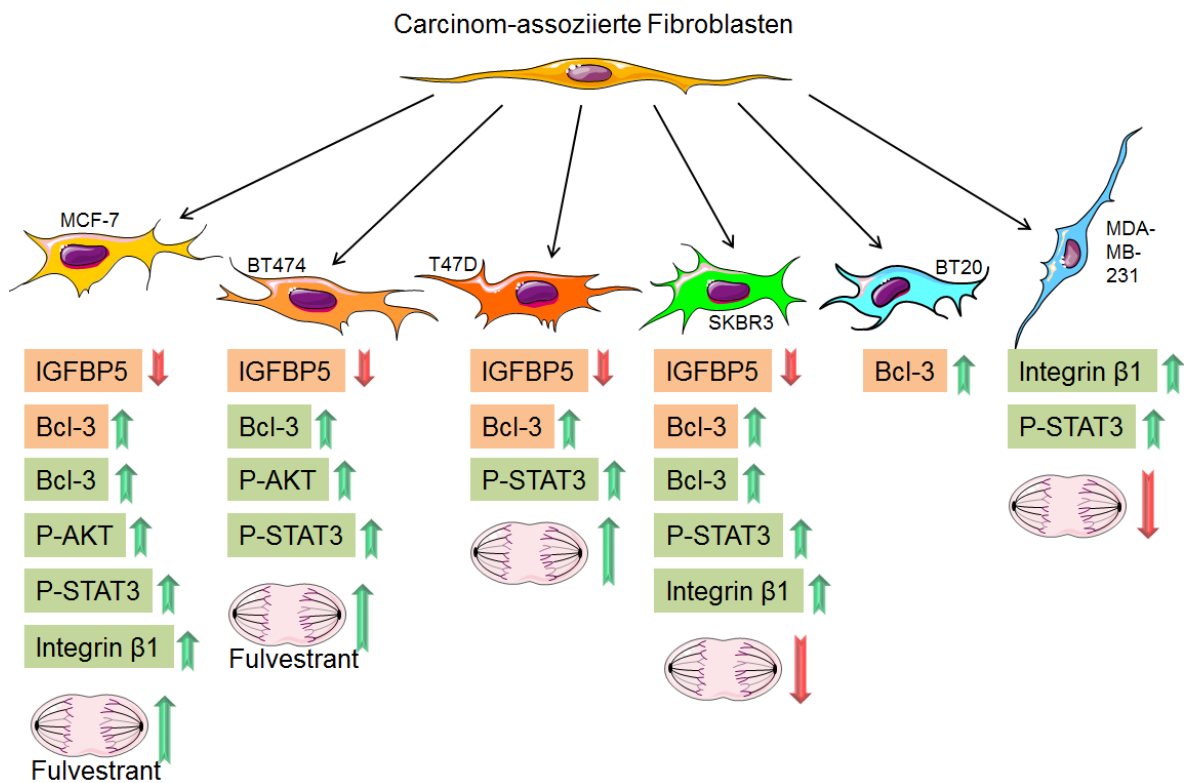


Abb. 22: Zusammenfassende Darstellung meiner Ergebnisse bezüglich des Einflusses von CAF-CM auf die Protein- und/oder RNA-Expression sowie das Zellwachstum. Rot hinterlegter Hintergrund = RNA-Daten, grün hinterlegter Hintergrund = Protein-Daten, Zellproliferation symbolisch dargestellt, grüner Pfeil = Anstieg, roter Pfeil = Reduktion

Abbildung 22 stellt den Einfluss von Carcinom-assoziierten Fibroblasten sowohl auf Protein-, als auch RNA-Ebene dar. Außerdem ist die Auswirkung auf das Zellwachstum symbolisch dargestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren IGFBP5 als bedeutenden Faktor, welcher bei der Interaktion zwischen CAFs und Mammakarzinomzellen unterschiedlicher Subgruppen eine Rolle zu spielen scheint. Das Ausmaß dieser Bedeutung für das Verständnis der Resistenzentwicklung gegen Antiöstrogene kann noch nicht vollständig abgeschätzt werden. Einige Autoren diskutieren bereits eine Nutzung von IGFBP5 als Biomarker, um das Ansprechen und Outcome einer Therapie bei Brustkrebs (Ahn et al. 2010), dem Retinoblastom (Xu et al. 2010) oder dem Adenokarzinomen des Kolons (Femia et al. 2010) vorherzusagen.

Oft wird eine IGFBP5-Erhöhung bei Brustkrebs mit einer Tumorprogression in Verbindung gebracht. Beispielsweise war die IGFBP5-Expression in Proben von Lymphknoten-Metastasen erhöht (Hao et al. 2004). IGFBP5 könnte daher ein hilfreicher Marker für Lymphknoten-Metastasen bei invasiven Mammakarzinomen sein (Wang et al. 2008). Des Weiteren wurde IGFBP5 bei Zellen des squamösen Zervixkarzinoms entdeckt und ist dort mit einer Progression

assoziiert. IGFBP5 könnte also auch hier ein Marker für die Tumorprogression im zervikalen Epithel darstellen (Miyatake et al. 2007). Auch in Ovarialkarzinom-Zellen wird IGFBP5 exprimiert (Rho et al. 2008; Conover et al. 1998; Wang et al. 2006). Die Daten der angegebenen Literatur identifizieren IGFBPs als potenzielle Angriffsziele für die Entwicklung von neuen Chemotherapeutika (Weigel et al. 2014).

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Effekten von IGFBP5 als Progressionsfaktor, gibt es Hinweise, dass IGFBP5 z.B. beim malignen Melanom Tumorwachstum und Metastasierung inhibiert (Wang et al. 2015).

Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob IGFBP5 ein Tumorsuppressor oder ein Onkogen ist, ein Prädiktor für gute oder schlechte Prognose oder ein Biomarker fürs Überleben oder doch ein Biomarker für die Krankheitsprogression. Die entweder negative oder positive Wirkung von IGFBP5 auf die Karzinogenese und dessen Bedeutung für die Behandlung hängt entscheidend von dem Gewebetyp, Zelltyp und dem jeweiligen Mikromilieu ab (Güllü et al. 2012).

Auch Bcl-3 scheint eine große Bedeutung als Wachstumsfaktor bei Brustkrebszellen unter einer endokrinen Therapie zuzukommen. Die Rolle von Bcl-3 gilt es in Zukunft weiter zu untersuchen.

Der Stellenwert von Interleukin-6 wurde als potenzieller Mediator der CAF-CM-Effekte in dieser Arbeit näher betrachtet. Es stellte sich heraus, dass IL-6 nicht die gesamten Effekte des CAF-CMs erklären kann

6. Zusammenfassung

Für Frauen steht Brustkrebs als Todesursache bei Krebserkrankungen weltweit an erster Stelle. Verschiedene beeinflussbare und nicht-beeinflussbare (z.B. genetische Veränderungen) Risikofaktoren tragen zur Entstehung eines Mammakarzinoms bei. Eine Einteilung dieser sehr heterogenen Erkrankung kann nach immunhistochemischen Kriterien oder basierend auf Genexpressionsanalysen erfolgen. Die Entstehung von endokrinen und Chemo-Resistenzen limitieren den Therapieerfolg.

Es ist bekannt, dass die Interaktion zwischen der Tumorzelle und dem Tumorstroma Krankheitsbeginn, Progression und Prognose wesentlich beeinflussen.

CAFs (Carcinom-assoziierte Fibroblasten) als wichtige Vertreter stromaler Zellen sezernieren verschiedene Faktoren, welche die Aktivität von Signalkaskaden beeinflussen und somit zur Entwicklung von Resistenzen gegen Antiöstrogene beitragen können. Zwei Proteine, IGFBP5 und Bcl-3, spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Antiöstrogenresistenz. Es wurde mit MCF-7-Zellen gezeigt, dass stromale Faktoren das IGFBP5-Level reduzieren und gleichzeitig die Bcl-3-Expression erhöhen können.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CAFs auf die Gen- und Proteinexpression sowie das Wachstum von sechs Brustkrebszelllinien mit unterschiedlichem Subtypus in Gegenwart und Abwesenheit des Antiöstrogens Fulvestrant untersucht.

Als erstes Resultat zeigte sich, dass abhängig von der Zelllinie, CAFs eine proliferationsfördernde oder auch proliferationsinhibierende Wirkung auf Mammakarzinomzellen haben können.

Durch konditioniertes Medium Carcinom-assoziiierter-Fibroblasten konnte bei vier Zelllinien die Bcl-3-mRNA-Expression und bei drei Zelllinien die Bcl-3-Proteinexpression gesteigert werden. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Heraufregulierung des P-STAT3-Proteinlevels bei 5 der 6 untersuchten Zelllinien.

CAF-CM konnte das IGFBP5-RNA-Level signifikant in 4 der 6 Zelllinien senken, wobei nur bei 2 Zelllinien die Bcl-3-Expression von IGFBP5 reguliert zu werden scheint.

Das Protein Bcl-3 hat einen bedeutenden Einfluss auf das Zellwachstum. Vier der sechs Zelllinien zeigten ein Bcl-3-abhängiges Wachstum. Möglicherweise trägt also eine Erhöhung des Bcl-3-Levels zu der zum Teil durch CAF-CM induzierten Wachstumssteigerung bei.

IL-6 als Hauptbestandteil von CAF-CM zeigte zum Teil die selben Effekte auf Proteinebene wie CAF-CM. Auf das Zellwachstum wirkte IL-6 allerdings proliferationsinhibierend.

Gegenstand der Diskussion ist die Bedeutung von IGFBP5 sowie der Stellenwert von Bcl-3 als Wachstumsfaktor bei Brustkrebszellen und die Bedeutung von IL-6 als partieller Mediator der CAF-CM-Effekte.

Literaturverzeichnis

Ahmed SU, Milner J (2009) Basal cancer cell survival involves JNK2 suppression of a novel JNK1/c-Jun/Bcl-3 apoptotic network. *PLoS one* 4:e7305.

Ahn BY, Elwi AN, Lee B, Trinh DLN, Klimowicz AC, Yau A, Chan JA, Magliocco A, Kim S (2010) Genetic screen identifies insulin-like growth factor binding protein 5 as a modulator of tamoxifen resistance in breast cancer. *Cancer research* 70:3013–3019.

Akkiprik M, Feng Y, Wang H, Chen K, Hu L, Sahin A, Krishnamurthy S, Ozer A, Hao X, Zhang W (2008) Multifunctional roles of insulin-like growth factor binding protein 5 in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 10:212.

Ansari MF, Idrees D, Hassan MI, Ahmad K, Avcilla F, Azam A (2018) Design, synthesis and biological evaluation of novel pyridine-thiazolidinone derivatives as anticancer agents; Targeting human carbonic anhydrase IX. *European Journal of Medicinal Chemistry* 144:544–556.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S et al (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American journal of human genetics* 72:1117–1130.

Arihiro K, Oda H, Kaneko M, Inai K (2000) Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 7:221–230.

Asgeirsson KS, Olafsdóttir K, Jónasson JG, Ogmundsdóttir HM (1998) The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 10:720–728.

Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357:539–545.

Bardou V, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM (2003) Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21:1973–1979.

Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V (2007) Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 109:1721–1728.

Baxter RC (2014) IGF binding proteins in cancer; Mechanistic and clinical insights. *Nature reviews. Cancer* 14:329–341.

Becker M, Sommer A, Kratzschmar JR, Seidel H, Pohlenz H, Fichtner I (2005) Distinct gene expression patterns in a tamoxifen-sensitive human mammary carcinoma xenograft and its tamoxifen-resistant subline MaCa 3366/TAM. *Molecular cancer therapeutics* 4:151–168.

Becker MA, Hou X, Harrington SC, Weroha SJ, Gonzalez SE, Jacob KA, Carboni JM, Gottardis MM, Haluska P (2012) IGFBP ratio confers resistance to IGF targeting and correlates with increased invasion and poor outcome in breast tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18:1808–1817.

Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2013) Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in immunopathology* 35:585–600.

Boehmer H von, Daniel C (2013) Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 12:51–63.

- Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72:729–739.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 68:394–424.
- Brenne A, Fagerli U, Shaughnessy JD, Våtsveen TK, Rø TB, Hella H, Zhan F, Barlogie B, Sundan A, Børset M, Waage A (2009) High expression of BCL3 in human myeloma cells is associated with increased proliferation and inferior prognosis. *European journal of haematology* 82:354–363.
- Brocke-Heidrich K, Ge B, Cvijic H, Pfeifer G, Löffler D, Henze C, McKeithan TW, Horn F (2006) BCL3 is induced by IL-6 via Stat3 binding to intronic enhancer HS4 and represses its own transcription. *Oncogene* 25:7297–7304.
- Brown M, Tsodikov A, Bauer KR, Parise CA, Caggiano V (2008) The role of human epidermal growth factor receptor 2 in the survival of women with estrogen and progesterone receptor-negative, invasive breast cancer: the California Cancer Registry, 1999-2004. *Cancer* 112:737–747.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L (2010) Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney international* 78:838–848.
- Cao N, Li S, Wang Z, Ahmed KM, Degnan ME, Fan M, Dynlacht JR, Li JJ (2009) NF-kappaB-mediated HER2 overexpression in radiation-adaptive resistance. *Radiation research* 171:9–21.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang, Maggie C U, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295:2492–2502.
- Casneuf T, Axel AE, King P, Alvarez JD, Werbeck JL, Verhulst T, Verstraeten K, Hall BM, Sasser AK (2016) Interleukin-6 is a potential therapeutic target in interleukin-6 dependent, estrogen receptor- α -positive breast cancer. *Breast cancer (Dove Medical Press)* 8:13–27.
- Chen X, Cao X, Sun X, Lei R, Chen P, Zhao Y, Jiang Y, Yin J, Chen R, Ye D, Wang Q, Liu Z, Liu S, Cheng C, Mao J, Hou Y, Wang M, Siebenlist U, Eugene Chin Y, Wang Y, Cao L, Hu G, Zhang X (2016) Bcl-3 regulates TGF β signaling by stabilizing Smad3 during breast cancer pulmonary metastasis. *Cell death & disease* 7:e2508.
- Chiu JJ, Sgagias MK, Cowan KH (1996) Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2:215–221.
- Choi HJ, Lee JM, Kim H, Nam HJ, Shin HR, Kim D, Ko E, Noh D, Kim KI, Kim JH, Baek SH (2010) Bcl3-dependent stabilization of CtBP1 is crucial for the inhibition of apoptosis and tumor progression in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 400:396–402.
- Ciruelos Gil, Eva Maria (2014) Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev* 40:862–871.
- Clarke M, Coates AS, Darby SC, Davies C, Gelber RD, Godwin J, Goldhirsch A, Gray R, Peto R, Pritchard KI, Wood WC (2008) Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 371:29–40.

- Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Colleoni M, Lang I, Del Mastro L, Smith I, Chirgwin J, Nogaret J, Pienkowski T, Wardley A, Jakobsen EH, Price KN, Goldhirsch A (2007) Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 25:486–492.
- Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin AS, JR (2000) Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 19:1123–1131.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer¹ (2012) Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet. Oncology* 13:1141–1151.
- Conover CA, Hartmann LC, Bradley S, Stalboerger P, Klee GG, Kalli KR, Jenkins RB (1998) Biological characterization of human epithelial ovarian carcinoma cells in primary culture; The insulin-like growth factor system. *Experimental cell research* 238:439–449.
- Correia AL, Bissell MJ (2012) The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 15:39–49.
- Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, Vogel V, Shepherd J, Vachon C, Smith-Bindman R, Kerlikowske K (2009) Prevention of breast cancer in postmenopausal women: approaches to estimating and reducing risk. *J Natl Cancer Inst* 101:384–398.
- Dittmer A, Lange T, Leyh B, Dittmer J (2019) Protein- and growth-modulatory effects of carcinoma-associated fibroblasts on breast cancer cells; Role of interleukin-6. *International journal of oncology*.
- Dittmer A, Vetter M, Schunke D, Span PN, Sweep F, Thomssen C, Dittmer J (2006) Parathyroid hormone-related protein regulates tumor-relevant genes in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 281:14563–14572.
- Dittmer J, Leyh B (2015) The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. *Seminars in cancer biology* 31:3–15.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378:771–784.
- Elenbaas B, Weinberg RA (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Experimental cell research* 264:169–184.
- Femia AP, Luceri C, Toti S, Giannini A, Dolara P, Caderni G (2010) Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC cancer* 10:194.
- Firth SM, Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine reviews* 23:824–854.
- Franzoso G, Bours V, Park S, Tomita-Yamaguchi M, Kelly K, Siebenlist U (1992) The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature* 359:339–342.

- Gabbitas B, Pash JM, Delany AM, Canalis E (1996) Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures by transcriptional mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 271:9033–9038.
- Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, Le Floc'h A, Huse M, Sun JC, Rudensky AY (2013) IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 210:1167–1178.
- Ghoussaini M, Edwards SL, Michailidou K et al (2014) Evidence that breast cancer risk at the 2q35 locus is mediated through IGFBP5 regulation. *Nature communications* 4:4999.
- Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee J, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA, Jove R (2006) Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:11–19.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883–899.
- Güllü G, Karabulut S, Akkiprik M (2012) Functional roles and clinical values of insulin-like growth factor-binding protein-5 in different types of cancers. *Chinese journal of cancer* 31:266–280.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674.
- Hao X, Sun B, Hu L, Lähdesmäki H, Dunmire V, Feng Y, Zhang S, Wang H, Wu C, Wang H, Fuller GN, Symmans WF, Shmulevich I, Zhang W (2004) Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer* 100:1110–1122.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* 334 (Pt 2):297–314.
- Holliday DL, Speirs V (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research : BCR* 13:215.
- Hölzel M, Bovier A, Tüting T (2013) Plasticity of tumour and immune cells; A source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nature reviews. Cancer* 13:365–376.
- Huang C, Park CC, Hilsenbeck SG, Ward R, Rimawi MF, Wang Y, Shou J, Bissell MJ, Osborne CK, Schiff R (2011) β 1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast cancer research : BCR* 13:R84.
- IARC Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018.
- Jones LM, Broz ML, Ranger JJ, Ozelik J, Ahn R, Zuo D, Ursini-Siegel J, Hallett MT, Krummel M, Muller WJ (2016) STAT3 Establishes an Immunosuppressive Microenvironment during the Early Stages of Breast Carcinogenesis to Promote Tumor Growth and Metastasis. *Cancer research* 76:1416–1428.
- Junttila MR, Sauvage FJ de (2013) Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501:346–354.
- Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 3:422–433.

- Kalluri R (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* 16:582–598.
- Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS (2006) Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes & development* 20:225–235.
- Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H (1988) Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332:83–85.
- Kim H, Choi D, Yun SJ, Choi S, Kang JW, Jung JW, Hwang D, Kim KP, Kim D (2012) Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *Journal of proteome research* 11:839–849.
- Knüpfer H, Preiss R (2007) Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast cancer research and treatment* 102:129–135.
- Koch-Institut R Krebs in Deutschland | 2013/2014 | Brustdrüse C50.
- Koch-Institut R Krebs in Deutschland | 2015/2016.
- Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K (2012) The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11:730–739.
- Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K (2012) The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11:730–739.
- Krebsinformationsdienst, Krebsforschungszentrum D (2014) TNM-System: International einheitliche Tumorklassifikation. Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum. <https://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/tnm.php>. Zugegriffen: 23. Mai 2015.
- Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, Akira S (2003) IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. *Blood* 102:4123–4129.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Leyh B, Dittmer A, Lange T, Martens JWM, Dittmer J (2015) Stromal cells promote anti-estrogen resistance of breast cancer cells through an insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)/B-cell leukemia/lymphoma 3 (Bcl-3) axis. *Oncotarget* 6:39307–39328.
- Li X, Cao X, Li X, Zhang W, Feng Y (2007) Expression level of insulin-like growth factor binding protein 5 mRNA is a prognostic factor for breast cancer. *Cancer science* 98:1592–1596.
- Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ (2013) The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 138:105–115.
- Lindemann RK, Ballschmieter P, Nordheim A, Dittmer J (2001) Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism. *The Journal of biological chemistry* 276:46661–46670.
- Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. Thieme, Stuttgart.

- Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J (2013) Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 32:303–315.
- Martens JWM, Sieuwerts AM, Bolt-deVries J, Bosma PT, Swiggers SJJ, Klijn JGM, Foekens JA (2003) Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression. *Thrombosis and haemostasis* 89:393–404.
- Martinez-Outschoorn UE, Goldberg AF, Lin Z, Ko Y, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP (2014) Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 12:924–938.
- McCarthy TL, Casinghino S, Mittanck DW, Ji CH, Centrella M, Rotwein P (1996) Promoter-dependent and -independent activation of insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression by prostaglandin E2 in primary rat osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 271:6666–6671.
- Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature reviews. Cancer* 9:665–674.
- Mita K, Zhang Z, Ando Y, Toyama T, Hamaguchi M, Kobayashi S, Hayashi S, Fujii Y, Iwase H, Yamashita H (2007) Prognostic significance of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 expression in breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology* 37:575–582.
- Miyatake T, Ueda Y, Nakashima R, Yoshino K, Kimura T, Murata T, Nomura T, Fujita M, Buzard GS, Enomoto T (2007) Down-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5); Novel marker for cervical carcinogenesis. *International journal of cancer* 120:2068–2077.
- Mueller MM, Fusenig NE (2004) Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews. Cancer* 4:839–849.
- Nishidate T, Katagiri T, Lin M, Mano Y, Miki Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tsunoda T, Hirata K, Nakamura Y (2004) Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. *International journal of oncology* 25:797–819.
- Ohno H, Takimoto G, McKeithan TW (1990) The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 60:991–997.
- Okada K, Shimizu Y, Nambu S, Higuchi K, Watanabe A (1994) Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in a cholangiocarcinoma cell line. *Journal of gastroenterology and hepatology* 9:462–467.
- Okamoto M, Lee C, Oyasu R (1997) Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer research* 57:141–146.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer research* 59:5002–5011.
- Osborne CK, Schiff R (2011) Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annual review of medicine* 62:233–247.
- Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X (2004) Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *The Journal of pathology* 204:569–577.

- Paraiso KHT, Smalley KSM (2013) Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology* 85:1033–1041.
- Park CC, Zhang HJ, Yao ES, Park CJ, Bissell MJ (2008) Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer research* 68:4398–4405.
- Pekonen F, Nyman T, Ilvesmaki V, Partanen S (1992) Insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer tissue. *Cancer research* 52:5204–5207.
- Polanska UM, Orimo A (2013) Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *Journal of cellular physiology* 228:1651–1657.
- Pollak M (2008) Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature reviews. Cancer* 8:915–928.
- Pontiggia O, Sampayo R, Raffo D, Motter A, Xu R, Bissell MJ, Joffé, Elisa Bal de Kier, Simian M (2012) The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through β 1 integrin. *Breast cancer research and treatment* 133:459–471.
- Prat A, Perou CM (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* 5:5–23. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003.
- Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M (2015) Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* (Edinburgh, Scotland).
- Puvvada SD, Funkhouser WK, Greene K, Deal A, Chu H, Baldwin AS, Tepper JE, O'Neil BH (2010) NF- κ B and Bcl-3 activation are prognostic in metastatic colorectal cancer. *Oncology* 78:181–188.
- Quail DF, Joyce JA (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 19:1423–1437.
- Rathinam R, Alahari SK (2010) Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer metastasis reviews* 29:223–237.
- Rebollo A, Dumoutier L, Renauld JC, Zaballos A, Ayllon V, Martinez-A C (2000) Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors. *Molecular and cellular biology* 20:3407–3416.
- Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat J (1998) ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *European Journal of Cancer* 34:791–808.
- Rho SB, Dong SM, Kang S, Seo S, Yoo CW, Lee DO, Woo JS, Park S (2008) Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) acts as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis. *Carcinogenesis* 29:2106–2111.
- Ritte R, Tikk K, Lukanova A et al (2013) Reproductive factors and risk of hormone receptor positive and negative breast cancer: a cohort study. *BMC cancer* 13:584.
- Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, Brown GD, Gojis O, Ellis IO, Green AR, Ali S, Chin S, Palmieri C, Caldas C, Carroll JS (2012) Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* 481:389–393.

- Rozen F, Yang XF, Huynh H, Pollak M (1997) Antiproliferative action of vitamin D-related compounds and insulin-like growth factor-binding protein 5 accumulation. *Journal of the National Cancer Institute* 89:652–656.
- Sæther S, Bakken K, Lund E (2012) The risk of breast cancer linked to menopausal hormone therapy. *Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny række* 132:1330–1334.
- Saha S, Mukherjee S, Khan P, Kajal K, Mazumdar M, Manna A, Mukherjee S, De S, Jana D, Sarkar DK, Das T (2016) Aspirin Suppresses the Acquisition of Chemoresistance in Breast Cancer by Disrupting an NFκB-IL6 Signaling Axis Responsible for the Generation of Cancer Stem Cells. *Cancer research* 76:2000–2012.
- Samoszuk M, Tan J, Chorn G (2005) Clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured in direct contact with serum-activated fibroblasts. *Breast cancer research : BCR* 7:R274-83.
- Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schurch W, Gabbiani G (1988) Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *International journal of cancer* 41:707–712.
- Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE, Hall BM (2007) Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:3763–3770.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)* 331:1565–1570.
- Schuster M, Annemann M, Plaza-Sirvent C, Schmitz I (2013) Atypical IκB proteins - nuclear modulators of NF-κB signaling. *Cell communication and signaling : CCS* 11:23.
- Shekhar MPV, Santner S, Carolin KA, Tait L (2007) Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *The American journal of pathology* 170:1546–1560.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869–10874.
- Sotiriou C, Neo S, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10393–10398.
- Stocco C (2008) Aromatase expression in the ovary; Hormonal and molecular regulation. *Steroids* 73:473–487.
- Su G, Sung KE, Beebe DJ, Friedl A (2012) Functional screen of paracrine signals in breast carcinoma fibroblasts. *PloS one* 7:e46685.
- The Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group (2008) Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *The Lancet Oncology* 9:45–53.
- Thornburg NJ, Pathmanathan R, Raab-Traub N (2003) Activation of nuclear factor-kappaB p50 homodimer/Bcl-3 complexes in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer research* 63:8293–8301.

- Tkach M, Rosembli C, Rivas MA, Proietti CJ, Díaz Flaqué MC, Mercogliano MF, Beguelin W, Maronna E, Guzmán P, Gercovich FG, Deza EG, Elizalde PV, Schillaci R (2013) p42/p44 MAPK-mediated Stat3Ser727 phosphorylation is required for progestin-induced full activation of Stat3 and breast cancer growth. *Endocrine-related cancer* 20:197–212.
- Tlsty TD, Hein PW (2001) Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Current opinion in genetics & development* 11:54–59.
- Tripathi G, Salih DAM, Drozd AC, Cosgrove RA, Cobb LJ, Pell JM (2009) IGF-independent effects of insulin-like growth factor binding protein-5 (Igfbp5) in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:2616–2626.
- Viatour P, Dejardin E, Warnier M, Lair F, Claudio E, Bureau F, Marine J, Merville M, Maurer U, Green D, Piette J, Siebenlist U, Bours V, Chariot A (2004a) GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Molecular cell* 16:35–45.
- Viatour P, Merville M, Bours V, Chariot A (2004b) Protein phosphorylation as a key mechanism for the regulation of BCL-3 activity. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 3:1498–1501.
- Vogel, S. 2012. Einfluss des Plasminogen-Aktivator-Systems auf die Expression von Tumor-relevanten Membranproteinen in Brustkrebszellen (Masterarbeit). Halle: Universität
- Wakefield A, Soukupova J, Montagne A, Ranger J, French R, Muller WJ, Clarkson RWE (2013) Bcl3 selectively promotes metastasis of ERBB2-driven mammary tumors. *Cancer research* 73:745–755.
- Wang H, Arun BK, Wang H, Fuller GN, Zhang W, Middleton LP, Sahin AA (2008) IGFBP2 and IGFBP5 overexpression correlates with the lymph node metastasis in T1 breast carcinomas. *The breast journal* 14:261–267.
- Wang H, Rosen DG, Wang H, Fuller GN, Zhang W, Liu J (2006) Insulin-like growth factor-binding protein 2 and 5 are differentially regulated in ovarian cancer of different histologic types. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19:1149–1156.
- Wang J, Ding N, Li Y, Cheng H, Wang D, Yang Q, Deng Y, Yang Y, Li Y, Ruan X, Xie F, Zhao H, Fang X (2015) Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) functions as a tumor suppressor in human melanoma cells. *Oncotarget* 6:20636–20649.
- Wang VY, Li Y, Kim D, Zhong X, Du Q, Ghassemian M, Ghosh G (2017b) Bcl3 Phosphorylation by Akt, Erk2, and IKK Is Required for Its Transcriptional Activity. *Molecular cell* 67:484-497.e5.
- Ward C, Meehan J, Mullen P, Supuran C, Dixon JM, Thomas JS, Winum J, Lambin P, Dubois L, Pavathaneni N, Jarman EJ, Renshaw L, Um IH, Kay C, Harrison DJ, Kunkler IH, Langdon SP (2015) Evaluation of carbonic anhydrase IX as a therapeutic target for inhibition of breast cancer invasion and metastasis using a series of in vitro breast cancer models. *Oncotarget* 6:24856–24870.
- Weigel KJ, Jakimenko A, Conti BA, Chapman SE, Kaliney WJ, Leevy WM, Champion MM, Schafer ZT (2014) CAF-secreted IGFBPs regulate breast cancer cell anoikis. *Molecular cancer research : MCR* 12:855–866.
- Weigelt B, Lo A, Park C, Gray J, Bissell M (2010) HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment; *Breast Cancer Research and Treatment. Breast Cancer Res Treat* 122:35–43.

- Westerheide SD, Mayo MW, Anest V, Hanson JL, Baldwin AS, JR (2001) The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition. *Molecular and cellular biology* 21:8428–8436.
- Wood TL, Yee D (2000) Introduction: IGFs and IGFBPs in the normal mammary gland and in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 5:1–5.
- Xu XL, Lee TC, Ofori N, Cheng C, Liu A, Fang Y, Jhanwar SC, Abramson DH, Cobrinik D (2010) Tumor-associated retinal astrocytes promote retinoblastoma cell proliferation through production of IGFBP-5. *The American journal of pathology* 177:424–435.
- Yao ES, Zhang H, Chen Y, Lee B, Chew K, Moore D, Park C (2007) Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer research* 67:659–664.
- Yu H, Kortylewski M, Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* 7:41–51.
- Yuan Y, Yost SE, Yuan Y, Solomon NM, Mambetsariev I, Pal S, Frankel P, Salgia R, Neuhausen SL, Mortimer J (2017) Genomic mutation-driven metastatic breast cancer therapy; A single center experience. *Oncotarget* 8:26414–26423.
- Zesławski W, Beisel HG, Kamionka M, Kalus W, Engh RA, Huber R, Lang K, Holak TA (2001) The interaction of insulin-like growth factor-I with the N-terminal domain of IGFBP-5. *The EMBO journal* 20:3638–3644.

Thesen

1. Stromale Zellen (CAFs) tragen zur Entwicklung von Resistenzen von Brustkrebszellen gegen Antiöstrogene bei.
2. CAF-CM erhöht die Expression tumorrelevanter Genen und aktiviert tumorrelevante Signalkaskaden in Brustkrebszellen.
3. Verschiedene Brustkrebszelllinien zeigen zum Teil erhebliche Übereinstimmungen in ihren Reaktionen auf CAF-CM.
4. CAF-CM konnte die Bcl-3-RNA-Expression bei 4 der 6 untersuchten Zelllinien steigern. Die Bcl-3-Proteinexpression signifikant bei 3 Zelllinien.
5. Durch CAF-CM wurde das P-STAT3-Level bei 5 der 6 untersuchten Zelllinien gesteigert.
6. CAF-CM konnte das IGFBP5-Level bei 4 der 6 Zelllinien senken.
7. In 3 Zelllinien wurde parallel zur Senkung des IGFBP5-Levels ein Anstieg der Bcl-3-RNA-Expression beobachtet.
8. 4 der 6 Zelllinien zeigten ein Bcl-3-abhängiges Wachstum. Eine Erhöhung des Bcl-3-Levels trägt möglicherweise zu der durch CAF-CM induzierten Wachstumssteigerung bei. 4 der 6 Zelllinien zeigten ein Bcl-3-abhängiges Wachstum.
9. Rekombinantes Interleukin-6 als Hauptbestandteil von CAF-CM kann die CAF-CM-Effekte auf Proteinexpression und –aktivität zum großen Teil nachahmen.
10. Rekombinantes Interleukin-6 ist jedoch nicht in der Lage, die positiven Wachstumseffekte von CAF-CM zu reproduzieren.

Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

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

Halle (Saale), 18.02.2020

Theresia Lange

Eidesstattliche Erklärung

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.

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

Halle (Saale), 18.02.2020

Theresia Lange

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Lange, Theresia

Geburtsdatum: 29.07.1992

Geburtsort: Leipzig

Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

Seit 02/2019 Assistenzärztin für Innere Medizin am Städtischen Klinikum
Magdeburg

Seit 2014 Promotion mit dem Titel „Bedeutung von Stroma-regulierten Genen für
die Progression des Mammakarzinoms“, Klinik für Gynäkologie UKH

10/2011 – 11/2018 Studium der Humanmedizin an der Martin - Luther - Universität Halle-
Wittenberg

Schulbildung

2003-2011 Rudolf - Hildebrand - Schule, Gymnasium Markkleeberg

Besuch des vertieft musischen Profils

Schulabschluss: 2011 mit Abitur (1,4)

1999-2003 Heinrich - Mann - Grundschule Meusdorf, Leipzig

Sonstige Aktivitäten

03/2015 – 09/2017 wissenschaftliche Hilfskraft im SkillsLab des Dorothea Erxleben
Lernzentrums Halle (Saale)

WS 2013/14 Tutor im Präparierkurs am Institut für Anatomie und Zellbiologie Halle
(Saale)

Magdeburg, 09.12.2019