

**„Wirkmechanismen der Interaktion mesenchymaler Stammzellen und  
Karzinom-assoziiierter Fibroblasten mit Brustkrebszellen“**

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Benjamin Leyh

geb. am 20.07.1984 in Schmalkalden

öffentlich verteidigt am 10.01.2019

Gutachter:

Prof. Dr. Ingo Heilmann

Prof. Dr. Jürgen Dittmer

Prof. Dr. Helge Taubert

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abkürzungsverzeichnis .....	iii
Abbildungsverzeichnis .....	vii
Tabellenverzeichnis .....	ix
1. Einleitung .....	1
1.1. Epidemiologie des Brustkrebses .....	1
1.2. Brustkrebsklassifizierung und -subtypen .....	2
1.3. Therapie des Brustkrebses .....	4
1.4. Tumor-Stroma-Interaktion .....	6
1.4.1. Mesenchymale Stammzellen in der Tumorprogression .....	7
1.4.2. Fibroblasten in der Tumorprogression .....	10
1.5. Therapieresistenzmechanismen beim Mammakarzinom .....	12
1.5.1. Allgemeine Therapieresistenzmechanismen .....	12
1.5.2. Stroma-induzierte Therapieresistenzmechanismen im Mammakarzinom .....	14
1.6. Der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg in der Onkogenese und Tumorprogression .....	17
1.7. Zielstellung .....	21
2. Material und Methoden .....	22
2.1. Material .....	22
2.1.1. Chemikalien .....	22
2.1.2. Standardpuffer .....	22
2.1.3. Zellkulturadditive .....	22
2.1.4. Antikörper .....	23
2.1.5. siRNAs .....	23
2.1.6. Primer .....	24
2.1.7. Geräte .....	25
2.1.8. Software .....	25
2.2. Methoden .....	25
2.2.1. Kultivierung humaner Zellen .....	25
2.2.2. Quantitative Reverse-Transkription PCR (RT-qPCR) .....	28
2.2.3. <i>Microarray</i> .....	29
2.2.4. RNA-Interferenz-Experimente (Knock-down mit siRNA) .....	29
2.2.5. Proteinanalyse .....	30
2.2.6. Funktionale Assays .....	33
2.2.7. Statistische Analyse .....	34
3. Ergebnisse .....	35
3.1. cRNA- <i>Microarray</i> von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen .....	35
3.1.1. Ergebnisse des cRNA- <i>Microarrays</i> von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen .....	35
3.1.2. Validierung der Ergebnisse des cRNA- <i>Microarrays</i> .....	36
3.1.3. Test der Ergebnisse des cRNA- <i>Microarrays</i> mit weiteren Stroma-Zellen .....	37
3.2. Analyse des Zell-Zell-Kommunikationsmechanismus zur Regulation der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7-Zellen .....	39
3.3. Analyse potenziell beteiligter Signaltransduktionsmechanismen an der Regulation der „stromal reprimierten“ Gene in MCF-7-Zellen .....	41
3.3.1. Identifikation beteiligter Signaltransduktionswege .....	41
3.3.2. Analyse des Hypoxie-Signalweges .....	44

3.3.3. Analyse des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges.....	45
3.3.4. Identifikation weiterer stromal aktivierter Signalwege .....	50
3.3.5. Analyse des Estrogen-Signalweges und der Anti-Estrogen-Therapie.....	55
3.3.6. Analysen zum Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und der Reprimierung der „stromal regulierten“ Gene .....	61
3.4. Analyse des parakrinen Effektors, über den die stromalen Zellen die Effekte in den MCF-7-Zellen regulieren .....	71
4. Diskussion .....	74
4.1. cRNA-Microarray von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen .....	74
4.1.1. Ergebnisse des cRNA-Microarrays von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen.....	74
4.1.2. Validierung der Ergebnisse des cRNA-Microarrays .....	75
4.1.3. Test der Ergebnisse des cRNA-Microarrays mit weiteren Stroma-Zellen .....	76
4.2. Analyse des Zell-Zell-Kommunikationsmechanismus zur Regulation der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7-Zellen .....	78
4.3. Analyse potenzieller Signaltransduktionsmechanismen, die an der Regulation der „stromal reprimierten“ Gene in MCF-7-Zellen beteiligt sein könnten.....	79
4.3.1. Identifikation beteiligter Signaltransduktionswege .....	79
4.3.2. Analyse des Hypoxie-Signalweges.....	81
4.3.3. Analyse des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges.....	82
4.3.4. Identifikation weiterer stromal aktivierter Signalwege .....	85
4.3.5. Analyse des Estrogen-Signalweges und der Anti-Estrogen-Therapie.....	88
4.3.6. Analysen zum Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und der Reprimierung der „stromal regulierten“ Gene .....	90
4.4. Analyse des parakrinen Effektors, über den die stromalen Zellen die Effekte in den MCF-7-Zellen regulieren .....	95
5. Zusammenfassung .....	98
6. Literaturverzeichnis .....	99
7. Anhang.....	111
8. Lebenslauf.....	117
9. Publikationen.....	117
9.1. Veröffentlichungen in Fachzeitschriften .....	117
9.2. Kongress- und Tagungsbeiträge .....	118
9.2.1. Vorträge.....	118
9.2.2. Poster .....	118
10. Danksagung .....	119
11. Erklärung.....	120

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti (gerichtet gegen spezifisches Epitop)
19TT	Name einer immortalisierten Zelllinie von Karzinom-assoziiierter Fibroblasten
ABC	engl. <u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ABCG2	engl. <u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette, <u>s</u> ub- <u>f</u> amily <u>G</u> member <u>2</u>
ACTA2	engl. <u>alpha-actin-2</u> ( <i>alpha smooth muscle actin</i> )
AKT	engl. <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> (auch bekannt als Proteinkinase B)
ALDH1A1	<u>Al</u> dehyd- <u>D</u> ehydrogenase <u>1</u> Familie, Mitglied <u>A1</u> (auch bekannt als ALDH1)
ALDH3A1	<u>Al</u> dehyd- <u>D</u> ehydrogenase <u>3</u> Familie, Mitglied <u>A1</u> (auch bekannt als ALDH3)
APS	<u>A</u> mmoniumperoxidisulfat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BCC	engl. <u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>c</u> ell (Brustkrebszelle)
Bcl-3	engl. <u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma <u>3</u> - <u>e</u> ncoded <u>p</u> rotein
BMP	engl. <u>b</u> one <u>m</u> orphogenetic <u>p</u> rotein
BT-474	Name einer Brustkrebszelllinie
BT-20	Name einer Brustkrebszelllinie
CAF	engl. <u>c</u> arcinoma- <u>a</u> ssociated <u>f</u> ibroblast (Karzinom-assoziiierter Fibroblast)
CAF-CM	engl. <u>c</u> arcinoma- <u>a</u> ssociated <u>f</u> ibroblast <u>c</u> onditioned <u>c</u> ell <u>c</u> ulture <u>m</u> edium
CAIX	<u>C</u> arboanhydrase <u>IX</u> , CA9
CALCR	<u>C</u> alcitoninrezeptor
CAV1	<u>C</u> aveolin <u>1</u>
CCL 1	<u>CC</u> -Chemokin- <u>L</u> igand <u>1</u>
CCL 5	<u>CC</u> -Chemokin- <u>L</u> igand <u>5</u>
CCL 8	<u>CC</u> -Chemokin- <u>L</u> igand <u>8</u>
CCR5	<u>CC</u> -Motiv- <u>C</u> hemokin- <u>R</u> ezeptor <u>5</u>
CD	engl. <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
CD44	engl. <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation <u>44</u>
CDH1	<u>C</u> adherin <u>1</u> , Gen des Proteins E-Cadherin
cDNA	engl. <u>c</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u>
CDSN	<u>C</u> orneodesmosin
CE	<u>C</u> ytosolextrakt
CM	engl. <u>c</u> onditioned <u>c</u> ell <u>c</u> ulture <u>m</u> edium (konditioniertes Zellkulturmedium)
CoCl <sub>2</sub>	Cobalt(II)-chlorid
COL1A1	engl. <u>coll</u> agen <u>t</u> ype <u>1</u> <u>alpha</u> <u>1</u>
COX-2	<u>C</u> yclooxygenase-2
cRNA	engl. <u>c</u> oding RNA (RNA erzeugt aus cDNA)
CSC	engl. <u>c</u> ancer <u>s</u> tem <u>c</u> ell (Krebsstammzelle)
CTGF	engl. <u>c</u> onnective <u>t</u> issue <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
CXCL	<u>CXC</u> -Chemokin- <u>L</u> igand
CXCR	<u>CXC</u> -Motiv- <u>C</u> hemokin- <u>R</u> ezeptor
DCIS	engl. <u>d</u> uctal <u>c</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu
DHT	5 $\alpha$ - <u>D</u> ihydrotestosteron (17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-on)
DMEM	engl. <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol (Butan-2,3-diol-1,4-dithiol)
E2	17 $\beta$ -Estradiol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGFR	engl. <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	engl. <u>e</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
EMT	<u>e</u> pitheliale- <u>m</u> esenchymale <u>T</u> ransition
EPCAM	engl. <u>e</u> pithelial <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule
ER $\alpha$	<u>E</u> strogen- <u>R</u> ezeptor alpha
ERBB2	<u>E</u> rb- <u>B</u> 2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase 2 (Gen von HER2)
ERK1/2	engl. <u>e</u> xtracellular <u>s</u> ignal- <u>r</u> egulated <u>k</u> inase <u>1/2</u>
ESR1	<u>E</u> strogen- <u>R</u> ezeptor 1 (Gen des ER $\alpha$ )

EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	engl. <i>focal adhesion kinase</i>
FAM84A	engl. <i>family with sequence similarity 84 member A</i>
FGF18	engl. <i>fibroblast growth factor 18</i>
FGFR	engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i>
FKS	fötales Kälberserum
FN1	Fibronectin 1
FoxO1A	engl. <i>forkhead box transcription factor O1A</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPR30	engl. <i>G protein-coupled receptor 30</i>
Grb2	engl. <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
GZE	Gesamtzellextrakt
HAT	Histon-Acetyltransferase
HAS1	engl. <i>hyaluronan synthase 1</i>
HAS2	engl. <i>hyaluronan synthase 2</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
Her2	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF	engl. <i>hepatocyte growth factor</i>
HIF1α	engl. <i>hypoxia-inducible factor 1-α</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HR	engl. <i>hazard ratio</i>
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IGF (1-2)	engl. <i>insulin-like growth factor (1-2)</i>
IGF1R	engl. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IGFBP (1-7)	engl. <i>insulin-like growth factor-binding protein (1-7)</i>
IL1	Interleukin-1
IL6	Interleukin-6
IL8	Interleukin-8
IL17RB	Interleukin-17-Rezeptor B
IMP (1-3)	engl. <i>insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein (1-3)</i>
IR	Insulin-Rezeptor
IRS (1-2)	Insulin-Rezeptor-Substrat (1-2)
ITGA1	Integrin alpha 1
ITGA5	Integrin alpha 5
ITGA11	Integrin alpha 11
ITGB1	Integrin beta 1 (auch bekannt als Fibronectin-Rezeptor oder CD29)
ITGB4	Integrin beta 4 (auch bekannt als CD104)
JAK2	engl. <i>Januskinase 2</i>
KE	(Zell-) Kernextrakt
Ki67	Antigen Kiel 67
KIF12	engl. <i>kinesin family member 12</i>
KIT	<i>V-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i> (auch bekannt als C-Kit oder CD117)
KLHL4	engl. <i>kelch-like family member 4</i>
KLK11	engl. <i>kallikrein-related peptidase 11</i> (auch bekannt als Kallikrein 11)
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
MALDI-TOF-MS	engl. <i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight - mass spectrometry</i>
MAP	engl. <i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7	Name einer Brustkrebszelllinie aus der „ <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> “
MCP-1	anderer Name für CCL2 (CC-Chemokinligand 2)
MCP-2	anderer Name für CCL8 (CC-Chemokinligand 8)
MDA-MB-231	Name einer Brustkrebszelllinie
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase (MAPKK)
MGAT1	Alpha-1,3-Mannosyl-Glycoprotein 2-beta-N-Acetylglucosaminyl-Transferase 1
MMP	Matrix-Metalloprotease
MSC	engl. <i>mesenchymal stem cell/multipotent stromal cell</i> (mesenchymale Stammzelle)
MSC-CM	engl. <i>mesenchymal stem cell conditioned cell culture medium</i>

mTOR	engl. <u>m</u> ammalian <u>t</u> arget <u>o</u> f <u>r</u> apamycin
NFκB	engl. <u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> appa-light-chain-enhancer of activated <u>B</u> cells
NGF	engl. <u>n</u> erve <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
NIH3T3	Name einer embryonalen Maus-Fibroblasten-Zelllinie
NP	<u>n</u> icht <u>p</u> hosphoryliert
NR4A2	engl. <u>n</u> uclear <u>r</u> eceptor <u>s</u> ubfamily <u>4</u> , <u>g</u> roup <u>A</u> , <u>m</u> ember <u>2</u> (auch bekannt als <i>nuclear receptor related 1 protein</i> )
OPG	<u>O</u> steoprotegerin
P	<u>p</u> hosphoryliert
P63	Tumorprotein p63
PAGE	<u>P</u> olyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	<u>P</u> lasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ <u>1</u> (auch bekannt als SERPINE1)
PAPPA	engl. <u>p</u> regnancy-associated <u>p</u> lasma <u>p</u> rotein <u>A</u> (auch bekannt als Pappalysin 1)
PARP	<u>P</u> oly( <u>A</u> DP- <u>r</u> ibose)- <u>P</u> olymerase
PCR	engl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PDGF	engl. <u>p</u> latelet- <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
PGE2	<u>P</u> rostaglandin <u>E</u> 2
PI3K	<u>P</u> hosphoinositid- <u>3</u> -Kinase (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase)
PIK3CA	engl. <u>p</u> hosphatidylinositol-4,5-bisphosphate <u>3</u> -kinase, <u>c</u> atalytic subunit <u>α</u> pha
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat
PKB	<u>P</u> roteinkinase <u>B</u> , auch bekannt als AKT
PM	<u>P</u> lasma <u>m</u> embran <u>e</u> xtrakt
PR	<u>P</u> rogesteron- <u>R</u> ezeptor
PROCR	engl. <u>p</u> rotein <u>C</u> <u>r</u> eceptor, <u>e</u> ndothelial
PTEN	engl. <u>p</u> hosphatase and <u>t</u> ensin <u>h</u> omolog <u>d</u> eleted on <u>c</u> hromosome <u>ten</u>
PVDF	<u>P</u> olyvinylid <u>e</u> nfluorid
qPCR	engl. <u>q</u> uantitative <u>r</u> eal-time <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
RAB30	engl. <u>r</u> as-related in <u>b</u> rain <u>30</u>
Raf	engl. <u>r</u> apidly <u>a</u> ccelerated <u>f</u> ibrosarcoma
RAMP3	engl. <u>r</u> eceptor <u>a</u> ctivity <u>m</u> odifying <u>p</u> rotein <u>3</u>
Rantes	anderer Name für CCL2 (CC-Chemokinligand 5)
Ras	engl. <u>r</u> at <u>s</u> arcoma (G-Protein)
RhoA	engl. <u>R</u> as <u>h</u> omolog <u>g</u> ene <u>f</u> amily, <u>m</u> ember <u>A</u>
ROCK	engl. <u>R</u> ho-associated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
ROS	engl. <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies (reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt im „Roswell Park Memorial Institute“
RT-PCR	engl. <u>r</u> everse <u>t</u> ranscription <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
RT-qPCR	engl. <u>r</u> everse <u>t</u> ranscription <u>q</u> uantitative <u>r</u> eal-time <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
SCGB2A1	engl. <u>s</u> ecretoglobin <u>f</u> amily <u>2A</u> <u>m</u> ember <u>1</u>
SDF-1	engl. <u>s</u> tromal <u>c</u> ell- <u>d</u> erived <u>f</u> actor <u>1</u> , auch bekannt als CXCL12
SDS	engl. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SDS-PAGE	engl. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> olyacrylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
SERM	engl. <u>s</u> elective <u>e</u> strogen <u>r</u> eceptor <u>m</u> odulator (selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator)
SEPP1	Selenoprotein P, Plasma 1
SERD	engl. <u>s</u> elective <u>e</u> strogen <u>r</u> eceptor <u>d</u> ownregulator
Shc	engl. <u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>r</u> egion <u>2</u> - <u>c</u> ontaining
SHP2	engl. <u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>r</u> egion <u>2</u> - <u>c</u> ontaining <u>p</u> rotein tyrosine <u>p</u> hosphatase <u>2</u>
SK-BR-3	Name einer Brustkrebszelllinie
SMA	engl. <u>α</u> - <u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>a</u> ctin
SPARC	engl. <u>s</u> ecreted <u>p</u> rotein <u>a</u> cidic and <u>r</u> ich in <u>c</u> ysteine (auch bekannt als Osteonectin)
Src	engl. <u>c</u> ellular <u>s</u> arcoma (Tyrosinkinase)
STAT3	engl. <u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription <u>3</u>
SUM149	Name einer Brustkrebszelllinie
SUM159	Name einer Brustkrebszelllinie
T47D	Name einer Brustkrebszelllinie
TAM	<u>T</u> umor- <u>a</u> ssoziierte <u>M</u> akrophage
TEMED	<u>N,N,N',N'</u> - <u>T</u> etramethylethylendiamin

TGFB	engl. <u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>b</u> eta
TGFBR1	engl. <u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>b</u> eta <u>r</u> eceptor <u>1</u>
TGFBR3	engl. <u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>b</u> eta <u>r</u> eceptor <u>3</u>
TIGAR	engl. <u>T</u> P53- <u>i</u> nduced <u>g</u> lycolysis and <u>a</u> poptosis <u>r</u> egulator
TIMP (1-2)	engl. <u>t</u> issue <u>i</u> nhibitor of <u>m</u> etallo <u>p</u> roteinases (1-2)
TKI	<u>T</u> yrosin <u>k</u> inase- <u>I</u> nhibitor
TME	engl. <u>t</u> umor <u>m</u> icro <u>e</u> nvironment ( <u>T</u> umormikromilieu)
TNBC	engl. <u>t</u> riple <u>n</u> egative <u>b</u> reast <u>c</u> ancer
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TMEM26	engl. <u>t</u> rans <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein <u>26</u>
TP53	Gen des Tumorproteins P53
TR	Therapieresistenz
UGT2B15	engl. <u>U</u> DP- <u>G</u> lucuronosyl <u>t</u> ransferase <u>2B15</u>
UICC	<u>U</u> nion <u>I</u> nternationale <u>C</u> ontre le <u>C</u> ancer
uPA	<u>U</u> rokinase-Typ <u>P</u> lasminogen <u>A</u> ktivator
VEGF	engl. <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
VEGFR	engl. <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
VIM	<u>V</u> imentin
YPEL1	engl. <u>y</u> ippee- <u>l</u> ike <u>1</u>
ZEB1	engl. <u>z</u> inc <u>f</u> inger <u>E</u> -box- <u>b</u> inding <u>h</u> omeobox <u>1</u>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Häufigkeit der Brustkrebssubtypen nach Rezeptor-Expressionsstatus.....	3
Abbildung 2. Einfluss des Tumormikromilieus auf die Onkogenese des Mammakarzinoms. ....	7
Abbildung 3. Parakrine Interaktionen zwischen mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Brustkrebszellen (BCC). ....	9
Abbildung 4. Durch Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF) sezernierte, parakrine Faktoren und deren Effekte auf andere Zelltypen und das Mikromilieu.....	11
Abbildung 5. Allgemeine Therapieresistenzmechanismen (TR). ....	14
Abbildung 6. Einfluss von mesenchymalen Stammzellen (MSC), Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF) und der extrazellulären Matrix (EZM) auf die Therapieresistenz der verschiedenen Brustkrebssubtypen. ....	16
Abbildung 7. Das komplexe Zusammenspiel der Komponenten des IGF/Insulin/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges und deren Einfluss auf die Zelle. ....	18
Abbildung 8. Zeitreihe zur Bildung von Sphäroiden in 3D-Suspensionskulturen. ....	34
Abbildung 9. cRNA- <i>Microarray</i> -Ergebnisse von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (50:1) im Vergleich zu MCF-7-Zellen alleine (Kontrolle). ....	35
Abbildung 10. Validierung ausgewählter <i>Microarray</i> -Ergebnisse von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (50:1) mittels RT-qPCR. ....	36
Abbildung 11. Effekte eines zweiten MSC-Isolates und von 19TT CAFs auf die 13 MSC-responsiven Gene.....	37
Abbildung 12. RT-qPCR-Analyse von MCF-7/MSC-3D-Ko-Kulturen (50:1 und 10:1) der 13-MSC responsiven Gene.....	38
Abbildung 13. Effekte von MSCs in <i>transwell</i> -Ko-Kulturen (50:1 oder 10:1) auf die Expression der 12-MSC-responsiven Gene in MCF-7.....	39
Abbildung 14. Effekte von MSC-CM und CAF-CM auf die 13-MSC-Gene in MCF-7-Zellen.....	40
Abbildung 15. Western-Blot-Analyse von Hypoxie-Signalweg-Komponenten in MCF-7-Zellen.....	45
Abbildung 16. Western-Blot-Analyse der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg-Komponenten. ....	46
Abbildung 17. Knock-down von IRS1 und PI3K in MCF-7-Zellen. ....	47
Abbildung 18. Relative Expression von IGF-1/-2 und deren korrespondierender Rezeptor IGF1R sowie der Proteine IGFBP1 bis 7. ....	49
Abbildung 19. Effekte der MSCs in MCF-7/MSC- <i>transwell</i> -Ko-Kulturen und von CAF-CM auf die Expression der Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges.....	50
Abbildung 20. Western-Blot-Analyse onkologischer Signalweg-Komponenten in MCF-7-Zellen. ....	51
Abbildung 21. Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der Wirkung von 20% CAF-CM auf MCF-7-Zellen. ....	52
Abbildung 22. Zeitverlauf der relativen RNA-Expressionen von Bcl-3 und IGFBP5 in MCF-7-Zellen in An- und Abwesenheit von CAF-CM. ....	53
Abbildung 23. Einfluss von MSCs und CAFs auf die Expression von IGFBP5 und Bcl-3. ....	54
Abbildung 24. Inverse Korrelation der Expression von IGFBP5 und Bcl-3 in MCF-7 Zellen.....	55
Abbildung 25. Einfluss von Fulvestrant auf MCF-7, MCF-7/MSC-Ko-Kulturen und MCF-7 ± CAF-CM oder MSC-CM.....	56
Abbildung 26. Einfluss von Fulvestrant auf MCF-7 Zellwachstum in An- und Abwesenheit von 20% CAF-CM..	57

Abbildung 27. Effekt von Fulvestrant auf die Abundanz bestimmter Proteine.....	58
Abbildung 28. Effekte von Fulvestrant und 20% CAF-CM auf EMT-Marker (A) und Krebsstammzell-Genexpressionen (B) in MCF-7-Zellen. ....	59
Abbildung 29. Effekte von Fulvestrant und 20% CAF-CM auf die mRNA-Expressionen onkologisch bedeutsamer Gene in MCF-7-Zellen. ....	60
Abbildung 30. Die Expression der „stromal regulierten“ Gene in der Fulvestrant-resistenten MCF-7-Zelllinie „MCF-7 Ful-R“ (A, B). ....	61
Abbildung 31. Western-Blot-Analyse der Effekte von CAF-CM auf MCF-7-Zellen nach Knock-down von STAT3. ....	62
Abbildung 32. RT-qPCR-Analysen der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7 nach Knock-down von STAT3. ....	63
Abbildung 33. Western-Blot-Analyse der Effekte von CAF-CM auf MCF-7-Zellen nach Knock-down von IGFBP5. ....	64
Abbildung 34. RT-qPCR-Analysen der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7 nach Knock-down von IGFBP5....	65
Abbildung 35. Einfluss von siIGFBP5 und Insulin auf das Wachstum einzelner Klone von MCF-7-Zellen in An- und Abwesenheit von Fulvestrant.....	66
Abbildung 36. Western-Blot-Analyse der Effekte von CAF-CM auf MCF-7-Zellen nach Knock-down von Bcl-3.	67
Abbildung 37. RT-qPCR-Analysen der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7 nach Knock-down von Bcl-3. ....	68
Abbildung 38. Einfluss von siBcl-3 auf das Wachstum einzelner Klone von MCF-7-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Fulvestrant. ....	69
Abbildung 39. <i>In-silico</i> -Analysen der Expressionslevel von Bcl-3, KLHL4 und SEPP1 auf die Prognose bei Brustkebspatientinnen mit Tumoren, positiv für die Expression von ER $\alpha$ und PR, nach endokriner Therapie.	70
Abbildung 40. Protein-Array-Analyse des konditionierten Mediums von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) nach zwei Tagen Kulturdauer.....	71
Abbildung 41. Western-Blot-Analyse der Wirkung von 0,1 $\mu$ g/mL, 0,3 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL IL6 auf das Level von P-STAT3 in MCF-7 Zellen. ....	72
Abbildung 42. RT-qPCR-Analyse der Wirkung von IL6 auf die Genexpression in MCF-7 Zellen .....	72
Abbildung 43. Einfluss von 300 ng/mL IL6 auf die stromal induzierte Fulvestrant-Resistenz MCF-7-Zellen. ....	73

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Epidemiologische Maßzahlen der Diagnose Brustkrebs (ICD-10 C50) in Deutschland für die Jahre 2011 bis 2012. Tabelle modifiziert aus Krebsregister des Robert-Koch-Instituts (2015). .....	1
Tabelle 2. Überlebensraten nach der Diagnose Brustkrebs (ICD-10 C50) in Deutschland für die Jahre 2011 bis 2012. Tabelle modifiziert aus Krebsregister des Robert-Koch-Instituts (2015).....	2
Tabelle 3. 5- und 10- Jahres-Überleben der Brustkrebssubtypen nach Subtypen-spezifischer Therapie.....	3
Tabelle 4. Charakteristika der (intrinsischen) molekularen Subtypen auf Grundlage der Genexpressionsprofile. Tabelle modifiziert aus Ades et al. (2017). Prävalenz aus Cheang et al. (2009) .....	4
Tabelle 5. Zusammensetzung der verwendeten Standardpuffer.....	22
Tabelle 6. Verwendete Inhibitoren in Zellkulturexperimenten.....	22
Tabelle 7. In Zellkulturexperimenten verwendete Aktivatoren und rekombinante Proteine.....	22
Tabelle 8. Primäre Antikörper, die für Western-Blot-Analysen verwendet wurden.....	23
Tabelle 9. Sekundäre Antikörper, die für Western-Blot-Analysen verwendet wurden.....	23
Tabelle 10. Sequenzen der verwendeten siRNAs für den spezifischen Knock-down mittels RNA-Interferenz..	23
Tabelle 11. Sequenzen der verwendeten Primer für RT-qPCR.....	24
Tabelle 12. Verwendete Geräte.....	25
Tabelle 13. Verwendete Software.....	25
Tabelle 14. Klassifizierung der verwendeten Brustkrebszelllinien nach immunhistologischen und molekularen Subtypen.....	26
Tabelle 15. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel in der SDS-PAGE.....	31
Tabelle 16. Nachweisbare Proteine des „RayBio Human Obesity Antibody Array C1“ (Raybiotech, Norcross, GA, USA). .....	33
Tabelle 17. <i>Heatmap</i> von mRNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen, nach Behandlung mit ausgewählten Inhibitoren und Aktivatoren. ....	42

## 1. Einleitung

In dieser Arbeit werden Aspekte der Diagnose und Therapie von Brustkrebs untersucht. Daher sollen wichtige Informationen zu Brustkrebs zunächst kurz erläutert werden. Im Anschluss werden die zentrale Bedeutung der Tumor-Stroma-Interaktionen sowie deren Einfluss auf Therapieresistenzmechanismen beschrieben. Danach wird der onkologisch bedeutsame *insulin-like growth factor* (IGF)/Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* (AKT)-Signaltransduktionsweg exemplarisch dargestellt.

### 1.1. Epidemiologie des Brustkrebses

Weltweit ist Brustkrebs die häufigste diagnostizierte Krebsart und damit eine der häufigsten krebserkrankten Todesursachen bei Frauen (Toriola and Colditz, 2013). Dies gilt auch für Deutschland. Hier ist Brustkrebs mit circa 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr die mit Abstand häufigste Malignität und die zweithäufigste Ursache für krebserkrankte Tode bei Frauen (Krebsregister des Robert-Koch-Instituts, 2015; Tabelle 1). Bei aktueller Inzidenzrate erkrankt statistisch jede achte Frau an Brustkrebs. Im Verhältnis zu den meisten anderen Krebsarten tritt das Mammakarzinom häufig früher auf. So sind ca. 30% der Frauen bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre (Krebsregister des Robert-Koch-Instituts, 2015). Interessanterweise sind die Inzidenz- und Mortalitätsraten in den neuen Bundesländern immer noch wesentlich niedriger als in den alten Bundesländern. Für Frauen unter 55 Jahren findet jedoch eine Angleichung der Werte statt (Robert-Koch-Institut 2015).

**Tabelle 1. Epidemiologische Maßzahlen der Diagnose Brustkrebs (ICD-10 C50) in Deutschland für die Jahre 2011 bis 2012. Tabelle modifiziert aus Krebsregister des Robert-Koch-Instituts (2015).**

Kategorie	2011		2012	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
<b>Neuerkrankungen</b>	600	70.190	620	69.550
<b>Rohe Erkrankungsrate (je 100.000 Personen)</b>	1,5	170,8	1,6	169,1
<b>Standardisierte Erkrankungsrate (nach Alter der Europabevölkerung, je 100.000 Personen)</b>	1,0	119,0	1,1	117,4
<b>Mittleres Erkrankungsrisiko (Median)</b>	71	64	71	64
<b>Sterbefälle</b>	159	17.815	150	17.748
<b>Rohe Sterberate (je 100.000 Personen)</b>	0,4	43,4	0,4	43,2
<b>Standardisierte Sterberate (nach Alter der Europabevölkerung, je 100.000 Personen)</b>	0,3	24,6	0,3	23,9
<b>5-Jahres-Prävalenz</b>	2.200	316.800	2.300	317.200

Aufgrund wirksamerer Medikationen und der etablierten Früherkennung sind die Mortalitätsraten seit den 1990er Jahren kontinuierlich um 2,2% pro Jahr gesunken, die Inzidenzraten stiegen bis 2008/2009 (aufgrund der Einführung des Mammographie-Screenings im Jahr 2005) und sind seitdem auf hohem Niveau konstant geblieben (Krebsregister des Robert-Koch-Instituts, 2015). Die absoluten 5-Jahres-Überlebensraten liegen für Frauen aktuell bei ca. 80% (Tabelle 2).

**Tabelle 2. Überlebensraten nach der Diagnose Brustkrebs (ICD-10 C50) in Deutschland für die Jahre 2011 bis 2012. Tabelle modifiziert aus Krebsregister des Robert-Koch-Instituts (2015)**

Kategorie	Nach 5 Jahren		Nach 10 Jahren	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
<b>Absolute Überlebensrate (2011 – 2012)</b>	64%	80%	43%	66%
<b>Relative Überlebensrate (2011 – 2012)</b>	78%	88%	65%	82%

Die Mortalitätsraten sind von vielen Faktoren abhängig und einer der wichtigsten ist der Subtyp des Brustkrebses.

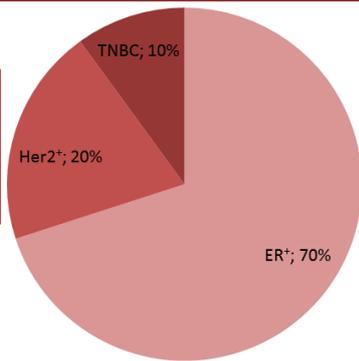
## 1.2. Brustkrebsklassifizierung und -subtypen

Brustkrebstumoren sind phäno- und genotypisch heterogen. Dies zeigt sich auf histologischer Ebene und besonders auf molekularbiologischem Niveau (Protein- oder Genexpressionsmuster). Daher werden Mammakarzinome anhand verschiedener Parameter klassifiziert: (a) histologisch z.B. in duktales oder lobuläres Karzinome, (b) molekularbiologisch auf der Grundlage von Genexpressionsprofilen werden bis zu sechs verschiedene Subtypen identifiziert (wichtig hierbei luminal, basale und Her2-angereicherte Subtypen) und (c) nach immunhistologischen Expressionsstatus von Estrogen-Rezeptor (ER $\alpha$ ), Progesteron-Rezeptor (PR) und *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2) (Sørli et al., 2001; Sotiriou et al., 2003; Herschkowitz et al., 2007; Prat und Perou, 2011; Guedj et al., 2012). Dabei überlappen die molekularbiologischen und immunhistologischen Subgruppen miteinander. So sind die meisten luminalen Tumoren für ER $\alpha$  positiv, die basalen Tumoren meist für die drei immunhistologisch erfassten Rezeptoren negativ (*triple negative breast cancer*, TNBC) und die Subgruppe mit Her2-Signatur (*Her2-enriched*) ist meist für die Her2-Expression positiv (Abbildung 1). Die Subtypisierung erlaubt eine selektivere Therapie und stellt somit einen wichtigen Schritt zu einer effektiven und personalisierten Therapie dar, wobei die histologische Einteilung der Brustkrebstypen nur eingeschränkt Rückschluss auf ein Ansprechen einer bestimmten Therapie ermöglicht. Deswegen ist diese Klassifizierung klinisch obsolet und ein Fokus auf immunhistologische und molekulare Subtypen hat sich durchgesetzt.

Die immunhistologische Bestimmung des Expressionsstatus der Rezeptoren hat sich als Standardanalyse für die Therapieentscheidung etabliert (Ades et al., 2017; Guedj et al., 2012). Man unterscheidet drei Subgruppen (Abbildung 1): (1) ER $\alpha$ -positiv (ER<sup>+</sup>) oder (2) Her2-positiv (Her2<sup>+</sup>) oder (3) ER $\alpha$ -negativ, PR-negativ und Her2-negativ (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> und Her2<sup>-</sup> = triple negativ). Die Gruppe ER<sup>+</sup>-Tumoren, die immunhistologisch positiv für den kernständigen ER $\alpha$  sind, trifft auf ca. 70% aller diagnostizierten Brustkrebs zu (Polyak und Filho, 2012; Abbildung 1). In normalen Brustepithel-Zellen ist der ER $\alpha$  in Subpopulationen exprimiert und steuert dort über parakrine Mechanismen die Differenzierung und Entwicklung der Brustdrüse (Mallepell et al., 2006; Lamb et al., 2008). Dieser Hormon-Rezeptor wird durch das Estrogen-Rezeptor-1-(ESR1)-Gen kodiert und ligandenabhängig (durch Estrogen) aktiviert. Für die ER<sup>+</sup>-Tumoren ist die Aktivität dieses Signalweges von zentraler Bedeutung. Dies wird klinisch als Schwachstelle ausgenutzt und ermöglicht die Behandlung dieses Brustkrebssubtyps mit einer endokrinen Therapie. Dabei wird die Aktivität des ER $\alpha$  über verschiedene Wege moduliert. Es werden entweder Antagonisten verwendet, welche die Proteinmenge herunterregulieren (des ER $\alpha$ ) oder Moleküle, die das Estrogen-produzierende Enzym Aromatase inhibieren.

TNBC (*triple negative breast cancer*) ist ER-, PR-, HER2- und teilt viele Eigenschaften mit dem *basal-like* Subtyp (eingeteilt nach Differenzierungs-Status/Gen-Expressions-Profil). Keine zielgerichtete Therapie möglich.

Her2<sup>+</sup>-Brustkrebs ist durch eine Überexpression des Gens ERBB2 charakterisiert und einer damit verbundenen Abhängigkeit vom HER2-Signalweg. Deswegen können diese Tumoren mit einer zielgerichteten Therapie gegen HER2 therapiert werden.



ER<sup>+</sup>-Brustkrebs ist Estrogen-Rezeptor positiv und durch hohe Mengen des ERα charakterisiert. Daher ist das Wachstum dieser Tumoren von Estrogen abhängig und sie können mit einer endokrinen Therapie behandelt werden.

Abbildung 1. Häufigkeit der Brustkrebssubtypen nach Rezeptor-Expressionsstatus.

ERα = Estrogen-Rezeptor alpha, ERBB2 = Erb-B2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase 2, Her2 = *human epidermal growth factor receptor 2*, TNBC = *triple negative breast cancer*. Abbildung modifiziert aus Polyak und Filho (2012).

Her2<sup>+</sup>-Brustkrebs ist durch eine Überexpression des proto-Onkogens ERBB2 (Erb-B2-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-2) charakterisiert. Her2 ist eine ligandenunabhängige Rezeptor-Tyrosin-Kinase, gehört zur Familie der *epidermal growth factor receptors* (EGFR) und bildet Heterodimere mit den anderen drei Mitgliedern der EGFR-Familie. In ca. 20% aller Brustkrebsfälle ist Her2 überexprimiert (Polyak and Filho, 2012; Abbildung 1) und somit eine damit verbundenen Abhängigkeit vom Her2-Signalweg vorhanden. Deswegen können diese Tumoren mit einer zielgerichteten Therapie gegen Her2 therapiert werden.

TNBCs (*triple negative breast cancer*) teilen viele Eigenschaften mit dem basalen Subtypen und sind ER-, PR- sowie Her2-. Weil sie diese der drei charakteristischen Rezeptortypen nicht exprimieren, ist keine zielgerichtete Therapie gegen den Subtyp etabliert/möglich. Dies zeigt sich eindeutig in den wesentlich schlechteren Daten für das 5- und 10- Jahres-Überleben der Patientinnen mit TNBC (Tabelle 3).

Tabelle 3. 5- und 10- Jahres-Überleben der Brustkrebssubtypen nach Subtypen-spezifischer Therapie.

Subtyp	Stadium (UICC)	5-Jahres-Überleben [%]	10-Jahres-Überleben [%]
DCIS	0	99	98
ER <sup>+</sup>	I	98	95
	II	91	81
	III	72	54
	IV	33	17
Her2 <sup>+</sup>	I	98	95
	II	92	86
	III	85	75
	IV	40	15
TNBC	I	93	90
	II	76	70
	III	45	37
	IV	15	11

DCIS = *ductal carcinoma in situ*, ER = Estrogen-Rezeptor alpha, Her2 = *human epidermal growth factor receptor 2*, UICC = Union Internationale Contre le Cancer, TNBC = *triple negative breast cancer*. Tabelle modifiziert aus Polyak and Filho (2012).

Eine genaue Kenntnis der Biologie des Tumors ermöglicht es, Therapien subtypenspezifisch, nach Stadium und Verlauf zu optimieren (siehe Kap. 1.3. Therapie des Brustkrebses). Deswegen wurde versucht, die drei Subtypen durch die Analyse ihrer Genexpressionsprofile besser zu charakterisieren. Diese Transkriptom-

Analysen ermöglichten eine weitere Identifikation von Untergruppen innerhalb der Subtypen, die sogenannten molekularen Subtypen (intrinsische Subtypen) (Perou et al., 2000; Prat and Perou, 2011). Die Entdeckung dieser Subtypen ist von elementarer Bedeutung, da jeder molekulare Subtyp ein definiertes, klinisches Bild zeigt (Tabelle 4). So kann der luminal Subtyp noch weiter in die beiden Untergruppen Luminal A und Luminal B unterteilt werden (Prat and Perou, 2011; Sørli et al., 2001), wobei Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal A eine wesentlich bessere Prognose als Patienten mit Luminal B Brustkrebs aufweisen (Ades et al., 2017; Tabelle 4). Der Luminal B Subtyp zeichnet sich durch einen erhöhten Proliferationsstatus und ein schlechteres Ansprechen auf eine endokrine Therapie aus (Ades et al., 2014). Der molekulare Subtyp „Her2-enriched“ entspricht meist dem immunhistologischen Her2<sup>+</sup>-Subtyp, nur dass eine nachgewiesene Her2/ErbB2 Genamplifikation vorliegt (Ades et al., 2017; Perou et al., 2000; Prat and Perou, 2011). Der vierte molekulare Subtyp, *basal-like*, ist durch erhöhte Expression epithelialer und proliferativer Marker gekennzeichnet sowie durch die Negativität für die Hormonrezeptoren (ER und PR) und entspricht damit dem TNBC-Subtypen (Ades et al., 2017; Perou et al., 2000). Die molekularen Subtypen unterscheiden sich außerdem dramatisch in ihren Prävalenzen und den häufigsten Mutationen (Ades et al., 2017; Tabelle 4).

**Tabelle 4. Charakteristika der (intrinsischen) molekularen Subtypen auf Grundlage der Genexpressionsprofile. Tabelle modifiziert aus Ades et al. (2017). Prävalenz aus Cheang et al. (2009)**

Kategorie	Luminal A	Luminal B	Her2-enriched	Basal-like
IHC-Surrogat	ER <sup>+</sup> und /oder PR <sup>+</sup> , Her2 <sup>-</sup> , Ki67 < 14%	ER <sup>+</sup> und /oder PR <sup>+</sup> , Her2 <sup>-</sup> , Ki67 ≥ 14%	ER <sup>±</sup> , PR <sup>±</sup> , Her2 <sup>±</sup>	ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , Her2 <sup>-</sup>
Prognose	gut	intermediär bis schlecht	schlecht	schlecht
Therapie-Ansprechen	Endokrine Therapie	Endokrine Therapie + zytotoxische Chemotherapie	Her2-Blockade	zytotoxische Chemotherapie
Prävalenz	23,7%	52,8%	11,2%	12,3%
5 häufigsten Mutationen	PIK3CA (45%) GATA3 (14%) MAP3K1 (13%) TP53 (12%) CDH1 (9%)	TP53 (29%) PIK3CA (29%) GATA3 (15%) MLL3 (6%) MAP3K1 (5%)	TP53 (72%) PIK3CA (39%) MLL3 (7%) AFF2 (5%) PTPN22 (5%)	TP53 (80%) PIK3CA (9%) MLL3 (5%) RB1 (4%) AFF2 (4%)

Die Analysen zur Subtypisierung des Brustkrebses gehen beständig weiter und führen zu immer detaillierteren Aufschlüsselungen der Genome und Transkriptome (Network, 2012). So wurde zudem der molekulare Subtyp *Claudin-low* beschrieben, der sich durch ein Expressionsprofil ähnlich denen von mesenchymalen Stammzellen und Krebsstammzellen auszeichnet (Prat et al., 2010, 2013). Auf der Grundlage dieser und anderer Daten ist eine personalisierte Krebstherapie immer besser durchführbar und die Schlüsselfaktoren der Subtypen können therapeutisch adressiert werden (Nandy et al., 2014; Sabatier et al., 2014).

### 1.3. Therapie des Brustkrebses

Die Therapie des Brustkrebses kann radiologisch, chirurgisch und medikamentös (Chemotherapie und zielgerichtete Therapie) erfolgen. Im Folgenden soll kurz auf die verschiedenen gängigen Medikamente eingegangen werden, die für die Brustkrebstherapie verwendet werden.

Die in der Chemotherapie verwendeten Zytostatika adressieren die gesteigerte Proliferationsrate der Krebszellen. Chemotherapeutika inhibieren die DNA-Synthese durch Schädigung der DNA (Interkalierung oder

Alkylierung) oder richten sich gegen Proliferations-Gene (Whitfield et al., 2006). Chemotherapien können bei allen drei Brustkrebssubtypen sowie in allen Stadien des Brustkrebses angewendet werden. Für frühe Stadien des Brustkrebses sind Anthracycline (DNA-Interkalation und Topoisomerase-Inhibition, z.B. die Epimere Doxorubicin und Epirubicin) in Kombination mit 5-Fluorouracil (Pyrimidin-Analoga) und Cyclophosphamid (Alkylanz) geeignet (Greene und Hennessy, 2015). Die Taxane (Mitose-Inhibitoren mittels Verhinderung der Mikrotubuli-Depolymerisation) Paclitaxel und Docetaxel können bei Her2<sup>+</sup>-Tumoren verwendet werden (Wilcken et al., 2014). Der TNBC kann bisher nur chemotherapeutisch behandelt werden, weil dieser Krebstypus sehr heterogen ist und die Abwesenheit von spezifisch angreifbaren Proteinen charakteristisch ist. Auch neuere Therapieoptionen gegen die potenziellen Ziele *epidermal growth factor receptor* (EGFR), Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und luminalen Androgenrezeptor (LAR) zeigen keinen klinischen Benefit (Griffiths and Olin, 2012; Lehmann et al., 2011; Masuda et al., 2012). Daher haben sich zur Behandlung des TNBC-Subtyps die Anthracycline und Taxane bewährt, jeweils als Monotherapie oder Kombination (Davis et al., 2014).

Außer der „klassischen“ Chemotherapie stehen für die Subtypen ER<sup>+</sup> und Her2<sup>+</sup> auch zielgerichtete Therapien zur Verfügung. Zielgerichtete Therapien richten sich gegen spezifische, überexprimierte Proteine und/oder gegen überaktivierte Signaltransduktionswege der jeweiligen Neoplasien. So sind Her2<sup>+</sup>-Tumoren durch eine EGFR vermittelte Aktivität des RAS-MAP-Kinase-Signalweges (Zellproliferationssteigerung) gekennzeichnet sowie durch eine durch den mTOR-Weg vermittelte gehemmte Apoptose. Beide Signalwege werden durch Heterodimer-Bildung von Her2 mit anderen EGFR aktiviert. Aufgrund dessen versucht man das überexprimierte Her2 über zwei Wege „auszuschalten“: a) mittels humanisierter rekombinanter Antikörper, die an die extrazelluläre Domäne von Her2 binden (z.B. Trastuzumab und Pertuzumab) oder b) durch den Einsatz von niedermolekularen Verbindungen (engl. *small molecules*, < 900 Dalton), die als intrazelluläre Her2-Tyrosinkinase-Domäne inhibieren (z.B. Lapatinib) (Wilcken et al., 2014).

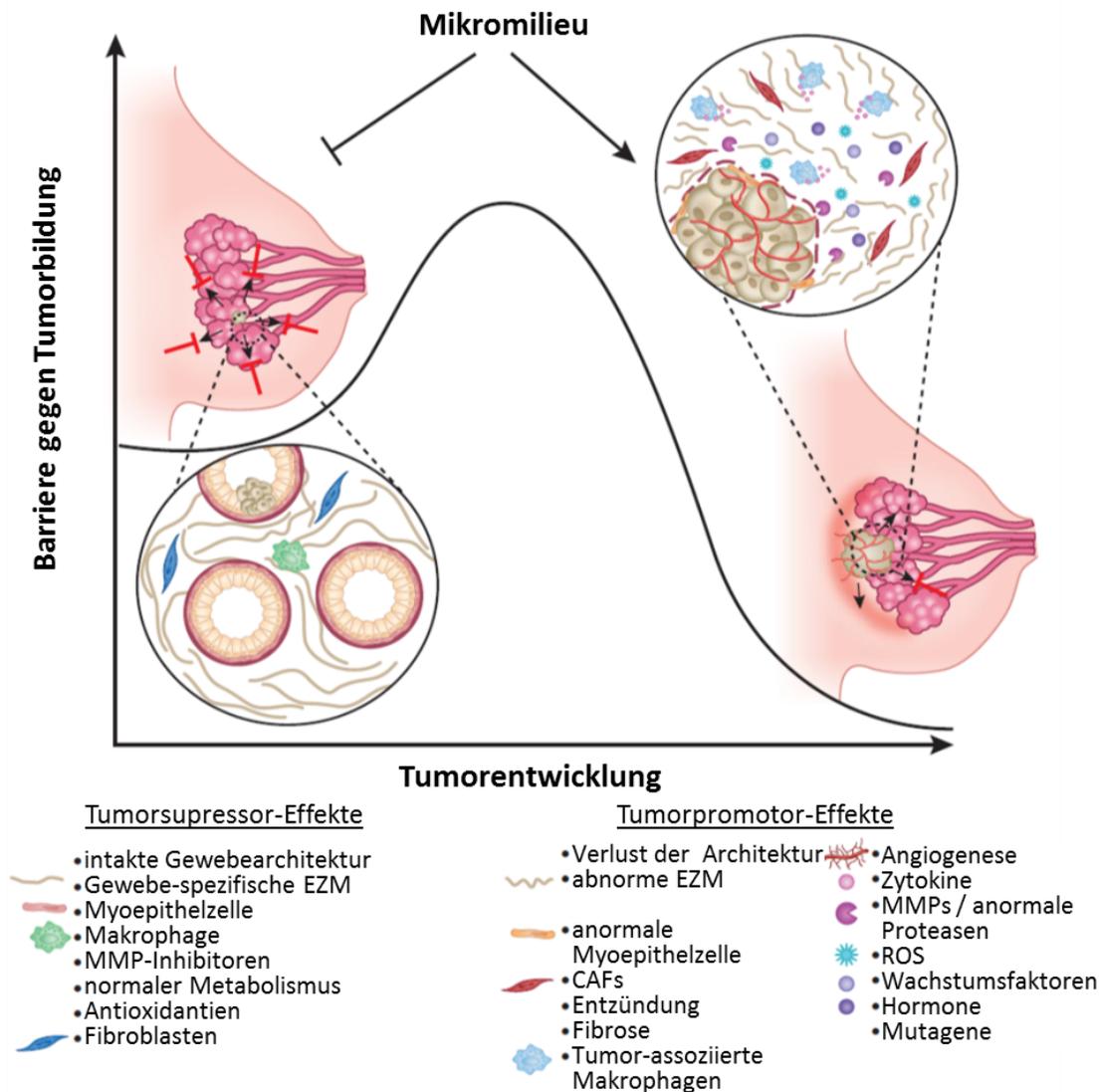
ER<sup>+</sup>-Tumoren sind von der Aktivität des Estrogen-Rezeptors alpha (ER $\alpha$ ) abhängig und können mit Anti-Estrogenen (z.B. Tamoxifen oder Fulvestrant) oder Aromatase-Inhibitoren (z.B. Anastrozol oder Letrozol) therapiert werden (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG), 2011). Diese Behandlungen haben das Ziel, den Estrogen Rezeptor (ER $\alpha$ ) direkt zu blockieren, zu degradieren oder dem Rezeptor das Substrat Estrogen zu entziehen und werden als „endokrine Therapien“ bezeichnet (Castrellon, 2017). Die Anti-Estrogene werden in 2 Gruppen unterteilt: a) *selective estrogen receptor modulators* (SERM) und b) *selective estrogen receptor downregulators* (SERD). SERMs, wie z.B. Tamoxifen, sind kompetitive Partialagonisten des ER $\alpha$  (Mirkin and Pickar, 2015). SERDs, wie z.B. Fulvestrant, binden hoch selektiv an den ER $\alpha$ . Durch die Bindung von Fulvestrant wird der ER $\alpha$  wesentlich hydrophober. Dies führt zu einer Änderung der Konformation (Falschfaltung) des Proteins, das anschließend proteosomal degradiert wird (Lai and Crews, 2017; Lee et al., 2017).

Der Erfolg einer Therapie hängt nicht nur von den Subtypen und deren entsprechender Medikation ab, sondern auch von dem Mikromilieu, dem Stroma, von dem die Tumorzellen umgeben sind. Häufig trägt das Stroma dazu bei, dass Tumorzellen Resistenzen gegen eine Therapie entwickeln und damit das Therapieansprechen verschlechtern (Dittmer and Leyh, 2015; Dittmer et al., 2011; Leyh et al., 2015).

## 1.4. Tumor-Stroma-Interaktion

Krebs wird oft als ein evolutionärer Prozess aus somatischen Mutationen, epigenetischen Veränderungen und klonaler Selektion beschrieben. Diese „Tumor-zentrische“ Perspektive führte zu zahlreichen Fortschritten in Prävention und Therapie von Krebserkrankungen (siehe Kap. 1.1). Allerdings berücksichtigt dieser Ansatz nicht den „evolutionären Kontext“ (Umgebung) in dem sich der Tumor befindet. So wird die evolutionäre Fitness einer klonalen Tumorphilpopulation durch eine Vielzahl an Parametern determiniert. Die biochemischen und mechanischen Interaktionen mit anderen Klonen sind von großer Bedeutung, aber auch die Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix (EZM), Hormonen, löslichen Faktoren und stromalem Gewebe des Tumormikromilieus (TME) beeinflussen die Fitness der Zellpopulation (Bolouri, 2015; Hu and Polyak, 2008; Lorusso and Rüegg, 2008; Polyak et al., 2009). Um die Onkogenese (von Tumorinitiation bis Metastasierung) und das Ansprechen auf Therapien besser verstehen zu können, ist daher es sinnvoll, den Tumor als „Organ“ oder als „multi-Spezies-Ökosystem“ innerhalb eines TME zu betrachten (Bissell and Hines, 2011; Bolouri, 2015), denn Krebszellen entwickeln sich in komplexen Strukturen mit einem heterogenen und vielfältigen TME (Quail and Joyce, 2013). Die Tumorzellen und die nicht-malignen Zellen, die diesen umgeben und/oder infiltrieren, stehen in einem ständigen Signalaustausch. Eine koordinierte Zell-Zell-Kommunikation ist für die Funktionalität von multizellulären Organismen unerlässlich. Zellen können dabei über lösliche Faktoren (Zytokine, Wachstumshormone usw.), per Zell-Zell-Kontakt (Cytonema, Adhäsionsmoleküle usw.) oder via gerichteten Membrantransfer (Mikrovesikel und Exosomen) kommunizieren. Diese Zell-Zell-Kommunikation ist ein wichtiger Prozess während der Ontogenese und ein kritischer Parameter der Gewebekomplexität. Daher stehen der Tumor und sein Stroma in einem wechselseitigen dynamischen Gleichgewicht, das sowohl tumorfördernd als auch tumorsupprimierend sein kann (Abbildung 2; Bissell and Hines 2011). Während der Tumorinitiation in einem Gewebe mit einer intakten Gewebe-Homöostase und -Architektur übt das Mikromilieu einen wachstumshemmenden Einfluss auf die entarteten Zellen aus (Bissell and Hines, 2011). Eine Vielzahl von Experimenten zeigen, dass ein embryonales Mikromilieu die Fähigkeiten potenter Onkogene (z.B. Rous Sarkoma Virus, v-Src oder 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate (TPA)) zur malignen Transformation unterdrückt (Brinster, 1974; Dolberg and Bissell, 1984; Stoker et al., 1990). Das Mikromilieu kann nicht nur schützend wirken, im Mausmodell konnte sogar gezeigt werden, dass embryonale Karzinomzellen durch das Mikromilieu von Mammaeudrüsen reprogrammiert werden können (Bussard and Smith, 2012; Bussard et al., 2010; Rosenfield and Smith, 2013). Dabei wurde eine phänotypische Veränderung der Karzinomzellen zu „normalen“ Epithelzellen beobachtet.

Beim Fortschreiten der Tumorgenese und einem damit einhergehenden Verlust der Homöostase des Gewebes kann das veränderte TME entscheidend zum Wachstum des Tumors beitragen (Bissell and Hines, 2011; Dittmer and Leyh, 2015; Klemm and Joyce, 2015; Quail and Joyce, 2013; Abbildung 2). So ist ein hohes Tumor-Stroma-Verhältnis (mehr als 50% Stroma) ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechteres Rezidiv-freies Überleben von Brustkrebspatienten (Kruijff et al., 2011).



**Abbildung 2. Einfluss des Tumormikromilieus auf die Onkogenese des Mammakarzinoms.**

**Links:** Auflistung der Tumorsuppressor-Effekte des Tumormikromilieus. **Rechts:** Auflistung der Tumor-Promotor-Effekte des Tumormikromilieus. CAF = Karzinom-assoziiierter Fibroblast, EZM = extrazelluläre Matrix, MMP = Matrix-Metalloprotease, ROS = reaktive Sauerstoffspezies  
Abbildung modifiziert aus Bissell and Hines (2011).

Dieses Gleichgewicht zwischen Tumor und Stroma ist durch eine reziproke Kommunikation zwischen den beiden Komponenten charakterisiert. Dabei kann die Signalmediation sowohl juxtakriner als auch parakriner Natur sein, wobei die sezernierten Zytokine (insbesondere Chemokine) und Mikrovesikel entscheidend die Tumor-Stroma-Interaktion determinieren. Das Stroma selbst besteht aus einer komplexen Extrazellulärmatrix mit einer Vielzahl assoziierter Zelltypen (Fibroblasten, Adipozyten und endotheliale Zellen, infiltrierende Immunozyten usw.). Zwei prominente Vertreter von stromalen Zellen im Tumor sind die tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs) und die mesenchymalen Stammzellen (MSCs).

#### 1.4.1. Mesenchymale Stammzellen in der Tumorprogression

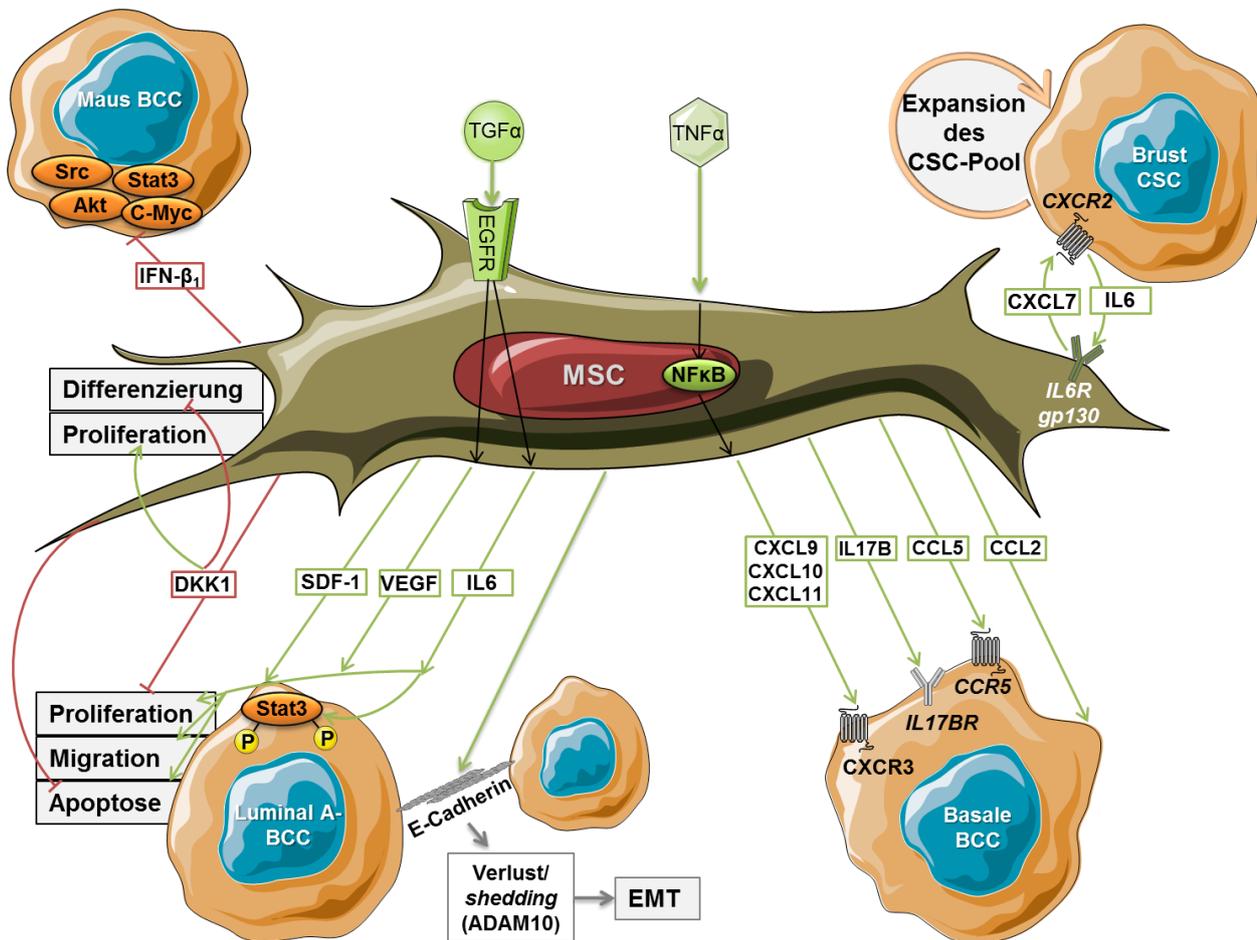
Tumoren, als nicht-heilende Wunden, üben eine anziehende Wirkung auf MSCs aus. Von besonderem Interesse ist daher die Mitwirkung von MSCs an der Tumorprogression. So können MSCs in Tumoren zu CAFs differenzieren, deren tumorfördernde Wirkung hinreichend belegt ist (Cirri and Chiarugi, 2012; Gascard and Tlsty, 2016). Auch undifferenziert scheinen sie auf das Tumorgeschehen einzugreifen. Eine Reihe von Arbeiten zeigen, dass MSCs Tumorzellen zur Migration anregen können. Auch metastasierungsfördernde Eigenschaften wurden den MSCs nachgewiesen. Grundlage dieser Einflussnahme scheint die Sekretion bestimmter Zytokine

(Chemokine) und Wachstumsfaktoren zu sein, für die die Tumorzellen empfänglich sind. Die genauen Prozesse dieser Interaktion zwischen MSCs und Tumorzellen sind jedoch nur ansatzweise bekannt (Dittmer et al., 2011).

Humane mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSC) sind multipotente, stammzellähnliche Stromazellen mit hoher Plastizität. Sie weisen daher ein breites Differenzierungspotential auf, da sie sich in mesenchymale Zellen differenzieren und zu Zellen anderer Keimblätter transdifferenzieren können. Sie wurden erstmals 1966 von Friedenstein und Kollegen beschrieben (Friedenstein et al., 1966). Die aus dem Knochenmark stammenden MSCs können nachgewiesenermaßen zu Osteoblasten, Chondrozyten oder Adipozyten differenzieren (Friedenstein et al., 1974; Noth et al., 2002; Pittenger et al., 1999). Auch ist bekannt, dass MSCs von ihrem Hauptbildungsort (Knochenmark) aus in verschiedenste Gewebe einwandern können und einen starken Tropismus gegenüber Wunden zeigen, um lokal in den Wundheilungsprozess und die Geweberemodellierung einzugreifen (Brooke et al., 2007). MSCs sind ebenfalls in der Hämatopoese von Bedeutung und sind in die Bildung von Nischen für hämatopoetische Stammzellen involviert (Ehninger & Trumpp, 2011; Mendez-Ferrer et al., 2010; Omatsu et al., 2010; Sacchetti et al., 2007). Im Knochenmark ist nur etwa jede 34.000ste kernhaltige Zelle eine mesenchymale Stromazelle (Wexler et al., 2003). Das Knochenmark ist jedoch nicht die einzige Quelle für MSCs. So können MSCs auch aus Fettgewebe (Zuk et al., 2002), Nabelschnurblut (Sun et al., 2010), fetaler Dermis (Qiao et al., 2008a), pankreatischem Gewebe (Seeberger et al., 2006) und Muttermilch (Patki et al., 2010) isoliert werden. Ihre Anwesenheit in verschiedenen Geweben, ihre hohe Plastizität, ihre migratorischen Fähigkeiten sowie ihre Rolle in der Wundheilung lassen vermuten, dass MSCs an pathologischen Vorgängen, wie der Tumorprogression, mitwirken.

Die Interaktion von stromalen Zellen mit Tumorzellen ist ein permanenter Prozess, der sowohl aktiv als auch passiv während der Tumorprogression stattfindet (Tlsty and Coussens, 2006, Bissell and Hines, 2011). Tumoren sezernieren einen ähnlichen Cocktail an Zytokinen wie Wunden (Kidd et al., 2008) und werden daher von den MSCs als Wunden wahrgenommen (Dvorak, 1986). Daher zeigen MSCs einen starken Tropismus gegenüber Krebsgewebe, wo sie lokal die Tumorprogression fördern können (Kidd et al., 2009). Grundlage der Einflussnahme von MSCs auf die Tumorprogression scheint die Sekretion bestimmter Zytokine (insbesondere Chemokine) und Wachstumsfaktoren zu sein, für die die Tumorzellen empfänglich sind (Abbildung 3).

Für die Interaktion von MSCs mit Brustkrebszellen in 3D-Kulturen konnte gezeigt werden, dass MSCs die Zell-Zell-Adhäsion in Brustkrebszell-Sphäroiden vermindern und die Migration der Zellen erhöhen. Als Ursache dieser Veränderungen wurde eine durch die Metalloprotease ADAM10 induzierte Degradation von E-Cadherin beschrieben (Dittmer et al., 2009). Des Weiteren können MSCs die Sensitivität der Brustkrebszelllinien MCF-7 oder MDA-MB-231 gegenüber klinisch relevanten Kinaseinhibitoren (RAD001 und RAF265) modulieren (Dittmer et al., 2011). So konnten MSCs und CAFs Brustkrebszellen gegenüber dem mTOR Inhibitor RAD001 sensibilisieren, indem sie die Apoptose in den Brustkrebszellen induzieren. Auch wurde ein zytotoxischer Effekt des RAF-Inhibitors RAF265 auf MDA-MB-231-Zellen durch MSCs und CAFs erhöht, eine Folge der durch die stromalen Zellen verhinderten Autophagie (Dittmer et al., 2011).



**Abbildung 3. Parakrine Interaktionen zwischen mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Brustkrebszellen (BCC).** Effekte von MSCs auf Luminal A und basale Subtypen von Brustkrebszellen (BCC), auf murine BCCs und auf Krebsstammzellen (CSC) sind separat dargestellt. ADAM10 = *a disintegrin and metalloprotease 10*, DKK1 = Dickkopf 1, EGFR = *epidermal growth factor receptor*, EMT = Epitheliale-mesenchymale Transition, IL6/17B = Interleukin-6/-17B-(Rezeptor), INF-β<sub>1</sub> = Interferon-β<sub>1</sub>, NF-κB = *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*, SDF-1 = *stromal-derived factor-1*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*, TGFα = *transforming growth factor α*, TNFα = *tumor necrosis factor α*, VEGF = *vascular endothelial growth factor*. Abbildung modifiziert aus Dittmer et al. (2011).

Es konnte für Brustkrebszellen gezeigt werden, dass diese in vitro und in vivo die Migration von MSCs stimulieren (Dwyer et al., 2007; Goldstein et al., 2010; Klopp et al., 2007; Lin et al., 2008; Ling et al., 2010; Liu et al., 2011; Rattigan et al., 2010), wobei das chemoattraktive Potenzial der verschiedenen Brustkrebszellsubtypen variiert. So kann die Migration von MCF-7-Zellen durch MSCs mittels Induktion eines E-Cadherin-*sheddings* stimuliert werden (Dittmer et al., 2009). Auch metastasierungsfördernde Eigenschaften wurden den MSCs nachgewiesen (Goldstein et al., 2010; Karnoub et al., 2007). Zudem können MSCs das Immunsystem modulieren und somit Tumoren vor der körpereigenen Immunabwehr schützen (Rasmuson, 2006). Des Weiteren erhöhen MSCs in Brustkrebszelllinien (MCF-7, SUM149 und SUM159) selektiv den Anteil an Brustkrebsstammzellen (Liu et al., 2011). Dies konnte ebenfalls in einer Studie an Brustkrebspatientinnen gezeigt werden. Hier korrelierte die relative Anzahl disseminierter CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup>/ALDH-1<sup>+</sup> Brustkrebsstammzellen mit der relativen Zahl von MSCs im Knochenmark (De Giorgi et al., 2011).

Die Wirkung von MSCs auf die Proliferation von Brustkrebszellen ist in der Literatur kontrovers diskutiert. So können MSCs durch Sekretion verschiedener Zytokine die Proliferationsrate von MCF-7-Zellen (Fierro et al., 2004; Klopp et al., 2010; Rhodes et al., 2010; Sasser et al., 2007b; Abbildung 3) und anderen ERα<sup>+</sup>-Brustkrebszelllinien (T47D, BT474 und ZR-75-1) steigern (Sasser et al., 2007a). Einige Publikationen beschreiben

jedoch einen wachstumshemmenden Effekt von MSCs auf MCF-7-Zellen (Goldstein et al., 2010; Qiao et al., 2008a). Warum einige Arbeiten einen stimulierenden und andere einen hemmenden Effekt von MSCs auf Brustkrebs zeigen, ist nicht final geklärt, könnte aber auf die verschiedenen Quellen der isolierten MSCs zurückzuführen sein. Auch die genauen zellulären Mechanismen die durch diese Faktoren reguliert werden, sind kaum bekannt.

In Tumoren können MSCs zu tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs) differenzieren, von denen bekannt ist, dass sie tumorfördernde Wirkung besitzen (Gascard and Tlsty, 2016; Kalluri, 2016)). CAFs sind in vielen Karzinomen nachweisbar, so auch in Brustkrebs (Chauhan et al., 2003). Ihre Anwesenheit korreliert eindeutig mit Tumorinvasion, -proliferation (De Wever and Mareel, 2003; Tlsty and Coussens, 2006), Angiogenese und gesteigerter Inflammation (Orimo et al., 2005; Tlsty and Coussens, 2006).

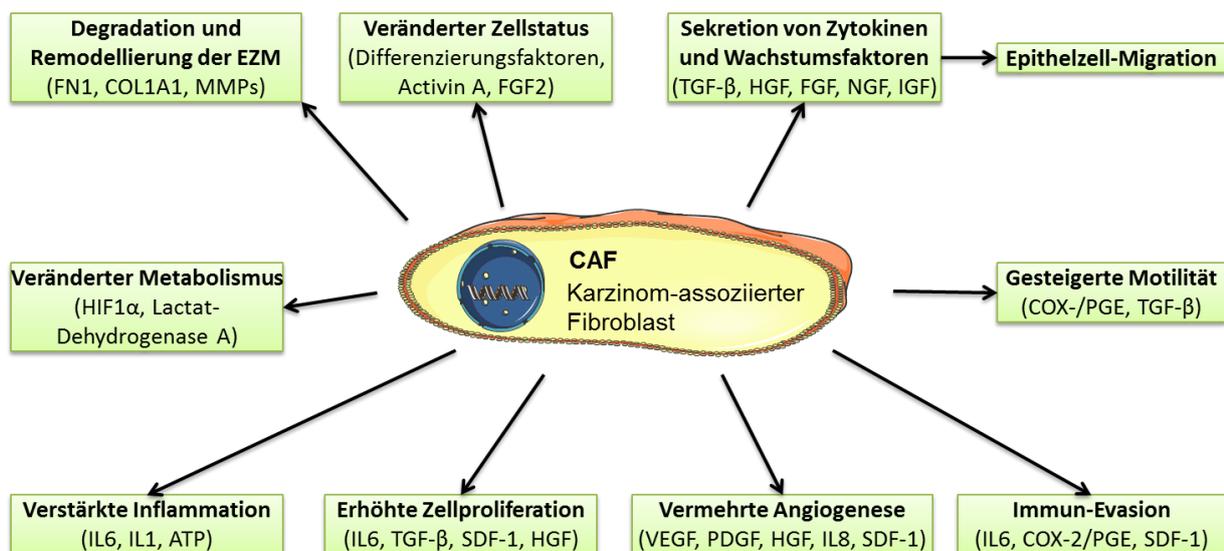
### 1.4.2. Fibroblasten in der Tumorprogression

Fibroblasten sind mesenchymale Zellen und der bei weitem abundanteste Zelltyp im Bindegewebe. Ihre primäre physiologische Aufgabe ist die Synthese von Chemokinen und der extrazellulären Matrix (EZM), womit sie die mechanische Stütze der Epithelzellen produzieren (Gascard and Tlsty, 2016). Diese Synthesefähigkeiten von Kollagenen, Fibronectin, Lamininen, Elastinen, Proteoglycanen, Integrinen, Matrix-Metalloproteasen (MMP) und *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) sind ebenfalls der Hauptgrund für ihre zentrale Bedeutung in der Wundheilung (Jacob et al., 2012). In der Nähe von Wunden zeigen Fibroblasten eine spindelförmige Morphologie und werden dann als Myofibroblasten (= aktivierte Form der Fibroblasten) bezeichnet. In der räumlichen Umgebung von Neoplasien weisen Fibroblasten denselben spindelförmigen Phänotypen auf (De Wever et al., 2008). Fibroblasten sind außerdem für die Synthese und Aufrechterhaltung der gewebespezifischen Basalmembran verantwortlich, die als Schutzbarriere für das jeweilige Epithel fungiert und die Polarität, Spezifität und Funktionalität des Epithelgewebes unterstützt (Kalluri, 2003, 2016). Fibroblasten können sowohl fördernde als auch reprimierende Effekte auf Krebszellen ausüben (Bissell and Hines, 2011; Marsh et al., 2013). In der frühen Onkogenese wirken Fibroblasten unterdrückend auf die Entwicklung des Tumors (Abbildung 2). Während des Voranschreitens der Tumorgenese ändert sich der Einfluss von Fibroblasten hin zu einem tumorpromovierenden Effekt. Diese tumorfördernden Fibroblasten werden meist als Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF) bezeichnet (Marsh et al., 2013).

CAFs bilden meist die Hauptkomponente des Tumorstromas und determinieren somit die Zusammensetzung des Tumormikromilieus (TME) entscheidend (Bissell and Hines, 2011; Buchsbaum and Oh, 2016; Marsh et al., 2013). Sie sind im Gegensatz zu normalen Fibroblasten permanent aktiviert, können nicht in einen inaktiven („normalen“) Phänotypen zurückkehren und zeigen verminderte Apoptose-Raten (Li et al., 2007). Eine einheitliche und akzeptierte Definition für CAFs existiert bisher nicht. Als kleinster etablierter Standard gilt die spindelförmige Morphologie, ein „Aktivierungs-Status“ und die Positivität für das *α-smooth muscle actin* (SMA) (Luo et al., 2015). SMA wird allerdings nicht exklusiv in CAFs exprimiert, so sind höhere Level von SMA auch während der Wundheilung sowie bei der Entwicklung von Muskeln und Gefäßen nachweisbar (Chaponnier and Gabbiani, 2004). Unabhängig davon ist eine erhöhte SMA-Expression im Stroma von Brustkrebstumoren mit einem höheren histologischen Brustkrebsstadium (*grading*), vermehrten Lymphknoten-Metastasen sowie einer schlechteren Prognose assoziiert (Surowiak et al., 2007; Yamashita et al., 2012). Somit umfassen CAFs

eine heterogene Gruppe spindelförmiger Zellen in Tumornähe, deren Zusammensetzung je nach Tumor stark variieren kann (Cirri and Chiarugi, 2012; Gascard and Tlsty, 2016). Der Ursprung von CAFs ist ebenso vielfältig wie heterogen. In der Literatur werden normale Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen (MSC) und epigenetische Transition aus Endothel-/Krebszellen (epitheliale-mesenchymale Transition, EMT) als mögliche Quellen von CAFs beschrieben (Anderberg and Pietras, 2009; Buchsbaum and Oh, 2016; McAnulty, 2007).

CAFs tragen während der Tumorgenese zu einer Vielzahl von Prozessen bei. Dazu zählen Angiogenese, EZM-Remodellierung, Inflammation, *Redox-signaling* und metabolische Reprogrammierung des TME (Gascard and Tlsty, 2016; Orimo et al., 2005; Pavlides et al., 2012; Raz and Erez, 2013; Abbildung 4). Alle diese Effekte beeinflussen somit direkt Initiation, Wachstum, Invasion, Metastasierung und Therapie des Tumors (Luo et al., 2015).



**Abbildung 4. Durch Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF) sezernierte, parakrine Faktoren und deren Effekte auf andere Zelltypen und das Mikromilieu.**

ATP = Adenosintriphosphat, COL1A1 = engl. *collagen type 1 alpha 1*, COX-2 = Cyclooxygenase-2, FGF = engl. *fibroblast growth factor*, FN1 = Fibronectin 1, HGF = engl. *hepatocyte growth factor*, HIF1 $\alpha$  = engl. *hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$* , IGF = engl. *insulin-like growth factor*, IL1 = Interleukin-1, IL6 = Interleukin-6, IL8 = Interleukin-8, MMP = Matrix-Metalloprotease, NGF = engl. *nerve growth factor*, PDGF = engl. *platelet-derived growth factor*, PGE2 = Prostaglandin E2, SDF-1 = engl. *stromal cell-derived factor 1*, TGF $\beta$  = engl. *transforming growth factor beta*, VEGF = engl. *vascular endothelial growth factor*. Abbildung modifiziert aus Gascard and Tlsty (2016).

Alle diese Ergebnisse führten Marsh und Kollegen (Marsh et al., 2013) zu der Hypothese und dem Konzept der „Fibroblasten als Architekten der Krebspathogenese“. Dabei gehen Marsh und Kollegen davon aus, dass nicht mehr das Epithelgewebe/Tumor das Verhalten der Fibroblasten „diktiert“, sondern die Fibroblasten selber Initiatoren und Förderer der Tumorgenese sein könnten (Marsh et al., 2013). So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass der *Knockout* von *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten* (PTEN) in stromalen Fibroblasten der Maus-Brustdrüsen die Initiation, Progression und maligne Transformation von Mamma-Tumoren der Maus fördert (Trimboli et al., 2009). In Proben von Brustkrebspatienten konnten in stromalen Zellen vermehrt Mutationen und der Verlust der Heterozygotie des Tumorproteins P53 (TP53) nachgewiesen werden (Patocs et al., 2007). Diese Veränderung des TP53 im Stroma korrelierte mit vermehrten Lymphknoten-Metastasen (Patocs et al., 2007). In einem Brustkrebsmausmodell konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Verlust des Tumorproteins p63 im Stroma zur Progression eines *ductal carcinoma in situ* (DCIS) hin zu einem invasiven Tumor führen kann (Hu et al., 2008). Durch die Überexpression von HGF und/oder

TGF- $\beta$  in Fibroblasten konnte eine Induktion eines DCIS in *Xenograft*-Mäusen gezeigt werden (Kuperwasser et al., 2004). Des Weiteren induziert eine Überexpression von Wnt-1 in Fibroblasten über einen parakrinen Mechanismus die onkogene Transformation von Brustepithelzellen (Jue et al., 1992). Wahrscheinlich sind Fibroblasten/CAFs in alle Schritte der Tumorentwicklung involviert, vom präneoplastischen Zustand bis zum terminalen Schritt der Krebsprogression, der Metastasierung (Buchsbaum and Oh, 2016; Marsh et al., 2013; Abbildung 4). Das wiederum zeigt, wie wichtig eine Betrachtung des TME ist, um therapeutisch effektiv behandeln zu können.

Außer den genannten Effekten können CAFs auch stark auf die Therapieresistenz von Tumorzellen einwirken, sowohl durch direkte Effekte auf die malignen Zellen als auch durch Rekrutierung/Selektion anderer Tumorzelltypen, wie Krebsstammzellen (Gascard and Tlsty, 2016).

### 1.5. Therapieresistenzmechanismen beim Mammakarzinom

#### 1.5.1. Allgemeine Therapieresistenzmechanismen

Die Erforschung neuer Therapien und Medikamente ist schon immer im Fokus der onkologischen Forschung gewesen. Jedoch entwickeln viele Karzinome eine Resistenz (erworbene Resistenz = *de novo* Resistenz) gegen eine Medikation oder besitzt diese bereits zu Beginn der Therapie (intrinsische Resistenz). Intrinsische Resistenzen sind schon lange bekannt und zählen zu den grundlegenden Charakteristika vieler Karzinome (Hanahan and Weinberg, 2011). Erworbene Therapieresistenzen werden im klinischen Alltag immer wichtiger, weil sie Chemotherapien, Bestrahlung und zielgerichtete Therapien betreffen können und somit die Effektivität sonst erfolgreicher Behandlungsregime einschränken (Sun, 2016). Die Entwicklung einer Resistenz führt meist zu einem Rezidiv, im Falle einer intrinsischen Resistenz kann es zudem zu therapeutischem Versagen kommen und der Tumor somit ungehindert weiter wachsen. Deswegen ist das Wissen über Resistenzmechanismen und deren molekularbiologischen Ursachen wichtig. Dieses Wissen kann genutzt werden, um den Therapieverlauf vorherzusagen und somit die Prognose der Patienten zu verbessern.

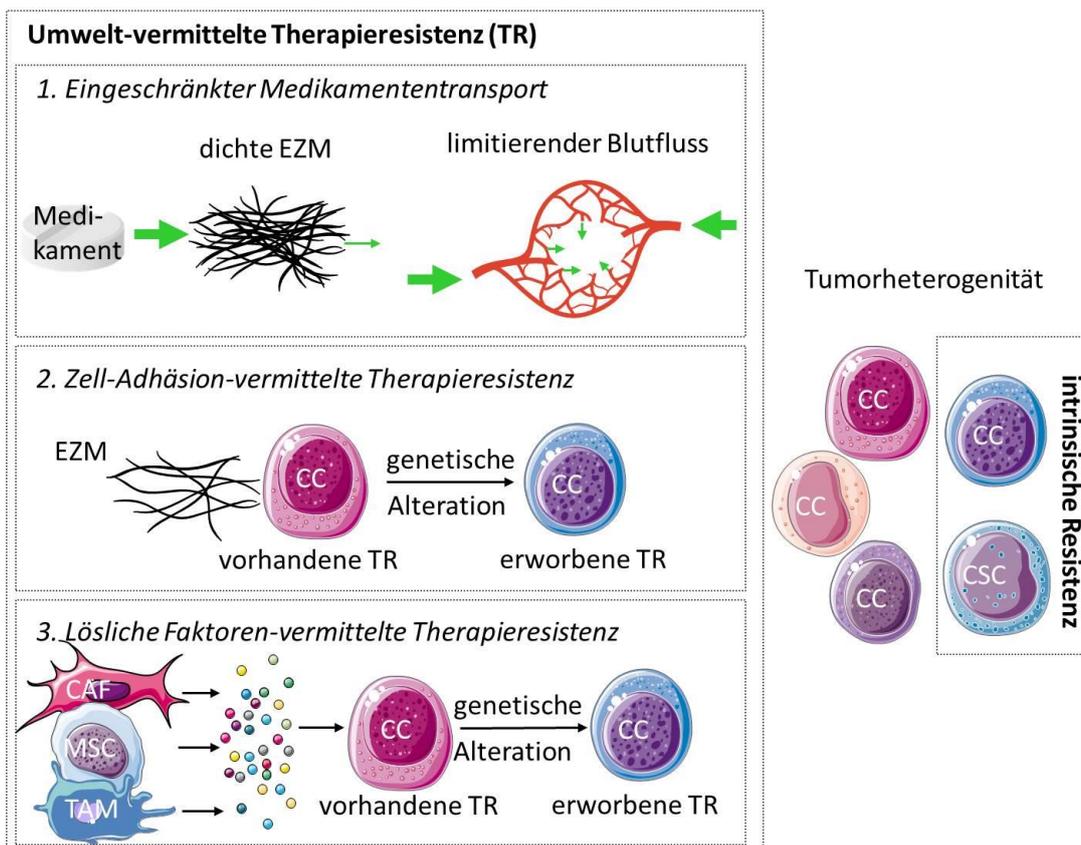
Die genotypische und oft auch phänotypische Heterogenität innerhalb eines Tumors ist ein wichtiger Faktor, wenn es um die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer intrinsischen Resistenz oder den Erwerb einer *de novo* Resistenz geht, denn je mehr Subpopulationen vorhanden sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz (Schmidt and Efferth, 2016; Abbildung 5). Die Tumorerogenität wird oft mit der klassischen darwinistischen Evolution und dem „*survival of the fittest*“ verglichen, wobei die Therapie den Selektionsdruck darstellt und resistente Klone/Subpopulationen einen Wachstumsvorteil aufweisen (Allison and Sledge, 2014).

Die erworbenen und intrinsischen Therapieresistenzen sind auf genetischem und epigenetischem Niveau gut etabliert und führen über diese Wege meist zur Inaktivierung von pro-apoptotischen Signalwegen, zur Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen oder zu einer gesteigerten DNA-Reparatur (Dittmer and Leyh, 2015; Niero et al., 2014). Des Weiteren kann durch Überexpression und erhöhte Aktivität der Superfamilie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter ein gesteigerter Efflux der Medikamente aus den Krebszellen heraus die therapeutische Wirkung stark vermindern (Luqmani, 2005). Die Überexpression von ABC-Transportern ist ein wichtiges Merkmal von Krebsstammzellen (*cancer stem cell* = CSC), die somit meist eine intrinsische Multiresistenz besitzen und zusätzlich noch eine verminderte Apoptose sowie verbesserte

DNA-Reparaturmechanismen aufweisen (Charafe-Jauffret et al., 2010; Dave et al., 2012; Sotiropoulou et al., 2014).

Auch zielgerichtete Therapien sind von Resistenzen betroffen. So können z.B. Her2<sup>+</sup>-Brustkrebszellen eine Resistenz gegen anti-Her2-Therapien entwickeln, indem sie den via ITGB1 den Gegenregulator der Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinasen (PI3K) das Protein *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten* (PTEN) herunterregulieren und damit den PI3K-Signalweg aktivieren (Huang et al., 2011; Nagata et al., 2004). Eine Resistenz gegen das Anti-Estrogen Tamoxifen kann durch einen *cross-talk* zwischen *G protein-coupled receptor 30* (GPR30) mit dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) vermittelt werden (Mo et al., 2013) oder durch eine Überexpression des Androgen-Rezeptors kompensiert werden (dessen Blockade wiederum gegen Tamoxifen sensibilisiert) (Amicis et al., 2010).

Umwelt-vermittelte Therapieresistenzen (Abbildung 5) entstehen meist durch einen adaptiven und reziproken Signalaustausch zwischen den Tumorzellen und dem sie umgebenden Tumormikromilieu (TME) (Meads et al., 2009). Umwelt-vermittelte Therapieresistenzen können neben Chemotherapie und Bestrahlung auch die zielgerichteten Therapien betreffen, wobei die Resistenzmechanismen sehr vielfältig und komplex sein können (Dittmer and Leyh, 2015; Abbildung 5, Abbildung 6;). Dabei kann das TME protektiv auf nicht-resistente Zellen wirken und diesen damit ein längeres Überleben ermöglichen. Je länger die nicht-resistenten Zellen überleben, umso so höher wird die Wahrscheinlichkeit, dass diese eine genetische/epigenetische Veränderung durchlaufen und somit eine *de novo* Resistenz erwerben können (Meads et al., 2009). Die Umwelt-vermittelten Therapieresistenzen (Abbildung 5) können dabei in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) eingeschränkter Medikamententransport durch sehr dichte EZM („physische Barriere“) oder schlechte Blutversorgung (unzureichende Vaskularisation); (2) Zell-Adhäsion-vermittelte Resistenz (Zell-Matrix-Kontakte aktivieren *survival*-Signalwege in den Krebszellen); (3) stromale Zellen sezernieren Faktoren, die das Überleben der Krebszellen verbessern (Dittmer and Leyh, 2015). Dabei ist der Einfluss der stromalen Zellen die biologisch vielfältigste und komplexeste Variable (Dittmer and Leyh, 2015). An der Resistenzbildung können viele verschiedene stromale Zelltypen beteiligt sein, wie z.B. T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten, Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), Perizyten, Adipozyten, Endothelzellen, Karzinom-assoziiierter Fibroblast (CAF = engl. *carcinoma-associated fibroblast*) und mesenchymale Stammzellen (MSC) (Dittmer and Leyh, 2015; Mao et al., 2013; Meads et al., 2009; Sun, 2016).



**Abbildung 5. Allgemeine Therapieresistenzmechanismen (TR).**

**Links: Umwelt-vermittelte Therapieresistenzmechanismen:** (1.) Dichte extrazelluläre Matrix (EZM) oder limitierender Blutfluss können die Bioverfügbarkeit der Medikation für den Tumor stark einschränken. (2.) Interaktion von Krebszellen (*cancer cells* (CC)) mit EZM-Proteinen, die intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und somit ein Überleben der Zellen ermöglichen, was zur Therapieresistenz führt (vorhandene Therapieresistenz). Dies erlaubt den Krebszellen lange genug zu überleben, um mittels epi-/genetischer Veränderungen eine neu erworbene Therapieresistenz auszubilden. (3.) Stromale Zellen sekretieren pro-*survival*-Faktoren, die über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden ein Überleben ermöglichen und die Zeit verlängern, um per Mutation eine weitere erworbene Therapieresistenz auszubilden. **Rechts: Intrinsische Therapieresistenz:** Tumoren bestehen aus verschiedenen Subpopulationen (Klonen), die sich geno- und phänotypisch unterscheiden. In dieser Tumorerheterogenität können sich Klone/Subpopulationen befinden die bereits eine intrinsische Therapieresistenz besitzen und durch die Therapie selektiert werden, z.B. verschiedene Populationen von Krebszellen (*cancer cell* (CC)) und/oder Krebsstammzellen (*cancer stem cell* (CSC)). CAF = engl. *carcinoma-associated fibroblast* (Karzinom-assoziiierter Fibroblast), MSC = engl. *mesenchymal stem cell/multipotent stromal cell* (mesenchymale Stammzelle), TAM = Tumor-assoziierte Makrophage, TR = Therapieresistenz. Abbildung modifiziert aus Dittmer and Leyh (2015).

Weil in der vorliegenden Dissertation die Effekte von CAFs und MSCs auf Brustkrebszellen analysiert wurden, werden im folgenden Kapitel deren Einflüsse auf die Therapieresistenz beim Mammakarzinom exemplarisch beschrieben.

### 1.5.2. Stroma-induzierte Therapieresistenzmechanismen im Mammakarzinom

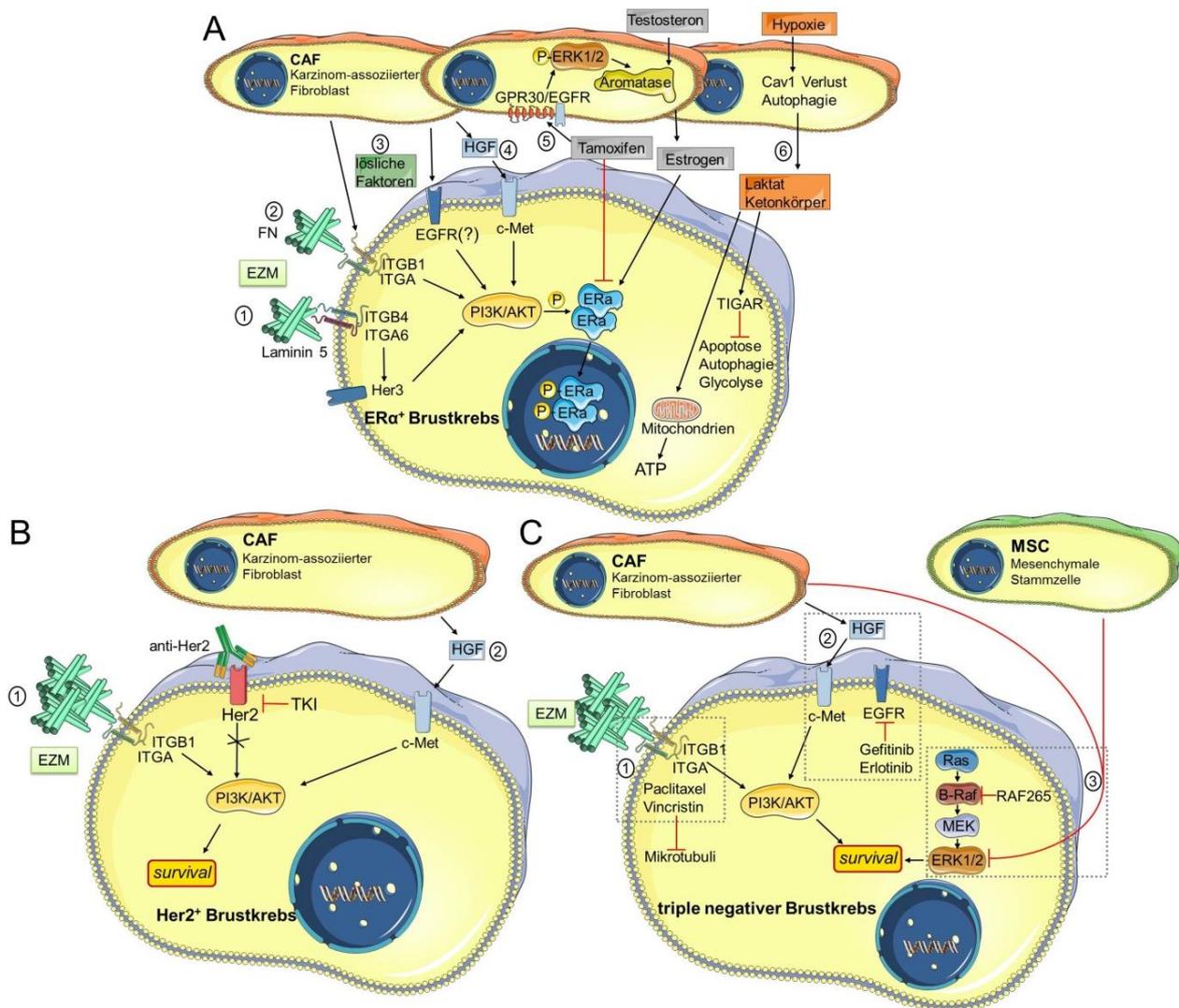
Aus klinischen Studien ist bekannt, dass eine erhöhte stromale Gensignatur mit einer Resistenz gegen die Chemotherapeutika 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid einhergeht (Farmer et al., 2009). Somit sind stromale Zellen neben der EZM ein wichtiger Faktor bei der Etablierung von Therapieresistenzen beim Mammakarzinom. Dabei können stromale Zellen über vier primäre Mechanismen wirken (Dittmer and Leyh, 2015): (1) Zell-Adhäsion-vermittelte Therapieresistenz über die Synthese von Matrixproteinen und deren Bindung an Integrine (meist Integrin  $\beta 1$  = ITGB1, (Margadant et al., 2011); (2) über die Sekretion bioaktiver Faktoren (Hormone, Proteine, Nukleinsäuren usw.; Mao et al., 2013; Sun, 2016); über die Sekretion von Mikrovesikeln und Exosomen, deren Inhalt (Proteine, mRNA und miRNA) endozytotisch oder durch

Membranfusion aufgenommen werden (Mao et al., 2013; Muralidharan-Chari et al., 2010); (4) durch direkten juxtakrinen Zell-Zell-Kontakt zwischen den Stromazellen und Krebszellen. Dies kann zu interzellulärem Membranaustausch führen (onkologische Trogozytose), bei dem ABC-Transporter zur Resistenzsteigerung an Tumorzellen transferiert werden (Rafii et al., 2008). Die wichtigsten Mechanismen sind dabei die Zell-Adhäsions-vermittelte Therapieresistenz und Sekretion bioaktiver Faktoren, die am Beispiel von CAFs und MSCs für die drei Brustkrebssubtypen (ER $\alpha$ <sup>+</sup>, Her2<sup>+</sup>, und TNBC) in Abbildung 6 aufgezeigt werden.

Bei der Adhäsions-vermittelten Therapieresistenz können EZM-Proteine, wie Fibronectin (FN) oder Laminin 5, die Anti-Estrogen-Therapie abschwächen, indem die Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Laminin 5 via des Integrin  $\alpha$ 6 (ITGA6)/Integrin  $\beta$ 4 (ITGB4)/Her3-Weges (Folgiro et al., 2008) oder mittels FN direkt über Integrin  $\beta$ 1 (ITGB1) erfolgt (Pontiggia et al., 2012). So kann im ER $\alpha$ <sup>+</sup>-Subtyp eine endokrine Resistenz induziert werden, indem der PI3K/AKT-Signalweg den ER $\alpha$  an Serin-118 phosphoryliert und somit den Rezeptor unabhängig von Estrogen aktiviert (Baselga et al., 2012; Musgrove and Sutherland, 2009; Pontiggia et al., 2012).

Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges ist ebenfalls für die Zell-Adhäsions-vermittelte Therapieresistenz (via Integrin  $\beta$ 1) bei den Her2<sup>+</sup>- und dem triple negativen Brustkrebssubtypen von Bedeutung und dies sogar gegen die Subtypen-spezifischen Medikationen wie Trastuzumab, Lapatinib oder Paclitaxel und Vincristin (Aoudjit and Vuori, 2001; Huang et al., 2011; Weigelt et al., 2010; Abbildung 6).

Über die Sekretion bioaktiver Faktoren wie dem *hepatocyte growth factor* (HGF) können CAFs den korrespondierenden Rezeptor c-Met auf den Brustkrebszellen aktivieren. Dieser führt wiederum zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und vermittelt damit eine Therapieresistenz gegen die Anti-Estrogene Tamoxifen oder Fulvestrant (Hiscox et al., 2006; Pontiggia et al., 2012). Hinzu kommt in diesem Fall, dass über c-Met sowohl Migration und Invasion der MCF-7-Zellen erhöht werden und damit zusätzlich zur Resistenz auch noch eine potenziell höhere Metastasierungsfähigkeit induziert wird (Hiscox et al., 2006; Pontiggia et al., 2012). Zudem sind CAFs in der Lage, durch die Sekretion von Estrogen die therapeutische Wirkung von Tamoxifen teilweise aufzuheben (Luo et al., 2014a; Mo et al., 2013). Über eine positive Feedbackschleife via des *G protein-coupled receptor 30* (GPR30)/EGFR/ERK-Signalweges können CAFs über eine Aromatase katalysierte Reaktion Testosteron zu Estradiol umwandeln und so dessen Konzentration erhöhen, womit der Effekt von Tamoxifen antagonisiert wird (Luo et al., 2014a; Mo et al., 2013). Auch ungewöhnlichere Mechanismen der Therapieresistenz sind möglich. So kann eine durch Hypoxie-vermittelte Autophagie der CAFs zur Ausschüttung von Laktat und Ketonkörpern führen, die in den ER $\alpha$ <sup>+</sup>-Brustkrebszellen die oxidative Phosphorylierung fördern und damit die Expression des *pro-survival*-Faktors *TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator* (TIGAR) induzieren und hierdurch den therapeutischen Effekt von Tamoxifen und Fulvestrant um Faktor 2,5 bis 4,5 verkleinern (Martinez-Outschoorn et al., 2011).



**Abbildung 6. Einfluss von mesenchymalen Stammzellen (MSC), Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF) und der extrazellulären Matrix (EZM) auf die Therapieresistenz der verschiedenen Brustkrebssubtypen.**

**(A) ERα<sup>+</sup>-Brustkrebszellen und Stroma-induzierte endokrine Resistenzmechanismen:** EZM-Proteine wie Fibronectin (FN) oder Laminin 5 können durch die Aktivierung des PI3K-Signalweges *via* des Integrinα6 (ITGA6)/Integrin β4 (ITGB4)/Her3-Weges (1) oder *via* Integrin β1 (ITGB1) (2) die Anti-Estrogen-Therapie abschwächen. Die Aktivierung des PI3K-Signalweges führt zu einer Estrogen-unabhängigen Phosphorylierung des Estrogen-Rezeptors alpha (ERα). Der phosphorylierte ERα kann somit ohne Estrogen als Transkriptionsfaktor aktiv werden und die übliche Liganden-abhängige Aktivierung wird umgangen. CAFs können über sekretierte Faktoren ITGB1 aktivieren und darüber die PI3K-vermittelte endokrine Resistenz induzieren (3). Über die Freisetzung von HGF können CAFs den korrespondierenden Rezeptor c-Met auf den Brustkrebszellen aktivieren. Dieser führt wiederum zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und vermittelt damit eine Therapieresistenz gegen Anti-Estrogene (4). Außerdem sind CAFs in der Lage, durch die Sekretion von Estrogen die Tamoxifen-Wirkung teilweise aufzuheben (5). Dies wird durch Tamoxifen selber ausgelöst, indem die GPR30/EGFR-Achse in den CAFs induziert wird und dadurch die Aromatase der CAFs aktiviert wird, die dann die Reaktion von Testosteron zu Estrogen katalysiert. Zuletzt kann eine Anti-Estrogen-Resistenz durch eine Hypoxie-vermittelte Autophagie der CAFs induziert werden. Die Autophagie führt zur Ausschüttung von Laktat und Ketonkörpern, die in den Brustkrebszellen die oxidative Phosphorylierung fördern und damit die Expression des pro-*survival*-Faktors TIGAR induzieren (6). **(B) Her2<sup>+</sup>-Brustkrebszellen und die Her2-Inhibitor-Resistenz:** Eine durch die EZM-vermittelte erhöhte Aktivität von ITGB1 kann die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges wiederherstellen, die durch die Her2-Inhibition mittels anti-Her2-Antikörper und/oder einem Her2-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) gesenkt wurde (1). Durch die CAF-vermittelte Sekretion von HGF kann, *via* c-Met Signalmediation, der PI3K/AKT-Signalweg reaktiviert werden (2). **(C) TNBC (triple negative breast cancer) und Therapieresistenzen:** Die EZM-vermittelte Aktivierung von ITGB1 steigert die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges und erhöht damit die Therapieresistenz gegen die Mitose-Inhibitoren Paclitaxel und Vincristin (1). Die CAF-vermittelte Sekretion von HGF kann TNBC-Zellen gegen die EGFR-Kinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib schützen (2). Im Gegensatz dazu können MSC und CAFs TNBC-Tumoren auch gegen den RAF-Inhibitor RAF265 sensibilisieren, indem sie die Aktivität von ERK1/2 senken (3). Abbildung modifiziert aus Dittmer and Leyh (2015).

Gemeinsam ist vielen Resistenzmechanismen (Abbildung 6), dass meist eine Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweges vorhanden ist, die den Effekt des Medikamentes umgeht und ein Überleben der Zellen ermöglicht (Dittmer and Leyh, 2015). Somit kann geschlussfolgert werden, dass der PI3K/AKT-

Signalweg für alle Brustkrebssubtypen ein *survival*-Signalweg ist, der eine Resistenz gegen eine Vielzahl von Therapien induzieren kann (Dittmer and Leyh, 2015).

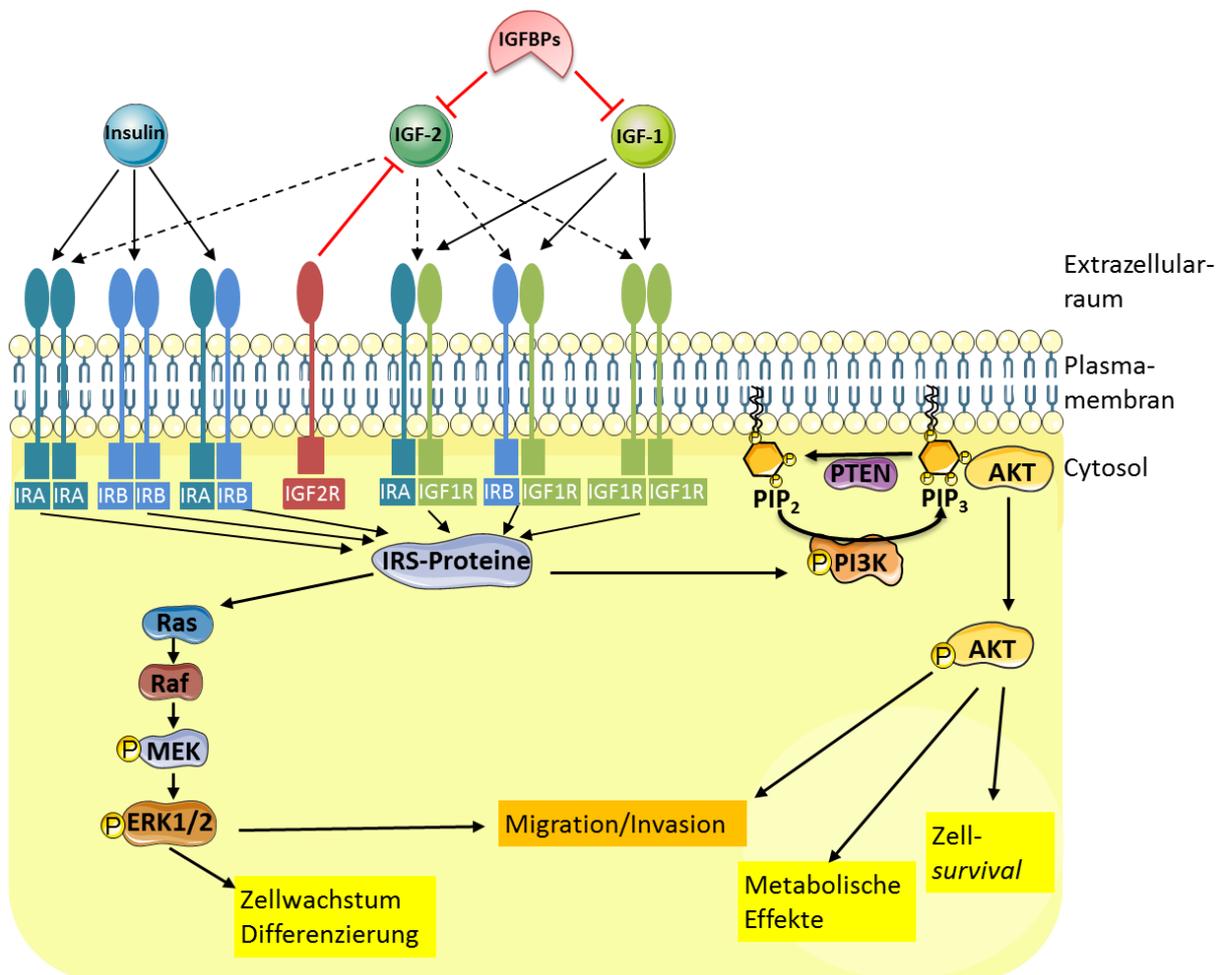
## 1.6. Der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg in der Onkogenese und Tumorprogression

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass der *insulin-like growth factor* (IGF)/Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1* (AKT)-Signaltransduktionsweg in der Onkogenese von zentraler Bedeutung ist (Denduluri et al., 2015). In Populationsstudien konnte korrelativ gezeigt werden, dass Krebsrisiko und -prognose durch die Mengen von IGF1 und Insulin beeinflusst werden (Pollak, 2008). So sind hohe Konzentrationen von IGF1 und *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3) im Blutserum mit einem erhöhten Risiko zur Erkrankung an Lungen-, Darm-, Prostata- und Brustkrebs assoziiert (Fürstenberger and Senn, 2002). Des Weiteren konnte in zahlreichen Experimenten und klinischen Studien gezeigt werden, dass Krebszellen den Insulin-Rezeptor (IR) und die IGF-Rezeptoren exprimieren. Diese Rezeptoren sind wichtige Aktivatoren von PI3K, AKT und der *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase, die wiederum wichtige Signalnetzwerke in neoplastischen Geweben sind (Pollak, 2008). Ein veränderter Energiemetabolismus zählt zu den grundlegenden Merkmalen eines Karzinoms (Hanahan and Weinberg, 2011). IGF1 und Insulin können hier gemeinsam mit anderen Regulatoren die Energiebalance im Organismus und auf Zellebene stören (Pollak, 2008). Des Weiteren ist der PI3/AKT-Signalweg in die stromal induzierten Therapieresistenzmechanismen involviert (Abbildung 6) und während der Entwicklung des Mammakarzinoms von zentraler Bedeutung (siehe Mutationshäufigkeit von PIK3CA in Tabelle 4). Daher soll nun der Aufbau und die physiologische Funktion des Signalweges näher dargestellt werden.

Die pleiotropen Hormone Insulin und die *insulin-like growth factors* (IGF-1 und IGF-2) sind die physiologischen Aktivatoren des PI3K/AKT-Signalweges (LeRoith and Roberts, 2003; Werner et al., 2008). Durch die IGFs und Insulin werden maßgeblich Metabolismus, Wachstum, Entwicklung und Proliferation auf Körper-, Organ- und Zellniveau reguliert (LeRoith and Roberts, 2003). Dabei beeinflusst Insulin primär die Kontrolle metabolischer Prozesse, wie die Bioverfügbarkeit von Glukose. Die IGFs sind für die Kontrolle von Wachstumsprozessen wie der Knochenverlängerung und der Zellteilung zuständig (Werner et al., 2008). Die physiologische Produktion von Insulin erfolgt exklusiv in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, die Synthese der IGFs erfolgt wahrscheinlich primär in der Leber, aber auch sekundär in allen Geweben des Organismus (Werner et al., 2008). Somit ist Insulin nur endokrin wirksam, die IGFs hingegen sind sowohl endokrin als auch parakrin und autokrin aktiv (Christopoulos et al., 2015; Werner and LeRoith, 2000).

Alle drei Faktoren können verschiedene Signaltransduktionswege induzieren (LeRoith and Roberts, 2003). Oft ist es aber nicht exakt möglich, zwischen den einzelnen Wirkungen von Insulin, IGF-1 und IGF-2 zu unterscheiden, weil sie viele Komponenten (Rezeptoren und intrazelluläre Signalmoleküle; Abbildung 7) innerhalb des Signalweges gemeinsam haben und diese einem starken *cross-talk* unterliegen (Christopoulos et al., 2015). Zusätzlich weisen die drei Faktoren eine hohe strukturelle und funktionelle Homogenität auf und können daher an alle Rezeptoren des Signalweges binden (Alarcón et al., 1998; Werner et al., 2008; Abbildung 7). Insulin, IGF-1 und IGF-2 teilen sich daher ein komplexes System aus heterotetrameren Rezeptoren: dem Typ 1 IGF-Rezeptor (IGF1R), den Insulinrezeptor (IR)-Isoformen, ihren verschiedenen Hybriden, dem homomeren Typ 2 IGF-Rezeptor (IGF2R), sowie die an den Rezeptoren assoziierten Signalmoleküle (Belfiore et al., 2009;

LeRoith and Roberts, 2003; Rosenfeld, 2005; Werner et al., 2008; Abbildung 7). IGF1R und IR gehören zur Superfamilie der Liganden-aktivierten Rezeptor-Kinasen, d.h. nach Bindungen von Insulin/IGF-1/IGF-2 kommt es zu einer induzierten Konformationsänderung mit ATP-Bindung und der anschließenden Autophosphorylierung der Tyrosin-Kinase-Domäne, die nun aktiviert ist und die zytosolischen Substrate phosphorylieren kann (Denduluri et al., 2015). Der monomere IGF2R besitzt hingegen eine große extrazelluläre Domäne, die nur zur Bindung von IGF-2 (nicht Insulin oder IGF-1) und der anschließenden lysosomalen Degradation dient (Werner et al., 2008). Damit reguliert der IGF2R direkt die Bioverfügbarkeit von IGF-2 und ist somit auch ein Tumorsuppressor (Leboulleux et al., 2001).



**Abbildung 7. Das komplexe Zusammenspiel der Komponenten des IGF/Insulin/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges und deren Einfluss auf die Zelle.**

AKT = *-akt murine thymoma viral oncogene homolog*, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, IGF-1/-2 = *insulin-like growth factor -1/-2*, IGFBP = *insulin-like growth factor binding proteins*, IGF1R = Typ 1 IGF-Rezeptor, IGF2R = Typ 2 IGF-Rezeptor, IRA = Insulinrezeptor alpha, IRB = Insulinrezeptor beta, IRS = Insulin-Rezeptor-Substrat, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinasen, MEK = Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase, PTEN = *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*, PIP<sub>3</sub> = Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat, PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat, Raf = *rapidly accelerated fibrosarcoma*, Ras = *rat sarcoma* (G-Protein). Abbildung modifiziert aus Pollak (2008, 2012).

Die IGFs unterscheiden sich von Insulin durch ihre Interaktionen im Blutkreislauf und im extrazellulären Mikromilieu mit einer Gruppe von sechs hochaffinen *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP) und einigen IGFBP-assoziierten Proteasen (Baxter, 2014; Siddle, 2012). Die IGFBPs dienen in erster Linie als „passive Reservoirs“ für im Blutkreislauf zirkulierende IGFs und verlängern deren Halbwertszeit durch einen effektiven Schutz vor Proteolyse (Baxter, 2014). Die sechs Mitglieder der IGFBP-Familie binden alle hochspezifisch ihre

Liganden IGF-1 und IGF-2, verhindern damit deren Bindung an ihre korrespondierenden Rezeptoren und sind somit die Hauptregulatoren des endokrinen Transports und der Bioverfügbarkeit der IGFs. Aufgrund ihrer gewebespezifischen Expression (Rajaram et al., 1997) und der damit verbundenen Modellierung der Gewebeverteilung der IGFs und der daraus resultierenden Regulation des Zugangs der IGFs zu ihren Zellrezeptoren erhöhen die IGF-BPs die Komplexität der Regulation der Bioverfügbarkeit der IGFs und der IGF-Signaltransduktion erheblich (Hwa et al., 1999; Abbildung 7). Weil die IGF-BPs nur an IGF-1 und -2 binden aber nicht an Insulin, liegt Insulin in den Körperflüssigkeiten meist frei vor und die IGFs sind stets an IGF-BPs gebunden (meist an IGF-BP3 und IGF-BP5) (Werner et al., 2008).

Außer diesen extrazellulären Funktionen üben die IGF-BPs noch zusätzliche intrazelluläre Funktionen aus. Sie können Zellwachstum und -überleben beeinflussen (Baxter, 2014). So kann IGF-BP5 in MCF-7-Zellen durch Bindung an Integrin $\alpha$ 2/ $\beta$ 1 die Zelladhäsion erhöhen und somit die Migration senken und eine Anoikis verhindern (Sureshbabu et al., 2012). Diese Effekte sind spezifisch für die verschiedenen Kompartimente der Zelle (Akkiprik et al., 2008, 2009). So können IGF-BPs im Zellkern in die Transkription eingreifen, Apoptose induzieren und DNA-Reparaturmechanismen regulieren sowie die Tumorentwicklung, -progression und Therapieresistenz beeinflussen (Baxter, 2014).

Wie bereits beschrieben, führt die Bindung von Insulin, IGF-1 und -2 an IR oder IGF1R zur deren Autophosphorylierung. Die dabei entstehenden Phosphotyrosine dienen als Bindungsstelle für die Insulin-Rezeptor-Substrat-Proteine (IRS) 1-4, Shc und weitere Proteine (Werner et al., 2008). Diese Proteine werden wiederum von den Rezeptoren phosphoryliert und aktivieren dann die PI3K/AKT- und/oder Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskaden. Die meisten *downstream* Signalproteine werden sowohl von IR als auch IGF1R aktiviert (Abbildung 7). Wie die Zelle unterscheidet, von welchem Rezeptor das Signal stammt, ist bisher unklar und Bestandteil aktueller Forschung (Denduluri et al., 2015; LeRoith and Roberts, 2003; Werner et al., 2008). Einige Theorien werden diskutiert, wie gewebespezifische Expression der Rezeptoren, unterschiedliche Internalisierungs-Kinetiken der Rezeptor-Substrat-Komplexe, verschiedene Rezeptor-Hormon-Affinitäten, bevorzugte Bindung von IGF-BPs zu IGFs und verschiedene Substrat-Affinitäten der Rezeptoren (z.B. nur der IR kann pp12 $\beta$  aktivieren) (Werner et al., 2008).

Interessanterweise gibt es erste Hinweise darauf, dass IR und IGF1R auch Liganden-unabhängig und unabhängig von den Signalwegen PI3K/AKT oder Ras-Raf-MEK-Erk apoptotisch wirken können (Boucher et al., 2010). Normal aktivierte IR oder IGF1R phosphorylieren IRS. IRS kann dann eine Reihe von Proteinen, wie PI3K oder die Adapterproteine *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) und *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2* (SHP2) binden (White, 2002). PI3K katalysiert dann die Reaktion von Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) (Abbildung 7). PIP<sub>3</sub> rekrutiert daraufhin die Kinase AKT und phosphoryliert diese am Tyrosin 308 (Siddle, 2012; Zha and Lackner, 2010). AKT wiederum kann dann eine Vielzahl an Funktionen erfüllen. So kann es z.B. das anti-apoptotische Proteine Bcl-2 freisetzen, die Proteinbiosynthese via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) stimulieren oder den Glukosemetabolismus mittels Inhibition der Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) aktivieren (Denduluri et al., 2015; Zha and Lackner, 2010; Abbildung 7). Die aktivierten Rezeptoren IR oder IGF1R können aber auch über Shc oder IRS1 den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg aktivieren und darüber

Differenzierung und Zellwachstum fördern (Siddle, 2012; Zha and Lackner, 2010). Dabei aktiviert das IRS Protein Shc über Raf die GTPase Ras. Diese startet dann die *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) ERK1 und ERK2 (Denduluri et al., 2015; Pouysségur et al., 2002). ERK1/2 phosphorylieren anschließend die für Proliferation und Wachstum zuständigen Transkriptionsfaktoren wie z.B. ELK1 (Denduluri et al., 2015; Pouysségur et al., 2002).

Die Signaltransduktionsmechanismen, die durch Insulin, IGF-1 und IGF-2 beeinflusst werden, sind komplex, vielfältig und elementar für Zelle und Organismus. Ihr genaues Zusammenspiel ist aber noch nicht final geklärt und bedarf weiterer Forschung.

## 1.7. Zielstellung

Wenig untersucht sind bisher die Effekte von Stromazellen, wie mesenchymale Stammzellen (MSC) und Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAFs), auf die Genexpression sowie die Aktivität von Brustkrebszellen. Um diese Aspekte genauer zu betrachten, wurden der direkte Einfluss von MSCs und der Einfluss von MSC-konditioniertem Medium auf MCF-7-Zellen analysiert. Mit Hilfe von *cRNA-Microarray*-Analysen konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren Expression durch direkten Kontakt mit MSCs und CAFs beeinflusst wurden. In der vorliegenden Dissertation sollen (1.) die molekularbiologischen Mechanismen bestimmt werden, welche die Änderungen in der Genexpression durch MSCs und CAFs regulieren sowie (2.) die Bedeutung dieser Genexpressionsveränderungen für die biologische Aktivität von Brustkrebszellen analysiert werden. Besonderes Interesse gilt dabei der Aufklärung der beteiligten Signaltransduktionswege. (3.) Des Weiteren zielen die Experimente darauf ab, Aufschluss über den Einfluss von MSCs und CAFs auf das Ansprechen der Brustkrebszellen auf das Anti-Estrogen Fulvestrant zu geben. (4.) Zudem ist es Ziel der Arbeit, den für die Effekte von MSCs und CAFs auf die Brustkrebszellen verantwortlichen sezernierten Faktor zu identifizieren.

Mit diesem experimentellen Vorgehen sollen neue Erkenntnisse zur Bedeutung der Stromazellen (MSCs und CAFs) für die Progression und Resistenzentwicklung des Mammakarzinoms gewonnen werden, um damit neue Ansätze für klinische Interventionen zu erarbeiten, die helfen könnten, Progression und Resistenzentwicklung zu verzögern bzw. ganz zu verhindern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Chemikalien von Applichem (Darmstadt, DE) bezogen.

#### 2.1.2. Standardpuffer

**Tabelle 5. Zusammensetzung der verwendeten Standardpuffer.**

Puffer/Medium	Zusammensetzung/Herstellung
<b>1X Dulbecco's PBS</b>	1 zu 10 Verdünnung mit sterilem bidest. H <sub>2</sub> O aus steriler 10X Stammlösung (Promocell GmbH, Heidelberg, DE)
<b>4X Protein-Probenpuffer</b>	5 ml H <sub>2</sub> O (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

Die Zusammensetzung spezieller Puffer und Medien wird in den entsprechenden Methodenteilen aufgeführt.

#### 2.1.3. Zellkulturadditive

**Tabelle 6. Verwendete Inhibitoren in Zellkulturexperimenten.**

Inhibitor	Spezifische Ziele des Inhibitors	Endkonzentration [μM]	Lösungsmittel	Hersteller
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	Hif1α	100	PBS	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>Erbbi</b>	EGFR, Her-2, Her-4	0,2	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>FAKi 14</b>	FAK	1	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>Fulvestrant</b>	ERα	0,1	DMSO	LKT Laboratories bezogen von Biomol, Hamburg, DE
<b>Ki11502</b>	PDGFR	0,2	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>Ly364947</b>	TGFBR1	10	DMSO	Tocris Bioscience, Bristol, GB
<b>M344</b>	HDAC 1 bis 3	0,2	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>PD173074</b>	FGFR, VEGFR	0,2	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>PQ401</b>	IGF1-R	10	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>RAD001</b>	mTOR	0,2	DMSO	Novartis, Basel, CH
<b>RKI</b>	ROCK	1	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>Shikonin</b>	Cytokin-Rezeptoren	0,1	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>Srci</b>	Src, VEGFR2	0,5	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA
<b>U0126</b>	MEK	10	DMSO	Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, USA

**Tabelle 7. In Zellkulturexperimenten verwendete Aktivatoren und rekombinante Proteine.**

Aktivator	Endkonzentration	Lösungsmittel	Hersteller
<b>CCL5</b>	100 ng/ml	H <sub>2</sub> O	ImmunoTools, Friesoythe, DE
<b>DHT</b>	0,01 μM	H <sub>2</sub> O	ImmunoTools, Friesoythe, DE
<b>Estrogen</b>	0,01 μM	H <sub>2</sub> O	ImmunoTools, Friesoythe, DE
<b>IGF-1</b>	50 ng/ml	H <sub>2</sub> O	ImmunoTools, Friesoythe, DE
<b>IGFBP-5</b>	50 ng/ml	H <sub>2</sub> O	PeproTech, Hamburg, DE
<b>IL6</b>	0,1 – 1 μg/ml	H <sub>2</sub> O	PeproTech, Hamburg, DE
<b>Insulin</b>	1,7 μM	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>TIMP1</b>	1 μg/ml	H <sub>2</sub> O	PeproTech, Hamburg, DE

## 2.1.4. Antikörper

Tabelle 8. Primäre Antikörper, die für Western-Blot-Analysen verwendet wurden.

Antikörper	Wirt und Klonalität	Verdünnung	Hersteller
(pan)-AKT (40D4)	Kaninchen, polyklonal	1:1.000	Cell Signaling, Danvers, USA
P(S473)-AKT (D9E)	Kaninchen, polyklonal	1:2.000	Cell Signaling, Danvers, USA
P(Thr308)-AKT (244F9)	Kaninchen, monoklonal	1:1.000	Cell Signaling, Danvers, USA
Bcl-3 (C-14)	Kaninchen, polyklonal	1:1.000	Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA
CAIX	Kaninchen, polyklonal	1:200	Zur Verfügung gestellt von S. Pastorekova
E-Cadherin	Maus, monoklonal	1:5.000	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
ER $\alpha$ (HC-20)	Kaninchen, polyklonal	1:2.000	Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA
ERK1/2	Kaninchen, polyklonal	1:2.000	Cell Signaling, Danvers, USA
P-(Thr202, Tyr204) ERK1/2	Kaninchen, polyklonal	1:2.000	Cell Signaling, Danvers, USA
GAPDH	Maus, monoklonal	1:5.000	Ambion/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HIF-1 $\alpha$	Maus, monoklonal	1:1.000	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IGF-1R $\beta$	Kaninchen, polyklonal	1:2.000	Cell Signaling, Danvers, USA
P-(Tyr1135/136) IGF-1R $\beta$	Kaninchen, monoklonal	1:100	Cell Signaling, Danvers, USA
IGFBP5 (H-100)	Kaninchen, polyklonal	1:200	Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA
Integrin $\beta$ 1 (EPR1040Y)	Kaninchen, monoklonal	1:2.000	Abcam, Cambridge, GB
Ki-67 (Klon EPR3610)	Kaninchen, monoklonal	1:2.000	Epitomics, Burlingame, USA
PI3K p110 $\alpha$ (C73F8)	Kaninchen, monoklonal	1:1.000	Cell Signaling, Danvers, USA
STAT3 (79D7)	Kaninchen, monoklonal	1:1.000	Cell Signaling, Danvers, USA
P-(Tyr705)STAT3 (D3A7)	Kaninchen, monoklonal	1:1.000	Cell Signaling, Danvers, USA
TGF $\beta$ -R3	Kaninchen, polyklonal	1:1.000	Cell Signaling, Danvers, , USA
TMEM26	Kaninchen, polyklonal	1:1.000	Sigma Life Science, St. Louis, USA

Tabelle 9. Sekundäre Antikörper, die für Western-Blot-Analysen verwendet wurden.

Antikörper	Wirt und Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus musculus-HRP	Ziege, monoklonal	1:2.000	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege, monoklonal	1:2.000	Cell Signaling, Danvers, USA

## 2.1.5. siRNAs

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

Tabelle 10. Sequenzen der verwendeten siRNAs für den spezifischen Knock-down mittels RNA-Interferenz.

Name der siRNA	Zieltranskript	Sequenz der siRNA (5, $\rightarrow$ 3,)
siLuc	Leuchtkäfer-Luciferase	CUU ACG CUG AGU ACU UCG A
siPIK3CA	PIK3CA	AAU CUG AGA UGC ACA AUA A
siIRS1	IRS1	AGA ACC UGA UUG GUA UCU A
siSTAT3	STAT3	GAA UCA CGC CUU CUA CAG A

siIGFBP5	IGFBP5	GCA GAU CUG UGA AUA UGA A
siBcl-3	Bcl-3	UGG UCU UCU CUC CGC AUC A
siTIMP1	TIMP1	ACU GCA GGA UGG ACU CUU G

### 2.1.6. Primer

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

**Tabelle 11. Sequenzen der verwendeten Primer für RT-qPCR.**

Transkript	Vorwärtsprimer (5,→3,)	Rückwärtsprimer (5,→3,)
ABCG2	TGCAACATGTACTGGCGAAGA	GAGAGATCGATGCCCTGCTT
ACTA2	GAGTTGCCTGATGGGCAAGT	GGCAGCGGAAACGTTTCATT
ALDH3A1	GTCCCTGAGACCACGGAGC	CCCGTGTACAGGATATGGTGC
Bcl-3	GAAGCACATGCACCTACCCA	GGACTGGTGCCTGAGAATGC
CALCR	CAGGAGCTGAGGAATGAACCA	CTCAGCACTCTCCTCGCCTT
CDH1	TTGACTTGAGCCAGCTGCAC	CGTTACGAGTCACTTCAGGCC
CDSN	GAAAGATCCCCTGCCGCT	GAGGCTTCACTTGGGCTAGGA
FGF18	ACACTCCTGCTGCTGTGCTT	GAAGTCCACGTTCTCCTCGG
FN1	TGCGAGAGTAAACCTGAAGCTG	ACCCACTCGGTAAGTGTTC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGTGGGATTC
HIF-1a	CCACAGGACAGTACAGGATG	TCAAGTCGTGCTGAATAATACC
HPRT	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	TGAGCACACAGAGGGCTACAA
IGF1	CTTCTACCTGGCGCTGTGC	CCATACCCTGTGGGCTTGT
IGF1R	ACGCCAATAAGTTCGTCCACA	GCGTCATACCAAAATCTCCGA
IGF2	GACGTACTGTGCTACCCCCG	TTGGAAGAAGTTCGCCACG
IGFBP1	ATTTCCATCTGATGGCCCC	CGTCCCAAAGGATGGAATGAT
IGFBP2	GGTTGCAGACAATGGCGAT	TGGTTCTCCACCAGGCCTC
IGFBP3	CAGCGCTACAAAGTTGACTACGA	GAAGTTCTGGGTATCTGTGCTCTG
IGFBP4	AGCACTTCGCCAAAATTCGA	TGACCTTCATCTTGCCCC
IGFBP5	CCAATTGTGACCGCAAAGG	CGGGAAGGTTTGCCTGCT
IGFBP6	CATGGAGCTGTCATCACTCAACA	TGAAGGTGGATTGAGGGCC
IGFBP7	AACTGGCTGGGTGCTGGTATC	TATTCTCCAGCATCTTCTTACTTAGAG
IRS1	AAGCGGGCTGACTCCAAGA	GTGCTCGTCCCGGGTGTGA
KIF12	CCCTTCGCGCCTCTTATCT	GCAAGTCCCGAACCTGCTC
KLHL4	TGATTGCAGGACACCTCCG	CTGCGCTGAGAACCAACCTAT
KLK11	AGCCCCGCTACATAGTTCACC	CAGCCCTCCTCTTCTGGA
NR4A2	GTCCTTCGATTAGCATACAGGTCC	AAAGATGAGTTTACCCTCCACTGG
PAI-1	GGCCATGGAACAAGGATGAGA	GACCAGCTTCAGATCCCCTGCT
PIK3CA	AGGCTATGGAACCTTCTGGACTGTAAT	AACCTCGAACCATAGGATCTGG
PTEN	TTTCTTCAGCCACAGGCTCC	TGCTAACGATCTCTTTGATGATTG
RAB30	CCTGTGAGGAATCCTTCCGTT	GTTCTATCTCCCGCAGCCACT
RAMP3	CATGATGGGCAAGGTGGAC	ATGAACTCGGACAGGTTGCAC
SCGB2A1	TGCCACGCACGACTGAAC	TCAGCAGCTTCATGGCGAG
SEPP1	CAGGCCTTCATCACCACCAT	GGTGACCCTGCCTATGCTGA
SPARC	TGAGCTGACCGAATTCCCC	CAGGACGTTCTTGCGCCAGTC
STAT3	GGACAATATCATTGACCTTGTGAAAA	CTTCGTTCCAAAGGGCCAG
TGFBR3	GGCTGTGCAGGAAGAAGCTAT	TTCCTTGTGTGTGCTGGCAT
TIMP-1	CTGTTGTTGCTGTGGCTGAT	TGGATAAACAGGGAAACACT

<b>TMEM26</b>	GAGGGTTGCATCAGCTCCA	CGACTCCCGTCACTCAACAAG
<b>UGT2B15</b>	GGTCATCCCAAACCAAAGCT	GATGCCATTGGTCCACCAT
<b>VIM</b>	GCAGGAGGCAGAAGAATGGTA	CAGCCTCAGAGAGGTCAGCAA
<b>YPEL1</b>	ACACGCCCTCTGGACAAC	AGCAACTGGAAAATGCACG

### 2.1.7. Geräte

Tabelle 12. Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
<b>Agarose-Gelelektrophorese: Agagel Standard G45/1</b>	Biometra, Göttingen, DE
<b>Elektroporator: Gene Pulser Xcell</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Inkubator: IG150 (eukaryotische Zellkultur)</b>	Jouan/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Luminometer: Sirius Luminometer</b>	Berthold Detection Systems, Pforzheim, DE
<b>Mikroskope: Axioskop 40, Axiovert 135</b>	Zeiss, Oberkochen/Jena, DE
<b>PCR-Cycler: T-Gradient Thermocycler,</b>	Biometra, Göttingen, DE
<b>qPCR-Cycler: iCycler</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Qubit 1.0 Fluorometer</b>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>SDS-PAGE: Mini-Protean 2 Cell</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Spectra Max 340PC (für 96 well-Platten)</b>	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, US
<b>Spectrophotometer: Ultrospec 1000 (für Küvetten)</b>	Pharmacia Biotech/GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SE
<b>Sterilbank: Hera safe</b>	Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Western-Blot-Analyse: Mini Trans-Blot Cell</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Zentrifugen: Biofuge Pico, Multifuge 3 S-R</b>	Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.1.8. Software

Tabelle 13. Verwendete Software.

Software	Hersteller
<b>AxioVision 4</b>	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena, DE
<b>Canvas 8</b>	ACD Systems (früher Deneba Systems), Seattle, USA
<b>iQ5 Optical System Software v2.1</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Microsoft Office</b>	Microsoft, Redmont, USA
<b>Primer Express v2.0</b>	Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, USA
<b>SOFTmax PRO 3.1.2</b>	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Kultivierung humaner Zellen

#### 2.2.1.1. Zellen

Die humanen, immortalen Brustkrebszelllinien MCF-7, T-47D, BT-474, SK-BR-3, BT-20 und MDA-MB-231 wurden verwendet. Die SK-BR-3 Zelllinie wurde von der *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA)

bezogen. Die anderen Zelllinien waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und deren Identität wurde per *short-tandem-repeats*-Analyse (LGC Standards, Wesel, DE oder Genolytic, Leipzig, DE) bestätigt.

**Tabelle 14. Klassifizierung der verwendeten Brustkrebszelllinien nach immunhistologischen und molekularen Subtypen.**

Zelllinie	Estrogen-rezeptor	Progesteron-rezeptor	ERBB2 Amplifikation	Molekularer Subtyp (Prat et al., 2013)
<b>MCF-7</b>	Ja	Ja	Nein	<i>Luminal A</i>
<b>T-47D</b>	Ja	Ja	Nein	<i>Luminal A</i>
<b>BT-474</b>	Ja	Ja	Ja	<i>Luminal B</i>
<b>SK-BR-3</b>	Nein	Nein	Ja	<i>Her2-enriched</i>
<b>MDA-MB-231</b>	Nein	Nein	Nein	<i>Basal-like/Claudin-low</i>
<b>BT-20</b>	Nein	Nein	Nein	<i>Basal A</i>

Die immortalisierte Karzinom-assoziierte Fibroblasten-(CAF)-Zelllinie 19TT wurde freundlicherweise von J.M.W. Martens (Erasmus University Medical Center, Rotterdam, NL) zur Verfügung gestellt. Die 19TT CAFs wurden aus einer Tumorprobe einer Patientin mit einem invasiven duktalem Mammakarzinom isoliert und anschließend retroviral mit einem Vektor, kodierend für humane Telomerase Reverse Transkriptase, transfiziert (Martens et al., 2003).

Die humanen multipotenten mesenchymalen Stroma-/Stammzellen (MSC) wurden aus dem Knochenmark verschiedener Spender isoliert und freundlicherweise von J. Lützkendorf und L. Müller (beide Universität Halle-Wittenberg, Halle, DE) zur Verfügung gestellt. Die Klassifizierung der MSCs als MSCs wurde nach den Minimal Kriterien von Dominici et al. (2006) durchgeführt.

Die Fulvestrant-resistente MCF-7-Zelllinie (MCF-7 Ful-R) wurde aus der parentalen MCF-7-Zelllinie von A. Dittmer generiert. Dazu wurden die MCF-7-Zellen mit 0,1 µM Fulvestrant kultiviert, ein resistenter Klon isoliert und unter Fulvestrant-Bedingungen weiter kultiviert. Anschließend wurden die MCF-7 Ful-R als Zelllinie etabliert und als MCF-7-Zellen authentifiziert.

### 2.2.1.2. Zellkultivierung

Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer *Hera safe* Sterilbank (Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Zelllinien und Primärkulturen wurden ohne Zugabe von Antibiotika bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und unter Lichtausschluss in einem Inkubator (IG150, Jouan/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert. Die Zellen wurden, unter Verwendung des *MycoAlert* Mykoplasmen Detektions-Kits (Lonza, Basel, CH), regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontaminationen überprüft. Für die Durchführung von Experimenten wurden ausschließlich Zellen ohne Mykoplasmen-Kontamination verwendet.

Die Brustkrebszelllinien (MCF-7, T-47D, BT-474, SK-BR-3, BT-20 und MDA-MB-231) sowie die 19TT CAFs wurden in RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX-I (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mit 10% fötalen Kälberserum (Pan Biotech, Aidenbach, DE) kultiviert.

MSCs wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 1 g/l Glukose (*low glucose*) und ohne Phenolrot (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kultiviert. Das DMEM-Medium wurde auf 1 mM Natriumpyruvat (100 mM Stammlösung; Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-Glutamin (200 mM Stammlösung; Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1X nichtessentielle Aminosäuren (100X Stammlösung; Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und 10% fötalem Kälberserum (Pan Biotech, Aidenbach, DE) vervollständigt. Um eine Differenzierung zu vermeiden, wurden die MSC bis maximal 50% Konfluenz kultiviert und anschließend passagiert.

Zur Durchführung von Zellkulturexperimenten wurden die Zellen mit 3 ml einer 0,025% Trypsin/EDTA-Lösung (Lonza, Basel, CH) für vier bis sechs Minuten inkubiert. Für 2D-Kulturen (einschichtige *monolayer*-Kulturen) wurden die Zellen in Abhängigkeit vom durchgeführten Experiment in Zellkulturplatten oder Zellkulturflaschen ausgesät. Für 3D Suspensionskulturen (Sphäroid-Assay) wurden die Trypsin behandelten Brustkrebszellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, CH) mit einer Schicht aus 2% Seakem GTG Agarose (in DPBS, Lonza, Basel, CH) ausgesät. Die Agaroseschicht verhindert ein Anheften der Zellen und zwingt die Kulturen zur Ausbildung von Zellaggregaten und Sphäroiden (Dittmer et al., 2008). Zur Beobachtung von einzelnen 3D-Aggregaten/Sphäroiden wurden 5.000 Zellen in je eine Kavität einer mit 2% Seakem GTG Agarose beschichteten 96-*well*-Platte (TPP, Trasadingen, CH) transferiert und dort über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet.

Für Ko-Kulturen von Brustkrebszellen (BCC) mit stromalen Zellen wurden zuerst MSCs oder CAFs in ihrem jeweiligen Medium ausgesät (MSCs in DMEM mit Zusätzen und CAFs in RPMI 1640, je mit 10% FKS). Nach Anheftung der MSCs/CAFs an die Oberfläche der Zellkulturschalen wurde das Medium abgesaugt und frisches in RPMI 1640 mit 10% FKS zu den Brustkrebszellen hinzugegeben. Dabei wurden die Zellen in einem Verhältnis 50 zu 1 oder 10 zu 1 (BCCs zu MSC/CAF) für ein bis sieben Tage kultiviert, je nach durchgeführtem Experiment/Assay. Die genaue Versuchsdauer ist im korrespondierenden Methoden- und Ergebnisteil angegeben.

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium (CM) von MSCs (MSC-CM) wurde zu einer MSC-Kultur mit ca. 50% Konfluenz (zur Vermeidung von Differenzierung) frisches Medium geben. Nach drei Tagen wurde dieses MSC-CM steril abgenommen und bei 1.000 rpm für 5 min in einer Multifuge 3 S-R (Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 5 Minuten zentrifugiert. Der von Zellen und Zelltrümmern geklärte Überstand wurde im Anschluss bei -20°C gelagert. Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu ermöglichen, wurden größere Mengen CM gesammelt, einmalig aufgetaut, vereinigt und anschließend aliquotiert. Die Lagerung dieser Aliquots erfolgte bei -80°C. Für die Gewinnung des CMs von CAFs (CAF-CM) wurde äquivalent verfahren, mit dem Unterschied, dass konfluente 19TT-Fibroblasten-Kulturen als Spender dienen.

Zur Testung der parakrinen Signalmediation von stromalen Zellen auf Brustkrebszellen wurde CM von MSCs oder CAFs mit einer Endkonzentration von 20% zu den BCCs gegeben (MSC- oder CAF-CM ein Teil plus vier), zeitgleich zum Aussäen der BCC. Als Kontrolle diente „unkonditioniertes“ RPMI 1640 mit 10% FKS. Des Weiteren wurden zur Testung der parakrinen Signalmediation ebenfalls Experimente mit Zellkultureinsätzen (*transwell inserts*) durchgeführt. Dabei wurden Zellkultureinsätze mit 0,4 µm großen Poren (Greiner Bio-one, Frickenhausen, DE) verwendet. Diese ermöglichen den Austausch sezernierter Komponenten zwischen BCCs und stromalen Zellen, verhindern aber den direkten Zell-Zell-Kontakt. Dabei wurden MCF-7-Zellen auf dem Boden der Kavität einer 6-*well*-Platten ausgesät und diese bis zur Adhärenz kultiviert. Anschließend wurden

MSCs in den Zellkultureinsätzen platziert. Dabei wurden die Zellen in einem Verhältnis 1 zu 50 oder 1 zu 10 (MSC zu BCCs), äquivalent zu den normalen Ko-Kultur-Experimenten, ausgesät und für zwei Tage kultiviert. Zellkulturadditive, wie Inhibitoren (Tabelle 6) oder Aktivatoren (Tabelle 7), wurden direkt nach Einsaat der Brustkrebszellen in die Kulturgefäße appliziert. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel in identischer Konzentration wie bei den Additiven verwendet. Die Behandlungsdauer mit dem spezifischen Inhibitoren oder Aktivatoren richtete sich nach dem jeweiligen Experiment und/oder der Toxizität der Inhibitoren und ist im entsprechenden Methoden- und Ergebnissteil angegeben. Die verwendeten Konzentrationen der Zellkulturadditive sind in Tabelle 6 und in Tabelle 7 gelistet.

### 2.2.2. Quantitative Reverse-Transkription PCR (RT-qPCR)

#### 2.2.2.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem „*High Pure RNA Isolation Kit*“ von Roche (Basel, CH) durchgeführt, exakt nach Protokoll des Herstellers. Zellen in *monolayer*-Kulturen (2D-Kulturen) wurden einmal mit 1x DPBS gewaschen und mit „*lysis buffer*“ des „*High Pure RNA Isolation Kit*“ lysiert. Zellen aus 3D-Suspensions-Kulturen wurden mit Medium abgenommen und bei 1.000 rpm für 5 min in einer Multifuge 3 S-R zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 1x DPBS gewaschen und anschließend lysiert (s.o.). Die Gesamt-RNA-Isolierung wurde anschließend mit dem „*High Pure RNA Isolation Kit*“ durchgeführt, entsprechend der Herstellerangaben. Bei allen Proben wurde ein DNA-Verdau mit der DNase des *Kits* durchgeführt. Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde photometrisch bestimmt. Dafür wurde eine 1:50 Verdünnung der isolierten RNA angefertigt und die Absorption bei 260 nm in einem Ultrospec 1000-Photometer (Pharmacia Biotech/GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SE) gemessen. Reinheit und Qualität der RNA wurden über das Verhältnis der Absorption von 260 nm und 280 nm bestimmt.

#### 2.2.2.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels Reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion, unter Verwendung der „*Superscript II*“-Reversen-Transkriptase (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), durchgeführt. 1 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µl *Random*-Hexamer-Primer (100 ng/µl; Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe, Freiburg, DE), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (Eppendorf, Hamburg, DE), 0,5 µl RNasin Plus RNase Inhibitor (40 U/µl; Promega, Madison, USA) und 1 µl RNase-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 13,5 µl vermischt. Die RNase-freien Reaktionsgefäße (Qiagen, Hilden, DE) mit der Reaktionsmischung wurden 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zur kalten Reaktion wurden im nächsten Schritt 4 µl des 5x „*first strand buffer*“ und 2 µl einer 0,1 M DTT-Lösung hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 25°C für 2 min (*Primer-annealing*). Darauf folgend wurde die cDNA-Synthese gestartet, indem 0,5 µl „*Superscript II*“ (200 U/µl) hinzu pipettiert wurden und wurde bei 25°C für 10 min und bei 45°C für 50 min fortlaufend inkubiert. Die Reaktion wurde abschließend, durch eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15 min, gestoppt.

#### 2.2.2.3. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Zur Durchführung der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) wurde der „*Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix*“ (ABgene/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Dazu wurden 2 µl cDNA (1:10 verdünnt in Nuklease-freiem Wasser) mit 5 µl des „*2x SYBR Green Mix*“ sowie 0,625 µl der jeweiligen spezifischen Primer

(2  $\mu$ M; Eurofins MWG Operon, Ebersberg, DE) und 1,75  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser vermischt. Die qPCR wurde in einem Bio-Rad iCycler (Bio-Rad, München, DE) unter Verwendung dieses Protokolls durchgeführt: Nach Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 min wurden 40 identische Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus begann mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 s, gefolgt von einem *annealing*-Schritt bei 60°C für 1 min und einem Syntheseschritt bei 72°C für 1 min. Zur Überprüfung der Qualität der qPCR-Reaktion wurden Schmelzkurven der Reaktionsprodukte aufgenommen. Die Ergebnisdaten der qPCR wurden mit der „iQ5 Optical System“-Software Version 2.1 (Bio-Rad, München, DE) analysiert. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Die relativen mRNA-Level der Zielgene wurden mittels komparativer  $C_t$  ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )-Methode ermittelt. Die für die qPCR verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgelistet.

### 2.2.3. Microarray

$5 \times 10^5$  MCF-7-Zellen wurden jeweils alleine (Kontrolle) oder gemeinsam mit  $1 \times 10^4$  MSCs (eine MSC auf 50 MCF-7-Zellen) in die Kavität einer 6-well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden für je zwei Tage kultiviert und anschließend erfolgte die Extraktion und Isolierung der Gesamt-RNA. Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Qualität (mittels Agilent 2100 Bioanalyzer), die cRNA-Herstellung und die Analyse der Genexpression erfolgte durch Miltenyi Biotec. Zur Bestimmung der relativen mRNA-Mengen wurde der „Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray 8  $\times$  60K“ (zweifarbige) verwendet.

Zur Herstellung der cRNA wurden 100 ng gereinigter Proben-RNA mit dem „Low Input Quick AMP Labelling Kit“ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) umgeschrieben. Die cRNAs der Kontrollproben (MCF-7 alleine) wurden mit Cy3 und die MCF-7/MSC Ko-Kulturen (50:1) mit Cy5 markiert. Die lineare T7-basierende Amplifikation wurde ebenfalls mit Hilfe von Agilent-Reagenzien durchgeführt. Die Ausbeuten an cRNA und die Effizienz der Fluorophor-Markierung wurden mit einem ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Je 300 ng Cy3- und Cy5-markierte cRNA-Fragmente wurden kombiniert und mit dem „Agilent Gene Expression Hybridization Kit“ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) an einen Agilent 60-mer Oligo Microarray hybridisiert. Die imitierten Fluoreszenzsignale des hybridisierten Microarrays wurden anschließend mit einem Agilent DNA-Microarray-Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) detektiert. Die abschließende Bild- und Datenanalyse erfolgte mit der Agilent „Feature Extraction Software“. Die putativen Kandidatengene mit einer „fold change“  $>2$  und einem p-Wert  $<0,01$  wurden in einer Kandidatengenliste zusammengefasst. Abschließend wurden die Kandidatengenlisten der beiden unabhängigen Versuche abgeglichen und nur Gene, die in beiden Versuchen signifikant reguliert waren, verwendet. Ausgewählte Gene dieser Kandidatenliste wurden anschließend per qPCR validiert.

### 2.2.4. RNA-Interferenz-Experimente (Knock-down mit siRNA)

Zur Durchführung von Knock-downs (RNA-Interferenz) wurden *small interfering* RNAs (siRNAs) genutzt. Alle siRNAs, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 10 (2.1.5. siRNAs) aufgeführt.

Die Zellen wurden trypsinisiert, bei 1.000 rpm für 5 min in einer Multifuge 3 S-R zentrifugiert und einmal mit RPMI1640 Medium (ohne Serum) gewaschen. Anschließend wurde erneut bei 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Medium abgenommen. Die Zellen wurden in einem kleinem Volumen RPMI1640 Medium (ohne

Serum) resuspendiert, sodass eine Suspension von ca.  $8 \times 10^6$  Zellen pro ml entstand. Für jede Transfektion wurden 250  $\mu$ l dieser Zellsuspension in „*MicroPulser*“-Elektroporations-Küvetten (mit 0,4 cm breitem Spalt) pipettiert. Die Zellen wurden mit je 5  $\mu$ l (500 pmol) einer sterilen 100  $\mu$ M siRNA-Stammlösung (in RNase-freiem Wasser) vermischt und mit einem Bio-Rad „*GenePulserX-Cell*“ (bei 250 V und 800  $\mu$ F) elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in den Elektroporations-Küvetten 30 min auf Eis inkubiert, dann mit RPMI 1640 mit 10% FKS vermischt und in 6 oder 10 cm ( $\varnothing$ ) Zellkulturschalen (Nunc/Thermo Electron LED, Langensfeld, DE) ausgesät. Zur Vermeidung einer Verdünnung der siRNA wurden die transfizierten Zellen dicht ausgesät, um die Proliferation der Zellen zu minimieren. Als Kontroll-siRNA wurde eine spezifische siRNA gegen die nicht von humanen Zellen exprimierte Luciferase (siLuc) aus *Photinus pyralis* verwendet. Somit sollte die siLuc siRNA kein spezifisches Zieltranskript in humanen Zellen erkennen. Nach der Transfektion wurden die Zellen zwei bis drei Tage kultiviert, damit sich der Knock-down-Effekt der siRNA etablieren konnte. Anschließend wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet oder zur Gesamt-RNA- oder fraktionierten Proteinisolierung lysiert. Der Effekt der siRNAs wurde stets per qPCR validiert und, wenn möglich, ebenfalls per Western-Blot-Analyse bestätigt.

### 2.2.5. Proteinanalyse

#### 2.2.5.1. Zellyse und fraktionierte Proteinisolierung

Zellfraktionierung und Proteinextraktion erfolgte in Anlehnung an die von Cardone et al. beschriebene Methode (Cardone et al., 2007). Zellen aus 2D-Kulturen wurden einmal mit 1 x DPBS gewaschen, mit einem Zellschaber von Plastikoberfläche entfernt und kurz bis zur Sedimentation zentrifugiert. 3D-Suspensionskulturen wurden im Zellmedium zentrifugiert und anschließend mit 1 x DPBS gewaschen und nochmals kurz zentrifugiert. Nach diesen Schritten wurde für 2D- und 3D-Kulturen identisch verfahren. Die gewaschenen und zentrifugierten Zellen wurden in 400  $\mu$ l Puffer A (0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA und 10 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7,9)) resuspendiert und zur Homogenisierung fünfmal durch eine 20 G Kanüle gezogen. Dieses Lysat wurde bei 3.000 rpm (600 g) für 10 min (bei 4°C) zentrifugiert. Das Sediment diente zur Isolierung des Kernextrakts und der Überstand zur Gewinnung der Zytosol- und Plasmamembranisolierung. Für den Kernextrakt wurde dieses Sediment in Puffer C (1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 400 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,9)) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert sowie anschließend zur Abtrennung der DNA für 5 min bei 13.000 rpm (14.000 g) zentrifugiert. Zur Gewinnung der Zytosol- und Plasmamembranisolierung wurde der erste Überstand (Puffer A) durch schrittweise Zentrifugation bei 6.500 rpm (3.500 g) für 10 min und anschließend bei 13.000 rpm (14.000 g) für 60 min zentrifugiert. Das erste Sediment wurde verworfen und das zweite Sediment enthielt die Plasmamembranfraktion und wurde in Puffer D (1 mM DTT, 0,5 mM K-EDTA (pH 7,25), 5 mM HEPES (pH 7,9)) resuspendiert. Der letzte Überstand enthielt die Zytosolfraction (in Puffer A). Für den Nachweis des Proteins HIF1 $\alpha$  musste eine andere Proteinisolationmethode gewählt werden, weil HIF1 $\alpha$  einer streng regulierten und raschen Degradation unterliegt. Deswegen wurde eine Isolierungsmethode nach Kessler et al. (2010) verwendet. Dazu wurde der Zellrasen mit eiskaltem 1 x DBPS gewaschen und in 100 - 300  $\mu$ l (je nach Zelldichte) eiskaltem RIPA-Puffer (0,25% Desoxycholsäure, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 200 mM NaCl, 50 mM Tris HCl (pH 7,4), 1% TritonX-100) mit Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lysiert. Diese Lysate wurden für 20 min auf Eis inkubiert und dann bei 13.000 rpm (14.000 g) für 10

min bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand diente als Gesamt-Zell-Extrakt (WCE) für den Nachweis von HIF1 $\alpha$ .

### 2.2.5.2. Proteinquantifizierung

Die Gesamtproteinmenge wurde fluorometrisch mittels Qubit 1.0 Fluorometer (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt.

### 2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung der Proteinlysate wurde das diskontinuierliche elektrophoretische System der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) gewählt. Die SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse wurden wie von Dittmer et al. (2006) beschrieben, durchgeführt. Von den Fraktionen für Kern und Zytosol wurden je 10  $\mu$ g und von den Plasmamembranextrakten je 5  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Lysate wurden mit 4 x Probenpuffer versetzt und für 3 min bei 99°C inkubiert. Nun folgte die Auftragung der Proben auf das Gel (Tabelle 15; 10%iges Trenngel überschichtet mit einem 4%igen Sammelgel). Zur Determinierung der Molekulargewichte der Proteine wurden 5  $\mu$ l „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) als Größenmarker aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde in Elektrophoresepuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 10% SDS) durchgeführt, zunächst bei 50 V zur Konzentrierung der Proteine im Sammelgel, danach bei 150 V zur Separierung der Proteine im Trenngel.

**Tabelle 15. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel in der SDS-PAGE.**

Chemikalie	4% Sammelgel	10% Trenngel
Acrylamid - Lösung (40%; Acrylamid : Bisacrylamid 29 : 1)	0,5 ml	2,5 ml
10% APS (frisch hergestellt)	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,2% SDS)	2,5 ml	-
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)	-	2,5 ml
TEMED	5 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l

### 2.2.5.4. Western-Blot-Analyse

#### 2.3.5.4.1. Proteintransfer

Nach Durchführung der SDS-PAGE wurden die SDS-Gele mit Elektroblot-Puffer gewaschen (192 mM Glycin, 20% Methanol, 25 mM, Tris-Base), um überschüssiges SDS zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine mittels Elektroblothing vom Gel auf eine „Immobilon“-PVDF-Membran (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) übertragen. Dieser elektrische Transfer erfolgte in Elektroblot-Puffer bei 200 V für 1 h.

#### 2.3.5.4.2. Immunodetektion spezifischer Proteine

Alle Schritte des spezifischen Proteinnachweises wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach erfolgreichem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde diese mit 2% Milchpulver in Waschpuffer (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) für zehn Minuten geblockt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit dem spezifischen, primären Antikörper (Tabelle 8) in Waschpuffer mit 0,2% Milchpulver. Anschließend wurde die Membran dreimal, für je 5 min, mit Waschpuffer mit 0,05% Tween-20 gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Nach diesem Schritt wurde die Membran für 1 h mit einem sekundären Antikörper (je nach Ursprungsorganismus des primären Antikörpers, gerichtet gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers, HRP-gekoppelt) in Waschpuffer mit 0,2% Milchpulver inkubiert. Darauf folgend

wurde die Membran dreimal für 20 min mit Waschpuffer mit 0,05% Tween-20 gewaschen. Zur Visualisierung der Peroxidase-Aktivität mittels Chemolumineszenz wurde „ECLPlus“ (Lonza, Basel, CH) verwendet und die emittierten Photonen in der Dunkelkammer mit einem Hyperfilm „ECL“ (GE Healthcare Europe, Freiburg, DE) detektiert. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Probenauftragung wurden Fraktions-spezifische Kontrollen verwendet und die Gele zusätzlich mit Coomassie gefärbt.

### 2.2.5.5. Gelfärbung mit Coomassie

Nach der Western-Blot-Analyse wurden die Gele mit einer modifizierten „SimplyBlue SafeStain“-Prozedur (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gefärbt. Zur Entfernung von SDS-Rückständen (nach der Western-Blot-Analyse) wurden die Gele je dreimal in der Mikrowelle mit Wasser aufgeköcht und für 5 min auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden Gele mit einer Coomassie-Lösung (80 mg Coomassie-Brilliant-Blau R-250 in 1 l bidest. Wasser, plus 3,5 ml 32% HCl) gefärbt und später mit Wasser entfärbt.

### 2.2.5.6. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Zur Bestimmung der Proteinmengen von IGFBP5 wurde der Sandwich-ELISA „RayBio Human IGFBP-5 ELISA Kit“ (Raybiotech, Norcross, GA, USA) verwendet. Die Durchführung dieses Festphasen-Enzymimmuno-Assays erfolgte exakt nach dem Protokoll des Herstellers.

Um den Proteingehalt von Insulin in den Proben bestimmen zu können, wurde der Sandwich-ELISA „HÖLZEL Insulin ELISA“ (Hölzel Diagnostika, Köln, DE) benutzt. Zur Durchführung dieses Festphasen-Enzymimmunoassays wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

Die Messung der Absorption (450 nm) der ELISAs erfolgte an einem „Spectra Max 340PC“-Mikrotiterplattenlesegerät (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Die Analyse der Daten wurde mit der „SOFTmax PRO 3.1.2“-Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt.

### 2.2.5.6. Antibody-Array

Zur Bestimmung der von MSCs/CAFs sezernierten Chemokine wurde der „RayBio Human Obesity Antibody Array C1“ (Raybiotech, Norcross, GA, USA) verwendet. Dieser basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA und erlaubt die Detektion von 62 Proteinen (Tabelle 16).

**Tabelle 16. Nachweisbare Proteine des „RayBio Human Obesity Antibody Array C1“ (Raybiotech, Norcross, GA, USA).**

Die Daten wurden der Homepage des Herstellers entnommen (<http://www.raybiotech.com/c-series-human-obesity-array-1-2.html>).

TNFRSF9/CD137	ACE-2	Adiponectin	Complement Factor D	AgRP
Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	ANGPTL4	C-Reactive Protein	ENA-78 (CXCL5)
Fas(TNFRSF6/Apo-1)	FGF-6	Growth Hormone	HCC-4 (CCL16)	IFN- $\gamma$
IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGF-1	IGF-1 R
IL1 R4	IL1 R1	IL10	IL11	IL12 p70
IL1 $\alpha$ (IL-1 F1)	IL1 $\beta$ (IL-1 F2)	IL6	IL6 R	IL8 (CXCL8)
Insulin	IP-10 (CXCL10)	Leptin R	Leptin	LIF
Lymphotactin	MCP-1(CCL2)	MCP-3 (MARC/CCL7)	M-CSF	MIF
MIP-1 $\beta$ (CCL4)	MSP $\alpha/\beta$	Osteoprotegerin	Oncostatin M	PAI-1
PARC (CCL18)	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	RANTES (CCL5)
Resistin	Serum Amyloid A	SDF-1 $\alpha$ (CXCL12 $\alpha$ )	TNF RII (TNFRSF1B)	TNF RI
TECK (CCL25)	TGF $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	TNF $\alpha$
VEGF-A	XEDAR			

## 2.2.6. Funktionale Assays

### 2.2.6.1. Klon-Assay

Zur Messung des Wachstums einzelner Klone von Brustkrebszellen wurden Klon-Assays durchgeführt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und je  $3 \times 10^4$  Zellen in 10 cm ( $\emptyset$ ) Zellkulturschalen in 10 ml RMPI1640 mit 10% FKS ausgesät. Die Zellen wurden mit MSCs, CAFs, 20% MSC-CM, 20% CAF-CM, 1,7  $\mu$ M Insulin und/oder 0,1  $\mu$ M Fulvestrant (Kirkegaard et al., 2014) inkubiert. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Probe. Nach fünf und/oder sieben Tagen im Inkubator wurde das Wachstum individueller Zellklonkolonien bestimmt. Dazu wurden pro Probe von mindestens 50 Klonen an einem „Axiovert 135“ Mikroskop mit einer „AxioCAM MRc5“-Kamera (Zeiss, Oberkochen/Jena, DE) mikroskopische Aufnahmen gemacht und die Fläche dieser Klone mit der „AxioVision R 4.5 Imaging“-Software (Zeiss, Oberkochen/Jena, DE) vermessen. Einzelne Zellen wurden nicht berücksichtigt. Die Auswahl der Klone erfolgte randomisiert.

Bei Knock-down-Experimenten (RNA-Interferenz, Kapitel 2.2.4., Seite 29) wurden die mit siRNA elektroporierten Zellen zwei Tage kultiviert, um die Wirkung der siRNA zu ermöglichen, bevor der Klon-Assay durchgeführt wurde.

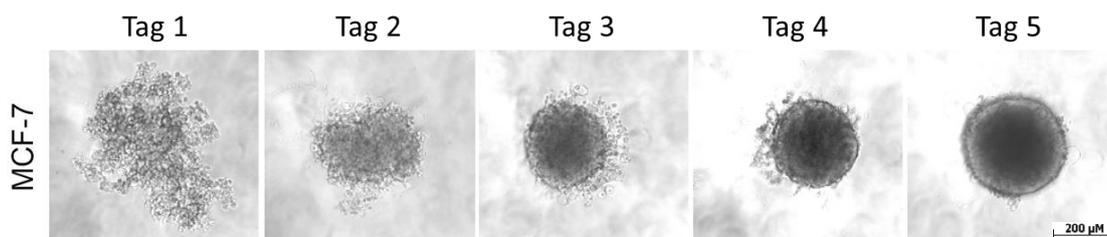
### 2.2.6.2. ATP-Assay

Um das Zellwachstum bei höheren Zelldichten bestimmen zu können, wurden Lumineszenz-basierte Messungen von zellulärem ATP mit dem „Vialight Plus Kit“ (Lonza, Basel, CH) durchgeführt. Die Menge des ATPs entspricht der Menge vitaler Zellen. Das aus den lysierten Zellen freigesetzte ATP wird für die Katalyse von Luciferin durch Luciferase benötigt, wobei die dabei emittierten Photonen mit der im Lysat vorhandenen ATP-Menge korrelieren. Dazu wurden  $1 \times 10^4$  oder  $3 \times 10^4$  Zellen (für langsam proliferierende Zelllinien) pro Kavität in 24-well-Platten ausgesät. Zeitgleich zur Aussaat wurden 0,1  $\mu$ M Fulvestrant (Kirkegaard et al., 2014) und/oder 20% CAF-CM oder keines von beiden zu den Zellen appliziert. Nach fünf und/oder sieben Tagen wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 1 x DPBS gewaschen und mit 1 x Lysis-Puffer (verdünnt aus 3 x Lysis-Puffer mit 1 x DPBS) lysiert. Die Lysate wurden in einer Mikrozentrifuge bei 4.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 75  $\mu$ l des geklärten Lysates mit 50  $\mu$ l AMR plus Reagenz (Luciferase-Lösung

mit Luciferin, aus „*Vialight Plus Kit*“) vermischt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Die Luciferase-Aktivität wurde über die emittierten Photonen dieser Mischung an einem Sirius Luminometer bestimmt (Berthold Detection Systems, Pforzheim, DE).

### 2.2.6.3. 3D-Sphäroid-Assay

Zur Beobachtung des Wachstums von einzelnen 3D-Aggregaten/Sphäroiden wurden 3D-Suspensionskulturen (Sphäroid-Assay) mit 2% Seakem GTG Agarose (in DPBS, Lonza, Basel, CH) beschichteten 96-*well*-Platten (TPP, Trasadingen, CH) durchgeführt. Die Agaroseschicht verhindert ein Anheften der Zellen und ermöglicht den Zellen die Ausbildung von Zellaggregaten und Sphäroiden (Dittmer et al., 2008). Dazu wurden die Brustkrebszellen trypsinisiert, gezählt und je 5.000 Zellen pro Kavität in eine beschichtete 96-*well*-Platte transferiert. Die Zellen wurden mit 20% MSC-CM, 20% CAF-CM, 1,7  $\mu\text{M}$  Insulin und/oder 0,01  $\mu\text{M}$  Fulvestrant (Kirkegaard et al., 2014) inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils eine unbehandelte Probe. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde das Wachstum der Sphäroide beobachtet (Abbildung 8). Dazu wurden pro Kavität/Sphäroid an einem „*Axiovert 135*“ Mikroskop mit einer „*AxioCAM MRc5*“-Kamera (Zeiss, Oberkochen/Jena, DE) eine mikroskopische Aufnahme erstellt und die Fläche des Sphäroids mit der „*AxioVision R 4.5 Imaging*“-Software (Zeiss, Oberkochen/Jena, DE) ermittelt.



**Abbildung 8. Zeitreihe zur Bildung von Sphäroiden in 3D-Suspensionskulturen.**

Sphäroid-Assay von 3D-Suspensionskulturen, mit je 5.000 MCF-7-Zellen pro Kavität, in einer mit 2% Seakem GTG Agarose beschichteten 96-*well*-Platte. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen beobachtet. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit 20-facher Vergrößerung an einem Axiovert 135 Mikroskop mit einer „*AxioCAM MRc5*“-Kamera durchgeführt. Die hier gezeigten Bilder sind repräsentativ für den zeitlichen Verlauf der Sphäroidbildung.

### 2.2.7. Statistische Analyse

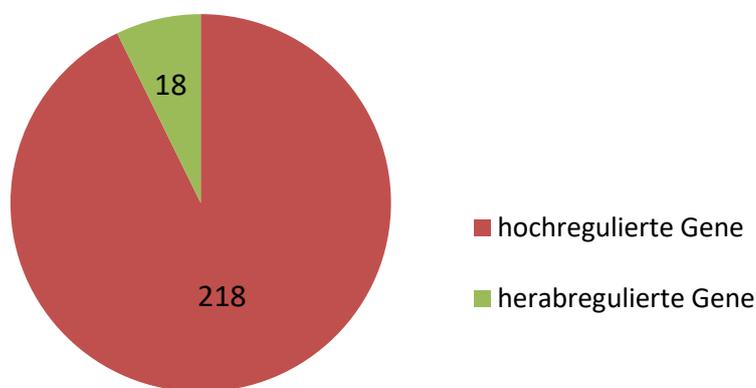
Zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse wurden verschiedene Signifikanztests verwendet. Die Daten aus dem Klon-Assay und dem ATP-Assay wurden mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgewertet. Für die anderen Mittelwertvergleiche zweier Gruppen wurde der Zweistichproben-t-Test genutzt. Zur grafischen Visualisierung wurden Signifikanzen mit Sternchen gekennzeichnet, wobei ein p-Wert von  $p \leq 0,05$  als signifikant gewertet wurde. Für alle Graphen gilt: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. cRNA-Microarray von MCF-7/MSC-Kulturen

##### 3.1.1. Ergebnisse des cRNA-Microarrays von MCF-7/MSC-Kulturen

Zur Testung des Effektes von humanen multipotenten/mesenchymalen Stroma/Stammzellen (MSC) auf die Genexpression von Brustkrebszellen wurden  $5 \times 10^5$  MCF-7-Zellen mit  $1 \times 10^4$  MSC-Zellen ausgesät und für zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde für je zwei unabhängige Experimente ein cRNA-Microarray durchgeführt und die mRNA-Mengen der Ko-Kultur mit der basalen mRNA-Expression der MCF-7-Zellen alleine (Kontrolle) verglichen. Alle Gene, deren Expression in beiden Experimenten mit einem „fold change“  $\geq 2$  signifikant ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ) verändert war, sind in Tabelle 1 des Anhangs aufgelistet. Die Expression von 236 Genen war signifikant im Verhältnis zur Kontrolle (MCF-7-Zellen alleine) verändert, 218 Gene davon zeigten eine erhöhte und 18 Gene eine verminderte Expression (Abbildung 9).



**Abbildung 9. cRNA-Microarray-Ergebnisse von MCF-7/MSC-Kulturen (50:1) im Vergleich zu MCF-7-Zellen alleine (Kontrolle).**

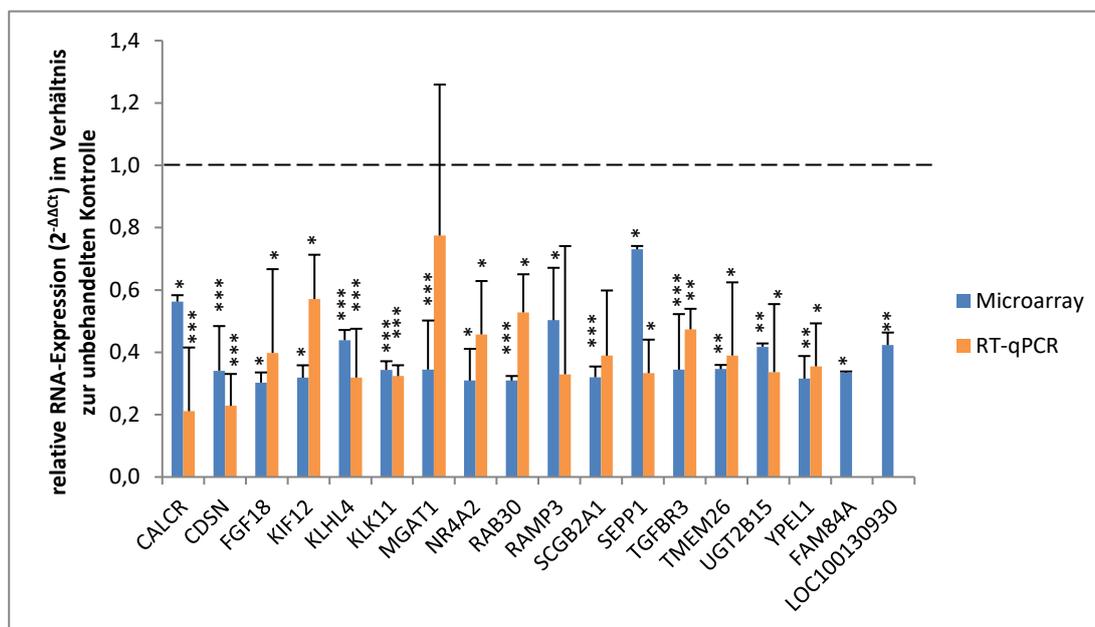
Verwendet wurde der *Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8 × 60K* für MCF-7/MSC-Kultur (50:1) sowie für MCF-7-Zellen alleine (Kontrolle), nach je zwei Tagen Kulturdauer. Insgesamt war die Expression von 236 Genen in zwei unabhängigen Experimenten mit einem „fold change“  $\geq 2$  und  $p$ -Wert  $\leq 0,01$  gegenüber der Kontrolle verändert. 218 Gene waren in ihrer Expression erhöht (rot) und 18 (grün) gesenkt. cRNA = coding RNA, MSC = mesenchymale Stammzellen

Um die *in-vivo*-Situation bestmöglich abzubilden, wurde für die *Microarray*-Analyse eine „direkte“ Ko-Kultur gewählt, bei der Zellen einen direkten Kontakt zueinander haben können. Diese berücksichtigte sowohl parakrine als auch juxtakrine Zell-Zell-Kommunikations-Mechanismen sowie Feedbackmechanismen einer *vice versa* verlaufenden Kommunikation (*cross-talk*). Allerdings wurden dadurch ebenfalls mRNAs detektiert, die in MSCs statistisch um mehr als Faktor 100 stärker exprimiert wurden (im Verhältnis zu MCF-7-Zellen). Diese Gene wurden als statistische Hochregulationen angezeigt, sind aber mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die mRNA der MSCs „kontaminiert“ und waren in Realität in den MCF-7-Zellen nicht hochreguliert. Der Nachweis dieser intrinsischen MSC-mRNA könnte somit ein Grund für die Mehrzahl an nachgewiesenen hochregulierten Genen gewesen sein. Es fanden sich unter den „hochregulierten Genen“ (Tabelle 1 des Anhangs) eine Vielzahl von mRNAs, die für mesenchymale Gene, wie die Protease PAI-1 (Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1), den MSC-Marker CD90 (*cluster of differentiation 90*), den Transkriptionsfaktor ZEB-1 (*zinc finger E-box-binding homeobox 1*) oder für Extrazellulärmatrixproteine wie die Kollagene (COL1A2, COL8A1, COL4A1, COL1A1, COL3A1, COL6A1, COL6A3 und COL5A2) kodierten. Diese Gene wurden als „falsch positiv“ in der *Microarray*-

Analyse bewertet, da deren RNA wahrscheinlich aus den MSC stammte und nicht in den MCF-7-Zellen hochreguliert wurden. Bei den 18 herunterregulierten Genen (Abbildung 9) sollte theoretisch allein die Expression in MCF-7-Zellen gemessen worden sein. Hier könnte eine Expression dieser Gene in MSCs „höchstens“ den Effekt reduziert haben. Aus diesen Gründen wurde der primäre Fokus auf die herunterregulierten Gene gelegt und deren Expressionsänderung durch MSCs per RT-qPCR validiert (einige prominente Vertreter der hochregulierten Gene wurden gemessen und waren ausschließlich in den MSC stark überexprimiert, Daten nicht gezeigt).

### 3.1.2. Validierung der Ergebnisse des cRNA-Microarrays

Die 18 herunterregulierten Gene (Abbildung 9) konnten rein mathematisch nicht von intrinsischer mRNA der MSCs stammen und müssen spezifisch in den MCF-7-Zellen reguliert worden sein. Von den 18 Genen wurden LOC100130930, weil es ein unbekanntes Gen ist, und FAM84A, weil es spezifisch in neurologischen Geweben exprimiert wird, nicht weiter analysiert. Bei den verbliebenen 16 Genen wurden die *Microarray*-Daten per RT-qPCR überprüft (Abbildung 10), wobei bei 14 Transkripten eine MSC-induzierte Expressionsreduzierung erfolgreich validiert werden konnte.



**Abbildung 10. Validierung ausgewählter *Microarray*-Ergebnisse von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (50:1) mittels RT-qPCR.**

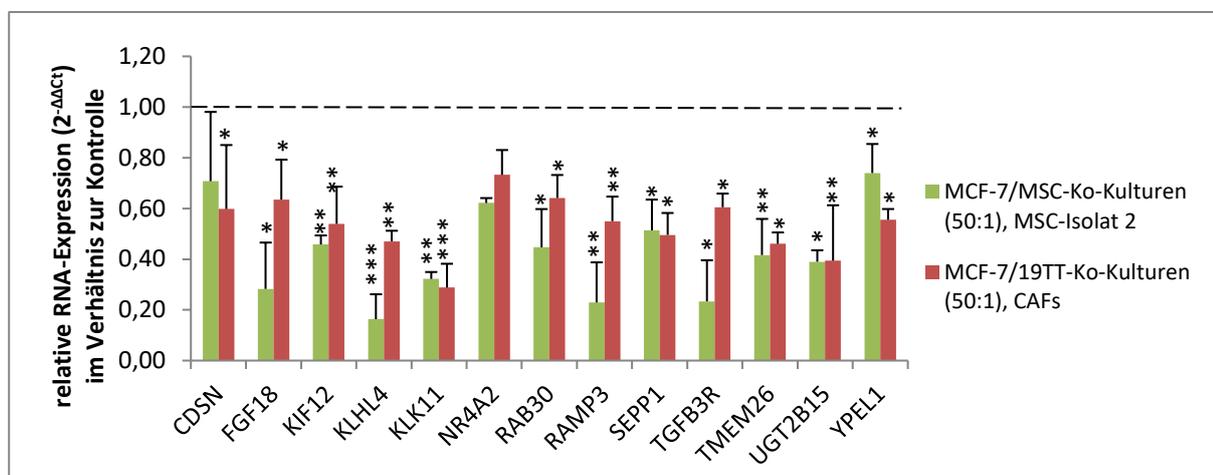
In blau (■) sind die herunterregulierten Gene aus dem „*Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8 × 60K*“ und in orange (■) die Validierung dieser Gene mittels RT-qPCR zu sehen. Die relative Quantifizierung der RT-qPCR erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Zellen ohne MSCs; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). CALCR = Calcitoninrezeptor, CDSN = Corneodesmosin, FAM84A = family with sequence similarity 84 member A, FGF18 = fibroblast growth factor 18, KIF12 = kinesin family member 12, KLHL4 = kelch-like family member 4, KLK11 = kallikrein-related peptidase 11 (auch bekannt als Kallikrein 11), MGAT1 = Alpha-1,3-Mannosyl-Glycoprotein 2-beta-N-Acetylglucosaminyl-Transferase 1, MSC = mesenchymale Stammzelle, NR4A2 = nuclear receptor subfamily 4 group A member 2, RAB30 = ras-related in brain 30, RAMP3 = receptor activity modifying protein 3, SCGB2A1 = secretoglobulin family 2A member 1, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = transforming growth factor beta receptor 3, TMEM26 = transmembrane protein 26, UGT2B15 = UDP-Glucuronosyltransferase 2B15, YPEL1 = yippee-like 1

SCGB2A1 und MGAT1 waren nur im *Microarray*, nicht aber in den mit RT-qPCR analysierten Proben statistisch signifikant herunterreguliert (Abbildung 10). In weiteren unabhängigen Experimenten mit MCF-7/MSC-Ko-

Kulturen, bei denen verschiedene MSC-Isolate benutzt wurden, wurden SCGB2A1 und MGAT1 ebenfalls nicht signifikant gesenkt (Daten nicht gezeigt). Somit wurden diese Gene aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Die restlichen 14 herunterregulierten, validierten Gene zeigten starke unterschiedliche Expressionen in Abwesenheit von MSCs, wobei CALCR teilweise an der Nachweisgrenze exprimiert wurde und von Experiment zu Experiment hohen basalen Expressionsschwankungen unterlag. CALCR wurde daher nur in ausgewählten Experimenten mitbestimmt. Somit konnten die MSC-bedingten Expressionsänderungen von 13 Genen erfolgreich durch RT-qPCR validiert werden. Folgend wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit weiteren stromalen Zellen überprüft.

### 3.1.3. Test der Ergebnisse des cRNA-Microarrays mit weiteren Stroma-Zellen

Um weitere Evidenz zur Regulation der verbleibenden 13 MSC-responsiven Gene zu erhalten, wurden diese unter verschiedenen stromalen Bedingungen analysiert. Zum Ausschluss eines patientenspezifischen Effektes der MSCs wurde ein weiteres MSC-Isolat getestet (Abbildung 11).

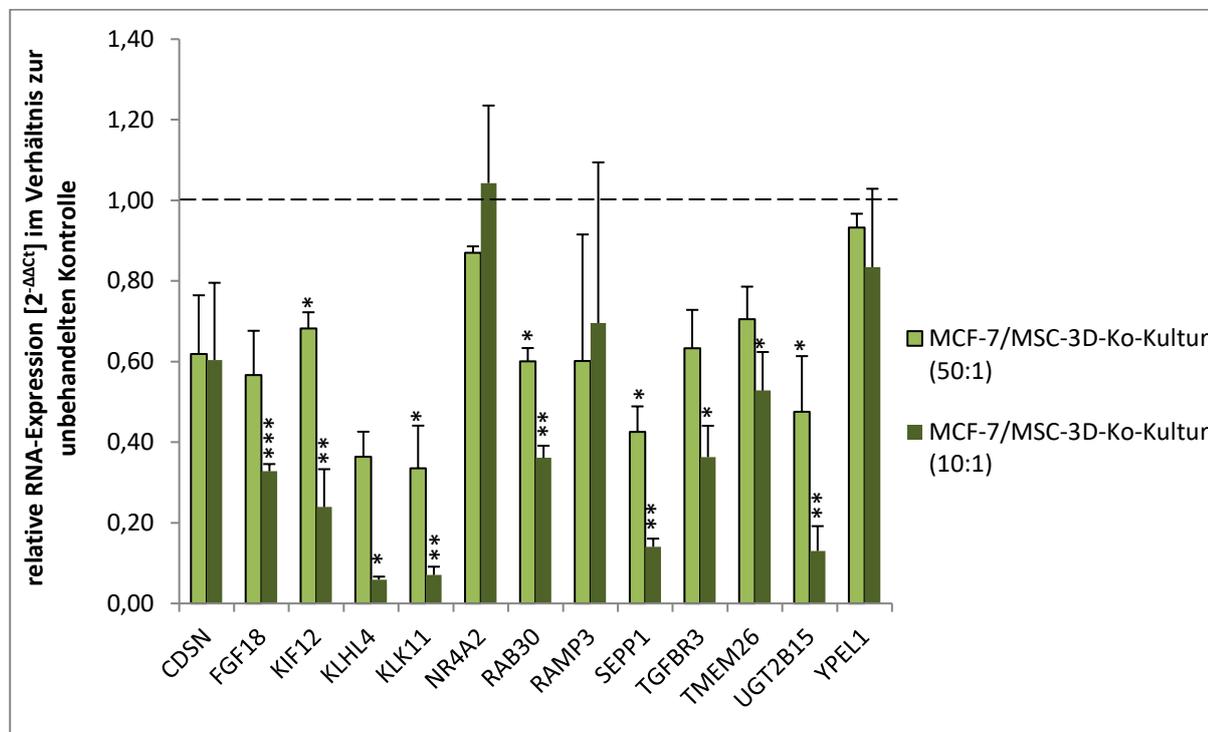


**Abbildung 11. Effekte eines zweiten MSC-Isolates und von 19TT CAFs auf die 13 MSC-responsiven Gene.**

RNA-Expressionen von 13 MSC-responsiven Genen aus RT-qPCR-Analysen von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (50:1; ■) und MCF-7/19TT-Ko-Kulturen (50:1; ■), je nach zwei Tagen Kulturdauer. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Zellen ohne stromale Zellen; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). CAF = Karzinom-assoziierte Fibroblasten, CDSN = Corneodesmosin, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), MSC = mesenchymale Stammzellen, NR4A2 = *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*, RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like 1*

Von den 13 MSC-responsiven Genen wurden alle durch das zweite MSC-Isolat reprimiert, die Daten für CDSN und NR4A2 waren statistisch nicht signifikant. Zur weiteren Validierung der Daten wurde überprüft, ob andere/weitere Zellen des Tumormikromilieus diese Gene regulieren. Dazu wurde die immortalisierte Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAFs)-Zelllinie 19TT (Martens et al., 2003) gemeinsam mit den MCF-7 in einer Ko-Kultur (50:1) inkubiert. Die CAFs regulierten die 13 MSC-responsiven Gene, bis auf NR4A2, signifikant negativ (Abbildung 11). Somit wurde gezeigt, dass CAFs in der Lage sind, den Effekt der MSCs auf die 13 Gene nachzuahmen.

Um weitere Evidenz für die Herunterregulation der MSC-responsiven Gene zu schaffen, wurden 3D-Suspensionskulturen durchgeführt, in denen MCF-7-Zellen zu Sphäroiden aggregieren. Die Sphäroid-Bildung ähnelt der Knospung bei der Entwicklung des Brustgewebes und entspricht damit eher der *in-vivo*-Situation als Kulturen mit adhärennten Zellen. Durch Verwendung verschiedener MCF-7-MSC-Verhältnisse wurde zusätzlich eine Dosisabhängigkeit überprüft. Aufgrund dessen wurden MCF-7/MSC-Ko-Kulturen im Verhältnis von 50:1 und 10:1 zwei Tage lang kultiviert und anschließend analysiert (Abbildung 12).



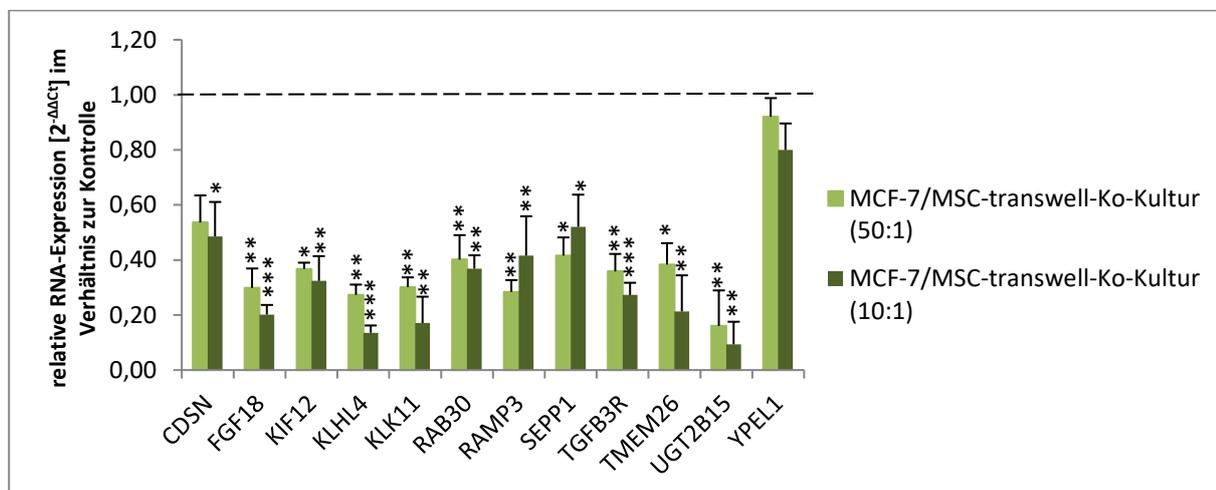
**Abbildung 12. RT-qPCR-Analyse von MCF-7/MSC-3D-Ko-Kulturen (50:1 und 10:1) der 13-MSC responsiven Gene.** RNA-Expressionen von MCF-7/MSC-3D-Ko-Kulturen (50:1; ■) und MCF-7/MSC-3D-Ko-Kulturen (10:1; ■), je nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analysen. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-3D-Kulturen ohne MSCs; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). CDSN = Corneodesmosin, FGF18 = fibroblast growth factor 18, KIF12 = kinesin family member 12, KLHL4 = kelch-like family member 4, KLK11 = kallikrein-related peptidase 11 (auch bekannt als Kallikrein 11), MSC = mesenchymale Stammzellen, NR4A2 = nuclear receptor subfamily 4 group A member 2, RAB30 = ras-related in brain 30, RAMP3 = receptor activity modifying protein 3, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = transforming growth factor beta receptor 3, TMEM26 = transmembrane protein 26, UGT2B15 = UDP-Glucuronosyltransferase 2B15, YPEL1 = yippee-like 1

Der Effekt von MSCs auf die Genexpression blieb auch unter dreidimensionalen Bedingungen erhalten (Abbildung 12). Die Expression von 9 der 13 getesteten Gene war signifikant durch MSCs in MCF-7-Zellen vermindert. Diese neun Gene (FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, SEPP1, TGFBR3, TMEM26 und UGT2B15) zeigten alle eine Dosisabhängigkeit und wurden durch eine höhere MSC-Anzahl stärker herunterreguliert.

Da CDSN, NR4A2 und YPEL1 nicht vom zweiten MSC-Isolat (Abbildung 11) und ebenfalls nicht in 3D-Suspensionskulturen (Abbildung 12) signifikant in der Expression vermindert waren, während CDSN und YPEL1 signifikant von den 19TT CAFs reguliert wurden (Abbildung 11), wurde NR4A2 aus den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen. Die verbliebenen 12 „stromal regulierten“ Gene (CDSN, FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, TMEM26, UGT2B15, YPEL1) wurden nachfolgend auf ihre Regulationsmechanismen analysiert.

### 3.2. Analyse des Zell-Zell-Kommunikationsmechanismus zur Regulation der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7-Zellen

Da die vorherigen Experimente zeigten, dass die 12 „stromal regulierten“ Gene CDSN, FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, TMEM26, UGT2B15 und YPEL1 in Ko-Kulturen mit verschiedenen MSC-Isolaten und 19TT CAFs in den Expressionen gesenkt wurden, wurde untersucht, ob diese Gene über einen parakrinen oder juxtakrinen Mechanismus reguliert werden. Dazu wurden *transwell*-Experimente mit MCF-7/MSC-Ko-Kulturen durchgeführt, wobei die zwei Zelltypen durch eine Membran mit 0,4 µm großen Poren getrennt waren. Poren mit einem Durchmesser von 0,4 µm ermöglichen einen beidseitigen Austausch sezernierter Faktoren, verhindern jedoch eine Durchwanderung von Zellen durch die Poren und somit einen direkten Zell-Zell-Kontakt. Es wurden *transwell*-Experimente mit MCF-7/MSC-Ko-Kulturen in einem Verhältnis von 50:1 (identisch zum ursprünglichen Ko-Kulturrexperiment) sowie mit 10:1 durchgeführt (Abbildung 13), da der Zellabstand in den *transwell*-Experimenten wesentlich höher ist (als in Ko-Kulturen) und eine Diffusionslimitierung ausgeschlossen werden sollte.



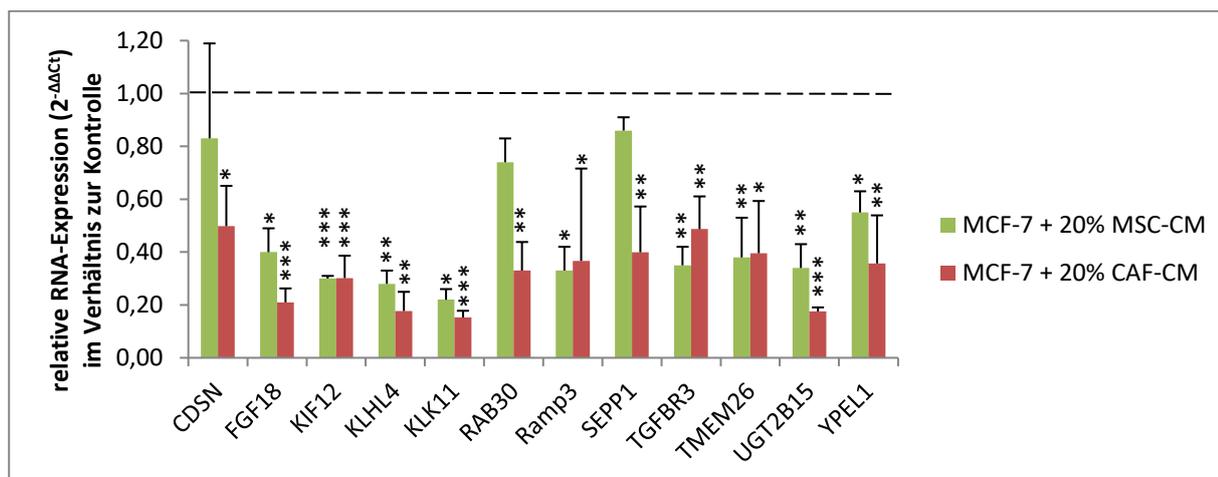
**Abbildung 13. Effekte von MSCs in *transwell*-Ko-Kulturen (50:1 oder 10:1) auf die Expression der 12-MSC-responsiven Gene in MCF-7.**

RNA-Expressionen von MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (50:1; ■) und MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (10:1; ■), je nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analysen. Es wurden *transwell*-Einsätze mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm verwendet. Diese verhindern einen direkten Zell-Zell-Kontakt. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-*transwell*-Kulturen ohne MSCs; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). CDSN = Corneodesmosin, FGF18 = fibroblast growth factor 18, KIF12 = kinesin family member 12, KLHL4 = kelch-like family member 4, KLK11 = kallikrein-related peptidase 11 (auch bekannt als Kallikrein 11), MSC = mesenchymale Stammzellen, NR4A2 = nuclear receptor subfamily 4 group A member 2, RAB30 = ras-related in brain 30, RAMP3 = receptor activity modifying protein 3, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = transforming growth factor beta receptor 3, TMEM26 = transmembrane protein 26, UGT2B15 = UDP-Glucuronosyltransferase 2B15, YPEL1 = yippee-like 1

MSCs senkten in MCF-7-Zellen in *transwell*-Ko-Kulturen signifikant die Expression aller getesteten Gene, bis auf YPEL1. Es war eine tendenzielle Dosisabhängigkeit zu beobachten und die Gene KLHL4 und KLK11 waren signifikant stärker durch eine höhere MSC-Anzahl herunterreguliert (Abbildung 13). Diese Ergebnisse deuteten auf eine parakrine Regulation der Gene hin, die somit ohne direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt wurde.

Ob diese parakrine Regulation einseitig von den stromalen Zellen auf die Brustkrebszellen (unidirektional) vermittelt wurde oder ein *cross-talk* zwischen Zellen erfolgen musste, wurde mit der Gabe von konditioniertem

Medium (von MSCs und CAFs) zu MCF-7-Zellen überprüft. Dazu wurden MCF-7-Zellen ausgesät und mit 20% konditioniertem Medium von MSCs (MSC-CM) oder mit 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) zwei Tage lang inkubiert (Abbildung 14).



**Abbildung 14. Effekte von MSC-CM und CAF-CM auf die 13-MSC-Gene in MCF-7-Zellen.**

RNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen mit 20% konditioniertem Medium von MSCs (MSC-CM ■) oder mit 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM ■), je nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analysen. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Kulturen ohne konditioniertes Medium; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CDSN = Corneodesmosin, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), MSC = mesenchymale Stammzellen, NR4A2 = *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*, RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippepe-like 1*

Das MSC-CM konnte die Expressionslevel aller Gene, bis auf CDSN, RAB30 und SEPP1, signifikant senken (Abbildung 14). CAF-CM war in seiner Wirkung stärker und reprimierte alle analysierten Gene signifikant. Der schwächere Effekt des MSC-CMs ist wahrscheinlich mit den Kulturbedingungen zu begründen, da diese mit max. 50% Konfluenz kultiviert werden konnten und die CAFs wesentlich dichter wachsen und so mehr Zellen an der Produktion des CMs beteiligt waren. Da beide konditionierten Medien mindestens tendenziell und größtenteils signifikant die Gene herunterregulierten, deutet dies auf einen unidirektionalen und parakrinen Regulationsmechanismus hin. Da das CAF-CM den Effekt der MCF-7/MSC-Kulturen und/oder MCF-7/19TT-Ko-Kulturen nachahmen konnte (bzw. der Effekt parakrin vermittelt wurde), wurden die folgenden Versuche mit CAF-CM durchgeführt. CAF-CM ist besser standardisierbar als MSC-CM, welches sich mit jeder Passagierung der MSCs aufgrund langsam einsetzender Seneszenz ändert. Zudem sind Variationen aufgrund unterschiedlicher Isolate ausgeschlossen. Die Benutzung von CM im Allgemeinen bringt den Vorteil, dass „Kontaminationen“ mit Brustkrebsmaterial unwahrscheinlicher sind. Des Weiteren standen die 19TT-CAFs als immortalisierte Zelllinie in großer Anzahl zur Verfügung und waren einfacher genetisch manipulierbar.

### 3.3. Analyse potenziell beteiligter Signaltransduktionsmechanismen an der Regulation der „stromal reprimierten“ Gene in MCF-7-Zellen

#### 3.3.1. Identifikation beteiligter Signaltransduktionswege

In den vorherigen Experimenten konnte ein parakriner Effekt von MSCs und CAFs auf die Genexpression von MCF-7-Zellen nachgewiesen werden. Nun wurde analysiert, über welche Signaltransduktionswege diese „stromal regulierten“ Gene beeinflusst werden können. Außerdem sollte diese Versuchsreihe erste Ansätze liefern, um den von MSCs/CAFs sezernierten parakrinen Effektor identifizieren zu können.

Um erste Hypothesen zu generieren, wurden ausgewählte Inhibitoren und Aktivatoren (Konzentrationen in Tabelle 7, Abschnitt 2.1.3. Zellkulturadditive) wichtiger onkologischer Signaltransduktionswege zu den MCF-7-Zellen appliziert (Tabelle 17) und für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Effekte auf die mRNA-Expression der „stromal reprimierten“ Gene bestimmt. Die RT-qPCR-Analysen dieser Experimente sind in Tabelle 17 als *heatmap* aufgeführt. Wegen einer besseren Übersichtlichkeit wurde in Tabelle 17 auf die Angabe der p-Werte und Standardabweichungen verzichtet. Diese sind in einer separaten Variante der *heatmap* im Anhang (Tabelle 2) aufgeführt.

Der PDGF-Rezeptor-Inhibitor Ki11502 sowie der FGFR-/VEGFR-Inhibitor PD173074 konnte keines der getesteten Gene regulieren (Tabelle 17). Somit wurden diese Rezeptoren aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

RKI inhibiert die *Rho-associated protein kinase* (ROCK). Die Serin-Threonin-Kinase Rock ist ein wichtiger *downstream*-Effektor der GTPase RhoA und ist ein Schlüsselregulator der Zytoskelett-Organisation und Zellmigration. Da stromale Zellen häufig die Migration von Krebszellen beeinflussen, ist ROCK ein interessantes Zielprotein. RKI konnte in diesem Experiment nur die Expression von NR4A2 signifikant senken (Tabelle 17). Somit wurde ROCK als ein möglicher Modulator ausgeschlossen.

SRCI ist ein Inhibitor der *cellular sarcoma* (Src)-Tyrosin-Kinase. Dieser kann weitere Proteine bzw. Signalkaskaden, wie z.B. STAT3, PI3K/AKT, FAK oder RAS/MEK/ERK aktivieren. Somit nimmt Src eine Schlüsselrolle in der intrazellulären, cytosolischen Signaltransduktion ein (Frame, 2002). SRCI konnte nur KIF12 signifikant in der Expression senken (Tabelle 17). Dies deutet daraufhin, dass das Proto-Onkogen Src eine untergeordnete Rolle in der Regulation der „stromal reprimierten“ Gene einnimmt.

Die Her-Protein-Familie ist im Brustkrebs von zentraler Bedeutung. Deswegen wurde durch Inhibition von Her-1 (EGFR), Her-2 (Neu) und Her-4 mit ERBBi deren Einfluss auf die „stromal reprimierten“ Gene getestet. ERBBi senkte nur KIF12 signifikant in der Expression (Tabelle 17) und somit wurde die Her-Protein-Familie aus den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen.

Die Effekte und Rolle des *transforming growth factor beta* (TGFB) im Brustkrebs sind in der Literatur (Massagué, 2012; Pickup et al., 2013) und in der Arbeitsgruppe (Dissertation Ilka Oerlecke, 2013) sehr gut bekannt. Durch die Hemmung des TGFB-Rezeptors 1 (TGFB1) mit Ly364947 wurden CDSN, KIF12 und TGFB3R signifikant in der Expression erhöht (Tabelle 17). Die Steigerung des mRNA-Niveaus von TGFB3R durch Inhibierung des TGF $\beta$ -Signalweges war dabei von besonderem Interesse.

**Tabelle 17. Heatmap von mRNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen, nach Behandlung mit ausgewählten Inhibitoren und Aktivatoren.**

Die MCF-7-Zellen wurden für je zwei Tage mit verschiedenen Inhibitoren und Aktivatoren inkubiert. Die RNA-Expression wurden mittels RT-qPCR bestimmt. Dargestellt sind die *fold changes* der behandelten Kulturen im Verhältnis zur Kontrolle (MCF-Zellen plus Solvent). Signifikante Änderungen ( $p \leq 0,05$ , Zweistichproben-t-Test) der RNA-Expression sind fett dargestellt und nicht signifikante Werte sind in grauer Schrift dargestellt. Die *Heatmap* ist eine Dreifarben Rot-Gelb-Grün-Skala, die Farben wurden wie folgend definiert: Dunkelgrün  $\leq 0,33$ ; Gelb = 1; Dunkelrot  $\geq 3$ .

Inhibitor/Aktivator	Relative Genexpression in MCF-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle (MCF-7 mit Solvent), gemessen mit RT-qPCR nach 2 Tagen Inkubation.														
	CALCR	CDSN	FGF18	KIF12	KLHL4	KLK11	NR4A2	RAB30	RAMP3	SEPP1	TGFBR3	TMEM26	UGT2B15	YPEL1	
2 $\mu$ M M344	8,36	20,36	2,26	0,94	2,30	16,57	2,98	1,43	0,90	17,39	0,61	3,53	2,49	0,91	
10 $\mu$ M U0126	0,94	1,31	0,46	0,71	1,38	1,08	1,07	1,10	0,93	1,37	0,79	0,60	1,40	3,37	
10 $\mu$ M Ly364947	1,75	2,08	1,11	1,64	0,77	2,34	1,46	1,84	1,54	1,00	1,43	0,70	1,32	1,62	
1 $\mu$ M RKI	0,99	1,02	0,91	0,93	1,00	0,79	0,55	0,98	0,81	0,86	0,94	0,92	0,74	0,87	
0,2 $\mu$ M Ki11502	1,43	1,35	0,88	0,80	0,89	0,79	0,87	1,25	0,90	0,84	1,04	0,59	0,82	1,19	
0,5 $\mu$ M SRCi	1,59	1,46	0,87	0,68	1,12	0,93	0,86	1,09	1,16	1,18	1,04	0,55	1,00	1,23	
0,2 $\mu$ M ERBBI	2,55	1,41	0,96	0,70	0,86	0,85	0,91	1,13	1,16	1,15	1,23	0,59	0,93	1,47	
0,2 $\mu$ M PD173074	1,11	1,65	0,83	0,85	1,09	1,16	3,59	1,45	1,25	1,19	1,21	0,60	1,09	1,39	
0,1 $\mu$ M Fulvestrant	1,04	2,29	0,96	0,58	1,88	0,27	3,86	0,91	0,11	3,72	0,35	0,71	1,74	3,95	
0,01 $\mu$ M DHT	0,67	0,76	3,12	0,66	0,53	1,18	0,81	0,89	0,38	0,64	1,14	1,58	1,40	0,72	
0,01 $\mu$ M Estradiol	0,91	0,93	1,38	0,71	0,67	1,51	0,81	0,65	0,95	0,71	1,15	0,82	1,47	0,58	
20 $\mu$ M PQ401	0,89	1,27	0,43	0,24	0,62	0,43	1,74	1,16	0,21	1,73	0,29	0,94	0,72	3,26	
0,33 $\mu$ M Shikonin	1,75	0,97	0,94	0,72	1,02	0,76	1,31	0,74	1,02	0,95	0,54	0,59	1,86	0,48	
1 $\mu$ M FAKi	2,04	1,41	2,47	0,17	0,49	0,36	0,74	0,71	1,00	1,17	1,08	0,69	0,90	0,16	
100 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub>	0,42	0,50	0,55	0,42	0,59	0,46	0,81	0,38	0,31	0,55	0,61	0,47	0,62	0,63	
1,7 $\mu$ M Insulin	0,93	0,57	0,67	0,37	0,50	0,53	0,75	0,25	0,39	0,47	0,61	0,83	0,44	0,21	

CALCR = Calcitoninrezeptor, CDSN = Corneodesmosin, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), NR4A2 = *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*, RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like 1*

Der Histon-Deacetylase-Inhibitor M344 führte zu einer signifikanten Hochregulation von 9 Genen mit teils starken Effekten auf CDSN, KLK11 und SEPP1 (Tabelle 17). Da Histon-Deacetylase-Inhibitoren allgemein starke epigenetische Effekte haben, sollen die Ergebnisse an dieser Stelle mit Vorsicht interpretiert werden, sind aber für zukünftige Experimente von Interesse.

Weil MSCs und CAFs die Gene parakrin reprimieren, wurde Shikonin, ein Pan-Cytokin-Rezeptoren-Inhibitor, genutzt. Shikonin senkte die Expression von TMEM26 und YPEL1, die Expression von UGT2B15 wurde signifikant erhöht (Tabelle 17).

Aus Arbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass MSCs über MEK1 Brustkrebszellen beeinflussen können (Dittmer, 2011). Daher wurde durch Inhibierung der MAP-Kinase MEK mit U0126 der Effekt auf die stromal reprimierten Gene untersucht. FGF18, KIF12 und TGFBR3 wurden signifikant in der Expression gesenkt und die von YPEL1 erhöht (Tabelle 17). FAKi inhibierte die *focal adhesion kinase* (FAK). Diese Hemmung führte zu einer Erhöhung der Expression von CDSN und FGF18 und senkte die mRNA-Mengen von KIF12, KLK11 und YPEL1 (Tabelle 17).

Weil der Estrogen-Rezeptor alpha (ER $\alpha$ ) für MCF-7-Zellen überlebenswichtig ist und ein zentrales Zielprotein in der Brustkrebstherapie darstellt, wurde mit den Substanzen Estrogen (E2, 17 $\beta$ -Estradiol) und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) überprüft, welche Rolle der Estrogen-Signalweg in der Regulation der „stromal regulierten“ Gene spielt. DHT und Estradiol werden *in vivo* aus dem Prohormon Testosteron gebildet. DHT ist ein reines Androgen und kann nicht durch die Aromatase zu Estradiol aromatisiert werden. DHT senkt die mRNA-Mengen von KIF12, KLHL4, RAMP3 und SEPP1. Des Weiteren erhöht DHT die Expression von FGF18 und TMEM26. Estradiol (E2) ist das potenteste Estrogen und damit der stärkste physiologische Aktivator von ER $\alpha$ . E2 senkt das Expressionsniveau von KIF12, RAB30 und YPEL1, zusätzlich erhöht es leicht die Expression von FGF18 und KLK11. Da E2 und DHT acht der Gene regulieren, wurde zusätzlich ein Anti-Estrogen getestet. Fulvestrant ist ein SERD (*selective estrogen receptor downregulator*) und ist ein reines Anti-Estrogen (antagonistische Wirkung auf ER $\alpha$  und kein agonistischer Effekt), das zusätzlich die proteasomale Degradation von ER $\alpha$  vermittelt (Scott et al., 2011). Fulvestrant reprimierte die Expression von KIF12, KLK11, RAMP3, TGFBR3 und TMEM26 und erhöhte die mRNA-Mengen von CDSN, KLHL4, NR4A2, SEPP1 und YPEL1. Dies lässt vermuten, dass ER $\alpha$  eine Funktion in der Regulation der „stromal reprimierten“ Gene hat und/oder dass diese in der Therapieresistenz von Bedeutung sein könnten. Daher wurden weitere Versuche zur Wirkung von CAF-CM auf ER $\alpha$  und die Resistenzbildung unter Fulvestrant-Therapie durchgeführt (siehe Kap. 3.3.5.).

Die MCF-7-Zellen sind heterozygot für die Mutation A1633G im *pik3ca*-Gen, die im Protein p110 $\alpha$ , das es kodiert, zu einem Aminosäureaustausch führt (E545K) und dafür sorgt, dass der PI3K/AKT-Signalweg konstitutiv aktiv ist. Deswegen ist der IGFR/PI3K/AKT Signalweg für MCF-7 überlebenswichtig und häufig mit Therapieresistenzen verbunden. Um den Einfluss des IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges auf die „stromal reprimierten“ Gene zu testen, wurden PQ401 (Inhibitor der Transmembran-Rezeptor-Tyrosinkinase *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R)) und Insulin (physiologischer Aktivator von P-AKT) verwendet. PQ401 induzierte die Expression von YPEL1 und reprimierte FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, RAMP3 und TGFBR3 (Tabelle 17). Die Senkung der Expression war unter Insulin noch stärker. Es wurden KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, UGT2B15 und YPEL1 signifikant reprimiert (Tabelle 17). Diese Daten wurden durch einen PI3K-Inhibitor bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in nachfolgenden

Experimenten der Effekt von CAF-CM auf den IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg in MCF-7-Zellen überprüft (Kap. 3.3.3. Analyse des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges).

Weil im Mikromilieu und im Metabolismus der Krebszellen eine ausreichende Sauerstoffversorgung wichtig ist und es häufig zu Veränderungen im Metabolismus kommt (Hanahan and Weinberg, 2011), wurde der Hypoxie-Signalweg untersucht.  $\text{CoCl}_2$  stabilisiert den *hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) durch Inaktivierung der Prolyl-Hydroxylasen (Austausch des Kofaktors Eisen gegen Cobalt) (Epstein et al., 2001) und der Bindung an die von-Hippel-Lindau-Protein-bindende-Domäne von HIF-1 $\alpha$  (Yuan et al., 2003). Beide Mechanismen verhindern eine Degradation von HIF1 $\alpha$  und induzieren somit eine „Pseudo“-Hypoxie (Byrne et al., 2014). Diese Hypoxie-Induktion konnte die getesteten Gene (bis auf YPEL1) signifikant reprimieren. Dies deutet auf eine Involvierung von HIF1 $\alpha$  bzw. einer Komponente des Hypoxie-Signalweges in die Regulation der „stromal regulierten“ Gene hin. Daher wurde in nachfolgenden Experimenten überprüft, inwieweit CAF-CM den Hypoxie-Signalweg in MCF-7-Zellen beeinflussen kann.

Zusammenfassend ergeben sich aus den Ergebnissen der Inhibitor/Aktivator-Experimenten (Tabelle 17) drei wichtige Signalwege, die an der Regulation der „stromal reprimierten“ Gene beteiligt sein könnten; 1.) der Hypoxie-Signalweg sowie die therapeutisch interessanten Signalwege 2.) IGFR/PI3K/AKT und 3.) Estrogen-Signalweg. Alle drei Wege wurden im Folgenden näher analysiert.

### 3.3.2. Analyse des Hypoxie-Signalweges

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden (Tabelle 17), dass die „stromal regulierten“ Gene ebenfalls durch die Gabe von 100  $\mu\text{M}$  Cobalt(II)-chlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) reprimiert wurden. Dies deutet auf eine Involvierung des Hypoxie-Signalweges in der Regulation dieser Gene hin. Deswegen wurde überprüft, ob der Hypoxie-Signalweg durch  $\text{CoCl}_2$  und die stromalen Zellen induziert werden kann. Dazu wurde als Positivkontrolle  $\text{CoCl}_2$  zur Induktion des Hypoxie-Signalweges verwendet und die MCF-7-Zellen ebenfalls mit konditioniertem Medium von MSCs (MSC-CM) oder CAFs (CAF-CM) für zwei Tage inkubiert. Zum Nachweis der Aktivität des Hypoxie-Signalweges wurde der *hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ) auf Proteinebene nachgewiesen. HIF1 $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor und gilt als Master-Regulator in der hypoxischen Antwort der Zelle (Byrne et al., 2014). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1 $\alpha$  durch Proteolyse auf einem niedrigen Expressionsniveau gehalten. Da der Nachweis von HIF1 $\alpha$  besondere Aufarbeitungsbedingungen erfordert, wurde keine Proteinfractionierung durchgeführt, sondern das Gesamtzellextrakt analysiert. In den Gesamtzellextrakten (GZE) induzierte  $\text{CoCl}_2$  den Hypoxie-Signalweg sehr stark (Abbildung 15A). Für HIF1 $\alpha$  war eine eindeutige Induktion sichtbar und selbiges galt für die Carboanhydrase IX (CAIX) (Abbildung 15A). CAIX katalysiert die Reaktion von Kohlenstoffdioxid mit Wasser zu Kohlensäure und ist ein etablierter Surrogat-Marker für Hypoxie in Brustkrebszellen (McDonald and Dedhar, 2014; Sedlakova et al., 2014; Tan et al., 2009). CAF-CM induzierte ebenfalls HIF1 $\alpha$  und CAIX (Abbildung 15B).



**Abbildung 15. Western-Blot-Analyse von Hypoxie-Signalweg-Komponenten in MCF-7-Zellen.**

Die MCF-7-Zellen wurden für zwei Tage mit 1,7  $\mu\text{M}$  Insulin, 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , 20% konditioniertem Medium von MSCs (MSC-CM) oder mit 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) inkubiert. **(A)** Zur Visualisierung des HIF1 $\alpha$ -Proteins wurden Gesamtzellextrakte (GZE) in RIPA-Puffer angefertigt. Im GZE wurde ERK1/2 als Ladekontrolle verwendet. **(B)** Zum Nachweis der Aktivität des Hypoxie-Signalweges in fraktionierten Zelllysaten wurde die Carboanhydrase IX (CAIX) in Plasmamembranextrakten (PM) nachgewiesen. Als Ladekontrolle für die Plasmamembranextrakte wurden die nach dem Elektrophoretikum auf dem Gel verbliebenen Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Coom.) gefärbt. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CAIX = Carboanhydrase IX, Coom. = Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Färbung, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, GZE = Gesamtzellextrakt, HIF1 $\alpha$  = *hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$* , MSC-CM = konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen, PM = Plasmamembranextrakt

Da HIF1 $\alpha$  in den fraktionierten Zelllysaten nicht nachweisbar war, sollte in diesen Lysaten CAIX als membranständiges Surrogat nachgewiesen werden. Dazu wurden Proben von MCF-7-Zellen nach zwei-tägiger Behandlung mit 1,7  $\mu\text{M}$  Insulin (als Kontrolle für die Induktion des IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges), 20% MSC-CM und 20% CAF-CM im Western-Blot analysiert. Wie erwartet, war CAIX in der Plasmamembranfraktion nachweisbar. Insulin hatte keinen nachweisbaren Effekt auf CAIX (Abbildung 15B), während MSC-CM und CAF-CM zu einer eindeutigen Erhöhung von CAIX führten (Abbildung 15B). Daraus folgt, dass MSCs und CAFs über einen parakrinen Mechanismus den Hypoxie-Signalweg in MCF-7-Zellen induzieren. Diese Induktion ist wahrscheinlich unabhängig vom IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg, da Insulin keinen Einfluss auf CAIX hatte. Dies ist insofern interessant, weil  $\text{CoCl}_2$  und Insulin alle „stromal regulierten“ Gene reprimierten (Tabelle 17).

### 3.3.3. Analyse des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges

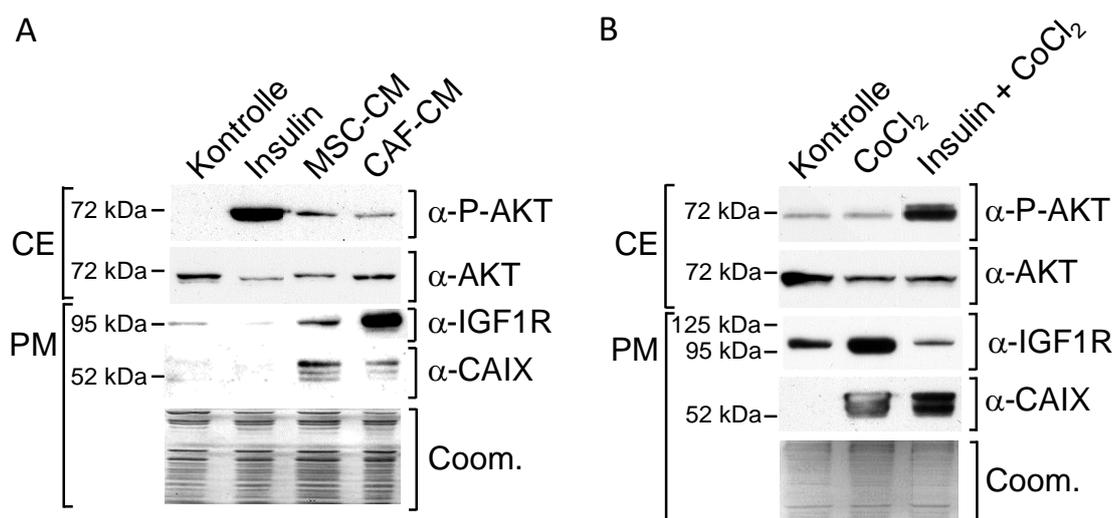
#### 3.3.3.1. Einfluss der stromalen Zellen auf den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg

Der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg ist sehr komplex und vielfältig. Für eine Zusammenfassung und einen kurzen Überblick siehe Kapitel 1.6. Der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg und Abbildung 7.

Es konnte gezeigt werden, dass in MCF-7-Zellen durch Applikation von 1,7  $\mu\text{M}$  Insulin alle „stromal regulierten“ Gene in der Expression gesenkt werden konnten. Davon waren KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1 und TGFBR3, UGT2B15 und YPEL1 signifikant reprimiert. Weil Insulin der physiologische Aktivator des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges ist (Pollak, 2008, 2012), wurde überprüft, welchen Einfluss die stromalen Zellen auf den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg haben. Da ebenfalls gezeigt werden konnte, dass der Hypoxie-Signalweg durch CAFs/MSCs induziert wird, wurde ebenfalls der Einfluss von  $\text{CoCl}_2$  auf den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg überprüft. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit 1,7  $\mu\text{M}$  Insulin, 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , 20% MSC-CM und 20% CAF-CM behandelt und für zwei Tage inkubiert. Diese Proben wurden im Western-Blot auf die Phosphoprotein-Mengen von AKT und das Plasmamembranlevel des *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R) analysiert (Abbildung 16).

Sowohl Insulin, als auch MSC-CM und CAF-CM, führten zu einer Erhöhung der am Serin 473 phosphorylierten Variante von P-AKT im Cytosol, wobei die Induktion durch Insulin stärker war (Abbildung 16A). 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$

hatte keinen Einfluss auf die cytosolische Menge von P-AKT, in Kombination mit 1,7  $\mu\text{M}$  Insulin war eine eindeutige Erhöhung sichtbar (Abbildung 16B). Die Proteinmenge des membranständigen IGF1R wurde durch 20% MSC-CM, 20% CAF-CM und 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  gesteigert, wobei der Einfluss des MSC-CM geringer war. Insulin führte alleine und in Kombination mit  $\text{CoCl}_2$  zu einer Abnahme des IGF1R-Plasmamembran-Level (Abbildung 16). Damit konnte gezeigt werden, dass MSCs und CAFs in MCF-7-Zellen über einen parakrinen Mechanismus den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg aktivieren. Der beobachtete Effekt auf P-AKT ist wahrscheinlich unabhängig vom Hypoxie-Signalweg (wird ebenfalls von MSCs/CAF s induziert, erhöhte CAIX-Menge in der Plasmamembran), da  $\text{CoCl}_2$  keinen Effekt auf P-AKT zeigte.



**Abbildung 16. Western-Blot-Analyse der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg-Komponenten.**

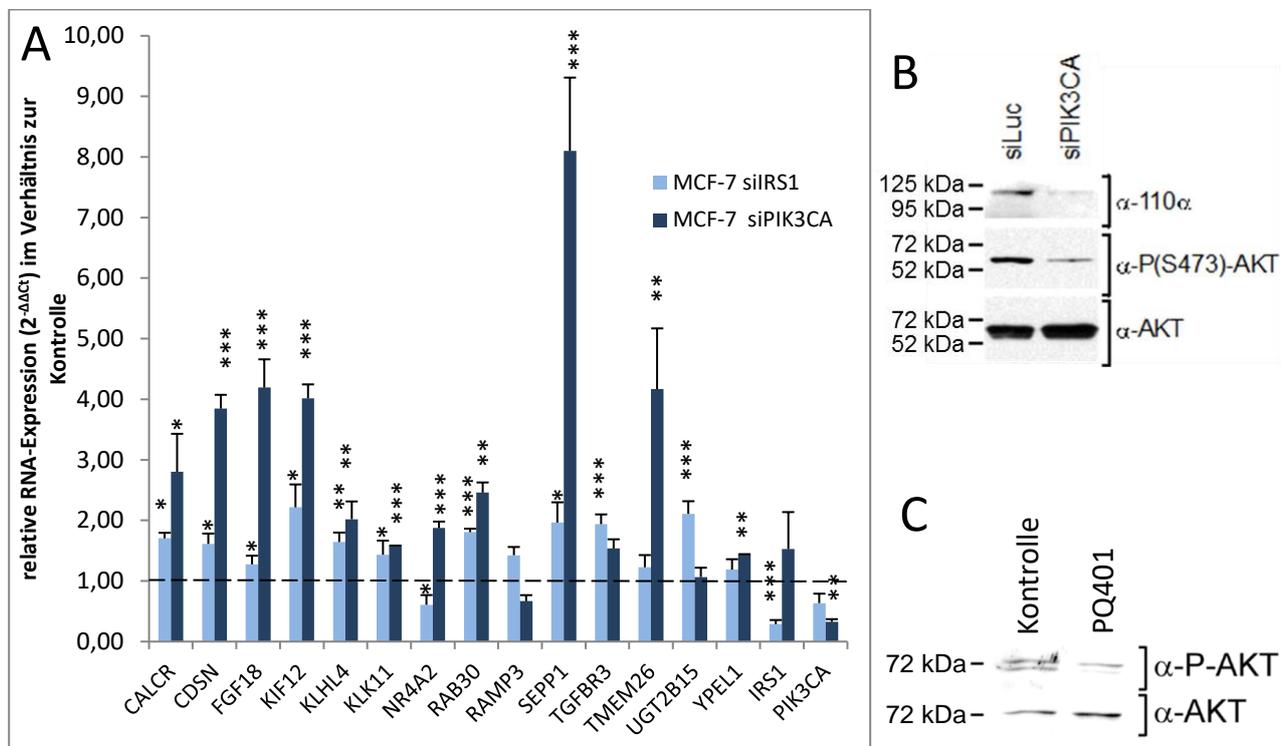
Spezifischer Nachweis einzelner Proteine der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg-Komponenten in MCF-7-Zellen, nach Gabe von (A) 20% konditioniertem Medium von MSCs (MSC-CM), 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM), von 1,7  $\mu\text{M}$  Insulin (B) und/oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  oder unbehandelte Zellen (Kontrolle), nach je zwei Tagen Kulturdauer. Zum Nachweis der Aktivität des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges in fraktionierten Zelllysaten wurden AKT und die an Serin 473 phosphorylierte Variante (P-AKT) im Cytosol nachgewiesen. In den Plasmamembranextrakten (PM) wurde die Menge des *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R) bestimmt. Als Ladekontrolle für die Plasmamembranextrakte wurden die nach dem Elektrobplot auf dem Gel verbliebenen Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Coom.) gefärbt. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CAIX = Carboanhydrase IX, CE = Cytosolextrakt, Coom. = Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Färbung, IGF1R = *insulin-like growth factor 1 receptor*, MSC-CM = konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen, PM = Plasmamembranextrakt

Die stromal induzierte Erhöhung des membranständigen IGF1R ist wahrscheinlich durch Komponenten des Hypoxie-Signalweges vermittelt, da sowohl  $\text{CoCl}_2$  als auch MSC-CM und CAF-CM die detektierte Menge an IGF1R erhöhten. Insulin als Induktor von P-AKT senkte hingegen das Level des IGF1R.

### 3.3.3.2. Knock-down von Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges

Da gezeigt werden konnte, dass die stromalen Zellen in MCF-7-Zellen den IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg induzieren (Abbildung 16) und Insulin die „stromal regulierten“ Gene beeinflusst (Tabelle 17), wurde überprüft, welche weiteren Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges involviert sind. Dazu wurden mittels siRNA-vermittelten spezifischen Knock-down die Transkripte für die *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* (PIK3CA) und Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS1) in der Expression in MCF-7-Zellen vermindert (Abbildung 17A und 17B). IRS1 ist ein intrazelluläres Adapterprotein, dass das einkommende Signal vom Insulin-Rezeptor und/oder IGF-Rezeptor an die Signalkaskaden *downstream*

der Rezeptoren weiterleitet. Das Gen *pik4ca* kodiert für die katalytische Untereinheit 110 $\alpha$  der (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase) PI3K, deren Funktion essentiell für die Phosphorylierung von AKT ist. Weil die Aktivierung des IGF1R/PI3K/AKT-Signalweges zur Reprimierung der „stromal regulierten“ Gene führte, sollte ein Knock-down von IRS1 oder PIK3CA den gegenteiligen Effekt haben, falls diese an Regulation der Gene beteiligt sind.



**Abbildung 17. Knock-down von IRS1 und PI3K in MCF-7-Zellen.**

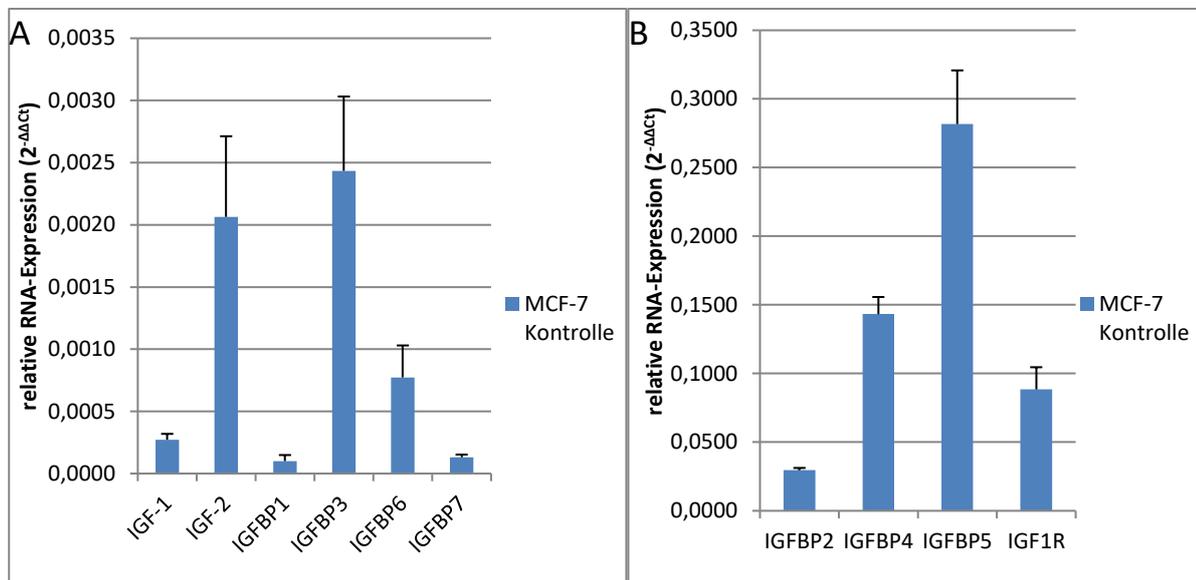
**(A)** RNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen nach Elektroporation mit siRNA gegen IRS1 (siIRS1, ■) oder gegen die katalytische Untereinheit 100 $\alpha$  von PI3K (siPIK3CA, ■), je nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Zellen elektroporiert mit siLuc, siRNA gegen Luciferase; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen (n = 3). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). **(B)** Western-Blot-Analysen eines cytosolischen Extraktes von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit siPIK3CA und siLuc (Kontrolle). **(C)** Western-Blot-Analysen eines cytosolischen Extraktes von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) und 20  $\mu$ M PQ401 (Inhibitor des IGF1R) nach zwei Tagen Kulturdauer. **(B) und (C)** Die Experimente wurden zweimal durchgeführt (n = 2) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. CALCR = Calcitoninrezeptor, CDSN = Corneodesmosin, FGF18 = fibroblast growth factor 18, IRS1 = Insulin-Rezeptor-Substrat 1, KIF12 = kinesin family member 12, KLHL4 = kelch-like family member 4, KLK11 = kallikrein-related peptidase 11 (auch bekannt als Kallikrein 11), NR4A2 = nuclear receptor subfamily 4 group A member 2, PIK3CA = phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PQ401 = Inhibitor des insulin-like growth factor 1 receptor, RAB30 = ras-related in brain 30, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = transforming growth factor beta receptor 3, TMEM26 = transmembrane protein 26, UGT2B15 = UDP-Glucuronosyltransferase 2B15, YPEL1 = yippee-like 1

Der Knock-down von IRS1 mit der spezifischen siRNA siIRS1 wurde in MCF-Zellen erfolgreich durchgeführt. Die mRNA-Menge von IRS1 konnte im Vergleich zur Kontrolle (elektroporiert mit siRNA siLuc, gegen das Luciferase-Gen) auf 29% reduziert werden (Abbildung 17A). Die meisten der „stromal regulierten“ Gene wurden durch siIRS1 leicht, aber signifikant erhöht. Für RAMP3, TMEM26 und YPEL1 waren nur tendenzielle Erhöhungen nachweisbar (Abbildung 17). Der Knock-down von PIK3CA mit der spezifischen siRNA siPIK3CA konnte in MCF-Zellen ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Im Verhältnis zur Kontroll-siRNA senkte siPIK3CA die Expression von PIK3CA auf 33% (Abbildung 17A). In der Western-Blot-Analyse war eine eindeutige Reduktion

der Level von 110 $\alpha$  und dessen *downstream*-Effektors P-AKT nachweisbar (Abbildung 17B). SiPIK3CA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von RAMP3, TGFBR3 und UGT2B15. Für die Transkripte KLHL4, KLK11, NR4A2, RAB30 und YPEL1 war eine leichte Erhöhung der mRNA-Menge um den Faktor 1,5 bis 2 detektierbar. CSDN, FGF18, KIF12 und TMEM26 wurden in der Expression durch siPIK3CA um den Faktor 3,8 bis 4,2 erhöht, SEPP1 um das 8-fache (Abbildung 17A). Somit liegt die Vermutung nahe, dass PIK3CA und IRS1 an der Regulation der „stromal regulierten“ Gene beteiligt sind. *Upstream* dieser beiden Proteine befindet sich der Rezeptor IGF1R, der durch stromale Zellen in der Expression erhöht wurde (Abbildung 16B). Um zu testen, inwieweit der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg in MCF-7-Zellen von der Aktivität des IGF1R abhängt, wurden die Zellen mit dem spezifischen IGF1R-Inhibitor PQ401 behandelt (Abbildung 17C). PQ401 reduzierte den Phosphorylierungsstatus von AKT eindeutig (Abbildung 17C). Daraus kann geschlossen werden, dass der IGF1R der zentrale Aktivator von P-AKT in MCF-7-Zellen ist. Die Induktion der IGF1R-Expression durch stromale Zellen könnte somit die Erhöhung des P-AKT-Levels erklären (Abbildung 16A). Dies wäre nur möglich, wenn der IGF1R aktiv ist (was durch dessen Inhibition mit PQ401 gezeigt wurde). Der Knock-down von IRS1 und PIK3CA führte zu einer Unterbrechung der Aktivität des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges (Übersichtsschema zum IGFR/PI3K/AKT-Signalweg siehe Abbildung 7), welche zur Erhöhung der „stromal regulierten“ Gene führte (Abbildung 17). Dies ist in Übereinstimmung zu den Ergebnissen aus Tabelle 17. Hier wurde gezeigt, dass eine Induktion des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges mit Insulin die „stromal regulierten“ Gene in ihrer Expression signifikant senkte. Somit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression der „stromal regulierten“ Gene direkt über die Aktivität des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges gesteuert werden kann (Expression der „stromal regulierten“ Gene invers zu Aktivität des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges). Daher liegt ebenfalls die Vermutung nahe, dass die stromalen Zellen über den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg die Expression der „stromal regulierten“ Gene beeinflussen können.

### 3.3.3.3. Analyse der extrazellulären Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges

Weil ebenfalls gezeigt werden konnte, dass der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg in MCF-7-Zellen durch MSCs und CAFs induziert wurde und die Komponenten dieses Signalweges die „stromal regulierten“ Gene beeinflussten, wurde überprüft, ob weitere Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges reguliert werden. Dazu wurden die mRNA-Expression der sezernierbaren Komponenten dieses Weges in MCF-7-Zellen analysiert (Abbildung 18). Diese wurden gewählt, weil die Aktivität des IGF1R von seinen beiden Liganden *insulin-like growth factor* (IGF)-1 und -2 sowie deren physiologischen Inhibitoren, den *insulin-like growth factor-binding proteins* (IGFBP) 1 bis 6, abhängig ist (Denduluri et al., 2015). Des Weiteren kann IGFBP7 an den IGF1R binden und somit die Aktivierung des Rezeptors inhibieren (Evdokimova et al., 2012). Deswegen wurden in unbehandelten MCF-7-Zellen die Genexpressionen der beiden Aktivatoren IGF-1 und IGF-2, deren physiologische Inhibitoren IGFBP1 bis IGFBP6 sowie von IGFBP7 (niedrig Affinitäts-Inhibitor) bestimmt. Des Weiteren wurde der mRNA-Level von IGF1R gemessen, da dieser auf Proteinebene durch stromale Zellen induziert wurde (Abbildung 16A).



**Abbildung 18. Relative Expression von IGF-1/-2 und deren korrespondierender Rezeptor IGF1R sowie der Proteine IGFBP1 bis 7.**

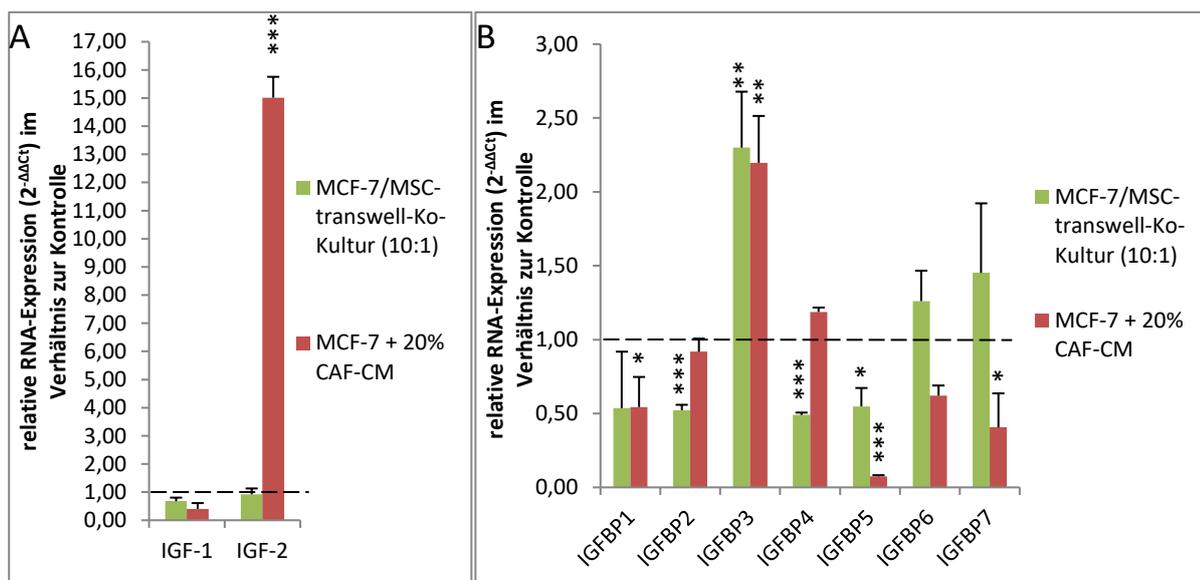
RNA-Expressionen von IGF-1/-2 und deren korrespondierender Rezeptor IGF1R sowie der Proteine IGFBP1 bis 7, in unbehandelten MCF-7-Kulturen (MCF-7-Kontrolle) nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). **(A)** „niedrig“ exprimierte Komponenten des IGF1R/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges. **(B)** „hoch“ exprimierte Komponenten des IGF1R/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges (Achse um Faktor 100 höher skaliert als in (A)). IGF-1-2 = *insulin-like growth factor 1-2*, IGF1R = *insulin-like growth factor 1 receptor*, IGFBP1-7 = *insulin-like growth factor-binding protein 1-7*

IGF-1 und IGF-2 waren niedrig in MCF-7-Zellen exprimiert, dabei war siebenmal mehr IGF-2 als IGF-1 mRNA nachweisbar (Abbildung 18A). IGFBP3 und IGFBP6 zeigten eine niedrige Expression, IGFBP1 und IGFBP7 waren an der Nachweisgrenze exprimiert (Abbildung 18A). IGFBP2, IGFBP4, IGFBP5 und IGF1R waren wesentlich höher exprimiert (mindestens Faktor 100). IGFBP4 und IGFBP5 waren die beiden am höchsten exprimierten IGFBPs, IGFBP4 war 4,5-mal und IGFBP5 zehnmal höher exprimiert als IGFBP2 (das am drittmeisten exprimierte IGFBP) (Abbildung 18).

Weil die basalen Expressionen von IGF-1, -2, IGFBP1 bis 7 und von IGF1R in MCF-7-Zellen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 18), wurde im Folgenden überprüft, welchen Einfluss stromale Zellen auf die Expression dieser Gene haben. Dazu wurden in MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (10:1) und in MCF-7 mit 20% CAF-CM nach zwei Tagen Kulturdauer die Änderung der mRNA-Mengen von IGF-1 bis -2, IGF1R und IGFBP1 bis 7 bestimmt (Abbildung 19). Es wurden MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen gewählt, weil diese den besten Effekt auf die „stromal regulierten“ Gene aufwiesen (Abbildung 13) und gleichzeitig einen *cross-talk* der Zelltypen berücksichtigten.

In MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen zeigten MSCs keinen Effekt auf die Expression von IGF-1 und IGF-2 (Abbildung 19A). 20% CAF-CM senkte nicht signifikant die mRNA-Menge von IGF-1 und erhöhte das Level von IGF-2 signifikant um das Fünfzehnfache (Abbildung 19A). IGFBP1 wurde durch beide stromale Zelltypen reprimiert, jedoch nur signifikant durch CAF-CM. CAFs zeigten keinen Effekt auf IGFBP2, MSCs senkten dieses auf die Hälfte der Kontrolle. MSCs und CAFs erhöhten beide die Expression von IGFBP3 signifikant um das Zweifache. Die mRNA Menge von IGFBP4 wurde durch MSCs signifikant vermindert, jedoch nicht durch CAF-CM. Sowohl MSCs als auch CAF-CM senkten die Expression von IGFBP5 signifikant, wobei MSCs die Expression „halbierten“ und CAF-CM auf ein Zehntel senkte. IGFBP6 und IGFBP7 wurden durch MSCs in der *transwell*-Ko-

Kultur leicht erhöht (nicht signifikant) und durch CAF-CM wurden beide reprimiert, davon IGFBP7 signifikant (Abbildung 19B). Weil IGFBP1, IGFBP3, IGFBP6 und IGFBP7 sehr schwach in MCF-7-Zellen exprimiert waren (Abbildung 18A), sind deren Regulationen wahrscheinlich von geringer Bedeutung. Bei den stärker exprimierten IGFBPs IGFBP2, IGFBP4 und IGFBP5 (Abbildung 18B) wurden alle 4 IGFBPs durch MSCs gesenkt, jedoch nur IGFBP5 wurde sowohl von MSCs als auch von CAFs signifikant in der Expression gesenkt (Abbildung 19B). Hinzu kommt, dass IGFBP5 das höchst abundante IGFBP in MCF-7-Zellen ist (Abbildung 18). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die stromal induzierte Absenkung der Expression von IGFBP5 der wahrscheinlich relevante Regulationsmechanismus für die Aktivität des IGF1R-Signalweges ist. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde ein spezifischer Knock-down von IGFBP5 durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.6.2.).



**Abbildung 19. Effekte der MSCs in MCF-7/MSC-transwell-Ko-Kulturen und von CAF-CM auf die Expression der Komponenten des IGF1R/PI3K/AKT-Signalweges.**

Relative Expression von IGF-1 und IGF-2 (A) sowie von IGFBP1 bis 6 (B) in MCF-7/MSC-transwell-Ko-Kulturen (10:1, ■) oder in MCF-7 mit 20% CAF-CM (■) nach je zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analysen. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-transwell-Kulturen ohne MSCs oder MCF-7-Kulturen ohne konditioniertes Medium; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, IGF-1-2 = *insulin-like growth factor 1-2*, IGF1R = *insulin-like growth factor 1 receptor*, IGFBP1-7 = *insulin-like growth factor-binding protein 1-7*, MSC-CM = konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen

Weil IGFBP5 auf mRNA-Ebene reguliert wurde, wurde nach einer Möglichkeit zum Nachweis von IGFBP5 auf Proteinebene gesucht. Sowohl der Nachweis von IGFBP5 mittels Sandwich-ELISA „RayBio Human IGFBP5 ELISA Kit“ (Raybiotech, Norcross, GA, USA) als auch in der Western-Blot-Analyse mit einem Anti-IGFBP5 Antikörper waren erfolglos.

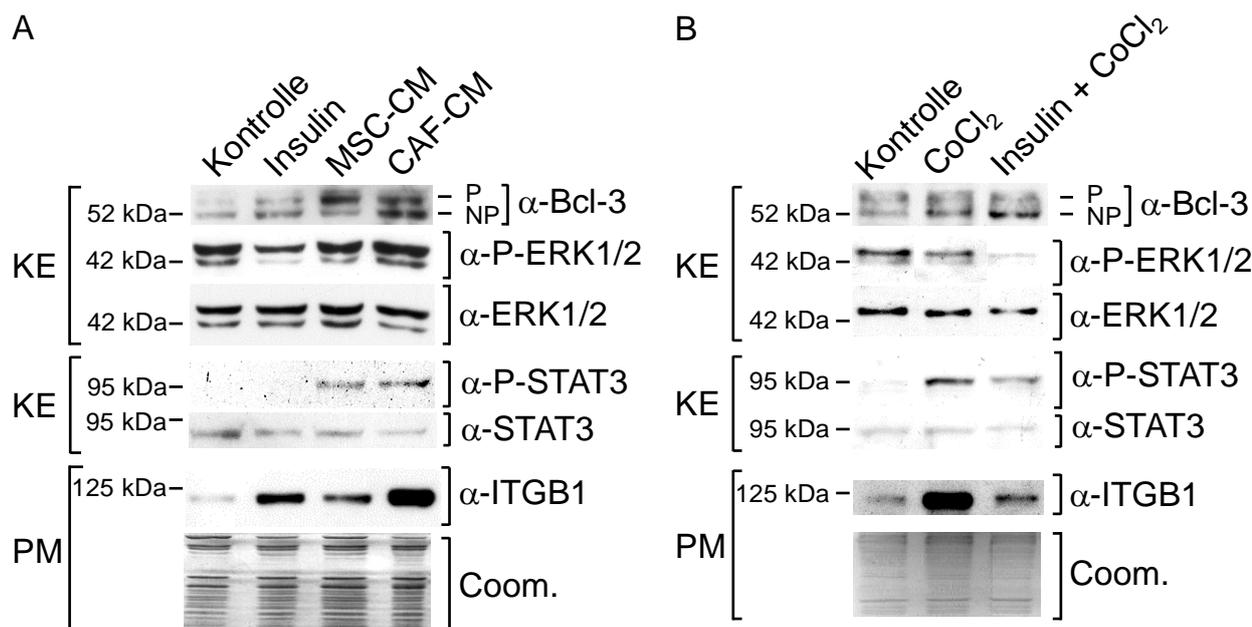
### 3.3.4. Identifikation weiterer stromal aktivierter Signalwege

Es wurde bereits gezeigt, dass die „stromal regulierten“ Gene durch Insulin, Fulvestrant und  $\text{CoCl}_2$  beeinflussbar waren (Tabelle 17). Zudem wurde gezeigt, dass die stromalen Zellen den IGF1R/PI3K/AKT-Signalweg (siehe Seite 45), den Estrogen-Signalweg (siehe Seite 53) und den Hypoxie-Signalweg (siehe Seite 44) beeinflussten. Diese Signalwege regulieren eine Vielzahl von Komponenten in der Zelle. Deswegen wurde auf Proteinebene nach

weiteren stromal induzierten Veränderungen von Signalproteinen gesucht. Für dieses *Screening* ist es im Folgenden notwendig, sich thematisch von den „stromal regulierten“ Genen zu entfernen, um Ergebnisse zeigen zu können, die im Kontext dieser Dissertation sehr wichtig sind.

Für das *Screening* wurden MCF-7-Zellen mit 1,7  $\mu$ M Insulin (Positivkontrolle für IGFR/PI3K/AKT-Signalweg), 100  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (Positivkontrolle für Hypoxie-Signalweg), 20% konditioniertem Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) und 20% konditioniertem Medium von mesenchymalen Stammzellen (MSC-CM) für zwei Tage behandelt und anschließend per Western-Blot analysiert (Abbildung 20).

Abbildung 20



**Abbildung 20. Western-Blot-Analyse onkologischer Signalweg-Komponenten in MCF-7-Zellen.**

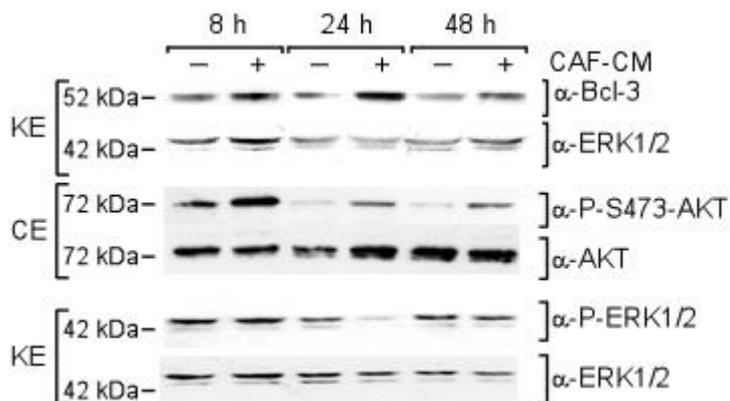
Es wurden MCF-7-Zellen nach Gabe von (A) 20% konditioniertem Medium von MSCs (MSC-CM), 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM), von 1,7  $\mu$ M Insulin (B) und/oder 100  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> oder unbehandelte Zellen (Kontrolle), nach je zwei Tagen Kulturdauer analysiert. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CE = Cytosolextrakt, Coom. = Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Färbung, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, ITGB1 = Integrin beta 1, KE = Kernextrakt, MSC-CM = konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen, NP = nicht phosphoryliert, P = phosphoryliert, PM = Plasmamembranextrakt, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*

Die wissenschaftliche Evidenz für die Induktion des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges ist in Abbildung 16 und die des Hypoxie-Signalweges ist in Abbildung 15 zu finden. In diesem Experiment wurden insbesondere ITGB1, der STAT3-Signalweg und der NF $\kappa$ B-Signalweg analysiert. STAT3 und ITGB1 spielen in Tumor-Stroma-Interaktionen und bei der Bildung von Therapieresistenzen eine wichtige Rolle (Dittmer and Leyh, 2015). Unter Estrogen-Mangelbedingungen zeigen MCF-7-Zellen eine erhöhte Aktivität des NF $\kappa$ B-Signalweges gemeinsam mit einer erhöhten Expression des Koaktivators Bcl-3 (Pratt et al., 2003). Dies macht Bcl-3 zu einem interessanten Kandidaten, weil Fulvestrant die „stromal regulierten“ Gene beeinflusste (Tabelle 17) sowie die Expression von ER $\alpha$  senkte und den Estrogen-Signalweg inhibiert (Lee et al., 2017; Scott et al., 2011).

20% MSC-CM und 20% CAF-CM induzierten eine Phosphorylierung des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), zeigten jedoch keinen Effekt auf die Phosphorylierung der *extracellular signal-*

*regulated kinase 1/2* (ERK1/2) (Abbildung 20). Des Weiteren erhöhten die konditionierten Medien die Menge des membranständigen Integrin beta 1 (ITGB1) und des Kernproteins *B-cell lymphoma 3-encoded protein* (Bcl-3). Insulin erhöhte die Menge von ITGB1 und zeigte keinen Einfluss auf Bcl-3, P-ERK1/2 und P-STAT3. CoCl<sub>2</sub> induzierte P-STAT3 und ITGB1, erhöhte Bcl-3 schwach und zeigte keinen Einfluss auf P-ERK1/2 (Abbildung 20). Zusammenfassend aktivierten MSCs und CAFs über einen parakrinen Mechanismus den JAK2/STAT3-Signalweg, induzierten Bcl-3 sowie ITGB1 und hatten keinen Einfluss auf den Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signalweg. In Kombination konnten Insulin und CoCl<sub>2</sub> die meisten dieser durch CAF-CM induzierten Effekte nachahmen und senkten zusätzlich die Menge an P-ERK1/2 (Abbildung 20).

Wie bereits beschrieben, konnten nach zwei Tagen mehrere durch CAF/MSC regulierte Gene und Proteine nachgewiesen werden. Weil P-ERK1/2, P-STAT3, P-AKT und Bcl-3 eine Vielzahl an Prozessen beeinflussen können und ihre Signalwege einem *cross-talk* unterliegen, sollte geklärt werden, in welcher zeitlichen Reihenfolge diese Proteine und die „stromal regulierten“ Gene durch CAF-CM beeinflusst werden. Daher wurden Zeitreihen-Experimente durchgeführt (Abbildung 21 und Abbildung 1 im Anhang), um den Mechanismus der stromal induzierten Effekte besser verstehen zu können. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit 20% CAF-CM behandelt und nach 8 h, 24 h, und 48 h analysiert.



**Abbildung 21. Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der Wirkung von 20% CAF-CM auf MCF-7-Zellen.**

Es wurden MCF-7-Zellen nach Gabe von 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM, +) und unbehandelten Zellen (Kontrolle, -) nach je 8 h, 24 h und 48 h Kulturdauer analysiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt (n = 2) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. AKT = *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*, Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CE = Cytosolextrakt, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, KE = Kernextrakt, P = phosphoryliert, PM = Plasmamembranextrakt

CAF-CM erhöhte im Kernextrakt nach 8 h die Proteinmenge an Bcl-3. Dieser Effekt war ebenfalls nach 24 h und 48 h nachweisbar (Abbildung 21). Der cytosolische Gehalt von P-AKT war ebenfalls zu allen drei Messpunkten (8 h, 24 h, 48 h) durch CAF-CM erhöht, wobei im Laufe der Zeit die Gesamtmenge an P-AKT abnahm. Eine Bestimmung von P-STAT-3 war wegen der niedrigen Zellzahl nach 8 h und 24 h nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

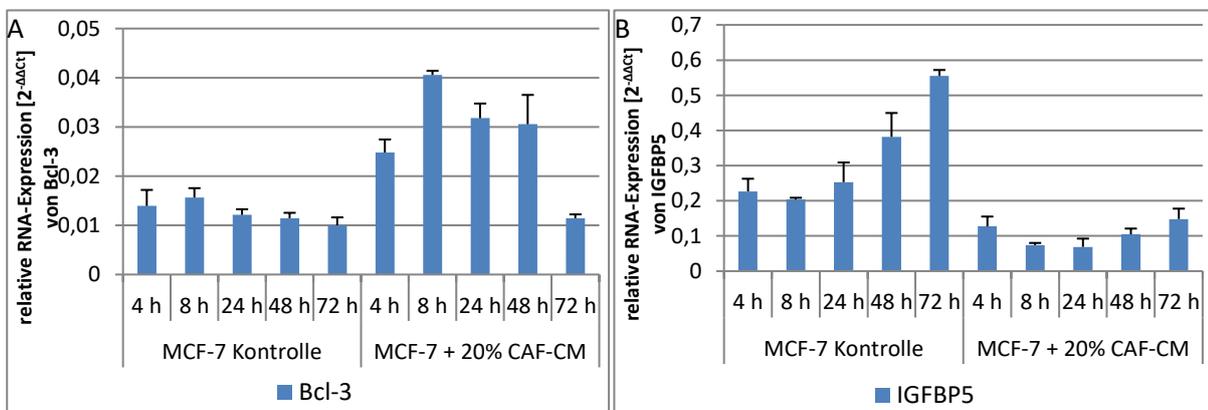
Weil für das CAF-CM von 8 h bis 48 h gute Effekte auf Proteinebene nachweisbar waren, wurden zusätzlich zu den drei Zeitpunkten Genexpressionsanalysen mit zwei weiteren Messpunkten (4 h und 72 h) durchgeführt (Abbildung 1 Anhang). Neben den „stromal reprimierten“ Genen wurde ebenfalls die Expression von Bcl-3 und ITGB1 bestimmt, da diese auf Proteine-Ebene durch CAF-CM erhöht wurden (Abbildung 20). Zusätzlich wurden die mRNA-Mengen von IGFBP4 und IGFBP5 bestimmt, weil diese die am stärksten exprimierten IGFBPs waren

(Abbildung 18B) und diese ebenfalls durch stromale Zellen reguliert wurden (Abbildung 19B) sowie mit der Induktion von P-AKT in Verbindung stehen könnten.

In den Zeitreihen-Experimenten induzierte CAF-CM nach 4 h eine Senkung der Expression von FGF18, RAMP3, TMEM26, TGFBR3, UGT2B15 und hielt die Expression dieser Gene für 72 h auf einem niedrigen Niveau (Abbildung 1 Anhang). YPEL-1, KIF12, KLHL4, KLK11 und RAB30 wurden innerhalb von 8 h reprimiert (Abbildung 1 Anhang). CDSN und SEPP1 wurden stufenweise durch CAF-CM in der Expression vermindert und waren nach 48 h und 72 h signifikant in der Expression gesenkt (Abbildung 1 Anhang). NR4A2 war nach 24 h und 48 h signifikant reprimiert.

ITGB1, dessen Expression auf Proteinebene durch stromale Zellen gut induziert wurde (Abbildung 20), zeigte auf mRNA-Ebene uneinheitliche Ergebnisse (Abbildung 1 Anhang). So war ITGB1 nach 8 h und 72 h induziert und zu den anderen Zeitpunkten identisch zur Kontrolle exprimiert. IGFBP4 wurde zu keinem Zeitpunkt in der Expression durch CAF-CM reprimiert (identisch zu Daten aus Abbildung 19). IGFBP5 hingegen war nach 4 h um die Hälfte im Verhältnis zur Kontrolle vermindert. Nach 8 h war IGFBP5 auf ein Drittel, und für die letzten drei Messwerte auf je ein Fünftel gesenkt (Abbildung 1 Anhang). CAF-CM erhöhte die mRNA-Expression von Bcl-3 nach 4 h um den Faktor 1,8 und nach 8 h bis 48 h um den Faktor ca. 2,6. Nach 72 h übte CAF-CM keinen weiteren Einfluss auf Bcl-3 aus (Abbildung 1 Anhang).

Weil die Expression von Bcl-3 und IGFBP5 therapeutisch relevant ist (Pratt et al., 2003; Sureshbabu et al., 2012), diese bereits nach 4 h durch CAF-CM signifikant verändert war sowie deren korrespondierende Signalwege durch stromale Zellen aktiviert werden (P-STAT3 und P-AKT, Abbildung 20), wurden deren relative basale Expressionen in den Zeitreihen-Experimenten analysiert (Abbildung 22).



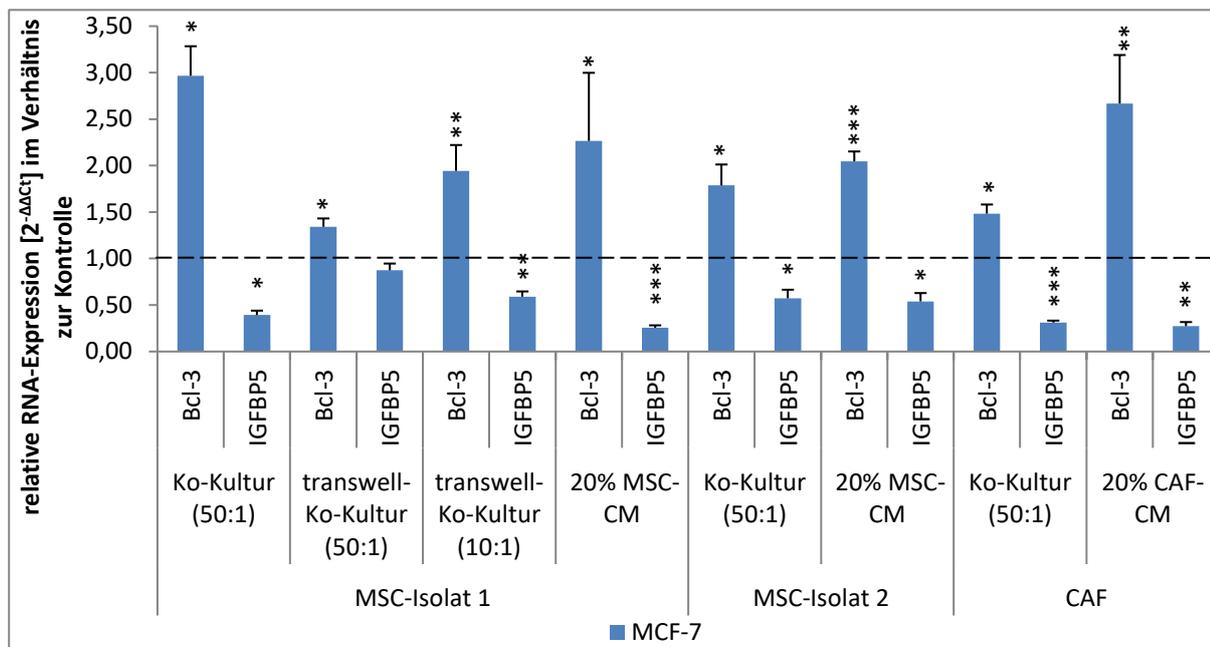
**Abbildung 22. Zeitverlauf der relativen RNA-Expressionen von Bcl-3 und IGFBP5 in MCF-7-Zellen in An- und Abwesenheit von CAF-CM.**

Relative Expressionen von Bcl-3 (A) und IGFBP5 (B) in MCF-7 ohne konditioniertes Medium (Kontrolle) und mit 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) nach 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analyse. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte. Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*

In den unbehandelten MCF-7-Zellen stieg die Expression von Bcl-3 innerhalb von 4 h auf 8 h leicht an und sank dann sukzessive über die Zeit ab (ca. 36% Unterschied zwischen Wert für 4 h und 72 h) (Abbildung 22A). In den MCF-7-Zellen mit 20% CAF-CM stieg die Expression von Bcl-3 innerhalb von 4 h auf 8 h an, stabilisierte sich dann für die Messwerte nach 24 h und 48 h (Abbildung 22A). Nach 72 h sank die mRNA-Menge nach Zugabe

von CAF-CM auf das Niveau der Kontrolle. CAF-CM induzierte somit die Expression von Bcl-3 für einen Zeitraum von 4 h bis 48 h. Die basale Expression von IGFBP5 stieg in den Kontrollen ab 24 h bis 72 h an (Unterschied zwischen 8 h und 72 h ca. Faktor 2,7) (Abbildung 22B). Für die Expression von IGFBP5 nach Applikation von 20% CAF-CM zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, jedoch waren alle Expressionen um zwei Drittel niedriger (Abbildung 22B). CAF-CM unterdrückte also die IGFBP5 Expression für mindestens 72 h.

Als nächstes wurde getestet, ob die Effekte von CAF-CM auf die Expression von Bcl-3 und IGFBP5 auch mit 20% MSC-CM, mit MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (50:1), MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (10:1), MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (50:1) und MCF-7/CAF-Ko-Kulturen (50:1) erzielt werden können (Abbildung 23).



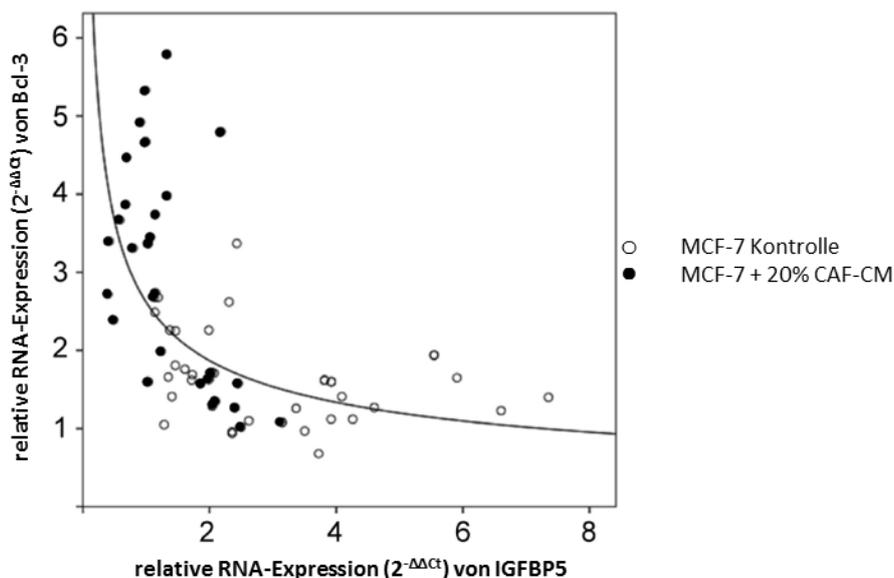
**Abbildung 23. Einfluss von MSCs und CAFs auf die Expression von IGFBP5 und Bcl-3.**

Relative Expression von Bcl-3 und IGFBP5 in MCF-7-Zellen mit 20% konditioniertem Medium von mesenchymalen Stammzellen (MSC-CM), MCF-7 mit 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM), MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (50:1), MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (10:1), MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (50:1) und MCF-7/CAF-Ko-Kulturen (50:1) und mit 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) nach je zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analyse. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative 2<sup>-ΔΔCt</sup>-Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Kulturen ohne MSCs; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen (n = 3). \* p ≤ 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, MSC-CM = konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen

Sowohl MSCs als auch CAFs erhöhten in Ko-Kulturen, in denen direkter Zell-Zell-Kontakt möglich ist, die Expression von Bcl-3 und senkten die mRNA-Menge von IGFBP5 (Abbildung 23). In MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen (10:1) war ebenfalls Bcl-3 gesteigert und IGFBP5 vermindert. Auch nach Zugabe von konditioniertem Medium wurde die mRNA-Menge von Bcl-3 erhöht und die von IGFBP5 gesenkt (Abbildung 23). Unter allen getesteten Bedingungen wurde Bcl-3 in der Expression erhöht und IGFBP5 gesenkt (Abbildung 23). Somit besteht die Annahme, dass sowohl CAFs als auch MSCs über einen parakrinen Mechanismus Bcl-3 und IGFBP5 invers zueinander regulieren.

Um den inversen Zusammenhang zwischen der Bcl-3- und IGFBP5-Expression weiter zu verdeutlichen, wurden die relativen mRNA-Mengen von IGFBP5 mit denen von Bcl-3 verglichen. Dazu wurden die Daten von 76 MCF-

7-RNA-Isolaten aus Zellen, die in Anwesenheit ( $n = 44$ ) oder Abwesenheit von 20% CAF-CM ( $n = 32$ ) inkubiert wurden, verwendet (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Inverse Korrelation der Expression von IGFBP5 und Bcl-3 in MCF-7 Zellen.**

76 MCF-7-RNA-Isolate nach Gabe von 20% CAF-CM ( $n = 32$ ) oder unbehandelte MCF-7-Zellen ( $n = 44$ ) nach je zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analyse. Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte. Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*

Die Daten der relativen Expressionen von Bcl-3 gegen IGFBP5 zeigten eine inverse Korrelation der beiden Gene (Abbildung 24). Besonders bei niedriger Expression von IGFBP5 führten leichte Änderungen des Levels von IGFBP5 zu einer starken Erhöhung der Expression von Bcl-3. Dies legt die Vermutung nahe, dass IGFBP5 und Bcl-3 gemeinsam reguliert werden oder sich wahrscheinlich gegenseitig regulieren könnten. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde ein spezifischer Knock-down von IGFBP5 (siehe Kapitel 3.3.6.2.) und Bcl-3 (siehe Kapitel 3.3.6.3.) durchgeführt sowie deren Einfluss auf die „stromal regulierten“ Gene untersucht.

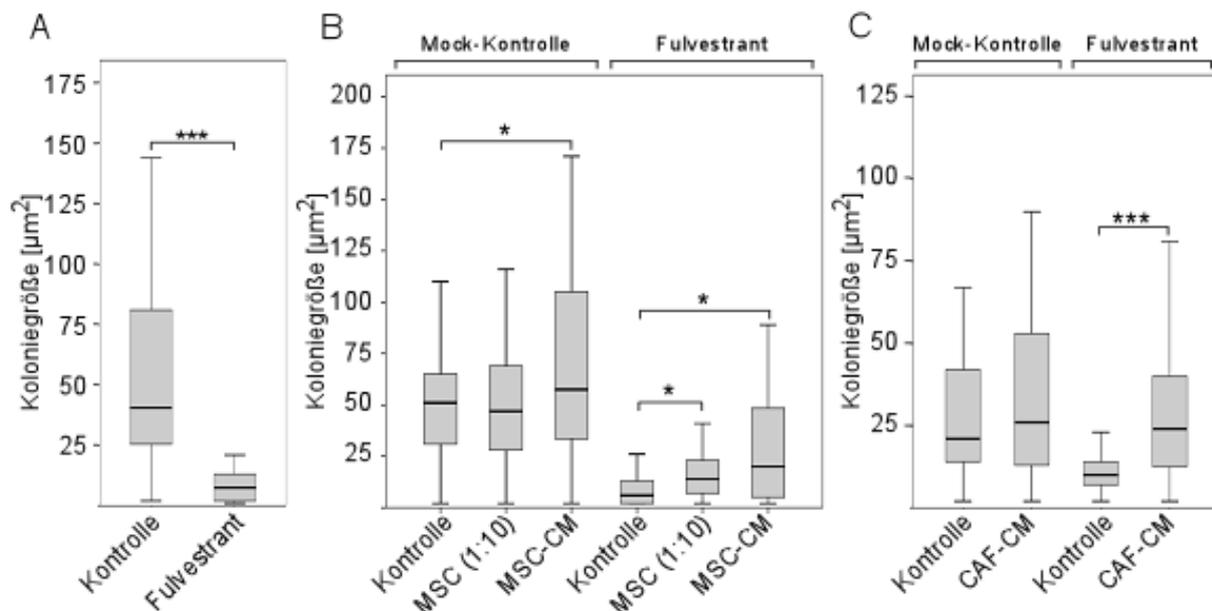
In MCF-7-Zellen können Anti-Estrogene die Sekretion von IGFBPs beeinflussen (ATCC-Datenblatt der MCF-7-Zellen; [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo\\_country=de#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo_country=de#characteristics)). Unter Estrogen-Mangelbedingungen zeigten MCF-7-Zellen eine erhöhte Aktivität des NFκB-Signalweges gemeinsam mit einer erhöhten Expression des Koaktivators Bcl-3 (Pratt et al., 2003). Deswegen wurde der Einfluss der Senkung von IGFBP5 und Bcl-3 auf die Anti-Estrogen-Resistenz in MCF-7-Zellen analysiert.

### 3.3.5. Analyse des Estrogen-Signalweges und der Anti-Estrogen-Therapie

In Kapitel 3.3.1 (Tabelle 17) konnte gezeigt werden, dass  $0,01 \mu\text{M}$   $17\beta$ -Estradiol (E2),  $0,01 \mu\text{M}$   $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) und  $0,1 \mu\text{M}$  Fulvestrant die „stromal regulierten“ Gene beeinflussen können. Zusätzlich ist der Estrogen-Rezeptor alpha (ERα) für MCF-7-Zellen überlebenswichtig und ein zentrales Element in der Brustkrebstherapie. Zudem legen Untersuchungen nahe, dass MCF-7-Zellen unter Estrogen-Mangelbedingungen eine erhöhte Expression des Koaktivators Bcl-3 zeigen (Pratt et al., 2003), ähnlich wie sie durch stromale Zellen vermittelt wurde (Abbildung 20).

Daher wurde untersucht, ob MSCs/CAFs einen Einfluss auf das Therapieansprechen bei Behandlung von MCF-7-Zellen mit Fulvestrant haben. Dazu wurde das Wachstum von MCF-7-Zellen, MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (10:1) und von MCF-7-Zellen nach Zugabe von 20% MSC-CM oder 20% CAF-CM bestimmt, je in An- und Abwesenheit

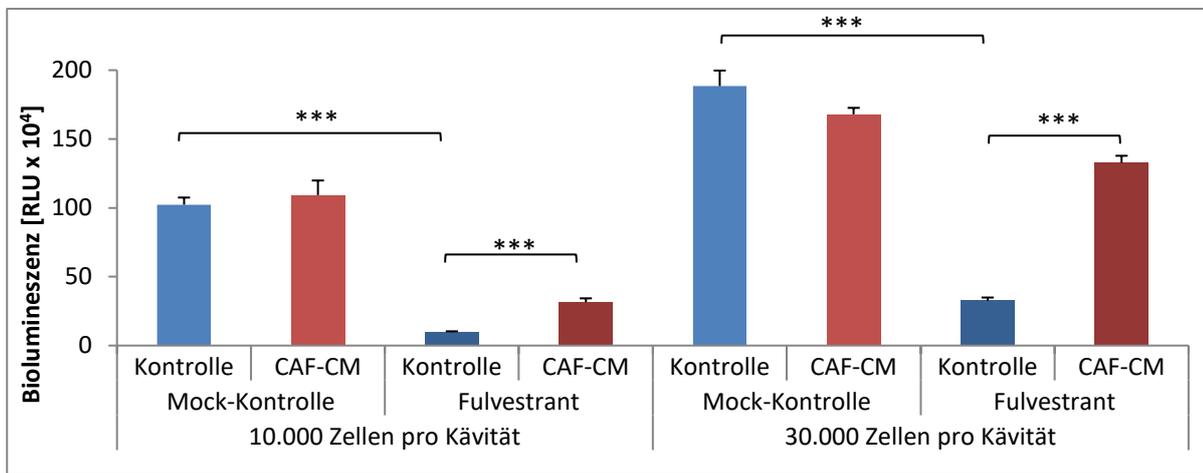
von 0,1  $\mu\text{M}$  Fulvestrant. Dazu wurden Klon-Assays durchgeführt, bei dem das Wachstum einzelner Zellklone nach fünf Tagen gemessen wurde (Abbildung 25).



**Abbildung 25. Einfluss von Fulvestrant auf MCF-7, MCF-7/MSC-Ko-Kulturen und MCF-7 ± CAF-CM oder MSC-CM.** (A) Effekte von Fulvestrant auf MCF-7-Zellkolonie-Flächen nach fünf Tagen Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Fulvestrant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mock-Kontrolle), im Klon-Assay. (B) Zellkolonie-Flächen von MCF-7-Zellen, MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (10:1) und MCF-7 + 20% konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen (MSC-CM) in An- und Abwesenheit (Mock-Kontrolle) von 0,1  $\mu\text{M}$  Fulvestrant. (C) Zellkolonie-Flächen von MCF-7-Zellen und MCF-7 + 20% konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) in An- und Abwesenheit (Mock-Kontrolle) von 0,1  $\mu\text{M}$  Fulvestrant. (A, B, C) Das Zellwachstum wurde mittels Messung der Fläche von Zellkolonien in einem Klon-Assay, nach fünf Tagen Kulturdauer, bestimmt. Dargestellt sind Boxplots von je mindestens 50 vermessenen Zellklonkolonien ( $n \geq 50$ ). Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, MSC = mesenchymale Stammzellen, MSC-CM = konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen

Die Applikation von 0,1  $\mu\text{M}$  Fulvestrant reduzierte die Fläche des Klones im Durchschnitt (Median) um etwa den Faktor vier (Abbildung 25A). In Anwesenheit von 0,1  $\mu\text{M}$  Fulvestrant waren die Koloniegrößen, im Vergleich zur Kontrolle, in MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (10:1) signifikant erhöht (Abbildung 25B). Dieser schützende Effekt von MSC gegen Fulvestrant war auch mit 20% MSC-CM und CAF-CM zu beobachten (Abbildung 25C). MSC-CM zeigte zudem einen wachstumsfördernden Effekt in Abwesenheit von Fulvestrant (Abbildung 25B). Zusammenfassend konnte ein parakriner, schützender Einfluss von MSC- und CAF-CM auf MCF-7-Zellen unter Fulvestrant-Therapie gezeigt werden.

Die Versuche wurden anschließend bei höherer Zelldichte wiederholt, bei der sich keine individuellen Kolonien bilden. Das Wachstum wurde in diesem Falle mittels einer biolumineszenten Methode gemessen, wobei die detektierte Biolumineszenz ein Äquivalent für den intrazellulären ATP-Gehalt darstellt und dieser als Maß für das Zellwachstum herangezogen werden kann. Es wurden je 10.000 bzw. 30.000 MCF-7-Zellen pro Kavität einer 12-well-Platte kultiviert. Diese wurden jeweils mit oder ohne 0,1  $\mu\text{M}$  Fulvestrant und/oder 20% CAF-CM behandelt und nach fünf Tagen analysiert (Abbildung 26).

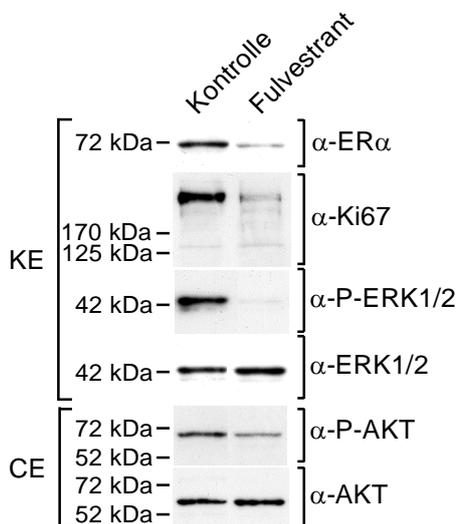


**Abbildung 26. Einfluss von Fulvestrant auf MCF-7 Zellwachstum in An- und Abwesenheit von 20% CAF-CM.**

Aufgetragen sind Biolumineszenz-Werte eines Luciferase-basierenden ATP-Assays von MCF-7-Zellen und MCF-7 + 20% konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM), in An- und Abwesenheit (Mock-Kontrolle) von 0,1  $\mu$ M Fulvestrant, nach fünf Tagen Kulturdauer. Das Zellwachstum wurde mittels Messung der emittierten Photonen der Luciferase-Reaktion durchgeführt. Dabei ist die gemessene Biolumineszenz ein Äquivalent für den zellulären ATP-Gehalt. Es wurden zwei verschiedene Zelldichten gewählt (10.000 und 30.000 Zellen pro Kavität, zu Beginn der Kultur), um die physiologische Wachstumssituation besser zu reflektieren. Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 4$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). ATP = Adenosintriphosphat, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten

Der biolumineszente Assay (Abbildung 26) lieferte ähnliche Ergebnisse wie der Klon-Assay (Abbildung 25). Auch hier zeigte sich in Gegenwart von Fulvestrant eine signifikante Wachstumserhöhung durch CAF-CM im Verhältnis zu Fulvestrant alleine, ohne dass CAF-CM einen Einfluss auf das Wachstum in Abwesenheit von Fulvestrant hatte (Abbildung 26). Die Ergebnisse legen nahe, dass stromale Zellen das Wachstum von adhären MCF-7-Zellen besonders in Gegenwart von Fulvestrant fördern und damit MCF-7 Zellen gegen Fulvestrant schützen.

Um den Mechanismus der Fulvestrant-desensitivierenden Wirkung von stromalen Zellen zu verstehen, wurde die Aktivität verschiedener Signaltransduktionswege (Abbildung 27) sowie die Expression von Markern der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) und von Stammzellgenen nach Zugabe von Fulvestrant untersucht (Abbildung 28).

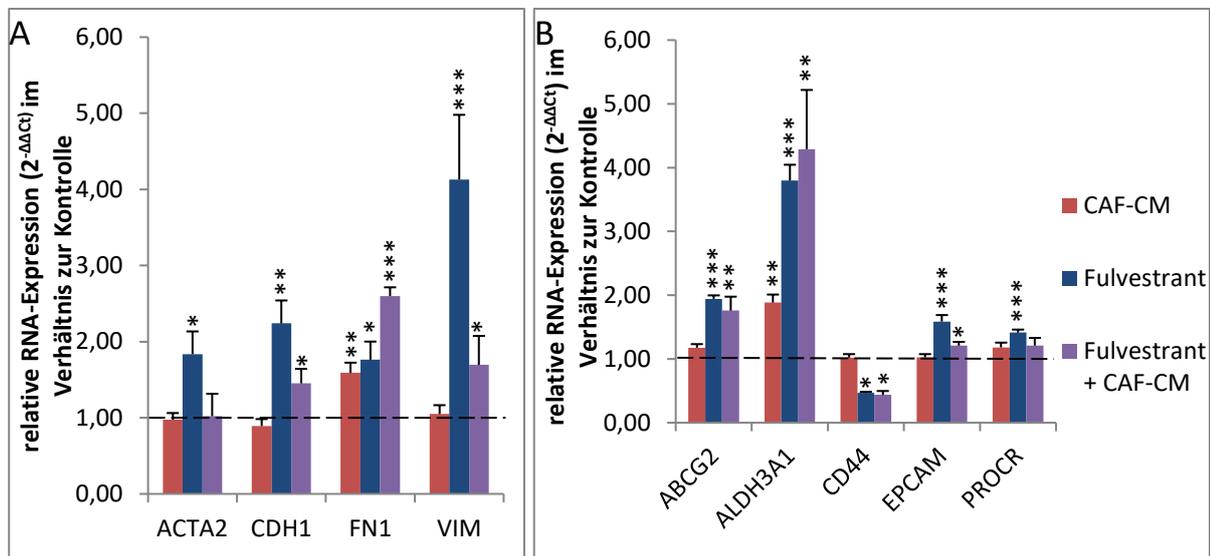


**Abbildung 27. Effekt von Fulvestrant auf die Abundanz bestimmter Proteine.**

Western-Blot-Analyse fraktionierter Zelllysate von MCF-7-Zellen mit 0,1  $\mu$ M Fulvestrant und unbehandelten MCF-7-Zellen (Mock-Kontrolle), nach je sechs Tagen Kulturdauer. Gezeigt sind die Proteinmengen von ER $\alpha$ , Ki67, ERK1/2, P-ERK1/2, AKT und P-AKT. Zu den phosphorylierten Proteinen sind jeweils die unphosphorylierten Formen gezeigt. Diese dienen gleichzeitig als Ladekontrolle. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt und die gezeigten Daten sind repräsentativ für beide Duplikate. AKT = *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*, CE = Cytosolextrakt, ER $\alpha$  = Estrogen-Rezeptor alpha, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, KE = Kernextrakt, Ki67 = Antigen Kiel 67, P- = phosphoryliert

In der Western-Blot-Analyse von MCF-7-Zellen nach sechs Tagen Behandlung mit 0,1  $\mu$ M Fulvestrant senkte dieses eindeutig und erwartungsgemäß die Proteinmengen seines Zielproteins ER $\alpha$  und die des Proliferationsmarkers Antigen Kiel 67 (Ki67) (Abbildung 27). Des Weiteren führte die sechstägige Behandlung mit Fulvestrant zu einer starken Abnahme der Menge an phosphoryliertem Protein von *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2 und senkte ebenfalls die Menge an P-AKT (Abbildung 27). Damit konnte gezeigt werden, dass Fulvestrant in MCF-7-Zellen die Aktivität des PI3K/AKT- und des Ras/Raf/MEK/ERK1/2-Signaltransduktionsweges reduziert. Diese beiden Signalwege wurden ebenfalls durch die Stromazellen beeinflusst. Interessanterweise wurden diese induziert (Abbildung 20 und Abbildung 16) und verhielten sich damit invers zur Wirkung von Fulvestrant.

Da aus diesen Daten und den Wachstums-Assays bekannt war, dass MSCs und CAFs die MCF-7-Zellen vor der Wirkung von Fulvestrant schützten, wurde auf Genexpressions-Ebene analysiert, ob eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) induziert wird oder Krebsstammzellen selektiert (Krebsstammzell-Gene wurden als Surrogat gemessen) werden. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit 20% CAF-CM und/oder 0,1  $\mu$ M Fulvestrant behandelt und per RT-qPCR analysiert (Abbildung 28).

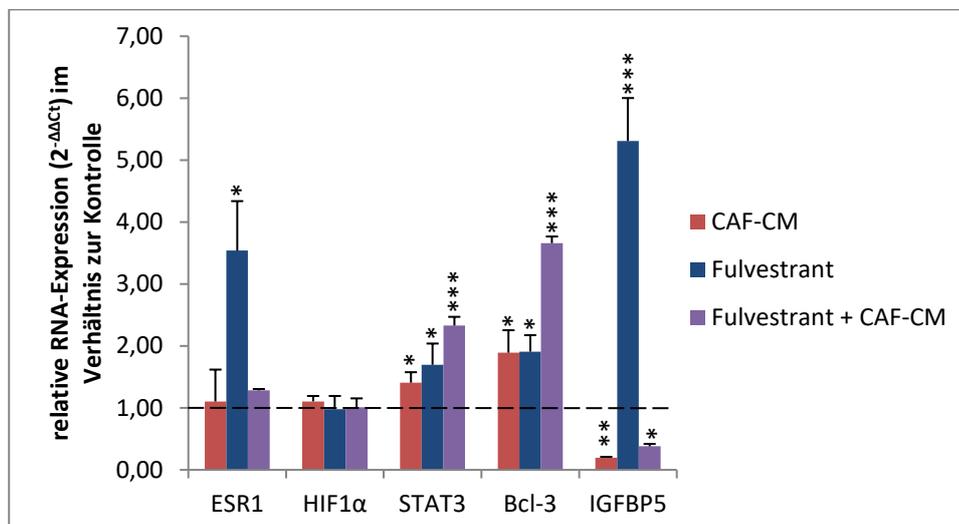


**Abbildung 28. Effekte von Fulvestrant und 20% CAF-CM auf EMT-Marker (A) und Krebsstammzell-Genexpressionen (B) in MCF-7-Zellen.**

**(A)** RT-qPCR-Analysen von Markern der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) in MCF-7-Kulturen nach Gabe 0,1  $\mu$ M Fulvestrant, in An- und Abwesenheit von 20% konditioniertem Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM), nach je zwei Tagen Kulturdauer. **(B)** RT-qPCR-Analysen von Stammzellgenen von MCF-7-Kulturen nach Gabe von 0,1  $\mu$ M Fulvestrant in An- und Abwesenheit von 20% konditioniertem Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM), nach je zwei Tagen Kulturdauer. **(A, B)** Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Mock-Kontrolle (MCF-7-Kulturen ohne CAF-CM mit DMSO; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). ACTA2 = *alpha-actin-2*, ABCG2 = *ATP-binding cassette sub-family G member 2*, ALDH3A1 = Aldehyd-Dehydrogenase 3 Familie Mitglied A1, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CD44 = *cluster of differentiation 44*, CDH1 = Cadherin 1, EMT = epitheliale-mesenchymale Transition, EPCAM = *epithelial cell adhesion molecule*, FN1 = Fibronectin 1, PROCR = *endothelial protein C receptor*, VIM = Vimentin

Fulvestrant erhöhte signifikant die mesenchymalen Marker ACTA2 (*alpha-actin-2*), Fibronectin (FN1) und Vimentin (VIM), was auf die Induktion einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) hindeutet (Abbildung 28A). Jedoch wurde auch die mRNA-Expression von E-Cadherin (CDH1) erhöht. Auf Proteinebene konnte kein Nachweis einer erhöhten E-Cadherin-Menge erbracht werden (Daten nicht gezeigt). CAF-CM alleine induzierte eine leichte Erhöhung von FN1 (Abbildung 28A). CAF-CM und Fulvestrant wirkten induzierend und synergistisch auf die Expression von FN1. Zudem verminderte das CAF-CM den Effekt von Fulvestrant auf CDH1 und VIM (Abbildung 28A). Interessant ist, dass das CAF-CM den CDH1-induzierenden Effekt von Fulvestrant abschwächt, was auf eine eventuelle Verschiebung in Richtung EMT hindeuten könnte. Des Weiteren induzierte Fulvestrant einige Krebsstammzellmarker wie ABCG2 (*ATP-binding cassette sub-family G member 2*), ALDH3A1 (Aldehyd-Dehydrogenase 3 Familie Mitglied A1), EPCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) und PROCR (*endothelial protein C receptor*) (Abbildung 28B), der Stammzellmarker CD44 (*cluster of differentiation 44*) wurde gesenkt. CAF-CM alleine induzierte nur ALDH3A1. CAF-CM und Fulvestrant wirkten in Kombination nicht anders als jeweils alleine auf die getesteten Stammzellgene. Daraus kann geschlossen werden, dass Fulvestrant einen eher mesenchymalen und „stammzellähnlichen“ Phänotyp selektiert (übereinstimmend zu mikroskopischen Beobachtungen aus den Klonogen-Assays). Das CAF-CM wirkte unter Fulvestrant-Therapie nicht fördernd auf die Selektion von Stammzellmarkern. Daher kann der protektive Effekt von CAF-CM auf das Wachstum, unter Fulvestrant, in MCF-7-Zellen sowohl im Klon-Assay (Abbildung 25) als auch im ATP-Assay (Abbildung 26) nicht auf eine verstärkte EMT oder die Förderung von Krebsstammzellen

zurückgeführt werden. Demzufolge liegt es nahe, dass der desensitivierende Effekt des CAF-CM gegen Fulvestrant eine andere Ursache haben muss, z.B. die gezeigte Aktivierung der IGFR/PI3K/AKT-, STAT3- oder Hypoxie-Signalwege. Aufgrund dessen wurde der Effekt von 0,1  $\mu$ M Fulvestrant, in An- und Abwesenheit von 20% CAF-CM auf die Expression in der Therapieresistenz relevanter Gene analysiert, die von CAF-CM auf Proteinebene reguliert wurden (Abbildung 29).

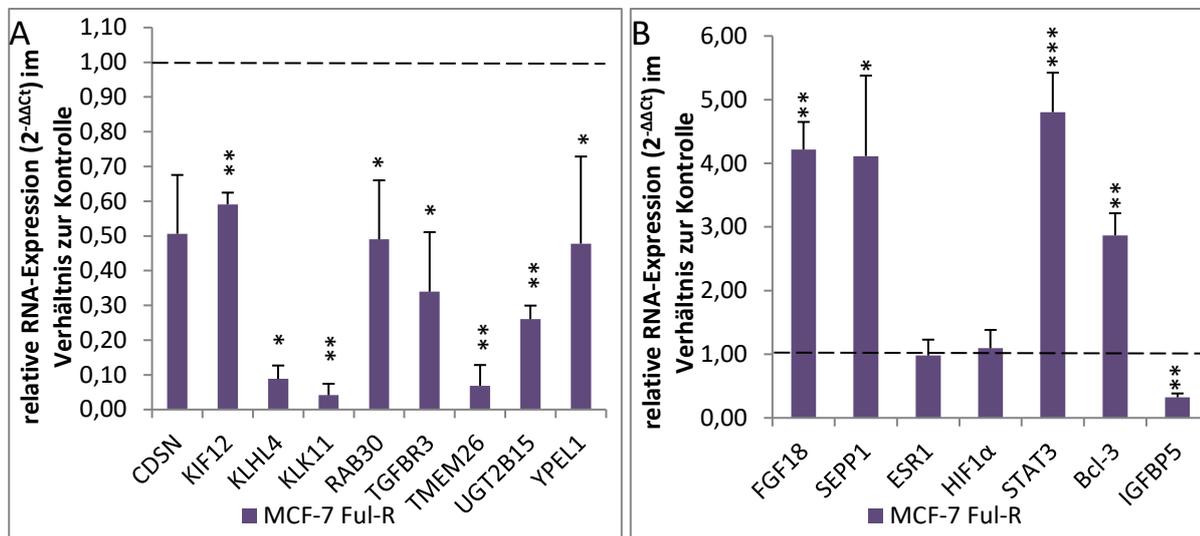


**Abbildung 29. Effekte von Fulvestrant und 20% CAF-CM auf die mRNA-Expressionen onkologisch bedeutsamer Gene in MCF-7-Zellen.**

RT-qPCR-Analysen wichtiger Gene in der Therapieresistenz in MCF-7-Kulturen nach Gabe von 0,1  $\mu$ M Fulvestrant, in An- und Abwesenheit von 20% konditioniertem Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM), nach je zwei Tagen Kulturdauer. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Mock-Kontrolle (MCF-7-Kulturen ohne CAF-CM mit DMSO; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, ESR1 = Estrogen -Rezeptor 1 (Gen des ER $\alpha$ ), HIF1 $\alpha$  = *hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$* , IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*

Keine der drei getesteten Bedingungen führte zu einer Induktion der mRNA von HIF1 $\alpha$  (Abbildung 29). Fulvestrant induzierte eine Steigerung der Genexpression von ESR1 um Faktor 3,5, was möglicherweise auf eine Gegenregulation wegen des proteasomalen Abbaus von ER $\alpha$  zurückzuführen ist. Sowohl CAF-CM als auch Fulvestrant steigerten die Expression von STAT3 und Bcl-3, in Kombination war der erhöhende Effekt stärker ausgeprägt (Abbildung 29). Fulvestrant erhöhte die Expression von IGFBP5, im Verhältnis zur Kontrolle, um das Fünffache. Das CAF-CM senkte die Expression von IGFBP5 auf ca. ein Fünftel der unbehandelten Proben. Damit unterschieden sich die Expressionen von IGFBP5, im Vergleich zu MCF-7-Zellen mit Fulvestrant gegen CAF-CM, um ca. Faktor 25. Nach Applikation von CAF-CM und Fulvestrant wurde die Expression von IGFBP5, im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle, auf ca. ein Drittel gesenkt (Abbildung 29).

Weil gezeigt werden konnte, dass die „stromal regulierten“ Gene (Tabelle 17) unter Fulvestrant reguliert wurden, CAFs und MSC eine Resistenz gegen Fulvestrant induzierten und dies mit der Induktion weiter RNA assoziiert war (Abbildung 29), wurde überprüft, wie diese Gene in der Fulvestrant resistenten MCF-7-Zelllinie „MCF-7 Ful-R“ exprimiert sind. Dazu wurde die basale Expression der Gene in MCF-7 Ful-R im Verhältnis zu MCF-7-Zellen bestimmt (Abbildung 30A und B).



**Abbildung 30. Die Expression der „stromal regulierten“ Gene in der Fulvestrant-resistenten MCF-7-Zelllinie „MCF-7 Ful-R“ (A, B).**

(A, B) RT-qPCR-Analysen der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7 Ful-R-Zellen. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative 2<sup>-ΔΔCt</sup>-Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (parentale MCF-7-Kulturen; mit Bezugsgröße 1). (A, B) Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen (n = 3), \* p ≤ 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CDSN = *Corneodesmosin*, ESR1 = *Estrogen-Rezeptor 1* (Gen des ERα), FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, HIF1α = *hypoxia-inducible factor 1-α*, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), MSC = mesenchymale Stammzellen, RAB30 = *ras-related in brain 30*, SEPP1 = *Selenoprotein P Plasma 1*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like 1*

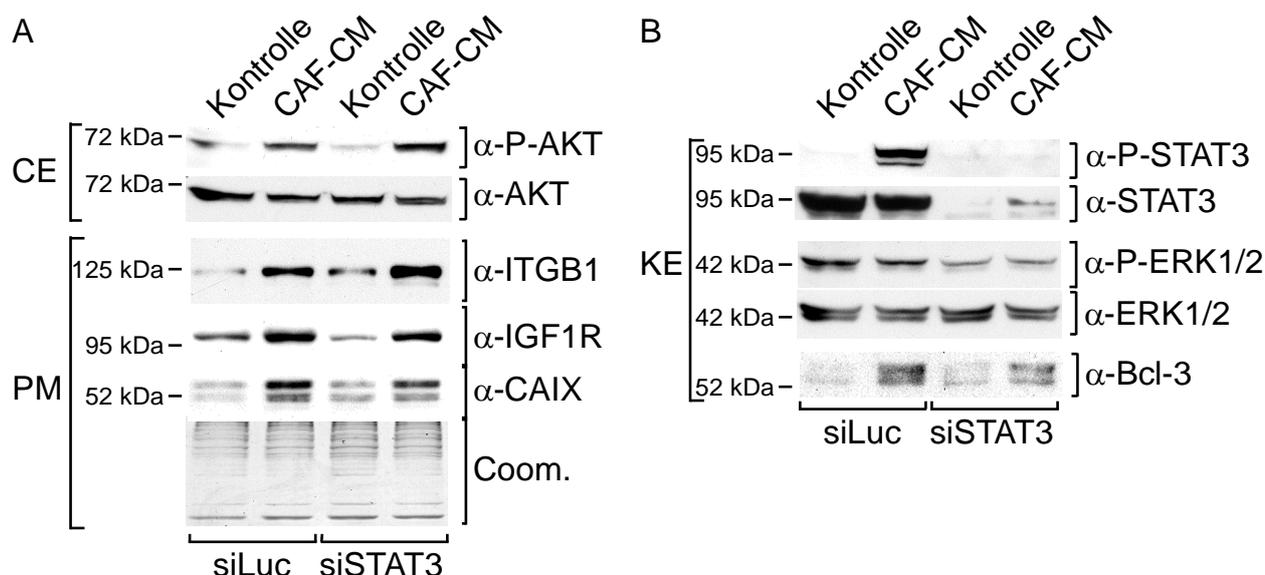
Im Vergleich zu den parentalen MCF-7-Zellen waren in den MCF-7 Ful-R die Transkripte für CDSN, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, TGFBR3, TMEM26, UGT2B15 und YPEL1 in der Expression gesenkt (Abbildung 30A), die mRNAs von FGF18 und SEPP1 waren hingegen um Faktor vier erhöht (Abbildung 30B). In der Expression von HIF1α und ESR1 war kein Unterschied nachweisbar. Es konnten signifikante Erhöhung für STAT3 und Bcl-3 gezeigt werden sowie eine starke Herunterregulation von IGFBP5 (Abbildung 30B). In den MCF-7 Ful-R scheint bereits basal Bcl-3 induziert und IGFBP5 reprimiert zu sein. Dies könnte ein Hinweis auf die Bedeutung der Bcl-3/IGFBP-5-Achse für die Endokrine-Resistenz-Bildung sein.

### 3.3.6. Analysen zum Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und der Reprimierung der „stromal regulierten“ Gene

Aus den vorherigen Experimenten ist bekannt, dass 20% MSC-CM und 20% CAF-CM zu einer Erhöhung der am Serin 473 phosphorylierten Variante von P-AKT im Cytosol und einer gesteigerten Proteinmenge des membranständigen IGF1R (Abbildung 16A) führten. Außerdem führte die Zugabe von MSC-CM und CAF-CM zu einer Phosphorylierung des STAT3 und der Induktion des Kernproteins Bcl-3 (Abbildung 20). Alle diese Signalwege können die Aktivität des Estrogen-Rezeptors modulieren sowie zu Bildung einer endokrinen Resistenz beitragen (Dixon, 2014; Osborne and Schiff, 2011; Pratt et al., 2003; Sasser et al., 2007). Deswegen wurden, zur Aufklärung des dahinter stehenden Mechanismus, ausgewählte Proteine mit spezifischer siRNA reprimiert.

### 3.3.6.1. Einfluss von STAT3 auf den Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und die „stromal regulierten“ Gene

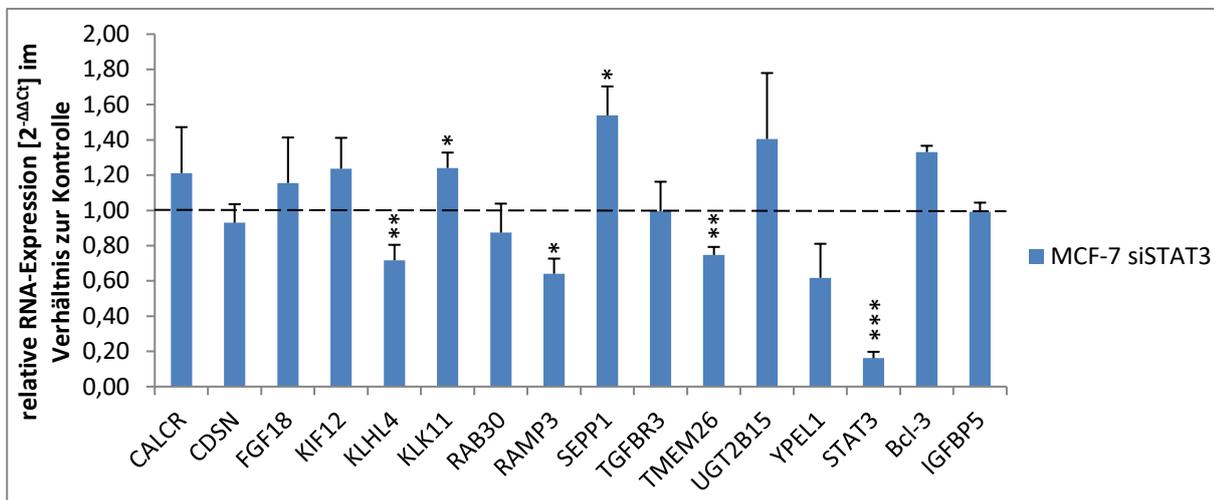
Aus Experimenten mit Prostatakarzinom-Zellen ist bekannt, dass Bcl-3 durch eine Interleukin-6 (IL6) vermittelte Erhöhung von STAT3 induziert werden kann (Ahlqvist et al., 2013). Aufgrund dessen wurde analysiert, ob STAT3 und Bcl-3 in MCF-7-Zellen ebenfalls „gekoppelt“ sind. Dazu wurde ein spezifischer Knock-down von STAT3, mit der siRNA siSTAT3, durchgeführt. Die Zellen wurden nach erfolgreichem Knock-down von STAT3 mit 20% CAF-CM inkubiert, auf Proteinebene analysiert (Abbildung 31) und die Expression von STAT3, Bcl-3, IGF1R und der „stromal regulierten“ Gene bestimmt (Abbildung 32).



**Abbildung 31. Western-Blot-Analyse der Effekte von CAF-CM auf MCF-7-Zellen nach Knock-down von STAT3.**

Es wurden MCF-7-Zellen nach Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen STAT3 (siSTAT3) oder gegen Luciferase (siLuc, Kontrolle) in An- und Abwesenheit von 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) für je zwei Tage kultiviert. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zelllysate fraktioniert in Cytosol- (CE), Kern- (KE) und Plasmamembranextrakte (PM). Als Ladekontrolle für die Plasmamembranextrakte wurden die nach dem Elektrobplot auf dem Gel verbliebenen Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Coom.) gefärbt. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt (n = 2) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CAIX = Carboanhydrase IX, CE = Cytosolextrakt, Coom. = Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Färbung, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, IGF1R = *insulin-like growth factor 1 receptor*, ITGB1 = Integrin beta 1, KE = Kernextrakt, MSC-CM = konditioniertes Medium von mesenchymalen Stammzellen, P = phosphoryliert, PM = Plasmamembranextrakt, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*

Der Knock-down von STAT3 konnte erfolgreich durchgeführt werden und zeigte eine eindeutige Reduktion der Proteinmenge von P-STAT3 und STAT3 (Abbildung 31B) sowie der mRNA von STAT3 (Abbildung 32). Der Knock-down von STAT3 senkte leicht die Proteinmenge von IGF1R in der Plasmamembran (Abbildung 31A) und verminderte die Menge von P-ERK1/2 im Kern (Abbildung 31B). SiSTAT3 reduzierte leicht die CAF-CM vermittelte Erhöhung von Bcl-3. Die Aktivierung von STAT3 durch stromale Zellen ist wahrscheinlich nicht der Hauptgrund für die Induktion von Bcl-3, kann aber dazu beitragen.



**Abbildung 32. RT-qPCR-Analysen der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7 nach Knock-down von STAT3.**

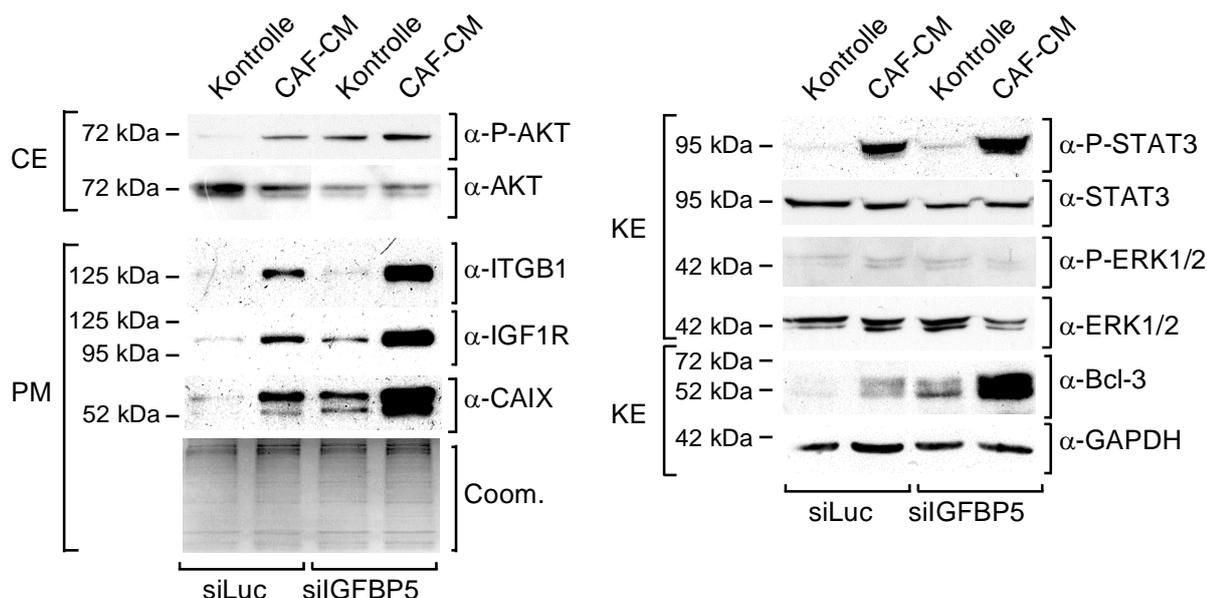
RNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen nach Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen STAT3 (siSTAT3) nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Zellen elektroporiert mit siLuc, siRNA gegen Luciferase; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle (siLuc)). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CALCR = *Calcitoninrezeptor*, CDSN = *Corneodesmosin*, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = *Selenoprotein P Plasma 1*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like 1*

Die „stromal regulierten“ Gene wurden durch siSTAT3 geringfügig und uneinheitlich beeinflusst (Abbildung 32). KLHL4, RAMP3 und TMEM26 wurden durch diese siRNA signifikant um ca. 30% - 40% in der Expression reduziert. KLK11 und SEPP1 wurden durch siSTAT3 leicht in der Expression erhöht (Abbildung 32). Die restlichen Gene zeigten keine signifikanten Expressionsänderungen. Die Aktivierung von STAT3 durch stromale Zellen ist somit wahrscheinlich nicht der Hauptgrund für die Repression der „stromal regulierten“ Gene, könnte aber dazu beitragen (Abbildung 32).

### 3.3.6.2. Einfluss von IGFBP5 auf den Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und die „stromal regulierten“ Gene

Die Senkung der Expression von IGFBP5 durch 20% CAF-CM war ein sehr frühes Ereignis während der Interaktion von MSCs/CAFs mit MCF-7-Zellen. Bereits nach 4 h war die Expression IGFBP5 auf ca. 50% im Verhältnis zur Kontrolle vermindert (Abbildung 1 Anhang). Des Weiteren war der supprimierende Effekt des CAF-CM auf IGFBP5 langanhaltend und konnte noch nach 72 h detektiert werden, wobei hier das Expressionslevel von IGFBP5 bei ca. 30% im Verhältnis zur Kontrolle lag (Abbildung 1 Anhang). Hinzu kommt, dass IGFBP5 das höchst abundante IGFBP in MCF-7-Zellen ist (Abbildung 18). Daher sollte die stromal induzierte Absenkung der Expression von IGFBP5 die relevante Regulation für die Aktivität des IGF1R sein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CAF-CM unter gleichzeitiger Gabe von Fulvestrant IGFBP5 senkte und Bcl-3 erhöhte (Abbildung 29). Beide Gene waren ebenfalls in der Fulvestrant-resistenten Zelllinie MCF-7 Ful-R identisch reguliert (IGFBP5 herunterreguliert, Bcl-3 hochreguliert) (Abbildung 29). Aus diesen Gründen und um zu testen, ob IGFBP5 die stromal induzierten Effekte nachahmen kann, wurde ein Knock-down von IGFBP5 mit der spezifischen siRNA siIGFBP5 durchgeführt. Die Zellen wurden nach erfolgreichem Knock-down von IGFBP5

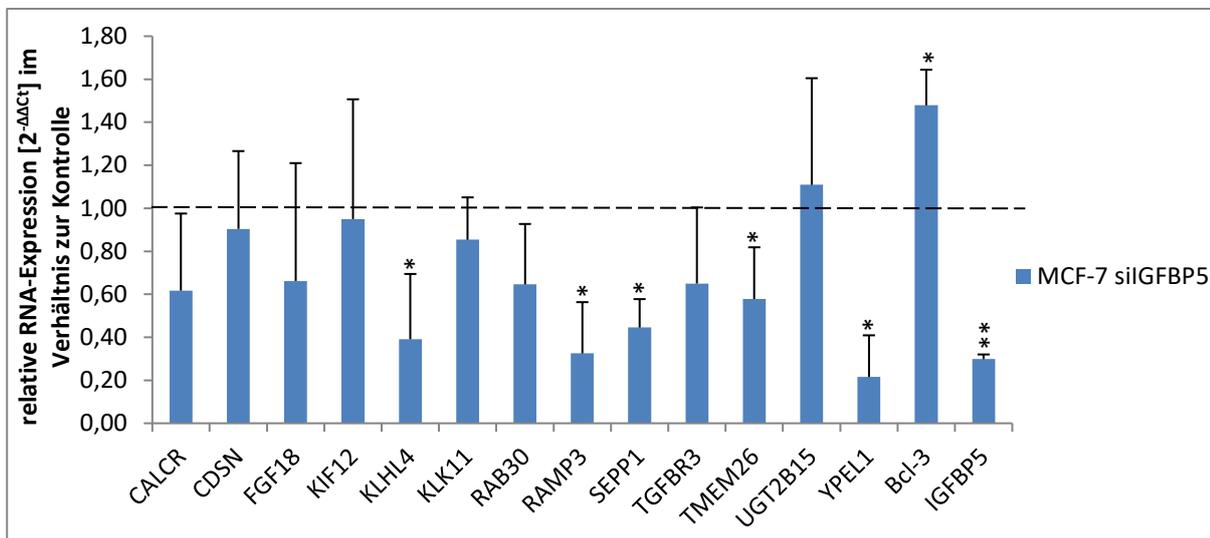
mit 20% CAF-CM inkubiert, auf Proteinebene analysiert (Abbildung 33) und die Expression von Bcl-3, IGFBP5 und der „stromal regulierten“ Gene bestimmt (Abbildung 34).



**Abbildung 33. Western-Blot-Analyse der Effekte von CAF-CM auf MCF-7-Zellen nach Knock-down von IGFBP5.**

Es wurden MCF-7-Zellen nach Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen IGFBP5 (siIGFBP5) oder gegen Luciferase (siLuc, Kontrolle) in An- und Abwesenheit von 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) für je zwei Tage kultiviert. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zelllysate fraktioniert in Cytosol- (CE), Kern- (KE) und Plasmamembranextrakte (PM). Als Ladekontrolle für die Plasmamembranextrakte wurden die nach dem Elektrolot auf dem Gel verbliebenen Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Coom.) gefärbt. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CAIX = Carboanhydrase IX, CE = Cytosolextrakt, Coom. = Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Färbung, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, IGF1R = *insulin-like growth factor 1 receptor*, ITGB1 = Integrin beta 1, KE = Kernextrakt, P = phosphoryliert, PM = Plasmamembranextrakt, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*

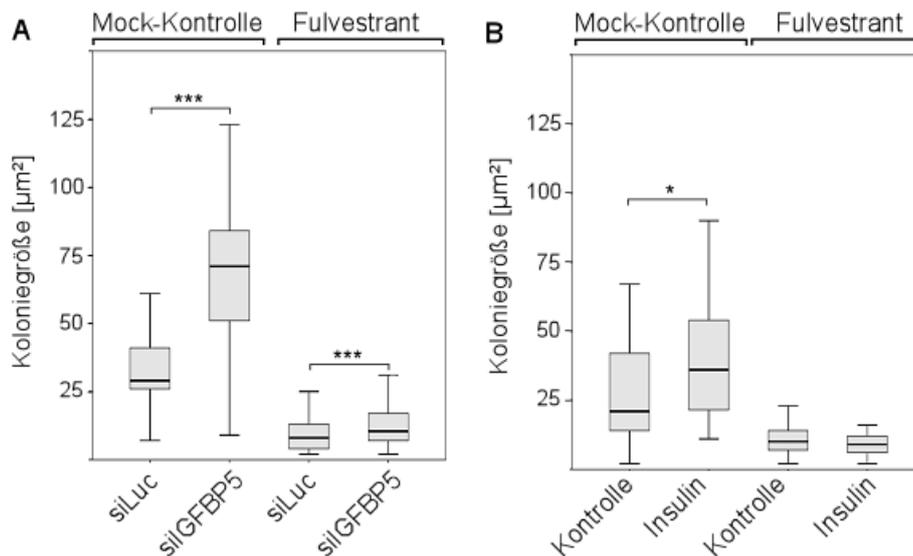
Der Knock-down von IGFBP5 mit siIGFBP5 senkte die Expression von IGFBP5 auf ca. 20% im Verhältnis zum Kontroll-Knock-down (siLuc) (Abbildung 34). Die Behandlung mit siIGFBP5 führte zu einer eindeutigen Steigerung der Proteinmengen von P-AKT, CAIX und Bcl-3, die mit der Induktion durch das CAF-CMs vergleichbar ist (Abbildung 33). Zusätzlich erhöhte siIGFBP5 die Mengen des membranständigen IGF1R leicht und führte zu einer schwachen Induktion von P-STAT3 im Kernextrakt (Abbildung 33). Die Expression von ITGB1 und P-ERK1/2 wurde durch den Knock-down von IGFBP5 nicht beeinflusst.



**Abbildung 34. RT-qPCR-Analysen der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7 nach Knock-down von IGFBP5.**

RNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen nach Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen IGFBP5 (siIGFBP5) nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Zellen elektroporiert mit siLuc, siRNA gegen Luciferase; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle (siLuc)). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CALCR = *Calcitoninrezeptor*, CDSN = *Corneodesmosin*, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = *Selenoprotein P Plasma 1*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like 1*

Der erfolgreiche Knock-down von IGFBP5 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf CALCR, CDSN, FGF18, KIF12, KLK11, TGFBR3 und UGT2B15. Die mRNAs von KLHL4, RAMP3, SEPP1, TMEM26 und YPEL1 wurden signifikant in ihrer Expression gesenkt (Abbildung 34). Interessanterweise wurde Bcl-3 in der mRNA- und Protein-Expression signifikant erhöht, somit zeigte sich auch hier wieder ein inverses Verhältnis von IGFBP5 zu Bcl-3 (ähnlich wie in Abbildung 23 und Abbildung 24). Da dieses inverse Verhältnis auch nach Fulvestrant-Zugabe vorhanden war und mit der möglichen endokrinen Resistenz in Verbindung stehen könnte (Abbildung 29 und Abbildung 30), wurde nun überprüft, welchen Einfluss ein Knock-down von IGFBP5 auf die stromal induzierte Resistenzbildung gegen Fulvestrant zur Folge hat. Dazu wurde ein Knock-down von IGFBP5 mit der spezifischen siRNA siIGFBP5 durchgeführt. Mit den Zellen wurde nach erfolgreichem Knock-down ein Klonogen-Assay durchgeführt (Abbildung 35A).



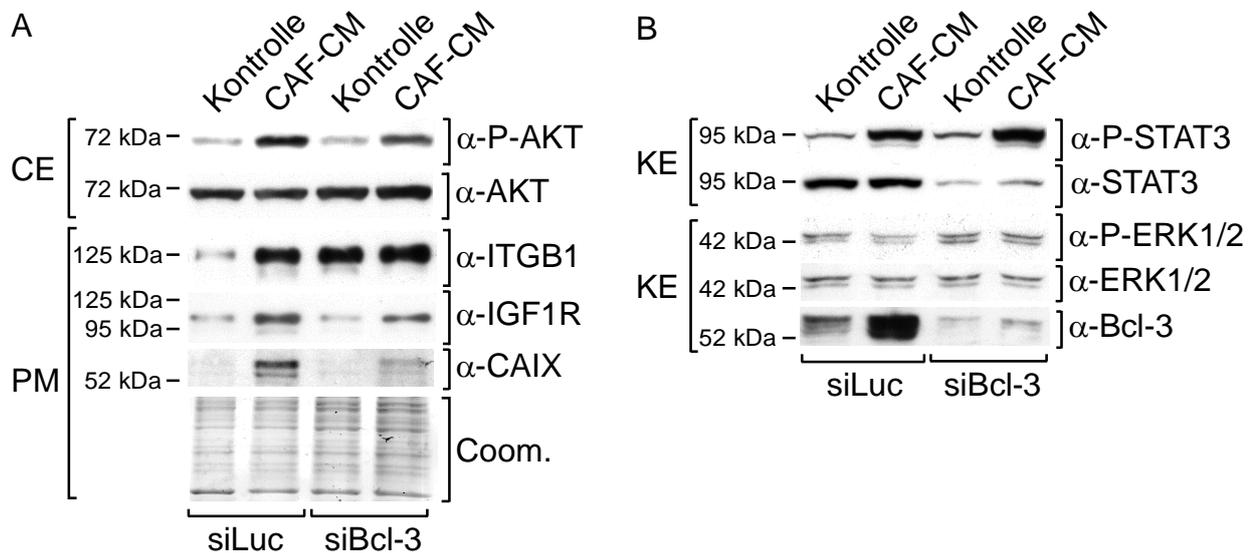
**Abbildung 35. Einfluss von siIGFBP5 und Insulin auf das Wachstum einzelner Klone von MCF-7-Zellen in An- und Abwesenheit von Fulvestrant.**

**(A)** Effekte von siIGFBP5 in MCF-7-Kulturen nach Elektroporation mit siRNA gegen IGFBP5 (siIGFBP5) nach fünf Tagen Behandlung mit und ohne  $0,1 \mu\text{M}$  Fulvestrant im Vergleich zur Kontrolle (siLuc, siRNA gegen Luciferase). **(B)** Effekte von  $1,7 \mu\text{M}$  Insulin auf MCF-7-Zellen nach fünf Tagen Behandlung mit und ohne  $0,1 \mu\text{M}$  Fulvestrant im Vergleich zur Kontrolle (siLuc, siRNA gegen Luciferase). **(A)** und **(B)** Das Zellwachstum wurde mittels Messung der Fläche von Zellkolonien in einem Klon-Assay, nach fünf Tagen Kulturdauer, bestimmt. Dargestellt sind Boxplots von je mindestens 50 vermessenen Zellklonkolonien ( $n \geq 50$ ). Die Experimente wurden zweimal durchgeführt ( $n = 2$ ) und die gezeigten Daten sind repräsentativ. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*

In Abwesenheit von Fulvestrant führte der Knock-down von IGFBP5 zu einer Vergrößerung der Kolonien unter Kontrollbedingungen (Abbildung 35A). In Gegenwart von Fulvestrant führte siIGFBP5, im Verhältnis zu Fulvestrant alleine, ebenfalls zu einer Vergrößerung der Koloniefächen (Abbildung 35A). Um zu testen, ob dieser Effekt von der Induktion des IGF/PI3K/AKT-Signalweges abhängig war, wurde das Experiment in Gegenwart von Insulin wiederholt (Abbildung 35B). Dabei führte Insulin zu einem besseren Wachstum in Fulvestrant-freiem Medium, hatte allerdings keinen Effekt in Anwesenheit von Fulvestrant. Dies legt die Vermutung nahe, dass der desensitivierende Effekt von siIGFBP5 gegen Fulvestrant nicht auf Aktivierung des IGF/PI3K/AKT-Signalweges zurückzuführen ist.

### 3.3.6.3. Einfluss von Bcl-3 auf den Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und die „stromal regulierten“ Gene

Weil der Knock-down von IGFBP5 zu einer starken Induktion von Bcl-3 führte, wurde nun überprüft, inwieweit Bcl-3 für die stromalen Effekte verantwortlich sein könnte. Dazu wurde ein Knock-down von Bcl-3 mit einer spezifischen siRNA (siBcl-3) durchgeführt und der Effekt auf die CAF-CM vermittelte Signaltransduktion im Western-Blot (Abbildung 36) und per RT-qPCR (Abbildung 37) analysiert.

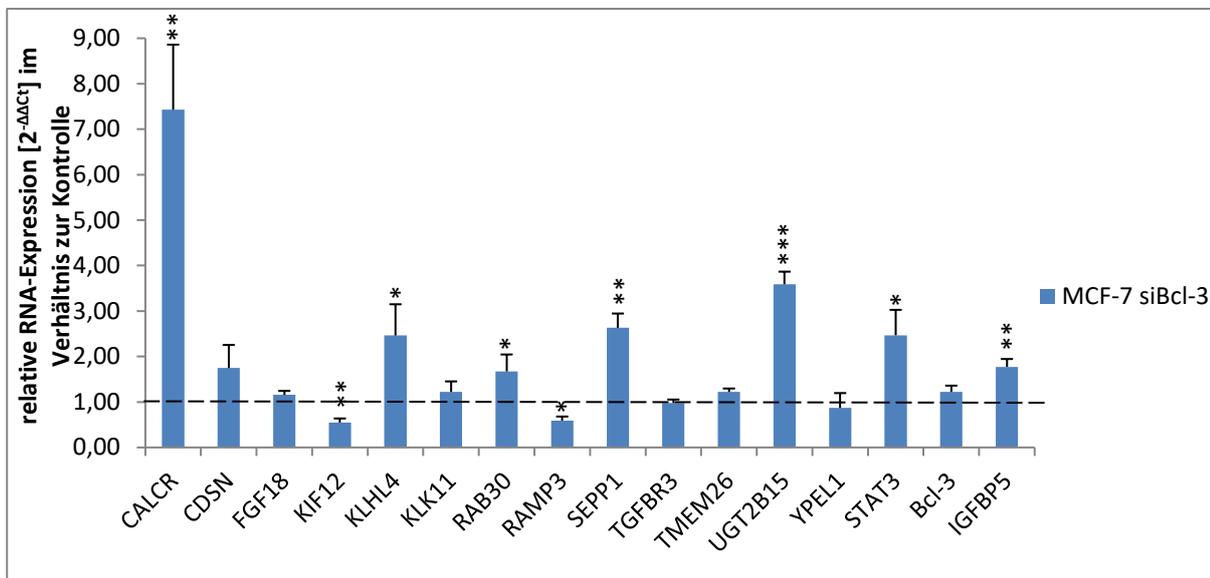


**Abbildung 36. Western-Blot-Analyse der Effekte von CAF-CM auf MCF-7-Zellen nach Knock-down von Bcl-3.**

Es wurden MCF-7-Zellen nach Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen Bcl-3 (siBcl-3) oder gegen Luciferase (siLuc, Kontrolle) in An- und Abwesenheit von 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) für je zwei Tage kultiviert. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zelllysate fraktioniert in Cytosol- (CE), Kern- (KE) und Plasmamembranextrakte (PM). Als Ladekontrolle für die Plasmamembranextrakte wurden die nach dem Elektrobplot auf dem Gel verbliebenen Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Coom.) gefärbt. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CAIX = Carboanhydrase IX, CE = Cytosolextrakt, Coom. = Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Färbung, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, IGF1R = *insulin-like growth factor 1 receptor*, ITGB1 = Integrin beta 1, KE = Kernextrakt, P = phosphoryliert, PM = Plasmamembranextrakt, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*

Der Knock-down von Bcl-3 mit der spezifischen siRNA siBcl-3 führte zu einer eindeutigen Reduktion der Proteinmenge von Bcl-3 (Abbildung 36B). Des Weiteren wurde durch den Knock-down die Plasmamembranmenge von ITGB1 erhöht (Abbildung 36A). SiBcl-3 schwächte die Wirkung von 20% CAF-CM auf IGF1R und CAIX ab (Abbildung 36), sodass diese durch CAF-CM, im Verhältnis zum Kontroll-Knock-down (siLuc) mit CAF-CM, nicht mehr so stark erhöht wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die stromalen Zellen das Plasmamembran-Level von CAIX und IGF1R über die Induktion von Bcl-3 erhöhen können.

Des Weiteren wurde der Knock-down auf der mRNA-Ebene sowie der Effekt der Reduktion von Bcl-3 auf die „stromal regulierten“ Gene überprüft (Abbildung 37).

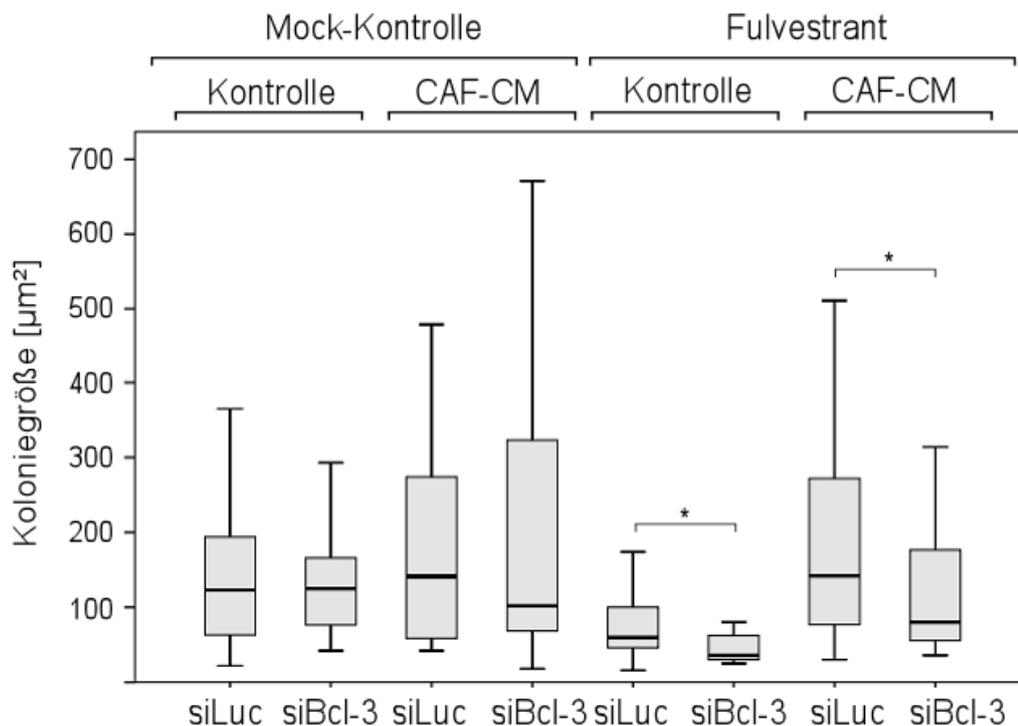


**Abbildung 37. RT-qPCR-Analysen der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7 nach Knock-down von Bcl-3.**

RNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen nach Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen Bcl-3 (siBcl-3) nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (MCF-7-Zellen elektroporiert mit siLuc, siRNA gegen Luciferase; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle (siLuc)). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CALCR = *Calcitoninrezeptor*, CDSN = *Corneodesmosin*, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = *Selenoprotein P Plasma 1*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like 1*

Der Knock-down von Bcl-3 war nach zwei Tagen Kulturdauer auf mRNA-Level nicht mehr detektierbar (Abbildung 37), konnte jedoch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 36). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Knock-down auf mRNA-Ebene bereits abgeklungen und nur noch auf Proteinebene sichtbar war. SiBcl-3 zeigte eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge von KIF12 und RAMP3 (Abbildung 37). Signifikante Erhöhungen für die mRNA-Level von KLHL4, RAB30, SEPP1, UGT2B15, STAT3 und IGFBP5 waren nachweisbar. Besonders interessant ist an dieser Stelle, dass IGFBP5 wiederholt invers zu Bcl-3 reguliert wird.

Nach den Analysen des Bcl-3 Knock-downs auf Protein- und mRNA-Level wurde nun überprüft, welchen Effekt siBcl-3 auf die CAF-induzierten endokrinen Resistenzmechanismen gegen Fulvestrant hatte. Dazu wurde mit den MCF-7-Zellen, nach erfolgreichem Bcl-3 Knock-down, ein Klonogen-Assay durchgeführt (Abbildung 38).



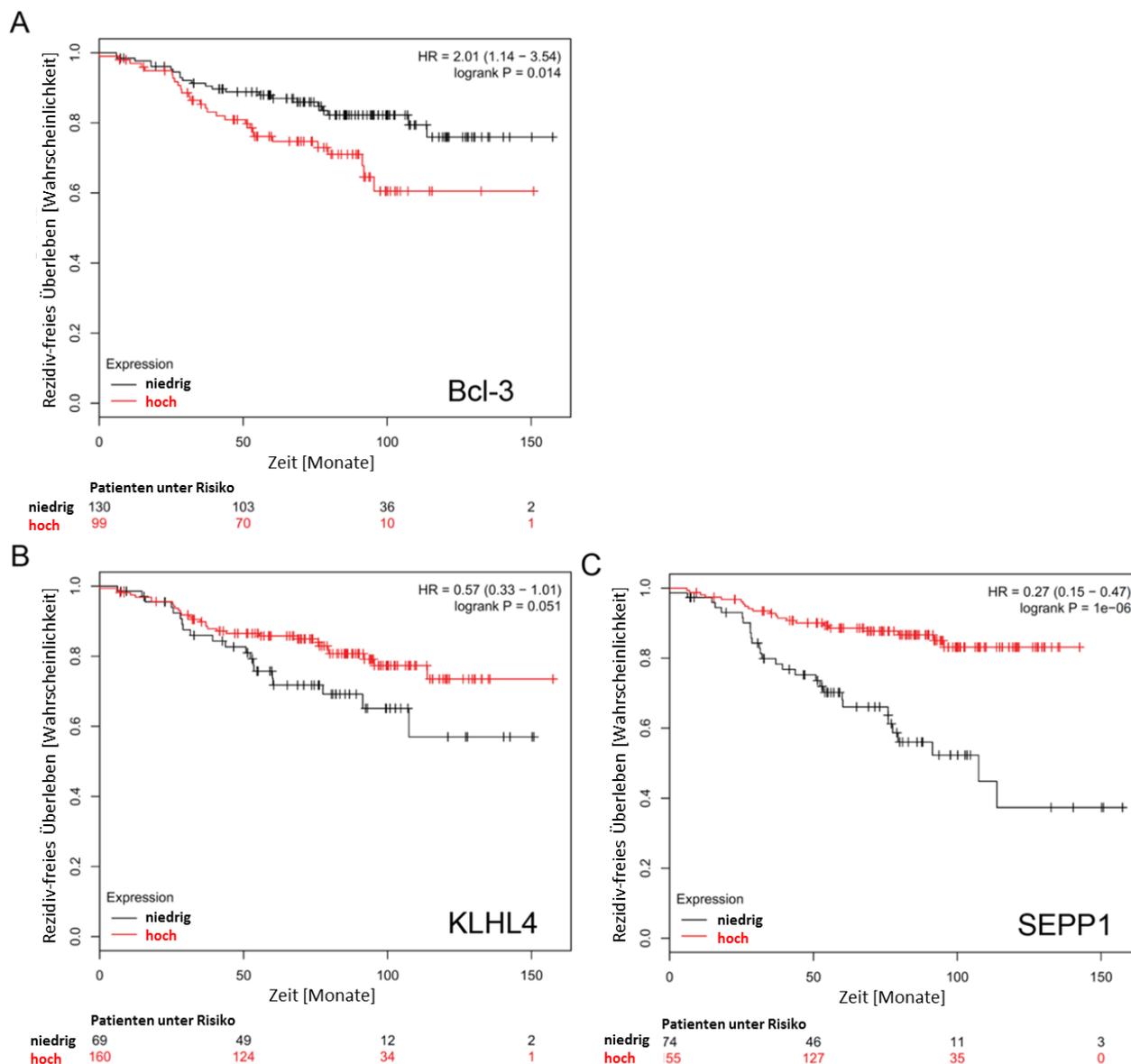
**Abbildung 38. Einfluss von siBcl-3 auf das Wachstum einzelner Klone von MCF-7-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Fulvestrant.**

Effekte von siBcl-3 in MCF-7-Kulturen nach Elektroporation mit siRNA gegen Bcl-3 (siBcl-3) nach fünf Tagen Behandlung mit und ohne 0,1 µM Fulvestrant im Vergleich zur Kontrolle (siLuc, siRNA gegen Luciferase). Das Zellwachstum wurde mittels Messung der Fläche von Zellkolonien in einem Klon-Assay, nach fünf Tagen Kulturdauer, bestimmt. Dargestellt sind Boxplots von je mindestens 50 vermessenen Zellklonkolonien ( $n \geq 50$ ). Die Experimente wurden zweimal durchgeführt ( $n = 2$ ) und die gezeigten Daten sind repräsentativ. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten

Der Knock-down von Bcl-3 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zellkolonien in Abwesenheit von Fulvestrant (Abbildung 38). Unter dem Einfluss von Fulvestrant führte siBcl-3 zu einer signifikanten Verkleinerung der Koloniegrößen (wieder invers zu siIGFBP5, Abbildung 38). Auch die zusätzliche Gabe von 20% CAF-CM konnte diesen Effekte nicht verhindern, vermutlich weil die Gabe des CAF-CM nicht die Reduktion des Bcl-3 durch den Knock-down ausgleichen konnte (Abbildung 36A). Diese Daten legen nahe, dass Bcl-3 ein wichtiges Protein für das Wachstum unter Fulvestrant-Zugabe ist.

Da gezeigt werden konnte, dass CAFs und MSCs in MCF-7-Zellen eine Resistenz gegen das Anti-Estrogen Fulvestrant induzieren, wurde überprüft, inwieweit die Induktion von Bcl-3 (und die Senkung von IGFB5) damit assoziiert ist und dies auf Patientenproben übertragen werden kann. Dazu wurde die Webseite <http://kmplot.com> genutzt. Diese basiert auf den Daten der Affymetrix *Microarray-Chips* HGU133A und HGU133 +2 (22277 Gene) von 3557 Brustkrebspatientinnen (Györfy et al., 2010, 2013). Mit diesem Kollektiv wurden *in-silico*-Kaplan-Meier-Analysen von Brustkrebspatientinnen mit ER $\alpha$ -positiven und PR (Progesteron-Rezeptor)-positiven Tumoren unter endokriner Therapie (Anti-Estrogen und/oder Aromatase-Inhibitoren) durchgeführt. Die Daten von 229 Brustkrebspatientinnen konnten in diese Analyse eingeschlossen werden. Diese Kohorte wurde auf das Rezidiv-freie Überleben in Abhängigkeit der Expressionslevel („hoch“ oder „niedrig“ mit „best cutoff“) von Bcl-3 oder SEPP1 oder KLHL4 analysiert (Abbildung 39). Es wurden die mRNA-Level von SEPP1 und KLHL4 gewählt, weil dies die beiden einzigen Gene waren, die durch einen Knock-down von IGFBP5 gesenkt (Abbildung 34) und durch einen Knock-down von Bcl-3 erhöht (Abbildung 37) wurden, weil

diese das inverse Verhältnis von IGFBP5 zu Bcl-3 (Abbildung 23 und Abbildung 24) wahrscheinlich am besten widerspiegeln.



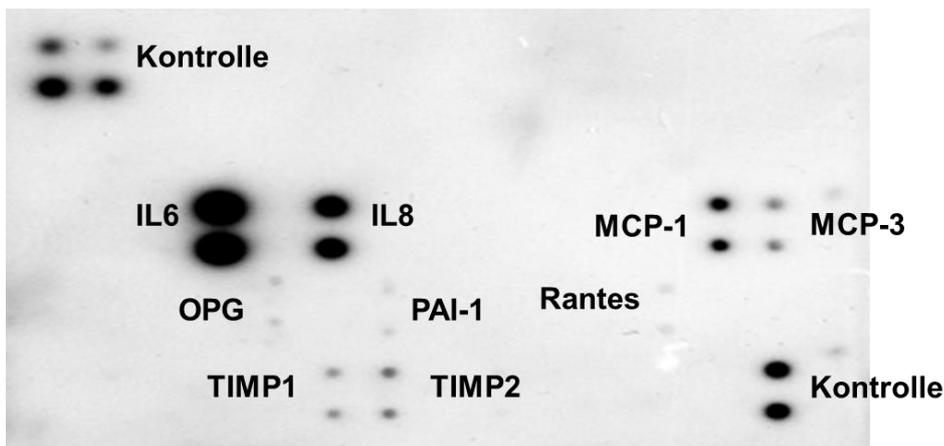
**Abbildung 39. In-silico-Analysen der Expressionslevel von Bcl-3, KLHL4 und SEPP1 auf die Prognose bei Brustkrebspatientinnen mit Tumoren, positiv für die Expression von ER $\alpha$  und PR, nach endokriner Therapie.**

In-silico-Kaplan-Meier-Analysen der Expression von (A) Bcl-3, (B) KLHL4 und (C) SEPP1 von 229 Brustkrebspatientinnen mit ER $\alpha$ +PR+ Tumoren. Alle Patienten wurde endokrin therapiert (Anti-Estrogene und/oder Aromatase-Inhibitoren) und das Rezidiv-freie Überleben über maximal 150 Monate aufgetragen. Die Berechnung der Kurven wurde auf der Seite <http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&default=true> durchgeführt. Die Aufteilung der Expression in die Gruppen „hoch“ und „niedrig“ erfolgte mit der Option „auto select best cutoff“. Die verwendeten Daten von <http://kmplot.com> wurden durch Györfy et al.(2010) publiziert. Bcl-3 = B-cell lymphoma 3-encoded protein, ER $\alpha$  = Estrogen-Rezeptor alpha, KLHL4 = kelch-like family member 4, HR = hazard ratio, PR = Progesteron-Rezeptor, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1

Hohe mRNA-Mengen von Bcl-3 waren mit einem zweimal schlechteren (*hazard ratio* = 2,01) Rezidiv-freien Überleben assoziiert (Abbildung 39A). Die beiden Gene KLHL4 und SEPP1, die sich in MCF-7-Zellen invers zum Expressionsniveau von Bcl-3 verhielten, zeigten in der Kohorte ebenfalls ein inverses Verhalten zu Bcl-3 (Abbildung 39C und D). So waren die niedrigen Expressionen von KLHL4 mit Faktor 1,75 (*hazard ratio* = 0,57) und SEPP1 mit Faktor 3,7 (*hazard ratio* = 0,27) mit einem schlechteren Rezidiv-freien Überleben assoziiert. Da SEPP1 und KLHL4 negativ durch Bcl-3 reguliert wurden, unterstreicht dies den Effekt von Bcl-3. Diese Daten lassen eine wichtige Rolle von Bcl-3 in der endokrinen Resistenz vermuten.

### 3.4. Analyse des parakrinen Effektors, über den die Stromalen Zellen die Effekte in den MCF-7-Zellen regulieren

Weil gezeigt werden konnte, dass eine Reihe von Genen und Proteinen durch MSCs und CAFs in den MCF-7-Zellen beeinflusst wurden und dies von therapeutischer Relevanz war, wurde nun untersucht, welche(s) von Stromalen Zellen sezernierte Protein(e) für diesen parakrinen Effekt verantwortlich sein könnte(n). Dazu wurde das konditionierte Medium von CAFs (CAF-CM) mittels des Sandwich-ELISAs „RayBio Human Obesity Antibody Array C1“ (Raybiotech, Norcross, GA, USA, Tabelle 16)) auf wichtige Cytokine und andere sezernierte Proteine hin analysiert (Abbildung 40).

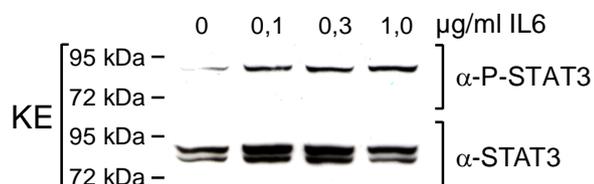


**Abbildung 40. Protein-Array-Analyse des konditionierten Mediums von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) nach zwei Tagen Kulturdauer.**

Das für zwei Tage konditionierte CAF-CM wurde mittels des Sandwich-ELISAs „RayBio Human Obesity Antibody Array C1“ (Raybiotech, Norcross, GA, USA) analysiert. Interleukin-6 = IL6, Interleukin-8 = IL8; MCP-1 = CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2), MCP-2 = CC-Chemokin-Ligand (CCL8), OPG = Osteoprotegerin, PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1, Rantes = CC-Chemokin-Ligand 5 (CCL5), TIMP-1 = *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*, TIMP-2 = *tissue inhibitor of metalloproteinases 2*

Mit Hilfe des Protein-Arrays konnten im CAF-CM neun Proteine nachgewiesen werden. Davon waren Osteoprotegerin (OPG), PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1), TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 1*), TIMP-2, CCL-5 und -8 (CC-Chemokin-Ligand 8) schwach nachweisbar. Die Signale für CCL-2, Interleukin-6 (IL6) und -8 (IL8) waren stärker, wobei IL6 das stärkste Signal zeigte (Abbildung 40).

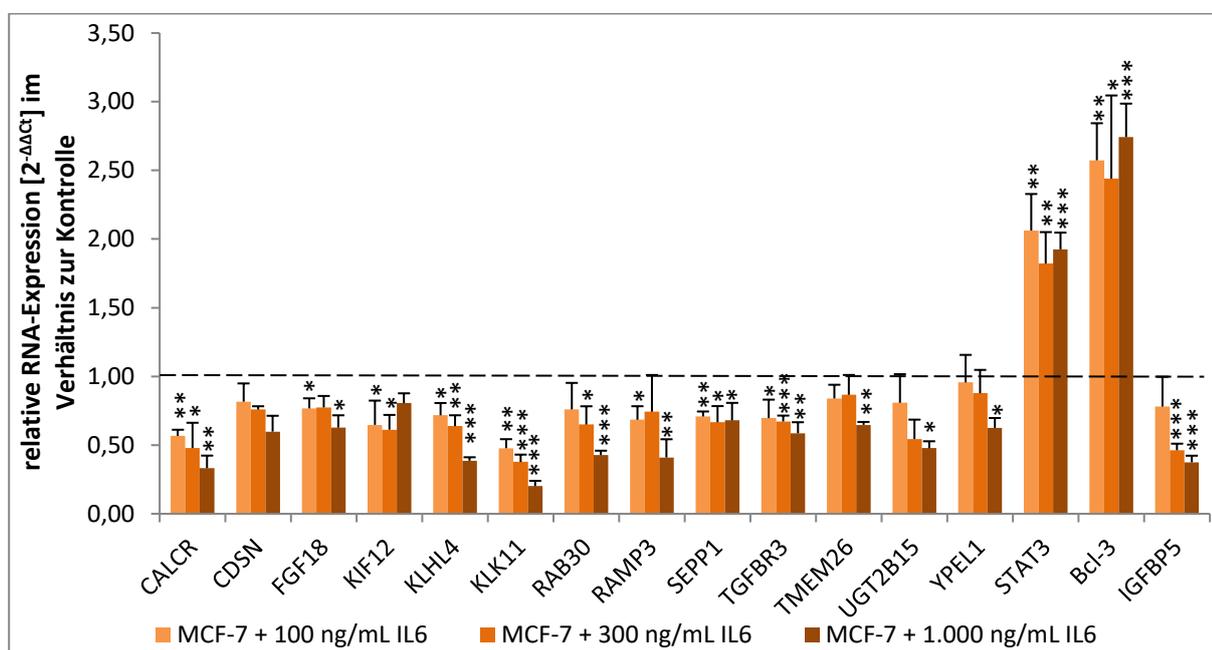
Aus der Literatur ist bekannt, dass MSCs über die Sekretion von IL6 P-STAT3 induzieren und das Wachstum bei ER<sup>+</sup>-Brustkrebs-Zellen steigern können (Sasser et al., 2007). Hinzu kommt, dass siSTAT3 die CAF-CM vermittelte Erhöhung von Bcl-3 verhinderte und IL6 im Array positiv war. Deswegen wurde der Einfluss von IL6 auf MCF-7 getestet werden. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit 100, 300 und 1.000 ng/mL IL6 für zwei Tage inkubiert. Zuerst wurde getestet ob IL6 den STAT3-Signalweg induzieren kann (Abbildung 41).



**Abbildung 41. Western-Blot-Analyse der Wirkung von 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL, 1 µg/mL IL6 auf das Level von P-STAT3 in MCF-7 Zellen.**

Es wurden MCF-7-Zellen nach Gabe von 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL, 1 µg/mL Interleukin-6 (IL6) sowie ohne Gabe von IL6 nach zwei Tagen Kulturdauer analysiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt (n = 2) und die gezeigten Western-Blots sind repräsentativ. P = phosphoryliert, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*

0,1 µg/mL IL6 induzierten P-STAT3 (Abbildung 41), ähnlich wie MSCs/CAFs dies ebenfalls tun (Abbildung 31B). Der induzierende Effekt auf die Phosphorylierung von STAT3 wurde durch eine höhere Menge von IL6 nicht weiter gesteigert. Weil eine Responsivität der MCF-7-Zellen auf IL6 gezeigt werden konnte (Abbildung 41), wurden anschließend die „stromal regulierten“ Gene und die Bcl-3/IGFBP-5-Achse analysiert (Abbildung 42).

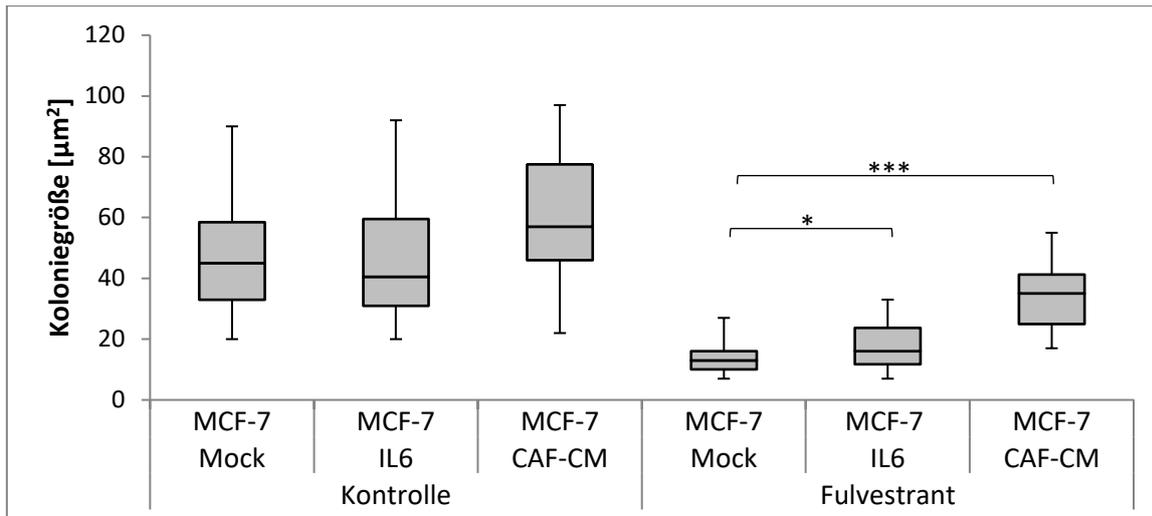


**Abbildung 42. RT-qPCR-Analyse der Wirkung von IL6 auf die Genexpression in MCF-7 Zellen**

RNA-Expressionen von MCF-7-Kulturen nach Gabe von 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL, 1 µg/mL Interleukin-6 (IL6) nach zwei Tagen Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der internen Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur unbehandelten Mock-Kontrolle (MCF-7-Zellen mit PBS; mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen (n = 3), \* p ≤ 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle (siLuc)). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CALCR = Calcitoninrezeptor, CDSN = Corneodesmosin, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = Selenoprotein P Plasma 1, TGFBR3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-Glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like 1*

IL6 senkte die Expression aller „stromal regulierten“ Gene signifikant, dabei zeigte die höchste Konzentration von IL6 jeweils den stärksten Effekt. Alle drei Konzentrationen erhöhten die Expression von STAT3 um ca. Faktor 2 und das mRNA-Level von Bcl-3 um ca. Faktor 2,5 (Abbildung 42). IGFBP5 wurde hingegen dosisabhängig in den MCF-7-Zellen reprimiert (Abbildung 42). Damit ist IL6 in der Lage, die Effekte von stromalen Zellen auf mRNA- Ebene nachzuahmen und ist damit der potenzielle parakrine Effektor im CAF-CM.

Weil IL6 den Effekt der stromalen Zellen auf Genexpressionsebene nachahmen konnte, wurde nun getestet, ob 300 ng/mL IL6 in den MCF-7-Zellen Auswirkung auf die endokrine Resistenzbildung im Klonogen-Assay hat.



**Abbildung 43. Einfluss von 300 ng/mL IL6 auf die stromal induzierte Fulvestrant-Resistenz MCF-7-Zellen.**

Zellkolonie-Flächen von MCF-7-Zellen (Mock-Kontrolle) und MCF-7 + 20% konditioniertem Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) sowie von MCF-7-Zellen mit 300 ng/mL IL6, jeweils in An- und Abwesenheit (Kontrolle) von 0,1 µM Fulvestrant. Das Zellwachstum wurde mittels Messung der Fläche von Zellkolonien in einem Klon-Assay, nach fünf Tagen Kulturdauer, bestimmt. Dargestellt sind Boxplots von je mindestens 50 vermessenen Zellklonkolonien ( $n \geq 50$ ). Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ) und die gezeigten Daten sind repräsentativ. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, IL6 = Interleukin-6

In Abwesenheit von Fulvestrant zeigten 300 ng/mL IL6 keinen Einfluss auf die Fläche der Zellkolonien (Abbildung 43). In Gegenwart von Fulvestrant wirkte IL6 hingegen desensitivierend und konnte damit den schützenden Effekt des CAF-CMs zum Teil nachahmen. Damit ist IL6 ein potenzieller parakriner Mediator der stromal induzierten endokrinen Resistenz.

## 4. Diskussion

### 4.1. cRNA-Microarray von MCF-7/MSC-Kulturen

#### 4.1.1. Ergebnisse des cRNA-Microarrays von MCF-7/MSC-Kulturen

Zur Testung des Effektes von humanen multipotenten/mesenchymalen Stroma-/Stammzellen (MSC) auf die Genexpression von Brustkrebszellen wurden MCF-7-Zellen mit MSC-Zellen im Verhältnis 50:1 per cRNA-Microarray analysiert. Der Microarray ergab statistisch signifikant 236 hochregulierte und 18 herunterregulierte Genexpressionen in den MCF-7/MSC-Kulturen (Abbildung 9).

Die verwendeten Ko-Kulturen bilden die Komplexität der Tumor-Stroma-Interaktion ab als *transwell*-Ko-Kulturen oder Kulturen mit konditioniertem Medium, weil sie sowohl parakrine als auch juxtakrine Zell-Zell-Kommunikationsmechanismen sowie Feedbackmechanismen einer *vice versa* verlaufenden Kommunikation (*cross-talk*) zwischen verschiedenen Zelltypen, berücksichtigen (Lovitt et al., 2014). Dadurch wird aber auch die intrinsische mRNA der MSC detektiert, was die Mehrzahl der hochregulierten Gene im Verhältnis zu den herunterregulierten Genen erklären könnte. Da in diesem Experiment jede 50. Zelle eine MSC war und der Schwellenwert (für signifikante Regulationen) des cRNA-Microarrays bei Faktor Zwei liegt, sollte theoretisch jedes Transkript, das um mehr als Faktor 100 ( $50 \text{ (Zellverdünnung)} \times 2 \text{ (Schwellenwert)} = 100$ ) in den MSCs höher exprimiert ist, als in den MCF-7-Zellen, als Hochregulation im Microarray erscheinen. Demzufolge sind mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Vielzahl der 236 hochregulierten Gene (Abbildung 9) intrinsische mRNA der MSCs. MSCs sind dafür bekannt, stark an der Remodellierung der extrazellulären Matrix beteiligt zu sein und daher eine Vielzahl an Extrazellulärmatrixproteinen wie die Kollagene (COL1A2, COL8A1, COL4A1, COL1A1, COL3A1, COL6A1, COL6A3 und COL5A2), TIMPs (TIMP-1) und MMPs (MMP1, MMP14) zu synthetisieren (Dittmer and Leyh, 2014; Ohnishi et al., 2007; Xu et al., 2005). Alle typischen Vertreter dieser Gruppen finden sich unter den 236 hochregulierten Genen (Tabelle 1 des Anhangs). Auch weitere Proteine, wie der MSC-Marker CD90 (*cluster of differentiation 90*), der zu den Minimalkriterien für MSC zählt (Dominici et al., 2006), sind unter den hochregulierten Genen zu finden. Des Weiteren befinden sich unter den hochregulierten Genen klassische mesenchymale Marker, die in den epithelialen MCF-7-Zellen niedrig exprimiert werden, wie z.B. der Proteaseinhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1), der Transkriptionsfaktor ZEB1 (*zinc finger E-box-binding homeobox 1*), die Matrixproteine Osteonektin (SPARC) und Fibronektin (FN1) sowie das intrazelluläre mesenchymale Markerprotein Vimentin (VIM) (Dittmer and Leyh, 2014; Dittmer et al., 2009; Dominici et al., 2006; Park and Schwarzbauer, 2014; Sudo et al., 2013). Alle diese Gene und noch weitere erscheinen im Microarray fälschlicherweise als Hochregulationen und wurden deswegen in der Untersuchung nicht berücksichtigt.

Die 18 herunterregulierten Gene (Abbildung 9) sollten relativ spezifisch die mRNA-Expressionen in der MCF-7-Zellen in der Ko-Kulturen wiedergeben, da die intrinsische mRNA der MSCs rechnerisch weniger Einfluss auf eine detektierte Herunterregulation haben sollte. Denn nur jede 50. Zelle der Ko-Kultur ist eine MSC-Zelle und daher geht der Einfluss der intrinsischen MSC-mRNA mit einem Verhältnis von 1 zu 50 bzw. 2% in die Rechnung ein. Hinzu kommt, dass der Vergleich der Genexpressionen nur zwischen den MCF-7 alleine versus der MCF-7/MSC-Ko-Kultur erfolgte. Dies soll an zwei Beispielrechnungen erklärt werden, für die fiktive Situation, dass

Gen A um Faktor 2 in der MCF-7/MSC-Ko-Kultur gesenkt wurde: (1) wenn Gen A in den MSC-Zellen um Faktor 100 höher exprimiert wäre (als in MCF-7-Zellen allein), dann ist unabhängig davon trotzdem das Gen in der Ko-Kultur gesenkt. Die eigentliche Senkung der Genexpression wäre ohne die intrinsische MSC-mRNA noch stärker und ca. um Faktor 20 erhöht ( $1.000 \times 1/50 = 20$ ). (2) Wenn Gen A in den MSC-Zellen um Faktor 1.000 niedriger exprimiert wäre (als in MCF-7-Zellen alleine), dann hätte dies kaum Einfluss auf die detektierte Herunterregulation von Gen A, weil die intrinsische Genexpression der MSC-mRNA von Gen A nur mit  $1/500$  ( $1/100 \times 1/50 = 0,00002$ ) in die Rechnung eingeht. Aus diesen rechnerischen Gründen und den damit verbundenen Ausschluss von falsch-positiven Ergebnissen, wurde der primäre Fokus dieser Dissertation auf die herunterregulierten Gene gelegt. Dass nur 18 herunterregulierte Gene detektiert wurden, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Absenkungen der mRNA in MCF-7-Zellen durch eine hohe intrinsische mRNA-Expression der MSC maskiert wurden (siehe Beispielrechnung (1)).

In der Literatur finden sich nur vereinzelt *Microarray*-Daten zu Ko-Kulturen zwischen Brustkrebszellen und MSCs, mit denen die erhobenen Daten verglichen werden können, 1. weil sich viele Analysen der Tumor-Stroma-Interaktion auf einzelne Aspekte beschränken, wie z.B. auf Proliferation (Zhang et al., 2013), Angiogenese (Comşa et al., 2011), Metastasierung (Kamat et al., 2015) oder Morphologie (Al-toub et al., 2015) und 2. die Heterogenität der MSCs sowie deren verschiedene Isolationsquellen (Patienten) und -orte (Knochen (Al-toub et al., 2015; Dittmer et al., 2009), Fettgewebe (Kamat et al., 2015) oder Nabelschnurblut (Li et al., 2015)) den Vergleich erschweren. Außerdem kommt hinzu, dass viele der publizierten Studien und Experimente meist sehr hohe („unphysiologische“) Verhältnisse von MSCs zu Brustkrebszellen verwenden. Die Gruppe um Zhang und Kollegen (2017) analysierte Ko-Kulturen von MDA-MB-231 mit MSCs per *Microarray*. Dabei wurden die Zelltypen im Verhältnis von 1 zu 1 eingesetzt und es konnten 193 Hochregulationen und 98 Herunterregulationen nachgewiesen werden (Zhang et al., 2017). Die 236 gemessenen Hochregulationen dieser Doktorarbeit befinden sich somit im Bereich der Menge der Hochregulationen von Zhang und Kollegen (2017). Warum die Gruppe um Zhang (2017) allerdings ca. 5-mal mehr herunterregulierte Gene als in der hier beschriebenen Studie gefunden hat, könnte damit zusammenhängen, dass MDA-MB-231- und nicht MCF-7-Zellen benutzt wurden. Zudem sind die MSC-Populationen unterschiedlich und es wurden 50-mal mehr MSCs im Verhältnis zu BCCs eingesetzt (Zhang et al., 2017). Andere Arbeiten, wie z.B. die von Liu und Kollegen (2017), zeigten oft nicht die Gesamtheit der *Microarray*-Ergebnisse und beschränkten sich nur auf eine kleine Gruppe von Genen (Liu et al., 2011). Sie zeigten in einer Publikation, dass MSCs per Interleukin-6-Sekretion den *Pool* von Brustkrebs-Stammzellen beeinflussten (Liu et al., 2011). Allerdings wurden hier SUM149- oder SUM 159-Zellen 1 zu 1 mit MSC kultiviert (Liu et al., 2011). Die Daten des *Microarrays*, die nicht Zytokin-bezogen waren, wurden nicht gezeigt. Der aktuelle Stand der Literatur zeigt keine Studien zu qualitativen Aussagen bezüglich Herunterregulation der 18 Gene in der Tumor-Stroma-Interaktion. In den bisherigen Studien werden meist nur das Stroma oder die Krebszellen betrachtet (nicht deren Interaktion) oder Daten zu hochregulierten Genen publiziert, wie durch Zhang et al. (2017).

#### 4.1.2. Validierung der Ergebnisse des cRNA-Microarrays

Aus den oben genannten Gründen wurde sich auf die Analyse der 18 herunterregulierten Gene des *Microarrays* beschränkt (Abbildung 9). Nach Literaturrecherche wurden LOC100130930 (unbekanntes Gen) und FAM84A (neurospezifisch exprimiert (Hillier et al., 2005; Pérez-Palma et al., 2016)) aus den nachfolgenden Analysen

entfernt. Die Expressionsänderungen der 16 verbliebenen herunterregulierten Gene aus der *Microarray*-Analyse wurden per RT-qPCR untersucht (Abbildung 10).

13 der 16 Gene wurden erfolgreich per RT-qPCR validiert (Abbildung 10). Die Reduktion von MGAT1 durch MSCs konnte per RT-qPCR nicht validiert werden. MGAT1 war auf solidem Expressionsniveau nachweisbar, konnte aber auch in weiteren Experimenten nicht durch MSCs herunterreguliert werden (Daten nicht gezeigt). Hinzu kommt, dass MGAT1 weniger in der Onkogenese von Bedeutung ist, sondern bei Patienten mit Multiple Sklerose die neuronale N-Glycosylierung beeinflusst (Mkhikian et al., 2011). Die Senkung der Expression von SCGB2A1 durch MSCs konnte per RT-qPCR nicht validiert werden. SCGB2A1 war in den MCF-7-Zellen nur knapp über der Nachweisgrenze detektierbar und wurde ebenfalls in weiteren Experimenten nicht durch MSCs herunterreguliert (Daten nicht gezeigt). MCF-7-Zellen sind zwar luminaire Zellen, aber eine hohe Expression von SCGB2A1 gilt in der Literatur als typisch für hochgradige luminaire Tumoren im Endstadium (Zubor et al., 2015) oder für disseminierte/zirkulierende Tumorzellen (Lacroix, 2006).

Die durch MSC-induzierte Senkung des Expressionslevels des Genes des Calcitoninrezeptors (CALCR) konnte validiert werden, jedoch war CALCR in diesem und weiteren Experimenten (Daten nicht gezeigt) stets am Rande der Nachweisgrenze detektierbar. Die verwendeten MCF-Zellen sind positiv für den Estrogen- und Progesteronrezeptor. CALCR ist nach den Daten aus 264 Mammakarzinomen jedoch spezifisch für Estrogen- und Progesteronrezeptor-negative Brustkrebstypen (Daniels et al., 2017), was seine niedrige Expression in MCF-7-Zellen erklären könnte.

Es konnten 13 der 16 MSC-induzierten mRNA-Herunterregulationen erfolgreich validiert werden (Abbildung 10). Bei diesen 13 Genen war die Stärke der Reduktion des Expressionslevels zwischen *Microarray*-Analyse und RT-qPCR sehr ähnlich.

#### 4.1.3. Test der Ergebnisse des *cRNA-Microarrays* mit weiteren Stroma-Zellen

Nach der Validierung von 13 der 18 herunterregulierten Genen der *Microarray*-Analyse von Ko-Kulturen von MCF-7-Zellen und MSCs wurde getestet, ob der Effekt spezifisch für das verwendete MSC-Isolat war oder ob weitere stromale Zellen den Effekt nachahmen können. Von den 13 Genen wurden alle durch das zweite MSC-Isolat in der Expression reprimiert, wobei Corneodesmosin (CDSN) und *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2* (NR4A2) statistisch nicht signifikant gesenkt wurden (Abbildung 11).

Zur weiteren Validierung der Daten wurde überprüft, ob weitere Zellen des Tumormikromilieus die 13 Gene regulieren können. Dazu wurden die immortalisierte Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAFs)-Zelllinie 19TT (Martens et al., 2003) verwendet und deren Einfluss auf die 13 MSC-responsiven Gene getestet. Bis auf das Transkript NR4A2 wurden die verbliebenen 12 Gene signifikant negativ in den MCF-7-Zellen reguliert (Abbildung 11). Somit konnte gezeigt werden, dass die CAFs in der Lage sind, den Effekt der MSCs nachzuahmen und somit zwei verschiedene Typen von stromalen Zellen diese 13 Gene in MCF-7-Zellen reprimieren können. Dies ist von Bedeutung, da CAFs und MSCs verschiedene Effekte auf Tumorzellen ausüben können und der Einfluss beider Zelltypen selten in gemeinsamen Experimenten untersucht wurde (Cirri and Chiarugi, 2012; Dittmer and Leyh, 2015; Lazennec, 2016). Zum jetzigen Zeitpunkt sind in der Literatur keine Daten zu den 13

Genen in der Tumor-Stroma-Interaktion zu finden, sodass eine adäquate Diskussion und Wertung der Daten limitiert ist.

Die Bildung von Sphäroiden in 3D-Kulturen simuliert ansatzweise die Knospung des Brustgewebes während der physiologischen Entwicklung der Brust. Diese 3D-Kulturen bilden daher die *in-vivo*-Situation besser ab als adhärenzte *Monolayer*-Kulturen (do Amaral et al., 2011; Dittmer, 2011; Lovitt et al., 2014). Deswegen wurde der Effekt verschiedener Anzahlen von MSCs auf 3D-Sphäroide von MCF-7-Zellen untersucht (Abbildung 12). Unter 3D-Bedingungen konnten die MSCs die Genexpression von 9 der 13 getesteten Gene in MCF-7-Zellen reprimieren (Abbildung 12). Diese 9 Gene (FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, SEPP1, TGFBR3, TMEM26 und UGT2B15) zeigten alle eine Dosisabhängigkeit und wurden durch eine höhere MSC-Anzahl stärker in ihrer Expression gesenkt. Aus Arbeiten der Forschungsgruppe ist bekannt, dass MSCs in die Sphäroide von MCF-7-Zellen eindringen können und lokal die Brustkrebszellen beeinflussen (Zell-Zell-Adhäsion und Therapie-Resistenzen) (Dittmer et al., 2009, 2011). Dass die 9 Gene durch eine höhere Anzahl an MSCs stärker reprimiert wurden, deutet auf einen Dosiseffekt hin. Unter 3D-Bedingungen ist die Kontaktfläche zwischen den MSCs und den MCF-7-Zellen verkleinert und auch die parakrine Signalmediation ist verändert. Daher sind unter 3D-Bedingungen wahrscheinlich mehr MSCs notwendig, um denselben Effekt wie unter 2D-Bedingungen zu erzielen und könnte ein Grund für dafür sein, dass CDSN, NR4A2, RAMP3 und YPEL1 nicht signifikant durch MSCs reprimiert wurden (Abbildung 12). Die äußeren Zellen eines Sphäroids sind viel stärker zum Medium exponiert und stärker proliferierend als die Zellen im Sphäroidinneren, die weniger Zugang zu Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren haben (Edmondson et al., 2014). Deswegen ist davon auszugehen, dass der Effekt von MSCs auf die Genexpression der Brustkrebszellen in den inneren und äußeren Bereichen des Sphäroids unterschiedlich stark ist (Edmondson et al., 2014). Dies könnte ebenfalls erklären, warum CDSN, NR4A2, RAMP3 und YPEL1 nicht unter 3D-Bedingungen in ihrer Expression verändert wurden.

Für CDSN liegen keine Literaturquellen vor, die eine Funktion dieses Proteins in der Onkogenese belegen. CDSN ist wichtig für die Bildung der der Corneodesmosomen in der Hornschicht (*Stratum corneum*) (Ishida-Yamamoto and Igawa, 2015) und spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen (Dermatitis) (Samuelov and Sprecher, 2014). NR4A2 ist in die Pathogenese der Kollagenose-Erkrankung „Sjörgen-Syndrom“ involviert (Takahashi et al., 2017) und hat wichtige Funktionen bei der Entwicklung und Reifung von Neuronen (Teratani-Ota et al., 2016). Eine Überexpression von YPEL1 in NIH3T3-Fibroblasten induziert in diesen eine epitheliale Morphologie (Farlie et al., 2001). Es wird davon ausgegangen, dass YPEL1 über *bone morphogenetic protein* (BMPs) reguliert wird und sein Expressionsstatus mit embryonalen Missbildungen des Schädels in Verbindung steht (Tan et al., 2015). Das G-Protein *receptor activity modifying protein 3* (RAMP3) ist wichtig für die Regulation der Aktivität des Calcitoninrezeptors (CACLR) nach Bindung seines Liganden Adrenomedullin und ist damit ein wichtiger Modulator der Angiogenese (McLatchie et al., 1998; Watkins et al., 2016). RAMP3 ist in CAFs ca. 4- bis 10-mal höher exprimiert als in normalen Fibroblasten und CAFs können zur Neovaskularisation des Tumors beitragen (Benyahia et al., 2017).

Weil NR4A2 nicht vom zweiten MSC-Isolat (Abbildung 11) und nicht unter 3D-Bedingungen (Abbildung 12) in der Expression gesenkt wurde, wurde NR4A2 aus den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen. Warum NR4A2 unter diesen Bedingungen nicht in der Expression vermindert wurde, ist unklar. Es unterliegt vermutlich

anderen Regulationsmechanismen als die anderen 12 Gene. Eine neuere Arbeit liefert dazu eine mögliche Erklärung: NR4A2 ist unter 3D-Bedingungen in MSCs um einen Faktor 4 bis 12 höher exprimiert als unter 2D-Bedingungen (Futrega et al., 2017). Daher könnte die intrinsische Expression der mRNA von NR4A2 in den MSCs die Senkung von NR4A2 in den MCF-7-Zellen maskieren.

#### 4.2. Analyse des Zell-Zell-Kommunikationsmechanismus zur Regulation der „stromal regulierten“ Gene in MCF-7-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Gene CDSN, FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, TMEM26, UGT2B15 und YPEL1 in MCF-7-Zellen in Ko-Kulturen mit verschiedenen MSC-Isolaten und/oder 19TT-CAFs reprimiert wurden, wurde überprüft, ob diese „stromal regulierten“ Gene über einen parakrinen oder juxtakrinen Mechanismus reguliert werden.

In den *transwell*-Experimenten mit MCF-7/MSC-Ko-Kulturen senkten MSCs in den MCF-7-Zellen signifikant die Expression von 11 der 12 getesteten Gene (außer YPEL1) (Abbildung 13). 9 dieser 11 Transkripte zeigten eine tendenzielle Dosisabhängigkeit (nicht RAMP3 und SEPP1), wobei nur KLHL4 und KLK11 signifikant stärker durch eine höhere MSC-Anzahl herunterreguliert wurden (Abbildung 13). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Regulation der Gene parakrin und ohne direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt ist, da in *transwell*-Experimenten ein direkter Zell-Zell-Kontakt nicht erfolgen kann (Lovitt et al., 2014). Darauf folgend sollte geklärt werden, ob diese parakrine Regulation einseitig von den stromalen Zellen auf die Brustkrebszellen (unidirektional) vermittelt wird oder ein *cross-talk* zwischen den Zelltypen notwendig ist.

Alle 12 Transkripte (CDSN, FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, TMEM26, UGT2B15 und YPEL1) konnten durch konditioniertes Medium (CM) von CAFs (CAF-CM) in der Expression signifikant gesenkt werden (Abbildung 14). Mit MSC-CM konnten die Expressionslevel von 9 der 12 Gene signifikant gesenkt werden. Die mRNA-Mengen von CDSN, RAB30 und SEPP1 wurden nur tendenziell und nicht signifikant gesenkt. Der schwächere Effekt des MSC-CM ist wahrscheinlich auf methodische Ursachen zurückzuführen. MSCs dürfen nur mit max. 50% Konfluenz kultiviert werden, da sie sich ansonsten zu anderen mesenchymalen Zellen differenzieren können und/oder eine Verschiebung der symmetrischen zur asymmetrischen Zellteilung stattfinden kann (Dominici et al., 2006; Freida et al., 2013). Aufgrund dessen müssen die MSC bei niedriger Konfluenz kultiviert werden. Zusätzlich proliferieren die CAFs schneller, sodass *summa summarum* weniger MSCs (bzw. mehr CAFs) dieselbe Menge Medium konditionieren. Ob das MSC-CM dadurch weniger „aktive“ Zytokine enthält, ist ohne eine weiterführende Analyse (z.B. Zytokin-Array oder LC-MS/MS Analyse des MSC-CMs (Huang et al., 2006)) nicht zu klären. Es liegt eine vergleichende Studie vor, in der das Sekretom von MSCs und CAFs analysiert wurde. Dabei waren nur ca. 25% der sekretierten Proteine von MSCs und CAFs identisch (De Boeck et al., 2013). Eine Vergleichsanalyse des Sekretoms von CAFs mit normalen Fibroblasten mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS ergab eine hohe quantitative und qualitative Übereinstimmung der Sekretome (Ge et al., 2012). Aufgrund der wenigen Publikationen und eigener vorliegender Analysen der Sekretome der verwendeten CAFs und MSCs, kann keine explizite Aussage getroffen werden. Eine Teilanalyse des CAF-CMs wurde durchgeführt (Abbildung 40) und wird an anderer Stelle diskutiert (Kap. 4.3.6.). Dennoch reprimieren beide konditionierten Medien mindestens tendenziell und größtenteils signifikant die getesteten Gene (Abbildung 14). Dies deutet auf einen unidirektionalen (direkt ohne *cross-talk*) und parakrinen

Regulationsmechanismus hin. Unidirektionale Mechanismen sind für MSCs und CAFs sowie die Sekretion von Zytokinen und Exosomen mehrfach beschrieben (Baglio et al., 2015; Cirri and Chiarugi, 2012; Dittmer and Leyh, 2014; Leyh et al., 2015; Liang et al., 2014). Weil das CAF-CM die Effekte der MSCs in den MCF-7/MSC-Kulturen nachahmt, kann das CAF-CM zur Aufklärung der dahinter stehenden Regulationsmechanismen verwendet werden. Die Verwendung von CAF-CM hat mehrere Vorteile gegenüber der Verwendung von Ko-Kulturen oder der Verwendung von MSC-CM (siehe oben). Ein Vorteil liegt in der Umgehung der Seneszenz von primären Zellkulturen (wie MSCs) (Lovitt et al., 2014). Das CM bietet im Allgemeinen den Vorteil, dass die Brustkrebszellproben nicht mit RNA oder Protein der stromalen Zellen „verfälscht“ werden (siehe Diskussion 4.1.1.). Somit ermöglicht die Verwendung von CAF-CM eine bessere Standardisierung und Reproduzierbarkeit. Zusätzlich lassen sich immortalisierte Fibroblasten besser transfizieren als MSCs (Lu et al., 2011).

### 4.3. Analyse potenzieller Signaltransduktionsmechanismen, die an der Regulation der „stromal reprimierten“ Gene in MCF-7-Zellen beteiligt sein könnten

#### 4.3.1. Identifikation beteiligter Signaltransduktionswege

Es konnte gezeigt werden, dass CAFs und MSCs über einen unidirektionalen und parakrinen Mechanismus die Expression mehrerer Transkripte (CALCR, CDSN, FGF18, KIF12, KLHL4, KLK11, NR4A2, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, TMEM26, UGT2B15 und YPEL1) in den MCF-7-Zellen senken. Um den Mechanismus aufzuklären, über den diese „stromal regulierten“ Gene reprimiert werden, wurde überprüft, welche Signaltransduktionswege involviert sind. Dazu wurden ausgewählte Inhibitoren und Aktivatoren (Konzentrationen und Zielproteine in Tabelle 7, in 2.1.3. Zellkulturadditive gelistet) wichtiger onkologischer Signaltransduktionswege getestet. Diese Experimente dienten *Screening*-Zwecken und sollten erste Hinweise auf beteiligte Signaltransduktionswege liefern und bedürfen weiterer Untersuchungen. Die relevanten Ergebnisse dieses Screenings wurden weiter validiert und werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Die gleichzeitige Inhibition des PDGF-Rezeptor, des FGF-Rezeptors und des VEGF-Rezeptors beeinflusste keines der Gene (Tabelle 17). Somit wurden diese Rezeptoren aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Der Inhibitor der Serin-Threonin-Kinase ROCK konnte nur die Expression von NR4A2 signifikant senken (Tabelle 17). ROCK ist ein wichtiger *downstream*-Effektor der GTPase RhoA und ist ein Schlüsselregulator der Zytoskelett-Organisation und Zellmigration. Stromale Zellen können die Migration von Krebszellen beeinflussen (Dittmer and Leyh, 2014; Dittmer et al., 2009). Passend dazu zeigen Studien, dass NR4A2 die Migration und Proliferation von Tumorzellen beeinflussen kann (Beard et al., 2016; Han and Cao, 2012). Dies bedarf weiterer Validierung. Da der Inhibitor von ROCK nur NR4A2 beeinflusst, kann ROCK als ein möglicher Modulator der „stromal regulierten“ Gene ausgeschlossen werden. Durch die Inhibition der Tyrosin-Kinase Src wurde ebenfalls nur ein Gen (KIF12) signifikant in der Expression gesenkt (Tabelle 17). Src ist ein zentraler Mediator zytosolischen Signaltransduktion (Frame, 2002) und ist für die Regulation der „stromal regulierten“ Gene von untergeordneter Rolle. KIF12 wurde ebenfalls durch die gleichzeitige Blockade von Her1 (EGFR), Her2 (Neu) und Her4 in der Expression gesenkt (Tabelle 17), was bei einer luminalen Zelllinie wie den MCF-7-Zellen auch den Erwartungen entspricht, da diese nicht zu den Her2<sup>+</sup>-Subtypen zählt (Prat et al., 2013). Daher kann die Her-Protein-Familie als zentraler Regulator der „stromal regulierten“ Gene ausgeschlossen werden.

Durch die Hemmung des TGF $\beta$ -Rezeptors 1 (TGFBR1) mit Ly364947 wurden CDSN, KIF12 und TGFBR3 signifikant in der Expression erhöht (Tabelle 17). TGF $\beta$  ist bei Brustkrebs von großer Bedeutung (Massagué, 2012; Oerlecke et al., 2013; Pickup et al., 2013) und kann je nach Kontext tumorfördernd oder -suppressiv wirken (Lebrun, 2012). Die Steigerung des mRNA-Niveaus von TGFBR3 durch Inhibierung des TGF $\beta$ -Signalweges ist dabei von besonderem Interesse. Die Betrachtung von TGFBR3 wurde in einer Masterarbeit der Arbeitsgruppe Dittmer (Masterarbeit, Vicky Hellwig 2014) separat untersucht.

Die Inhibition der MAP-Kinase MEK mit U0126 senkte die Expression der Transkripte FGF18, KIF12 und TGFBR3 und erhöhte die mRNA-Menge von YPEL1 (Tabelle 17). Aus Arbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass MSCs über MEK1 Brustkrebszellen beeinflussen können (Dittmer, 2011). Dies scheint hier teilweise der Fall zu sein.

Die Hemmung von FAK führte zu einer Erhöhung der Expression von CDSN und FGF18 und senkte die mRNA-Mengen von KIF12, KLK11 und YPEL1 (Tabelle 17). Die Inhibitionen von PDGF-Rezeptor, FGF-Rezeptor, VEGF-Rezeptor, ROCK, Src, Her1 (EGFR), Her2 (Neu), Her4, TGF $\beta$ -Rezeptor 1, MEK und FAK zeigten nur geringe Wirkung auf die „stromal regulierten“ Gene und können somit wahrscheinlich als mögliche intrazelluläre Regulatoren dieser ausgeschlossen werden.

Der Histon-Deacetylase-Inhibitor M344 führte zu einer signifikanten Hochregulation von 9 Genen mit teils starken Effekten auf CDSN, KLK11 und SEPP1 (Tabelle 17). Dies deutet daraufhin, dass die „stromal regulierten“ Gene epigenetisch beeinflussbar sind. M344 ist allerdings ein Breitband Histon-Deacetylase-Inhibitor und wirkt in MCF-7-Zellen toxisch (Weberpals et al., 2011; Yeung et al., 2012), was die Interpretation der Daten erschwert.

Die Stimulation des Estrogen-Signalweges senkte mehrere Gene in der Expression. DHT verminderte die mRNA-Mengen von KIF12, KLHL4, RAMP3 und SEPP1. Estradiol (stärkste physiologische Aktivator von ER $\alpha$ ) senkte das Expressionsniveau von KIF12, RAB30 und YPEL1 (Tabelle 17). Des Weiteren erhöhten DHT und Estradiol die Expression von FGF18. Der Estrogen-Rezeptor alpha (ER $\alpha$ ) ist für MCF-7-Zellen überlebenswichtig und ein zentrales Element in der Brustkrebstherapie (do Amaral et al., 2011). Daher sind die Daten des SERDs (*selective estrogen receptor downregulator*) Fulvestrant von zentraler Bedeutung. Fulvestrant reprimiert KIF12, KLK11, RAMP3, TGFBR3 und TMEM26, zusätzlich wird CDSN, KLHL4, NR4A2, SEPP1 und YPEL1 induziert (Tabelle 17). Somit sind viele der „stromal regulierten“ Gene in den Prozess einer Anti-Estrogen-Therapie-Zellantwort eingebunden und damit eventuell von therapeutischer Relevanz. Weil Fulvestrant sowohl eine antagonistische Wirkung auf ER ausweist als auch die proteosomale Degradation des ER $\alpha$  vermittelt (Scott et al., 2011) und DHT sowie Estradiol die „stromal regulierten“ Gene beeinflussen, lässt dies vermuten, dass der ER $\alpha$  eine wichtige Funktion in der Regulation der „stromal regulierten“ Gene hat und/oder diese therapeutisch bedeutsam sein könnten. Deswegen wurden nachfolgende Experimente mit der Wirkung von CAF-CM Resistenzbildung unter Fulvestrant-Therapie durchgeführt (siehe Kap. 3.3.5.) und in Kap. 4.3.5. diskutiert.

Der Einfluss von Insulin (physiologischer Aktivator von P-AKT) auf die „stromal regulierten“ Gene war stark senkend. Die Expression der Transkripte KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, UGT2B15 und YPEL1 wurde signifikant reprimiert (Tabelle 17). Dies, obwohl die MCF-7-Zellen heterozygot für Mutation A1633G im pik3ca Gen sind und bereits ein aktiviertes PI3K besitzen (Wu et al., 2005). Dieser Basenaustausch führt zum Aminosäureaustausch E545K im Protein und zu einer Liganden-unabhängigen Aktivität der helikalen Domäne von PI3K (Beaver et al., 2013). Somit ist der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg für MCF-7-Zellen

überlebenswichtig und ist häufig mit Therapieresistenzen verbunden (Beaver et al., 2013). Diese Ergebnisse sind ein starker Hinweis auf eine mögliche Regulation der „stromal regulierten“ Gene über den PI3K/AKT-Signalweg. Deswegen wurden diese Ergebnisse in nachfolgenden Experimenten mit CAF-CM auf den IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg in MCF-7-Zellen validiert (siehe Kap. 3.3.3.) und an diesen Stellen diskutiert (siehe Kap. 4.3.3.).

Die durch  $\text{CoCl}_2$  induzierte Hypoxie senkte alle getesteten Gene, bis auf YPEL1, signifikant. Hypoxische Bedingungen und deren Einfluss auf Tumoren und das Mikromilieu sind häufig während der Onkogenese und führen zu Veränderungen im zellulären Metabolismus (Hanahan and Weinberg, 2011).  $\text{CoCl}_2$  hat zwei beschriebene Wirkmechanismen: (1) es stabilisiert den *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ) durch Inaktivierung der Prolyl-Hydroxylasen (Austausch des Kofaktors Eisen gegen Cobalt) (Epstein et al., 2001) und (2) erhöht es die Affinität der Von-Hippel-Lindau-Protein bindenden Domäne des HIF1 $\alpha$  (Yuan et al., 2003). Beide Mechanismen verhindern eine Degradation von HIF1 $\alpha$ , wie sie unter Normoxie stattfindet. Somit wird das Level von HIF1 $\alpha$  künstlich erhöht und eine „Pseudo“-Hypoxie induziert (Byrne et al., 2014). Dies deutet auf eine Involvement von HIF1 $\alpha$  bzw. einer Komponente des Hypoxie-Signalweges in die Regulation der „stromal regulierten“ Gene hin. Daher wurde in nachfolgenden Experimenten überprüft, inwieweit CAF-CM den Hypoxie-Signalweg in MCF-7-Zellen beeinflussen kann (siehe Kap. 3.3.2. und Kap. 4.3.2. für Diskussion).

#### 4.3.2. Analyse des Hypoxie-Signalweges

Es konnte gezeigt werden, dass  $\text{CoCl}_2$  einen ähnlichen reprimierenden Effekt auf die getesteten Gene hatte wie die stromalen Zellen (MSCs/CAFs) (Tabelle 17).  $\text{CoCl}_2$  bindet an das Von-Hippel-Lindau-Protein und verhindert somit die Ubiquitinierung und die proteosomale Degradation von HIF1 $\alpha$  (Yuan et al., 2003). Deswegen ist  $\text{CoCl}_2$  ein „Induktor“ des Hypoxie-Signalweges und ermöglicht daher einen Nachweis von HIF1 $\alpha$  auf Proteinebene. HIF1 $\alpha$  ist als Transkriptionsfaktor der wichtigste Regulator und Sensor der Zelle für Sauerstoff und die davon abhängigen metabolischen Prozesse (Byrne et al., 2014). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1 $\alpha$  stetig degradiert und unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert (Byrne et al., 2014).

CAF-CM und  $\text{CoCl}_2$  erhöhten in der Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte die Proteinmengen von HIF1 $\alpha$  und der Carboanhydrase IX (CAIX) (Abbildung 15A). Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl CAF-CM als auch  $\text{CoCl}_2$  den Hypoxie-Signalweg induzieren, wobei der Effekt von  $\text{CoCl}_2$  erwartungsgemäß um ein vielfaches höher war. CAIX katalysiert die Reaktion von  $\text{CO}_2$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  zu Kohlensäure und ist ein etablierter Surrogat-Marker für Hypoxie in Brustkrebszellen (Chu et al., 2016; McDonald and Dedhar, 2014; Sedlakova et al., 2014; Tan et al., 2009). Weil HIF1 $\alpha$  aus methodischen Gründen in den fraktionierten Zelllysaten nicht nachweisbar ist, kann daher in den Plasmamembran-Lysaten der Nachweis von CAIX als Surrogat für die Aktivität des Hypoxie-Signalweges herangezogen werden (Kessler et al., 2010; Leyh et al., 2015; Tafreshi et al., 2016). Die Zugabe von MSC-CM und CAF-CM führte zu einer eindeutigen Erhöhung von CAIX in der Plasmamembran, Insulin zeigte hingegen keinen Effekt auf die Proteinmenge von CAIX (Abbildung 15B). Daraus kann geschlossen werden, dass MSCs und CAFs über einen parakrinen Mechanismus den Hypoxie-Signalweg in den MCF-7-Zellen induzieren. Weil der PI3K/AKT-Induktor Insulin keinen Effekt auf die Proteinmenge von CAIX hatte, kann der IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg und ein von diesem Weg vermittelter *cross-talk* zum Hypoxie-Signalweg ausgeschlossen werden (Nachweis über Funktionalität von Insulin siehe Abbildung 16). Dies

ist insofern interessant, als dass  $\text{CoCl}_2$  und Insulin alle „stromal regulierten“ Gene beeinflussen (Tabelle 17) und die Ergebnisse darauf hindeuten, dass diese über beide Wege reprimiert werden können. Eine stromal vermittelte Induktion des Hypoxie-Signalweges ist zudem interessant, weil die Expression von Hypoxie-Markern in Brustkrebszellen von prognostischer und prädiktiver Bedeutung ist. So korreliert z.B. die Expression von CAIX in Brustkrebszellen mit Tumorgröße und -grad sowie mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie (Tan et al., 2009). Eine Expression von HIF1 $\alpha$  und CAIX ist somit oft mit einem aggressiven Tumortyp (Tan et al., 2009) und einer schlechten Prognose assoziiert (Chu et al., 2016). Dies ist daher von Interesse, weil meist nur der Einfluss von Hypoxie auf das Stroma (Giaccia and Schipani, 2010) oder der Einfluss von Hypoxie auf die Tumorprogression (Kessler et al., 2010; Mimeault and Batra, 2013; Semenza, 2015) untersucht wird, die Induktion des Hypoxie-Signalweges durch stromale Zellen wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt experimentell nicht untersucht. Hinzu kommt, dass HIF1 $\alpha$  die Expression von bis zu 1.500 Genen regulieren kann (Semenza, 2015) und dass eine erhöhte Hypoxie-Signalweg-Aktivität den Pool von Brustkrebsstammzellen in Xenograft-Mäusen erhöht (Conley et al., 2012).

Die CAFs/MSCs induzieren vermutlich nur den Hypoxie-Signalweg (unter Normoxie) ohne dabei eine echte Hypoxie (Sauerstoffmangel, z.B. durch Verbrauch des Sauerstoffs durch CAFs/MSCs) zu verursachen. Denn ein hypoxischer Stoffwechsel der Tumorzellen würde zu einem anaeroben Metabolismus führen und damit zu einer erhöhten Laktat-Produktion (Warburg-Effekt). Eine erhöhte Sekretion von Laktat führt wiederum zu einem sauren Zellkulturmedium und dadurch müsste im Zellkulturmedium ein Farbumschlag des Phenolrotes von Rot zu Gelb ( $\text{pH} \leq 6,5$ ) sichtbar sein. Unter den Versuchsbedingungen war kein Farbumschlag zu Gelb sichtbar. Daher liegt die Vermutung nahe, dass kein Sauerstoffmangel vorhanden war. Dies müsste allerdings durch Messung der Oxygenierung der Zellen mittels Mikroelektroden validiert werden (Vaupel et al., 2004, 2007). Unter Normoxie können auch andere Faktoren eine Hypoxie induzieren. So ist bekannt, dass das Chemotherapeutikum Paclitaxel die Expression von HIF1 $\alpha$  in MCF-Zellen erhöhen kann (Samanta et al., 2014). Eine normoxische Aktivierung von HIF1 $\alpha$  durch *cross-talk* mit dem PI3K/AKT-Signalweg ist ebenfalls bekannt (Agani and Jiang, 2013), liegt hier aber nicht vor, weil Insulin keinen Einfluss auf die Proteinmengen von HIF1 $\alpha$  und CAIX hatte (Abbildung 15).

#### 4.3.3. Analyse des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges

##### 4.3.3.1. Einfluss der stromalen Zellen auf den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg

Der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg ist sehr komplex und vielschichtig. Ein kompakter Überblick dieses Signalweges ist in Abbildung 7 zu finden. Insulin ist ein physiologischer Aktivator des IR/IGFR/PI3K/AKT-Signalweges (Pollak, 2008, 2012). In den *Screening*-Experimenten (Kap. 3.3.1.) senkte die Inkubation mit Insulin in MCF-7-Zellen die Expression der Transkripte von KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, RAMP3, SEPP1, TGFBR3, UGT2B15 und YPEL1 signifikant (Tabelle 17). Deswegen wurde überprüft, inwieweit der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg durch die stromalen Zellen beeinflusst wird.

Insulin, MSC-CM und CAF-CM führten zu einer Erhöhung der am Serin 473 phosphorylierten Variante von P-AKT im Zytosol, wobei die Induktion durch Insulin stärker war (Abbildung 16A), was den Erwartungen für einen IGFR-Signalweg-Induktor entspricht (Siddle, 2012).  $\text{CoCl}_2$  hatte keinen Einfluss auf die zytosolische Menge von P-AKT, in Kombination mit Insulin war jedoch eine eindeutige Erhöhung sichtbar (Abbildung 16B). Dies ist

insofern wichtig, da bekannt ist, dass der PI3K- und Hypoxie-Signalweg sich gegenseitig induzieren und einem intensiven *cross-talk* unterliegen können (BelAiba et al., 2007; Sheng et al., 2017). In Plattenepithelzellkulturen konnte gezeigt werden, dass  $\text{CoCl}_2$  die Proteinmenge von P-AKT erhöhen kann (Heon Ryu et al., 2010). Außerdem ist ein hypoxisches Mikromilieu ein entscheidender Parameter in der Brustkrebsprogression (Semenza, 2015). Allerdings deuten die vorliegenden Ergebnisse auf Insulin als zentralen Faktor für die Induktion der Phosphorylierung von Serin 473 im AKT-Protein hin (Abbildung 16). Somit konnte gezeigt werden, dass MSCs und CAFs über einen parakrinen Mechanismus den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg aktivieren (Abbildung 16). Der beobachtete aktivierende Effekt auf AKT ist wahrscheinlich unabhängig vom Hypoxie-Signalweg, weil  $\text{CoCl}_2$  keinen Effekt auf P-AKT ausübt. Die stromal induzierte Erhöhung des plasmamembranständigen IGF1R ist wahrscheinlich durch Komponenten des Hypoxie-Signalweges vermittelt, weil sowohl  $\text{CoCl}_2$  als auch MSC-CM und CAF-CM die Menge an IGF1R erhöhen. Insulin als Induktor von P-AKT senkt hingegen das Level des IGF1R, was einen Hinweis auf eine negative Feedbackschleife gibt. Die Proteinmenge des membranständigen IGF1R wurde durch MSC-CM, CAF-CM und  $\text{CoCl}_2$  gesteigert, wobei der Einfluss des MSC-CM geringer war. Somit können stromale Zellen und der Hypoxie-Signalweg die Proteinmengen des membranständigen IGF-1R erhöhen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in HepG2-Zellen eine dosisabhängige Induktion des IGF1R-Levels durch  $\text{CoCl}_2$  zu sehen ist (Liu et al., 2015). Daten zum Einfluss von stromalen Zellen auf die IGF1R-Expression sind in der Literatur wenig beschrieben. Zhang et al. konnten zeigen, dass MSCs in einem Schlaganfall-nachahmenden ischämischen Mausmodell die Anzahl an IGF1R-positiven Zellen erhöhen können (Zhang et al., 2004). Aus Prostata-Karzinom-Analysen ist bekannt, dass ein aktivierter IGF1R von zentraler Bedeutung für die Tumorprogression ist und dass MSCs in den IGFR-Signalweg eingreifen können (Kawada et al., 2006). Eine Überexpression des IGF1R-Proteins ist häufig in Brustkrebstumoren zu finden, meist unabhängig vom Brustkrebssubtyp (Christopoulos et al., 2015) und korreliert mit einem niedrigen Risiko für Krankheitsprogression (Papa et al., 1993). Allerdings ist die Datenlage nicht eindeutig, da eine Diskrepanz zwischen den Daten für RNA- und Protein-Level des IGF1R vorliegt. Dies wird kontrovers diskutiert (Christopoulos et al., 2015). Eine Meta-Analyse von 10 Studien mit 5.406 Brustkrebspatientinnen ergab eine Korrelation zwischen einer hohen Expression von IGF1R und einer schlechten Prognose bei tripel-negativen Brustkrebs und einer guten Prognose für Hormon-Rezeptor-positive Tumoren (Yan et al., 2015). Zusätzlich wird IGF1R posttranskriptionell durch die microRNA miR-7 reguliert (Jiang et al., 2010), was teilweise die inkonsistenten Ergebnisse der aktuell vorliegenden Literatur zwischen Protein- und mRNA-Level erklären könnte.

Die beobachtete Erhöhung des IGF1R-Protein-Levels durch  $\text{CoCl}_2$  scheint keinen Einfluss auf das *downstream-signalling* zu haben, weil die Menge an P-AKT nicht erhöht wurde. Ob die erhöhte Expression von IGF1R auch mit einer erhöhten Aktivierung von IGF1R verbunden war, ließ sich nicht überprüfen, da Antikörper gegen die phosphorylierte Form von IGF1R keine validen Ergebnisse lieferte. Daher sollte die erhöhte Expression an IGF1R mit Bedacht interpretiert werden und die Aktivität des Rezeptors sollte durch weiterführende Experimente bestätigt werden.

#### 4.3.3.2. Knock-down intrazellulärer Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges

Zur Überprüfung, welche intrazellulären Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges involviert sind, wurde ein Knock-down der Transkripte der *downstream*-Komponenten des IGF1R/INSR durchgeführt. Dazu wurden

PIK3CA (katalytische Untereinheit 110 $\alpha$  von PI3K) und IRS1 (intrazelluläres Adapterprotein) per siRNA in der Expression unterdrückt (Abbildung 17). Da die Aktivierung des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges zur Reprimierung der „stromal regulierten“ Gene führte (Tabelle 17), sollte ein Knock-down von IRS1 bzw. PIK3CA den gegenteiligen Effekt haben, sofern diese an Regulation der Gene beteiligt sind.

IRS1 ist ein wichtiger Signal-Mediator des IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges und ist damit ein wichtiger Promotor von Proliferation und Differenzierung (Longobardi et al., 2009) sowie der endokrinen Resistenzbildung in MSCs und Krebszellen (Li et al., 2018). Der erfolgreiche Knock-down von IRS1 mit der spezifischen siRNA siIRS1 erhöhte signifikant die Expression der „stromal regulierten“ Gene um ca. Faktor 1,5 bis 2,5 (Abbildung 17A). Für RAMP3, TMEM26 und YPEL1 waren nur numerische (nicht signifikante) Erhöhungen nachweisbar (Abbildung 17A). Dies deutet auf eine Involvierung von IRS1 in der Regulation der „stromal regulierten“ Gene hin.

Der erfolgreiche Knock-down von PIK3CA (Abbildung 17A und Abbildung 17B) mit der spezifischen siRNA siPIK3CA zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von RAMP3, TGFBR3 und UGT2B15, die anderen „stromal regulierten“ Transkripte wurden signifikant erhöht, wobei der Effekt auf SEPP1 (um einen Faktor 8) am höchsten war (Abbildung 17A). Pawlowski et al. konnten zeigen, dass in tierischen Osteosarkom-Zellen ebenfalls eine negative Korrelation zwischen SEPP1 und PI3K besteht (Pawlowski et al., 2011). Interessanterweise ist die SEPP1-Variante SEPP1b ein direktes Ziel der microRNA miR-7 (Dewing et al., 2012) und diese kann IGF1R posttranskriptionell regulieren und daher auch die Mengen an P-AKT beeinflussen (Jiang et al., 2010). Somit liegt die Vermutung nahe, dass PIK3CA und IRS1 an der Regulation der „stromal regulierten“ Gene beteiligt sind. *Upstream* dieser beiden Proteine befindet sich der IGF1R, der durch stromale Zellen in der Expression erhöht wird (Abbildung 16B). *Downstream* befindet sich AKT, dessen Aktivität ebenfalls durch Insulin und MSCs/CAFs erhöht wird. Die Aktivität des IGF1R wurde durch Inhibition mittels IGF1R-Inhibitor PQ401 überprüft (Abbildung 17C). Daraus kann geschlossen werden, dass die „stromal regulierten“ Gene über den IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg in MCF-7-Zellen reprimiert werden.

#### 4.3.3.3. Analyse der extrazellulären Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus, über den die „stromal regulierten“ Gene beeinflusst werden und wie die MSCs/CAFs mit den MCF-7-Zellen kommunizieren, wurden die extrazellulären Komponenten des IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges untersucht. Dazu wurden die Liganden von IGF1R, die IGF-1 und -2 sowie deren physiologische Inhibitoren die IGFBP 1 bis 6 und IGFBP7 per RT-qPCR analysiert (Abbildung 18).

IGFBP2, -4, -5 waren hoch und IGFBP1, -3, -6, -7 niedrig exprimiert, wobei IGFBP4 und IGFBP5 die beiden am stärksten exprimierten IGFBPs waren (Abbildung 18). Die Expressionen von IGFBP-2, -3, -4 und -5 in MCF-7-Zellen ist aus der Literatur bekannt und die Verhältnisse der IGFBP-Mengen sind vergleichbar bzw. auf ähnlichem Niveau (Adamo et al., 1992; Martin and Baxter, 2007; McGuire et al., 1992). IGFBP3 und IGFBP5 wurden in Western-Blot-Analysen in MCF-7-Zellen ebenfalls als am stärksten exprimiert nachgewiesen (Dubois et al., 1995). In anderen Experimenten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in MCF-7-Zellen IGFBP4 und IGFBP5 die abundantesten IGFBPs sind (Hawsawi et al., 2016). Diese Daten dienen nicht einer direkten Quantifizierung und sollten nur Anhaltspunkte für die stark exprimierten IGFBPs (IGFBP2, IGFBP4, IGFBP5)

liefern, da diese IGFBPs mit hoher Wahrscheinlichkeit die relevanteren sind und sollen bei der Interpretation der Effekte der stromalen Zellen auf die IGFBP-Expression helfen (Abbildung 19).

In MCF-7/MS*transwell*-Ko-Kulturen zeigten MSCs keinen Effekt auf die Expression von IGF-1 und IGF-2 (Abbildung 19A). CAF-CM erhöhte das Level von IGF-2 um das Fünfzehnfache (Abbildung 19A). Dies ist von Bedeutung, da Studien darauf hindeuten, dass IGF-1 und -2 wichtige Parameter der Funktionalität der Stammzell-Nische sind und Einfluss auf Pluripotenz sowie Differenzierung von Stammzellen haben können (Youssef et al., 2017). Eine stromal bedingte Erhöhung des Krebsstammzell-Pools ist in der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich, weil die Messung der Krebsstammzellgene keine eindeutige Erhöhung aufzeigte (Abbildung 28). Hinzu kommt, dass MSCs das Level von IGF-2 mRNA nicht erhöhten (Abbildung 19A). Da MSCs und CAFs aber ansonsten vergleichbare Effekte induzierten, kann IGF-2 wahrscheinlich als potenzieller Effektor in der Aktivierung des IGFR/PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges und der Reprimierung der „stromal regulierten“ Gene ausgeschlossen werden (die IGF-2-mRNA-Mengen von MSCs/CAFs wurden bei dieser Aussage berücksichtigt, Daten nicht gezeigt).

MSCs in *transwell*-Ko-Kulturen und CAF-CM zeigten einen starken Einfluss auf die mRNA-Mengen der IGFBP1 bis -7 (Abbildung 19B). Beide stromalen Zelltypen erhöhten die Expression von IGFBP3 und senkten die Expression von IGFBP1, -2, und -5 (Abbildung 19B). IGFBP-2 kann durch einen aktivierten PI3K-Signalweg in MCF-7-Zellen induziert werden (Martin and Baxter, 2007), dieser Mechanismus scheint trotz stromal aktiviertem PI3K-Signalweg nicht aktiv zu sein. In MCF-7-Zellen kann eine Überexpression von IGFBP3 zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase führen (Kim et al., 2010). Dieser Mechanismus kann ausgeschlossen werden, weil MSCs und CAF-CM eher die Proliferation der MCF-7-Zellen steigern (Abbildung 25 und Abbildung 26).

IGFBP4 wurde nur durch MSCs und IGFBP7 nur durch CAF-CM in der Expression gesenkt. Für die mRNA-Expression von IGFBP6 war kein signifikanter Unterschied detektierbar. Unter der Berücksichtigung der relativen Expressionen der IGFBPs (Abbildung 18A) sind die Veränderungen der basal höher exprimierten IGFBP2, IGFBP4 und IGFBP5 (Abbildung 18B) von größerer Bedeutung. Von diesen drei IGFBPs wurde nur IGFBP5 durch beide stromalen Zelltypen in der Expression gesenkt (Abbildung 19B). Hinzu kommt, dass IGFBP5 das höchst abundante IGFBP in MCF-7-Zellen ist (Abbildung 18). Daher könnte die stromal induzierte Absenkung der Expression von IGFBP5 (durch MSCs auf 50% und durch CAF-CM auf 10% im Verhältnis zur Kontrolle) der wahrscheinlich relevante Regulationsmechanismus für die Aktivitätssteigerung des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges sein. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde ein spezifischer Knock-down von IGFBP5 durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.6.2. und 4.3.6.2).

#### 4.3.4. Identifikation weiterer stromal aktivierter Signalwege

Da gezeigt werden konnte, dass die stromalen Zellen den IGFR/PI3K/AKT-Signalweg (siehe Seite 45), den Estrogen-Signalweg (siehe Seite 53) und den Hypoxie-Signalweg (siehe Seite 44) beeinflussen, sollte nun überprüft werden, ob die Aktivität weiterer onkologisch bedeutsamer Signalwege, wie der Ras/Raf/MEK/ERK1/2-Kinase-Weg, der STAT3-Signalweg und der NFκB-Signalweg, durch stromale Zellen verändert werden.

In der Western-Blot-Analyse induzierten MSC-CM und CAF-CM eine Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 20). Des Weiteren erhöhten die konditionierten Medien die Menge des membranständigen ITGB1 und des Kernproteins Bcl-3. Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 war nicht verändert (Abbildung 20).

Insulin erhöhte die Menge von ITGB1 in ähnlicher Weise wie MSCs und CAFs. Das legt die Vermutung nahe, dass die Proteinmenge von ITGB1 über die Erhöhung des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges kontrolliert wird. Dies passt zu den beobachteten Effekten von Insulin auf CHO-T-Zellen, bei denen eine Steigerung der ITGB1-vermittelten Zelladhäsion nach Stimulation mit Insulin zu sehen war (Guilherme et al., 1998). Ergänzend konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine aktive PI3K für eine physiologische Aktivität von ITGB1 notwendig ist (Luo et al., 2014b).

Insulin hatte keinen Einfluss auf Bcl-3, P-ERK1/2 und P-STAT3. Dies ist interessant, weil bekannt ist, dass die Aktivierung des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges zu einer Phosphorylierung von STAT-3 im Mausmodell führen kann (Zong et al., 2000). Somit kann eine Aktivitätssteigerung des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges (wie durch MSCs und CAFs beobachtet) nicht die Ursache für die Erhöhung des Levels von Bcl-3 sein (siehe dazu ein spezifischer Knock-down von IGFBP5, Kapitel 3.3.6.2. und 4.3.6.2).

Durch CoCl<sub>2</sub> wurde die Proteinmenge von P-STAT3 und ITGB1 erhöht. Aus einer Vielzahl an Experimenten ist bekannt, dass Hypoxie zu einer Induktion von P-STAT3 in verschiedensten Zelltypen (Karzinomzellen, Fibroblasten und Trophoblasten) führen kann (Gao et al., 2015; Noman et al., 2009; Xu et al., 2017). Mit MDA-MB-231-Zellen konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen P-STAT3 erhöht wird und P-STAT3 für eine durch HIF1 $\alpha$ -induzierte Tumorprogression wichtig ist (Pawlus et al., 2014). Eine Steigerung der Proteinmenge von ITGB1 unter hypoxischen Bedingungen ist in der Literatur ebenfalls beschrieben (Ju et al., 2017; Keely et al., 2009). Brustkrebszelllinien zeigen unter hypoxischen Bedingungen häufig eine Induktion der Integrine Integrin alpha 1 (ITGA1), Integrin alpha 5 (ITGA5), Integrin alpha 11 (ITGA11) und ITGB1 (Ju et al., 2017). Somit werden die in der vorliegenden Arbeit gefundenen CoCl<sub>2</sub>-induzierten Erhöhungen der Proteinmengen von P-STAT3 und ITGB1 durch die Daten anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Gao et al., 2015; Ju et al., 2017; Keely et al., 2009; Pawlus et al., 2014; Xu et al., 2017).

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass MSCs und CAFs über einen parakrinen Mechanismus den STAT3-Signalweg aktivieren, Bcl-3 sowie ITGB1 induzieren und keinen Einfluss auf den Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signalweg haben. In Kombination können Insulin und CoCl<sub>2</sub> die meisten der durch CAF-CM induzierten Effekte nachahmen (Abbildung 20). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die MSCs und CAFs über eine Induktion des Hypoxie-Signalweges und einer gleichzeitigen Aktivierung des IGFR/PI3K/AKT-Signalweges eine Reihe dieser Effekte induzieren können.

Zur weiteren Aufklärung der Mechanismen, die den stromal induzierten Effekten zugrunde liegen, wurden Zeitreihen-Experimente durchgeführt (Abbildung 21 und Abbildung 1). Bereits nach 4 h erhöhte das CAF-CM die Proteinmenge von Bcl-3 und P-AKT im Verhältnis zur Kontrolle. Diese Effekte waren bis zu 48 h nach CAF-CM-Applikation nachweisbar (Abbildung 21). Alle „stromal regulierten“ Gene zeigten im Zeitrahmen von 8 h bis 48 h nach Stimulation mit CAF-CM signifikant eine Senkung ihrer mRNA-Expression (Abbildung 1), wobei die Reprimierung mit dem zeitlichen Verlauf stärker wurde („Treppeneffekt“ bis 48 h). Somit werden die

„stromal regulierten“ Gene schon frühzeitig und über einen längeren Zeitraum durch die stromalen Zellen reprimiert.

IGFBP5 war bereits zu allen diesen Zeitpunkten signifikant reprimiert, wobei der Effekt nach 24 h und 48 h am stärksten war (Abbildung 1 Anhang). In der Literatur sind kaum zeitabhängige IGFBP5-Expressionen publiziert, mit denen diese Werte verglichen werden können. Interessanterweise wird die mRNA-Expression von IGFBP5 in ischämischen Schweineherzen bereits nach 3 h und bis zu 72 h reprimiert (Kluge et al., 1997). Dies legt nahe, dass Hypoxie einen Einfluss auf die Expression von IGFBP5 haben könnte. In MCF-7-Zellen hatte eine Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> allerdings keinen Einfluss auf die Expression von IGFBP5 (Daten nicht gezeigt). In Abwesenheit von CAF-CM stieg die IGFBP5-Expression im Zeitraum zwischen 24 h und 72 h nach Beginn des Experimentes kontinuierlich an (Abbildung 22B). In Gegenwart von 20% CAF-CM zeigte sich ein ähnlicher Trend, jedoch waren die IGFBP5-Level beim jeweils gleichen Zeitpunkt um zwei Drittel niedriger (Abbildung 22B). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass CAF-CM die IGFBP5-Expression mindestens für die Dauer von 72 h unterdrückt. CAF-CM induzierte die mRNA-Expression von Bcl-3 bereits nach 4 h und hielt diese Werte 48 h lang hoch (Abbildung 22A). Somit wurden sowohl IGFBP5 als auch Bcl-3 bereits nach 4 h durch CAF-CM beeinflusst.

Weiterführende Experimente mit MSC-CM, MCF-7/MSC-*transwell*-Ko-Kulturen, MCF-7/MSC-Ko-Kulturen und MCF-7/CAF-Ko-Kulturen validierten die Steigerung der mRNA-Expression von Bcl-3 und die Senkung des IGFBP5-Levels durch stromale Zellen in MCF-7-Zellen (Abbildung 23). Somit konnte gezeigt werden, dass zwei verschiedene MSC-Isolate und CAFs die mRNA-Expression von Bcl-3 erhöhten und die mRNA-Menge von IGFBP5 senkten (Abbildung 23). Des Weiteren lässt sich feststellen, dass dafür kein Zell-Zell-Kontakt oder ein *cross-talk* zwischen den Zelltypen notwendig ist, da sowohl CAF-CM als auch MSC-CM diese Effekte induzieren konnten. Somit können sowohl CAFs als auch MSCs über einen parakrinen Mechanismus Bcl-3 und IGFBP5 invers zueinander regulieren. Dieser inverse Zusammenhang wurde nochmals genauer untersucht (Abbildung 24). Die Analyse der 76 MCF-7-RNA-Isolate der MCF-7-Zellen, die in Anwesenheit (n = 44) oder Abwesenheit von 20% CAF-CM (n = 32) inkubiert wurden, ergaben eine inverse, exponentielle Korrelation der RNA-Expressionen von Bcl-3 gegenüber IGFBP5 (Abbildung 24). Besonders bei niedriger Expression von IGFBP5 führten leichte Änderungen des Levels von IGFBP5 zu einer starken Erhöhung der Expression von Bcl-3. Dies legt die Vermutung nahe, dass IGFBP5 und Bcl-3 gemeinsam reguliert werden oder sich wahrscheinlich gegenseitig regulieren könnten. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde ein spezifischer Knock-down von IGFBP5 (siehe Kap. 3.3.6.2. und 4.3.6.2) und Bcl-3 (siehe Kap. 3.3.6.3. und 4.3.6.3) durchgeführt. Ein Zusammenhang zwischen IGFBP5 und Bcl-3 wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Ein Grund könnte sein, dass ein solcher Zusammenhang nur unter bestimmten Umständen beobachtet werden kann. Dafür spricht, dass ein inverser Zusammenhang zwischen IGFBP5 und Bcl-3 auch für die luminalen Brustkrebszelllinie BT474 (Leyh et al., 2015, medizinische Doktorarbeit Theresia Lange), nicht aber für die Her2<sup>+</sup>-SKBR3 (Daten nicht gezeigt), für die luminalen T47D (Leyh et al., 2015, medizinische Doktorarbeit Theresia Lange), die basal A BT20 und die *basal-like* MDA-MB-231 (Daten nicht gezeigt) gezeigt werden konnte. Somit ist das stromal induzierte inverse Verhältnis von IGFBP5 und Bcl-3 in Brustkrebszelllinien nicht generalisierbar. Die Gründe dafür können vielfältig sein. Vermutlich werden IGFBP5 und Bcl-3 in anderen Zellen durch andere Faktoren stärker beeinflusst als durch Bcl-3 bzw. IGFBP5. So können z.B. Anti-Estrogene die Sekretion von IGFBPs

beeinflussen (ATCC-Datenblatt der MCF-7-Zellen; [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo\\_country=de#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo_country=de#characteristics)). Deswegen wurde ebenfalls der Einfluss der Senkung von IGFBP5 auf die Anti-Estrogen-Resistenz in MCF-7-Zellen analysiert.

#### 4.3.5. Analyse des Estrogen-Signalweges und der Anti-Estrogen-Therapie

In Kapitel 3.3.1 (Tabelle 17) konnte gezeigt werden, dass  $17\beta$ -Estradiol (E2),  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) und Fulvestrant die „stromal regulierten“ Gene beeinflussen können. Zusätzlich ist der Estrogen-Rezeptor alpha ( $ER\alpha$ ) für MCF-7-Zellen überlebenswichtig. Daher wurde untersucht, ob MSCs/CAFs einen Einfluss auf das Therapieansprechen bei Behandlung von MCF-7-Zellen mit dem SERD Fulvestrant haben (Abbildung 25).

Die Applikation von Fulvestrant wirkte stark wachstumshemmend (Abbildung 25A). Der Nachweis der Wirkung von Fulvestrant wurde zusätzlich per Western-Blot-Analyse von MCF-7-Zellen nach Applikation von Fulvestrant untersucht. In diesem Experiment senkte Fulvestrant eindeutig und erwartungsgemäß die Proteinmengen seines therapeutischen Ziels  $ER\alpha$  und die des Proliferationsmarkers Antigen Kiel 67 (Ki67) (Abbildung 27), was die Wirkung des Fulvestrants eindeutig bestätigt. In Anwesenheit von Fulvestrant war das Wachstum in MCF-7/MSC-Ko-Kulturen signifikant erhöht (Abbildung 25B). Dieser schützende Effekt von MSC gegen Fulvestrant war auch mit MSC-CM und CAF-CM zu beobachten (Abbildung 25C). MSC-CM zeigte zudem einen leichten wachstumsfördernden Effekt in Abwesenheit von Fulvestrant (Abbildung 25B). Es ist bekannt, dass MSCs durch Sekretion verschiedener Zytokine die Proliferationsrate von MCF-7-Zellen und anderer  $ER\alpha^+$ -Zellen (T47D, BT474 und ZR-75-1) steigern kann (Fierro et al., 2004; Klopp et al., 2010; Rhodes et al., 2010; Sasser et al., 2007b). Hier konnte ein unidirektionaler, parakriner, schützender Einfluss von MSCs und CAFs auf MCF-7-Zellen unter Fulvestrant-Behandlung gezeigt werden. Es wurden zahlreiche Mechanismen beschrieben, wie stromale Zellen über die Sekretion bioaktiver Faktoren die Resistenz gegen Anti-Estrogene erhöhen können (Dittmer and Leyh, 2015). So können CAFs z.B. den *hepatocyte growth factor* (HGF) sezernieren und somit den HGF-bindenden Rezeptor c-Met in Brustkrebszellen aktivieren, dadurch den PI3K/AKT-Signalweg aktivieren und durch eine AKT-abhängige ER-Phosphorylierung, eine Estrogen-unabhängige ER-Aktivität bewirken, die letztendlich zu einer Resistenz gegenüber Anti-Estrogenen führen kann (Hiscox et al., 2006; Pontiggia et al., 2012). Theoretisch könnte ein solcher Mechanismus auch hier für die durch die stromalen Zellen verursachte Fulvestrant-Resistenz verantwortlich sein, weil durch die stromalen Zellen ebenfalls der IGFR/PI3K/AKT-Signalweg induziert wird (siehe Kap. 3.3.3.). Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass CAFs durch die Sekretion von Estrogen die Wirkung von Tamoxifen teilweise aufheben können (Luo et al., 2014a; Mo et al., 2013), wobei über eine positive Feedbackschleife via des *G protein-coupled receptor 30* (GPR30) in den CAFs, über eine Aromatase katalysierte Reaktion Testosteron zu Estradiol umgewandelt wird und so die Konzentration von Estradiol erhöht wird (Luo et al., 2014a; Mo et al., 2013). Durch diese Reaktion wird der Effekt von Tamoxifen „antagonisiert“ (Luo et al., 2014a; Mo et al., 2013). Dieser Mechanismus liegt hier vorrausichtlich nicht vor, weil das CAF-CM alleine wirksam ist und somit keine Feedbackschleife zwischen den Zelltypen notwendig ist, um eine Fulvestrant-Resistenz zu induzieren. Denkbar wäre noch, dass das CAF-CM eine hohe Menge Estrogen enthält, dann sollte allerdings der Effekt auf die Proliferation der  $ER\alpha$ -positiven MCF-7-Zellen größer sein. Um dies auszuschließen, sollte der Estrogengehalt in CAF-CM bestimmt werden.

Die Effekte der alleinigen Gabe von CAF-CM auf die Resistenzbildung gegen Fulvestrant wurde mit höheren Zelldichten (keine Zellkolonien, sondern „Zellrasen“) validiert (Abbildung 26). Der biolumineszente ATP-Assay (Abbildung 26) lieferte ähnliche Ergebnisse wie der Klon-Assay (Abbildung 25). Es lässt sich feststellen, dass stromale Zellen das Wachstum von adhären MCF-7-Zellen besonders in Gegenwart von Fulvestrant fördern und damit MCF-7-Zellen über einen parakrinen Mechanismus gegen Fulvestrant schützen. Ein anderer beschriebener parakriner Mechanismus funktioniert über eine Hypoxie-vermittelte Autophagie der CAFs, die zur Ausschüttung von Laktat und Ketonkörpern führt. Diese fördern in ER $\alpha$ <sup>+</sup>-Brustkrebszellen die oxidative Phosphorylierung und damit die Expression des pro-survival-Faktors *TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator* (TIGAR), was eine Resistenz gegen Anti-Estrogene induzieren kann (Martinez-Outschoorn et al., 2011). Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich auszuschließen, weil die CAFs erstens unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden und zweitens eine erhöhte Produktion von Laktat und Ketonkörpern wegen der Senkung des pH-Wertes zu einem Farbumschlag des Phenolrotes im Zellkulturmedium hätte führen müssen, was nicht beobachtet wurde.

Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und ein erhöhter Krebsstammzell-Pool können mit gesteigerter Therapie-Resistenz assoziiert sein (Dittmer and Leyh, 2015; Dixon, 2014). Um den Mechanismus der Fulvestrant-desensibilisierenden Wirkung der Stromalen Zellen weiter zu erkunden, wurde deswegen die Expression von EMT-Markern und von Stammzellgenen (als Surrogat-Marker für den Krebsstammzell-Pool) untersucht (Abbildung 28) (Dittmer and Leyh, 2015; Dixon, 2014). In der Abwesenheit von Stromalen Zellen erhöhte Fulvestrant signifikant die mesenchymalen Marker ACTA2, FN1 und VIM, was auf die Induktion einer EMT hindeutet (Abbildung 28A). EZM-Proteine, wie FN1 oder Laminin 5, können die Anti-Estrogen-Therapie abschwächen (Adhäsions-vermittelte Therapieresistenz, Abbildung 5), indem die Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Laminin 5, via des Integrin  $\alpha 6$  (ITGA6)/Integrin  $\beta 4$  (ITGB4)/Her3-Weges (Folgiro et al., 2008) oder mittels FN direkt über Integrin  $\beta 1$  (ITGB1) erfolgt (Pontiggia et al., 2012). So zeigten Untersuchungen, dass im ER $\alpha$ <sup>+</sup>-Subtyp eine endokrine Resistenz induziert werden kann, indem der PI3K/AKT-Signalweg ER $\alpha$  an Serin-118 phosphoryliert und somit den Rezeptor unabhängig von Estrogen aktiviert (Baselga et al., 2012; Musgrove and Sutherland, 2009; Pontiggia et al., 2012). CAF-CM alleine induzierte eine leichte Erhöhung von FN1 (Abbildung 28A). CAF-CM und Fulvestrant wirkten induzierend und synergistisch auf die Expression von FN1. Außerdem verminderte das CAF-CM den Effekt von Fulvestrant auf CDH1 und VIM (Abbildung 28A). Interessant ist an dieser Stelle, dass das CAF-CM den CDH1 induzierenden Effekt von Fulvestrant abschwächt, was auf eine eventuelle Verschiebung in Richtung EMT hindeuten könnte. CAFs können HGF sekretieren und darüber das aktivierte c-Met kann sowohl Migration als auch Invasion der MCF-7-Zellen erhöhen und somit über eine EMT eine potenziell höhere Metastasierungsfähigkeit induzieren (Hiscox et al., 2006; Pontiggia et al., 2012). Auch MSCs wurden metastasierungsfördernde Eigenschaften nachgewiesen (Goldstein et al., 2010; Karnoub et al., 2007). So kann die Migration von MCF-7-Zellen durch MSCs, mittels Induktion eines E-Cadherin-*sheddings*, stimuliert werden (Dittmer et al., 2009), was per Western-Blot-Analyse ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren induzierte Fulvestrant einige Krebsstammzellmarker wie ABCG2, ALDH3A1, EPCAM und PROCR (Abbildung 28B). Die Erhöhung der Stammzellgene ist vermutlich eine Reaktion auf das Zellgift, weil Krebsstammzellen unter Therapie einen Selektionsvorteil aufweisen (Dixon, 2014; Osborne and Schiff, 2011).

Das CAF-CM alleine „selektiert“ wahrscheinlich keine Krebsstammzellen, da durch dieses nur ALDH3A1 induziert wird. Simões et al. konnten ebenfalls eine Erhöhung von Krebsstammzellgenen (ALDH1) nach Anti-Estrogentherapie zeigen (Simões et al., 2015). Nach Behandlung von MCF-7-Zellen mit Tamoxifen waren ebenfalls erhöhte Mengen klassischer Stammzellgene nachweisbar (Leung et al., 2017). Um eine wirkliche Krebsstammzellselektion durch Fulvestrant nachzuweisen, müssten Aldeflour- oder *mammo-sphere-Assays* durchgeführt werden.

Das CAF-CM wirkte in Gegenwart von Fulvestrant nicht fördernd auf die Expression von Stammzellmarkern. Daher kann der protektive Effekt von CAF-CM auf das MCF-7-Zellwachstum unter Fulvestrant-Bedingungen nicht auf eine Induktion der EMT oder eine erhöhte Bildung von Krebsstammzellen zurückgeführt werden. Demzufolge muss der desensibilisierende Effekt des CAF-CM gegenüber Fulvestrant andere Ursachen haben. Hier kommen als weitere mögliche Ursachen die durch stromale Zellen verursachte Aktivierung der IGF/PI3K/AKT-, STAT3- oder Hypoxie-Signalwege infrage. Weder CAF-CM noch Fulvestrant oder die Kombination beider führte zu einer Induktion der mRNA von HIF1 $\alpha$  (Abbildung 29), was zur erwarten war, da HIF1 $\alpha$  primär auf Proteinebene reguliert wird (Masoud and Li, 2015). Fulvestrant induzierte eine Steigerung der Genexpression von ESR1 um Faktor 3,5, was wahrscheinlich auf eine Gegenregulation wegen des proteasomalen Abbaus von ER $\alpha$  zurückzuführen ist (Dixon, 2014). CAF-CM erhöhte nicht die Genexpression von ESR1. Damit kann eine stromale erhöhte Gegenregulation des ESR1 auf mRNA-Ebene (Dittmer and Leyh, 2015) ausgeschlossen werden. Fulvestrant erhöhte die Expression von IGFBP5 um das Fünffache, im Verhältnis zur Kontrolle. Dies ist konsistent mit den in der Literatur berichteten Ergebnissen, dass Anti-Estrogene die Sekretion von IGFBP5 in MCF-7-Zellen beeinflussen (ATCC-Datenblatt der MCF-7-Zellen). CAF-CM senkte die Expression von IGFBP5 auf ca. ein Fünftel im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Nach Applikation der Kombination von CAF-CM und Fulvestrant wurde die Expression von IGFBP5 auf ca. ein Drittel gesenkt, im Verhältnis zur Mock-Kontrolle (Abbildung 29). Dies ist von Bedeutung, weil der Effekt von Fulvestrant auf IGFBP5 dadurch negiert wird. Zusätzlich zeigte sich unter der Kombination von CAF-CM und Fulvestrant ebenfalls ein inverses Verhältnis von IGFBP5 zu Bcl-3. Da dies unter Therapie-Resistenzbedingungen von Bedeutung ist, wurden diese Daten in der Fulvestrant-resistenten MCF-7-Zelllinie „MCF-7 Ful-R“ validiert (Abbildung 30). Hier waren, im Vergleich zu den parental MCF-7-Zellen, die meisten Transkripte (CDSN, KIF12, KLHL4, KLK11, RAB30, TFGBR3, TMEM26, UGT2B15 und YPEL1) der „stromal regulierten“ Gene bereits in den MCF-7 Ful-R in der Expression gesenkt (Abbildung 30A). Gleichzeitig war Bcl-3 erhöht und IGFBP5 in der mRNA-Expression stark gesenkt (Abbildung 30B). Eine andere Arbeitsgruppe konnte in Tamoxifen-resistenten MCF-7-Zellen ebenfalls verminderte mRNA-Expression von IGFBP5 nachweisen (Hawsawi et al., 2016). In den MCF-7 Ful-R ist bereits basal Bcl-3 induziert und IGFBP5 reprimiert. Dies könnte ein Hinweis auf die Bedeutung der Bcl-3/IGFBP-5-Achse für die stromal vermittelte Endokrine-Resistenz-Bildung sein. Die Bedeutung von IGFBP5 und Bcl-3 für diesen Mechanismus wird im folgenden Kapitel diskutiert.

#### 4.3.6. Analysen zum Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und der Reprimierung der „stromal regulierten“ Gene

MSCs und CAFs reprimieren in den MCF-7-Zellen eine Gruppe von Genen („stromal regulierte“ Gene), aktivieren den IGF/PI3K/AKT-Signalweg (P-AKT-Erhöhung und IGFBP5-Senkung), erhöhen den P-STAT3-Level und die mRNA- und Protein-Menge von Bcl-3 (Abbildung 20). Alle diese Signalwege können die Aktivität des

Estrogen-Rezeptors modulieren sowie zur Bildung einer endokrinen Resistenz beitragen (Dixon, 2014; Osborne and Schiff, 2011; Pratt et al., 2003; Sasser et al., 2007). Des Weiteren waren IGFBP5 und Bcl-3 invers zu einander reguliert. Deswegen wurde durch spezifischen Knock-down von STAT3, IGFBP5 und Bcl-3 der zugrunde liegende Mechanismus analysiert.

#### ***4.3.6.1. Einfluss von STAT3 auf den Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und die „stromal regulierten“ Gene***

Aus Experimenten mit Prostatakarzinom-Zellen ist bekannt, dass Bcl-3 durch eine Interleukin-6 (IL6) vermittelte Erhöhung von STAT3 induziert werden kann (Ahlqvist et al., 2013). Deswegen wurde analysiert, ob STAT3 und Bcl-3 in MCF-7-Zellen ebenfalls „gekoppelt“ sind. Dazu wurde ein spezifischer Knock-down von STAT3 mit der siRNA siSTAT3 durchgeführt.

Der Knock-down von STAT3 zeigte eine Reduktion der Proteinmenge von P-STAT3 und STAT3 sowie der mRNA von STAT3 (Abbildung 32). Der Knock-down von STAT3 verhinderte die CAF-CM-vermittelte Phosphorylierung von STAT3, verhinderte aber nicht die CAF-CM-vermittelte Erhöhung der Proteinmengen von P-AKT, IGF1R und ITGB1 (Abbildung 31A). Zusätzlich wurden die „stromal regulierten“ Gene durch siSTAT3 wenig und uneinheitlich beeinflusst (Abbildung 32). IGFBP5 und Bcl-3 wurden durch siSTAT3 nicht in der Expression verändert. Die Aktivierung von STAT3 durch stromale Zellen ist somit wahrscheinlich nicht der Hauptgrund für die Repression der „stromal regulierten“ Gene (könnte aber dazu beitragen) und ist nicht an der Induktion von Bcl-3 und der Senkung der mRNA-Mengen von IGFBP5 beteiligt. Wie die Stromazellen IGFBP5 in den Brustkrebszellen herunterregulieren, muss noch weiter aufgeklärt werden. Studien konnten zeigen, dass die Expression von IGFBP5 in Fibroblasten durch STAT3 reguliert wird (Kojima et al., 2012) und dass die Bcl-3-Expression durch STAT3 in Prostatakarzinom-Zellen moduliert wird (Ahlqvist et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte in MCF-7-Zellen kein Zusammenhang zwischen STAT3-Expression und den IGFBP5-/Bcl-3-Level gefunden werden (Abbildung 31, Abbildung 32). Außerdem konnte der Knock-down von STAT3 nach Zugabe von CAF-CM die stromal induzierten Effekte nicht verhindern (Abbildung 31). Daher kann STAT3 als Mediator der MSC/CAF-vermittelten Effekte ausgeschlossen werden.

#### ***4.3.6.2. Einfluss von IGFBP5 auf den Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und die „stromal regulierten“ Gene***

Die mRNA-Expression von IGFBP5 wird durch CAF-CM bereits nach 4 h halbiert (Abbildung 1 Anhang) und ist somit ein sehr frühes Ereignis während der Interaktion von MSCs/CAFs mit MCF-7-Zellen. Hinzu kommt, dass IGFBP5 das am höchsten exprimierte IGFBP in MCF-7-Zellen ist (Abbildung 18). Daher besteht die Annahme, dass die stromal induzierte Absenkung der Expression von IGFBP5 die relevante Regulation für die Aktivität des IGF1R ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CAF-CM unter gleichzeitiger Gabe von Fulvestrant IGFBP5 senkte und Bcl-3 erhöhte (Abbildung 29). Beide Gene waren ebenfalls in der Fulvestrant-resistenten Zelllinie MCF-7 Ful-R identisch reguliert (IGFBP5 herunterreguliert, Bcl-3 hochreguliert) (Abbildung 29). Deswegen wurde ein Knock-down von IGFBP5 mit der spezifischen siRNA siIGFBP5 durchgeführt.

Der Knock-down von IGFBP5 führte zu einer eindeutigen Steigerung der Proteinmengen von P-AKT, CAIX und Bcl-3, die mit der Induktion durch CAF-CM vergleichbar ist (Abbildung 33). Zusätzlich erhöhte siIGFBP5 die Mengen des membranständigen IGF1R leicht und führte zu einer schwachen Anhebung des P-STAT3-Levels

(Abbildung 33). Von den „stromal regulierten“ Genen wurden die mRNAs von KLHL4, RAMP3, SEPP1, TMEM26 und YPEL1 signifikant in ihrer Expression gesenkt (Abbildung 34). Interessanterweise wurde Bcl-3 in der mRNA- und Protein-Expression signifikant erhöht. Somit zeigte sich auch hier wieder ein inverses Verhältnis von IGFBP5 zu Bcl-3 (ähnlich wie in Abbildung 23 und Abbildung 24). Somit erhöht eine verminderte Menge von IGFBP5 Bcl-3 auf Protein- und mRNA-Ebene und ahmt damit einen Effekt der stromalen Zelle nach. Dieses inverse Verhältnis war auch nach Zugabe von Fulvestrant nachweisbar und könnte mit der möglichen endokrinen Resistenz in Verbindung stehen (Abbildung 29, Abbildung 30). Der Knock-down von IGFBP5 führte zu einem Wachstumsanstieg (Abbildung 35A), was durch die erhöhte Aktivität des IGF/PI3K/AKT-Signalweges erklärt werden könnte. Demnach ist ein Überlebensvorteil nach Knock-down von IGFBP5 sichtbar. Eine Wiederholung des Experimentes mit Insulin anstelle von siIGFBP5 (Abbildung 35B) zeigte ein besseres Wachstum unter Kontrollbedingungen, hatte allerdings keinen Effekt unter der Wirkung von Fulvestrant. Dies legt die Vermutung nahe, dass der desensibilisierende Effekt von siIGFBP5 gegenüber Fulvestrant nicht auf Aktivierung des IGF/PI3K/AKT-Signalweges zurückzuführen ist, sondern auf andere Funktionen von IGFBP5 zurückzuführen sein könnte. IGFBP5 hat in den MCF-7-Zellen verschiedene Funktionen, die wiederum von verschiedenen Signaltransduktionswegen beeinflusst werden. Neben seiner klassischen Funktion als Regulator der Bioverfügbarkeit von IGF-1/-2 und der damit verbundenen IGF-abhängigen IGF1R-Aktivierung (Baxter, 2014) kann IGFBP5 auch IGF1R-unabhängig agieren (Akkiprik et al., 2008, 2009). So kann IGFBP5 in MCF-7-Zellen durch Bindung an Integrin  $\alpha 2/\beta 1$  die Zelladhäsion erhöhen und somit die Migration senken und eine Anoikis verhindern (Sureshabu et al., 2012). Dabei konnten Sureshabu und Kollegen nachweisen, dass die N-terminale Domäne (nötig für Bindung an IGF1R) für die Effekte nicht benötigt wurde, jedoch die C-terminale Domäne (vermittelt die Bindung an Heparin) essentiell war (Sureshabu et al., 2012). Die Bedeutung der jeweiligen Domänen und ihrer unterschiedlichen Funktionen wurden in Osteosarkom-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne die Proliferation inhibieren und die Apoptose induzieren kann, die C-terminale Domäne inhibiert hingegen Migration und Invasion (Luther et al., 2013). Die C-terminale Domäne enthält zusätzlich eine Kern-Lokalisierungs-Sequenz und IGFBP5 konnte im Kern von Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Akkiprik et al., 2009). Es wird vermutet, dass IGFBP5 im Kern IGF1R-unabhängige Effekte ausübt. So konnte in Brustkrebszellen gezeigt werden, dass eine nukleäre Lokalisation von IGFBP5 die Migration und Proliferation weniger steigert als eine cytoplasmatische Lokalisation des Proteins (Akkiprik et al., 2009). In *in-vivo*-Studien konnten ebenfalls IGF1R-unabhängige Effekte von IGFBP5 gezeigt werden, welche die Proliferation und Entwicklung der Mäuse beeinflussten (Tripathi et al., 2009). Es ist bekannt, dass IGFBP5 in MCF-7-Zellen die Zell-Zell-Adhäsion erhöht und das Zellüberleben unter nährstoffarmen Bedingungen steigern kann (Sureshabu et al., 2012). Des Weiteren wurden hohe Level von IGFBP2 und ein niedriges Level von IGFBP5 in Tamoxifen-resistenten MCF-7-Zellen nachgewiesen (Hawsawi et al., 2016), was die mögliche Bedeutung von IGFBP5 in der endokrinen Resistenz unterstreicht. Jedoch konnte die selbe Arbeitsgruppe an 77 Patientenproben keine Korrelation zwischen einem niedrigen IGFBP5-Level und einer endokrinen Resistenzbildung nachweisen (Hawsawi et al., 2016). Ob hier IGFBP5 IGF1R-unabhängige Effekte ausübt, muss durch weitere Experimente validiert werden. Weil der Knock-down von IGFBP5 die Mengen von Bcl-3 erhöhte, könnte dies in die endokrine Resistenzbildung und die Regulation der „stromalen regulierten“ Gene involviert sein. Deswegen wurde ein Knock-down von Bcl-3 durchgeführt.

#### 4.3.6.3. Einfluss von Bcl-3 auf den Mechanismus der stromal vermittelten Fulvestrant-Resistenz und die „stromal regulierten“ Gene

Weil der Knock-down von IGFBP5 zu einer starken Induktion von Bcl-3 führte, wurde nun überprüft, inwieweit Bcl-3 für die stromalen Effekte verantwortlich ist. Der Knock-down von Bcl-3 durch siBcl-3 schwächte die Wirkung von CAF-CM auf IGF1R und CAIX ab (Abbildung 36), sodass diese durch CAF-CM nicht mehr so stark erhöht wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die stromalen Zellen den Plasmamembran-Level von CAIX und IGF1R über die Induktion von Bcl-3 erhöhen können.

SiBcl-3 führte bei den „stromal regulierten“ Genen zu signifikanten Erhöhungen für die mRNA-Level von KLHL4, RAB30, SEPP1, UGT2B15, STAT3 und IGFBP5 (Abbildung 37), was dem gegenteiligen Effekt des CAF-CMs entspricht, welches Bcl-3 erhöht und IGFBP5 sowie die „stromal regulierten“ Gene reprimiert. Damit ist Bcl-3 ein möglicher zentraler Effektor der CAF-/MSC-vermittelten Effekte auf MCF-7-Zellen. Dies wird durch die Ergebnisse des Klon-Assays gestützt (Abbildung 38). Unter dem Einfluss von Fulvestrant führte siBcl-3 zu einer signifikanten Verkleinerung der Koloniegrößen (wieder invers zu siIGFBP5, Abbildung 38). Auch die Zugabe von CAF-CM konnte diesen Effekte nicht verhindern, vermutlich weil das CAF-CM die durch den Knock-down induzierte Reduktion des Bcl-3 nicht ausgleichen konnte (Abbildung 36A). Daraus lässt sich schließen, dass die stromalen Zellen die meisten der Signalwegänderungen und Proteinexpressionsinduktionen in MCF-7-Zellen und die Erzeugung der Fulvestrant-Resistenz durch eine Herunterregulation von IGFBP5 (und einer damit verbunden Erhöhung von Bcl-3) ausgelöst haben. Die Herunterregulation der Expression von IGFBP5 mit der spezifischen siRNA siIGFBP5 führte zu einem gesteigerten Zellwachstum in An- und Abwesenheit von Fulvestrant (Abbildung 35A). Dieser Effekt von IGFBP5 auf das Zellwachstum in Abwesenheit von Fulvestrant könnte durch den *insulin-like* Effekt auf P-AKT vermittelt sein, weil Insulin alleine ebenfalls das Wachstum steigerte (Abbildung 35B) und das Level von P-AKT erhöhte, jedoch nicht nach Zugabe von Fulvestrant. Der Effekt von siIGFBP5 auf das Zellwachstum in Gegenwart von Fulvestrant ist wahrscheinlich durch die Erhöhung der Expression (Protein und mRNA) von Bcl-3 vermittelt, weil siBcl-3 nur das Zellwachstum in Gegenwart von Fulvestrant beeinflusste (kein Effekt auf Zellwachstum ohne Fulvestrant). Demzufolge schützt Bcl-3 die ER $\alpha$ -positiven MCF-7-Zellen vor dem SERD Fulvestrant. Passend zu dieser Hypothese konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass MCF-7-Zellen im Mausmodell unter Estrogenmangel eine erhöhte Expression von Bcl-3 zeigten (Pratt et al., 2003). In einer Studie von Schuster und Kollegen (2013) konnte gezeigt werden, dass mit einer höheren Expression von Bcl-3 eine höhere DNA-Bindung und Aktivität von NF $\kappa$ B zu beobachten war (Schuster et al., 2013). Dies erfolgte primär durch die Bindung von Bcl-3 an p50/p50 und p52/p52 NF $\kappa$ B-Homodimeren, wodurch Bcl-3 die Aktivität von NF $\kappa$ B erhöhte (Schuster et al., 2013). Durch die stromal vermittelte Hochregulation von Bcl-3 in ER $\alpha$ -Brustkrebszellen fördern MSCs und CAFs das NF $\kappa$ B-abhängige Wachstum, wenn der ER $\alpha$  aufgrund von Fulvestrant nicht mehr funktionsfähig ist. Die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges kann auch bei Her2<sup>+</sup>-Brustkrebszellen schützend wirken. So haben Chen und Kollegen zeigen können, dass eine Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges die Zellen vor der Behandlung mit dem Her2-Inhibitor Lapatinib schützt (Chen et al., 2013). Damit kann geschlossen werden, dass eine NF $\kappa$ B-Aktivierung eine generelle Möglichkeit zur Resistenzbildung bei Inhibition eines zentralen Wachstums-Signalweges darstellt. So konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ER $\alpha$ -Brustkrebszellen bei Estrogenmangel auf die Aktivität von NF $\kappa$ B

angewiesen sind (Oida et al., 2014). Diese Hypothese müsste durch weitere Analysen des NF $\kappa$ B-Signalweges validiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der stromal induzierten Verminderung der Expression von IGFBP5 eine gleichzeitige Erhöhung der Protein-Expression von Bcl-3, IGF1R und P-AKT in den MCF-7-Zellen verbunden ist. In BT474-Zellen sind dieselben Effekte nachweisbar (Leyh et al., 2015, Dissertation Theresia Lange). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die beobachteten Effekte stromaler Zellen nicht nur spezifisch für die Zelllinie MCF-7 gelten. Für die Zelllinie T47D konnten die Effekte der CAFs und MSCs hingegen nicht gezeigt werden. Es waren auch keine Erhöhungen der Level von Bcl-3, IGF1R und P-AKT sowie keine Senkung der Expression von IGFBP5 nachweisbar (Leyh et al., 2015, Dissertation Theresia Lange). Das Expressionsniveau von Bcl-3 war in den T47D-Zellen so niedrig, dass es sowohl in der Western-Blot-Analyse als auch in der RT-qPCR nur an bzw. unterhalb der Nachweisgrenze detektierbar war. Es ist unwahrscheinlich, dass Bcl-3 an der Ausbildung der Fulvestrant-Resistenz in den T47D-Zellen beteiligt ist (Leyh et al., 2015, Dissertation Theresia Lange). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass in T47D-Zellen andere Proteine, wie Aurora-Kinase B, für eine Anti-Estrogen-Resistenz verantwortlich sind (Larsen et al., 2015).

Durch spezifischen Knock-down von IGFBP5 durch siIGFBP5 konnte ca. die Hälfte der untersuchten Gene in der Expression gesenkt werden (Abbildung 34). Weil das Verhältnis der Expressionen von Bcl-3 zu IGFBP5 stets invers und exponentiell korreliert (Abbildung 23, Abbildung 24), sollte dies auch für die durch IGFBP5/Bcl-3 regulierten Gene gelten. Deswegen müssten die durch siIGFBP5 in der Expression gesenkten Gene durch einen Bcl-3 Knock-down erhöht werden (wenn sie durch die „IGFBP5-Bcl-3-Achse“ reguliert werden). Von den durch siIGFBP5 (Abbildung 34) gesenkten Transkripten konnten durch den Knock-down von Bcl-3 (mit siBcl-3) KLHL4 und SEPP1 hochreguliert werden. Die Expression von KLHL4 und SEPP1 verhielt sich linear zur Expression von IGFBP5 und invers zu der von Bcl-3 (Abbildung 23 und Abbildung 24). Dies legt die Vermutung nahe, dass KLHL4 und SEPP1 durch die IGFBP5/Bcl-3-Achse reguliert werden. Interessanterweise führt eine Behandlung von MCF-7-Zellen mit dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), einem Aktivator von NF $\kappa$ B, zur Herunterregulation von SEPP1 (Frasor et al., 2009). Daraus lässt sich schließen, dass SEPP1 ein mögliches Zielgen von NF $\kappa$ B/Bcl-3 in MCF-7-Zellen ist. Die Herunterregulation der Expression von SEPP1 war auch nach Applikation von Insulin oder CoCl<sub>2</sub> nachweisbar. Daher besteht die Möglichkeit, dass NF $\kappa$ B/Bcl-3 in Wechselwirkung oder im *cross-talk* mit HIF1 $\alpha$  und/oder dem PI3K/AKT-Signalweg steht. Alle diese drei Signalwege werden durch die stromalen Zellen sowie durch siIGFBP5 aktiviert (Abbildung 36), somit vermutlich auch durch die stromal-vermittelte IGFBP5-Herunterregulation. Ein Weg, über den der PI3K/AKT-Signalweg die Expression von SEPP1 senken könnte, ist durch die Inhibition von *forkhead box transcription factor* 01A (Fox01A) (Sarkissyan et al., 2014; Walter et al., 2008; Wu et al., 2010). Fox01A ist ein Tumorsuppressorprotein und Transkriptionsfaktor, der in Hepatom-Zellen die Transkription von SEPP1 induzieren kann (Walter et al., 2008). Dies müsste in weiterführenden Experimenten durch Knock-down von Fox01A und SEPP1 überprüft werden. Interessanterweise konnte in *in-silico*-Kaplan-Meier-Analysen mit ER $\alpha$ -positiven und PR (Progesteron-Rezeptor)-positiven Tumoren von Brustkrebspatientinnen unter endokriner Therapie (Anti-Estrogen und/oder Aromatase-Inhibitoren) gezeigt werden, dass Expressionslevel von hohem Bcl-3 und/oder niedrigem KLHL4 sowie niedrigem SEPP1 (entspricht der „Wirkung“ der stromalen Zellen) mit einer schlechteren Prognose bei Brustkrebspatientinnen (ER $\alpha$ <sup>+</sup> und PR<sup>+</sup>) mit endokriner Therapie verbunden sind (Abbildung 39). Hohe mRNA-

Mengen von Bcl-3 sind mit einem zweimal schlechteren Rezidiv-freien Überleben assoziiert (*hazard ratio* = 2,01) (Abbildung 39A). Die beiden Gene KLHL4 und SEPP1, die sich in MCF-7-Zellen invers zum Expressionsniveau von Bcl-3 verhalten, zeigten in der Kohorte ebenfalls ein inverses Verhalten zu Bcl-3 (Abbildung 39C und 39D). So sind die niedrigen Expressionen von KLHL4 mit Faktor 1,75 (*hazard ratio* = 0,57) und SEPP1 mit Faktor 3,7 (*hazard ratio* = 0,27) mit einem schlechteren Rezidiv-freien Überleben assoziiert. Für SEPP1 konnte Steinbrenner (2013) zeigen, dass dieses die Phosphorylierung von AKT inhibieren kann (Steinbrenner, 2013). Somit wäre ein niedriges SEPP1-Level mit einem erhöhten P-AKT-Level assoziiert. Eine hohe Menge an P-AKT kann entscheidend zu einer stromal vermittelten Therapieresistenz beitragen (Dittmer and Leyh, 2015). Daher liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur Bcl-3 mit einer endokrinen Resistenz verbunden ist, sondern ebenfalls seine Zielgene KLHL4 und SEPP1, wobei auch die Möglichkeit besteht, dass eines dieser drei Proteine der Hauptfaktor für die Resistenz ist und die anderen Marker nur als Surrogat fungieren.

Diese Daten lassen eine wichtige Rolle der IGFBP5/Bcl-3-Achse in der endokrinen Resistenz vermuten, die durch stromale Zellen reguliert/induziert werden kann. Bcl-3 und SEPP1 als eines seiner Zielgene könnten als Biomarker zur Vorhersage einer endokrinen Resistenz bei Patienten mit ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>-Brustkrebs genutzt werden und müssten dafür an einer größeren Kohorte prospektiv validiert werden.

#### 4.4. Analyse des parakrinen Effektors, über den die stromalen Zellen die Effekte in den MCF-7-Zellen regulieren

Da gezeigt werden konnte, dass eine Reihe von Genen und Proteinen durch MSCs und CAFs in den MCF-7-Zellen beeinflusst wurden und dies von therapeutischer Relevanz ist, wurde untersucht, welches Signalmolekül für diesen parakrinen Effekt verantwortlich sein könnte und insbesondere die IGFBP5/Bcl-3-Achse beeinflussen kann.

Durch Analyse des CAF-CMs im Chemokin-Array konnten die Proteine Osteoprotegerin (OPG), PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1), TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 1*), TIMP-2, CCL-5 und -8 (CC-Chemokin-Ligand 8) nachgewiesen werden. Die Signale für CCL-2, Interleukin-6 (IL6) und -8 (IL8) waren am stärksten, wobei IL6 das prominenteste Chemokin war (Abbildung 40). MSCs und CAFs sezernieren den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) (Abbildung 40) und PAI-1 ist ein prognostischer Marker für den Brustkrebsverlauf und ein prädiktiver Marker für adjuvante Chemotherapie (Duffy, 2002; Duffy et al., 2014; Thomssen et al., 2009). PAI-1 ist zudem wichtig für die Migration der Krebszellen und die Progression des Karzinoms (Czekay et al., 2011; Dellas and Loskutoff, 2005). Der Knock-down von PAI-1 war erfolgreich, zeigte aber keinen Einfluss auf die Wirkung des CAF-CMs auf MCF-7-Zellen. Somit kann PAI-1 als parakriner Effektor ausgeschlossen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass MSCs über die Sekretion von IL6 P-STAT3 induzieren und das Wachstum bei ER<sup>+</sup>-Brustkrebszellen steigern können (Sasser et al., 2007). Hinzu kommt, dass siSTAT3 die CAF-CM vermittelte Erhöhung von Bcl-3 verhinderte und IL6 im Array positiv war. Aus Experimenten mit Prostatakarzinomzellen ist bekannt, dass Bcl-3 durch eine IL6 vermittelte Erhöhung von STAT3 induziert werden kann (Ahlqvist et al., 2013). Tatsächlich induzierte IL6 die Phosphorylierung von STAT3, senkte die Expression aller „stromal regulierten“ Gene signifikant, wobei die höchste Konzentration von IL6 jeweils den stärksten Effekt zeigte.

IL6 erhöhte das mRNA-Level von Bcl-3 um ca. Faktor 2,5 (Abbildung 42) und reprimierte IGFBP5 dosisabhängig (Abbildung 42). Somit ist IL6 in der Lage, die Effekte von stromalen Zellen auf mRNA-Ebene nachzuahmen und ist damit der potenzielle parakrine Effektor, der von den MSCs/CAFs sezerniert wird und die beobachteten Effekte auslöst. Im Klonogen-Assay führte IL6 ebenso zu einer endokrinen Resistenzbildung in MCF-7-Zellen und konnte damit den schützenden Effekt des CAF-CMs zum Teil nachahmen. Somit ist IL6 auch ein potenzieller parakriner Mediator der stromal induzierten endokrinen Resistenz. Wahrscheinlich sind die durch IL6 induzierten Effekte nicht primär über P-STAT-3 vermittelt, weil der STAT3-Knock-down keinen Einfluss auf die Expression von IGFBP5 und Bcl-3 hatte (Abbildung 32), jedoch siSTAT3 die CAF-CM vermittelte Erhöhung von Bcl-3 abschwächte (Abbildung 31).

Außer Proteinen, wie z.B. Chemokinen, können MSCs und CAFs auch Mikrovesikel oder Exosomen sezernieren (Camussi et al., 2010; Kim et al., 2012). Diese könnten ebenfalls an den stromal induzierten Effekten beteiligt sein. Der Einfluss von MSC sezernierten Mikrovesikeln wurde getestet und diese zeigten keinen Einfluss auf die gemessenen stromal vermittelten Effekte (Daten nicht gezeigt).

IL6 kann in Abhängigkeit vom Tumor und dessen Mikromilieu sehr verschieden wirken (Fisher et al., 2014). Es kann sowohl Proliferation, Überleben und Angiogenese fördern, als auch die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen den Tumor fördern (Fisher et al., 2014). IL6 kann in Brustkrebszellen über Bindung an seinen Rezeptor (IL6R, GP130) die Population von Krebsstammzellen erhöhen, wobei diese Proliferation über ein komplexes Zytokin-Netzwerk zwischen MSCs und Brustkrebszellen reguliert wird (Liu et al., 2011). Dieser Mechanismus liegt hier nicht zu Grunde, weil zum einem keine Erhöhung von Krebsstammzellgenen nachweisbar war (Abbildung 28B) und zum anderen aus der Literatur bekannt ist, dass CAFs aus Brusttumoren und Ovarialtumoren hohe Mengen der pro-inflammatorischen Moleküle IL6 und COX-2 exprimieren (Erez et al., 2013). Von CAFs sezerniertes IL6 kann in ER<sup>+</sup>-Tumoren Wachstum und Invasion fördern (Studebaker et al., 2008). In einer sehr ähnlichen Arbeit von Sun und Kollegen (2014) konnte gezeigt werden, dass CAFs in MCF-7-Zellen, T47D-Zellen und Xenograft-Mäusen über die stromale Sekretion von IL6 eine Resistenz gegen das SERM Tamoxifen induzierten (Sun et al., 2014). Dies war mit einer Induktion des PI3K/AKT-Signalweges und des STAT3/JAK2-Signalweges assoziiert (Sun et al., 2014), ähnlich wie es in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (Abbildung 16, Abbildung 20). Allerdings wurden in der Arbeit von Sun weder Bcl-3 noch IGFBP5 analysiert (Sun et al., 2014), sodass kein Rückschluss auf die „IGFBP5/Bcl-3-Achse“ getroffen werden kann. Eine Behandlung von MCF-7-Zellen mit IL6 kann die Proteinmenge von CAIX erhöhen und einen Hypoxie „nachahmenden“ Effekt auslösen (Sansone et al., 2007), ähnlich dem Effekt von CAFs/MSCs auf MCF-7-Zellen (Abbildung 15). Hohe Mengen IL6 korrelieren mit Progression und einer schlechten Prognose beim metastasierten Mammakarzinom (Salgado et al., 2003; Zhang and Adachi, 1999). Therapieresistente Brustkrebszellen können eine bis zu 100fach erhöhte Menge an IL6 aufweisen, die dadurch induzierte Therapieresistenz kann durch den Antikörper Tocilizumab (gegen den IL6-Rezeptor) vermindert werden (Korkaya et al., 2012).

Um die Theorie der IL6-vermittelten stromalen Effekte weiter zu untermauern, ist ein Knock-down von IL6 in den 19TT CAFs durchzuführen oder ein Antikörper gegen IL6 oder den IL6-Rezeptor (z.B. Tocilizumab; Korkaya et al., 2012) zu verwenden, sodass gezeigt werden kann, dass die stromalen Effekte durch Verminderung der

IL6-Menge abnehmen oder nicht mehr nachweisbar wären. Des Weiteren ist anzustreben, weitere Experimente mit IL6 durchzuführen (z.B. Western-Blot-Analysen weiterer Signalwege), um den Mechanismus der Regulation der IGFBP5/Bcl-3-Achse aufzuklären.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) und Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF) einen desensibilisierenden Effekt gegen das Anti-Estrogen Fulvestrant in ER $\alpha$ -positiven Brustkrebszellen induzieren. MSCs und CAFs steigerten in MCF-7-Zellen die Aktivitäten des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT- und *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)-Signalweges und erhöhten die Proteinexpressionen von Integrin  $\beta$ 1, *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R), *hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ), Carboanhydrase IX (CAIX) und *B-cell lymphoma 3-encoded protein* (Bcl-3). Weiterführende Analysen konnten zeigen, dass diese Induktionen durch eine MSC- und CAF-vermittelte parakrine Herunterregulation des *IGF binding protein 5* (IGFBP5) in den MCF-7-Zellen verursacht wurde. Die Herunterregulation von IGFBP5 führte zu einer Steigerung des Zellwachstums sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Fulvestrant. IGFBP5 konnte IGF inhibieren und damit die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges beeinflussen oder in einer IGF-unabhängigen Weise agieren. Insulin, das den Effekt der Herunterregulation von IGFBP5 bezüglich der Aktivierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges nachahmen konnte, stimulierte das Wachstum nur in Abwesenheit von Fulvestrant. Eine Verminderung des IGFBP5-Levels hatte eine Erhöhung des Bcl-3-Levels zur Folge, welches als Ursache für die Wachstumsförderung durch die stromalen Zellen in Anwesenheit von Fulvestrant ausfindig gemacht werden konnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Bcl-3 und IGFBP5 in MCF-7-Zellen invers zueinander reguliert wurden. Somit ist es wahrscheinlich, dass IGFBP5 das Zellwachstum in Abwesenheit von Fulvestrant in einem IGF-abhängigen Modus über den PI3K/AKT-Signalweg und in Anwesenheit von Fulvestrant in einer IGF-unabhängigen Weise über Bcl-3 reguliert. Basierend auf einem cRNA-Microarray von MCF-7/MSC-Ko-Kulturen (50:1) konnten mehrere Gene identifiziert werden, die durch Bcl-3 und IGFBP5 reguliert werden. Davon wurden zwei Gene (KLHL4 und SEPP1) invers durch diese beiden Proteine reguliert. *In silico*-Analysen anhand von Proben 229 endokrin therapierter Patientinnen zeigten, dass eine erhöhte Expression von Bcl-3 sowie eine verminderte Expression seiner Zielgene KLHL4 und SEPP1 mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Somit könnte Bcl-3 eine zentrale Rolle in der Resistenzentwicklung gegenüber dem Anti-Estrogen Fulvestrant spielen. Des Weiteren konnte Interleukin-6 (IL6) als möglicher parakriner Faktor identifiziert werden, der die Effekte der stromalen Zellen nachahmen konnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adamo, M.L., Shao, Z.M., Lanau, F., Chen, J.C., Clemmons, D.R., Roberts, C.T., LeRoith, D., and Fontana, J.A. (1992). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and retinoic acid modulation of IGF-binding proteins (IGFBPs): IGFBP-2, -3, and -4 gene expression and protein secretion in a breast cancer cell line. *Endocrinology* *131*, 1858–1866.
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., de Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., and Piccart, M. (2014). Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *J. Clin. Oncol.* *32*, 2794–2803.
- Ades, F., Tryfonidis, K., and Zardavas, D. (2017). The past and future of breast cancer treatment - from the papyrus to individualised treatment approaches. *Ecancermedicallscience* *11*.
- Agani, F., and Jiang, B.-H. (2013). Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* *13*, 245–251.
- Ahlqvist, K., Saamarthy, K., Syed Khaja, A.S., Bjartell, A., and Massoumi, R. (2013). Expression of Id proteins is regulated by the Bcl-3 proto-oncogene in prostate cancer. *Oncogene* *32*, 1601–1608.
- Akkiprik, M., Feng, Y., Wang, H., Chen, K., Hu, L., Sahin, A., Krishnamurthy, S., Ozer, A., Hao, X., and Zhang, W. (2008). Multifunctional roles of insulin-like growth factor binding protein 5 in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *10*, 212.
- Akkiprik, M., Hu, L., Sahin, A., Hao, X., and Zhang, W. (2009). The subcellular localization of IGFBP5 affects its cell growth and migration functions in breast cancer. *BMC Cancer* *9*, 103.
- Alarcón, C., Morales, A.V., Pimentel, B., Serna, J., and de Pablo, F. (1998). (Pro)insulin and insulin-like growth factor I complementary expression and roles in early development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *121*, 13–17.
- Allison, K.H., and Sledge, G.W. (2014). Heterogeneity and cancer. *Oncol. Williston Park N* *28*, 772–778.
- Al-toub, M., Vishnubalaji, R., Hamam, R., Kassem, M., Aldahmash, A., and Alajez, N.M. (2015). CDH1 and IL1-beta expression dictates FAK and MAPKK-dependent cross-talk between cancer cells and human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* *6*.
- do Amaral, J.B., Rezende-Teixeira, P., Freitas, V.M., and Machado-Santelli, G.M. (2011). MCF-7 Cells as a Three-Dimensional Model for the Study of Human Breast Cancer. *Tissue Eng. Part C Methods* *17*, 1097–1107.
- Amicis, F.D., Thirugnansampanthan, J., Cui, Y., Selever, J., Beyer, A., Parra, I., Weigel, N.L., Herynk, M.H., Tsimelzon, A., Lewis, M.T., et al. (2010). Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *121*, 1–11.
- Anderberg, C., and Pietras, K. (2009). On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 1461–1462.
- Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001). Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Publ. Online* 10 August 2001 Doi101038sjonc1204554 *20*.
- Baglio, S.R., Rooijers, K., Koppers-Lalic, D., Verweij, F.J., Pérez Lanzón, M., Zini, N., Naaijken, B., Perut, F., Niessen, H.W.M., Baldini, N., et al. (2015). Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res. Ther.* *6*.
- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., Rugo, H.S., Sahmoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., et al. (2012). Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 520–529.
- Baxter, R.C. (2014). IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 329–341.
- Beard, J.A., Tenga, A., Hills, J., Hoyer, J.D., Cherian, M.T., Wang, Y.-D., and Chen, T. (2016). The orphan nuclear receptor NR4A2 is part of a p53–microRNA-34 network. *Sci. Rep.* *6*.
- Beaver, J.A., Gustin, J.P., Yi, K.H., Rajpurohit, A., Thomas, M., Gilbert, S.F., Rosen, D.M., Park, B.H., and Lauring, J. (2013). PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 5413–5422.
- BelAiba, R.S., Bonello, S., Zähringer, C., Schmidt, S., Hess, J., Kietzmann, T., and Görlach, A. (2007). Hypoxia Up-Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Transcription by Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nuclear Factor  $\kappa$ B in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4691–4697.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* *30*, 586–623.
- Benyahia, Z., Dussault, N., Cayol, M., Sigaud, R., Berenguer-Daizé, C., Delfino, C., Tounsi, A., Garcia, S., Martin, P.-M., Mabrouk, K., et al. (2017). Stromal fibroblasts present in breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through adrenomedullin secretion. *Oncotarget* *8*, 15744–15762.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* *17*, 320–329.

- Bolouri, H. (2015). Network dynamics in the tumor microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* *30*, 52–59.
- Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M.A., Kriauciunas, K., and Kahn, C.R. (2010). A Kinase-Independent Role for Unoccupied Insulin and IGF-1 Receptors in the Control of Apoptosis. *Sci. Signal.* *3*, ra87.
- Brinster, R.L. (1974). The Effect of Cells Transferred into the Mouse Blastocyst on Subsequent Development. *J. Exp. Med.* *140*, 1049–1056.
- Buchsbaum, R.J., and Oh, S.Y. (2016). Breast Cancer-Associated Fibroblasts: Where We Are and Where We Need to Go. *Cancers* *8*.
- Bussard, K.M., and Smith, G.H. (2012). Human Breast Cancer Cells Are Redirected to Mammary Epithelial Cells upon Interaction with the Regenerating Mammary Gland Microenvironment In-Vivo. *PLOS ONE* *7*, e49221.
- Bussard, K.M., Boulanger, C.A., Booth, B.W., Bruno, R.D., and Smith, G.H. (2010). Reprogramming Human Cancer Cells in the Mouse Mammary Gland. *Cancer Res.* *70*, 6336–6343.
- Byrne, M.B., Leslie, M.T., Gaskins, H.R., and Kenis, P.J.A. (2014). Methods to study the tumor microenvironment under controlled oxygen conditions. *Trends Biotechnol.* *32*, 556–563.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Cantaluppi, V., and Biancone, L. (2010). Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* *78*, 838–848.
- Cardone, R.A., Bellizzi, A., Busco, G., Weinman, E.J., Dell'Aquila, M.E., Casavola, V., Azzariti, A., Mangia, A., Paradiso, A., and Reshkin, S.J. (2007). The NHERF1 PDZ2 Domain Regulates PKA–RhoA–p38-mediated NHE1 Activation and Invasion in Breast Tumor Cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1768–1780.
- Castrellon, A.B. (2017). Novel Strategies to Improve the Endocrine Therapy of Breast Cancer. *Oncol. Rev.* *11*.
- Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2004). Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J. Pathol.* *204*, 386–395.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., Houvenaeghel, G., Extra, J.-M., Bertucci, F., Jacquemier, J., et al. (2010). ALDH1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 45–55.
- Cheang, M.C.U., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., et al. (2009). Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *101*, 736–750.
- Chen, Y.-J., Yeh, M.-H., Yu, M.-C., Wei, Y.-L., Chen, W.-S., Chen, J.-Y., Shih, C.-Y., Tu, C.-Y., Chen, C.-H., Hsia, T.-C., et al. (2013). Lapatinib-induced NF-kappaB activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to proteasome inhibitors. *Breast Cancer Res. BCR* *15*, R108.
- Christopoulos, P.F., Msaouel, P., and Koutsilieris, M. (2015). The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol. Cancer* *14*.
- Chu, C.-Y., Chu, C.-Y., Jin, Y.-T., Jin, Y.-T., Zhang, W., Zhang, W., Yu, J., Yu, J., Yang, H.-P., Yang, H.-P., et al. (2016). CA IX is upregulated in CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer. *Int. J. Oncol.* *48*, 271–280.
- Cirri, P., and Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* *31*, 195–208.
- Comşa, S., Ciuculescu, F., Henschler, R., and Raica, M. (2011). MCF7-MSC co-culture assay: approach to assess the co-operation between MCF-7s and MSCs in tumor-induced angiogenesis. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* *52*, 1071–1076.
- Conley, S.J., Gheordunescu, E., Kakarala, P., Newman, B., Korkaya, H., Heath, A.N., Clouthier, S.G., and Wicha, M.S. (2012). Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 2784–2789.
- Czekay, R.-P., Wilkins-Port, C.E., Higgins, S.P., Freytag, J., Overstreet, J.M., Klein, R.M., Higgins, C.E., Samarakoon, R., and Higgins, P.J. (2011). PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration.
- Daniels, M.W., Brock, G.N., and Wittliff, J.L. (2017). Clinical outcomes linked to expression of gene subsets for protein hormones and their cognate receptors from LCM-procured breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *161*, 245–258.
- Dave, B., Mittal, V., Tan, N.M., and Chang, J.C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res.* *14*, 202.
- Davis, S.L., Eckhardt, S.G., Tentler, J.J., and Diamond, J.R. (2014). Triple-negative breast cancer: bridging the gap from cancer genomics to predictive biomarkers. *Ther. Adv. Med. Oncol.* *6*, 88–100.

- De Boeck, A., Hendrix, A., Maynard, D., Van Bockstal, M., Daniëls, A., Pauwels, P., Gespach, C., Bracke, M., and De Wever, O. (2013). Differential secretome analysis of cancer-associated fibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironmental regulators of colon cancer progression. *PROTEOMICS* 13, 379–388.
- De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., and Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer* 123, 2229–2238.
- Dellas, C., and Loskutoff, D.J. (2005). Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb. Haemost.* 93, 631–640.
- Denduluri, S.K., Idowu, O., Wang, Z., Liao, Z., Yan, Z., Mohammed, M.K., Ye, J., Wei, Q., Wang, J., Zhao, L., et al. (2015). Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes Dis.* 2, 13–25.
- Dewing, A.S.T., Rueli, R.H., Robles, M.J., Nguyen-Wu, E.D., Zeyda, T., Berry, M.J., and Bellinger, F.P. (2012). Expression and regulation of mouse selenoprotein P transcript variants differing in non-coding RNA. *RNA Biol.* 9, 1361–1369.
- Dittmer, J. (2011). Mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts sensitize breast cancer cells in 3D cultures to kinase inhibitors. *Int. J. Oncol.*
- Dittmer, J., and Leyh, B. (2014). Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression. *Int. J. Oncol.* 44, 1789–1798.
- Dittmer, J., and Leyh, B. (2015). The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 31, 3–15.
- Dittmer, A., Vetter, M., Schunke, D., Span, P.N., Sweep, F., Thomssen, C., and Dittmer, J. (2006). Parathyroid Hormone-related Protein Regulates Tumor-relevant Genes in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 281, 14563–14572.
- Dittmer, A., Schunke, D., and Dittmer, J. (2008). PTHrP promotes homotypic aggregation of breast cancer cells in three-dimensional cultures. *Cancer Lett.* 260, 56–61.
- Dittmer, A., Hohlfeld, K., Lützkendorf, J., Müller, L.P., and Dittmer, J. (2009). Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3053–3065.
- Dittmer, A., Fuchs, A., Oerlecke, I., Leyh, B., Kaiser, S., Martens, J.W.M., Lützkendorf, J., Müller, L., and Dittmer, J. (2011). Mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts sensitize breast cancer cells in 3D cultures to kinase inhibitors. *Int. J. Oncol.* 39, 689–696.
- Dixon, J.M. (2014). Endocrine Resistance in Breast Cancer, Endocrine Resistance in Breast Cancer. *New J. Sci. New J. Sci.* 2014, 2014, e390618.
- Dolberg, D.S., and Bissell, M.J. (1984). Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature* 309, 552–556.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Dubois, V., Couissi, D., Schonne, E., Remacle, C., and Trouet, A. (1995). Intracellular Levels and Secretion of Insulin-Like-Growth-Factor-Binding Proteins in MCF-7/6, MCF-7/AZ and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Eur. J. Biochem.* 232, 47–53.
- Duffy, M.J. (2002). Urokinase Plasminogen Activator and Its Inhibitor, PAI-1, as Prognostic Markers in Breast Cancer: From Pilot to Level 1 Evidence Studies. *Clin. Chem.* 48, 1194–1197.
- Duffy, M.J., McGowan, P.M., Harbeck, N., Thomssen, C., and Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res. BCR* 16.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (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.
- Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., and Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* 12, 207–218.
- Epstein, A.C.R., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., et al. (2001). *C. elegans* EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell* 107, 43–54.
- Erez, N., Glanz, S., Raz, Y., Avivi, C., and Barshack, I. (2013). Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 397–402.
- Evdokimova, V., Tognon, C.E., Benatar, T., Yang, W., Krutikov, K., Pollak, M., Sorensen, P.H.B., and Seth, A. (2012). IGFBP7 Binds to the IGF-1 Receptor and Blocks Its Activation by Insulin-Like Growth Factors. *Sci Signal* 5, ra92–ra92.
- Farlie, P., Reid, C., Wilcox, S., Peeters, J., Reed, G., and Newgreen, D. (2001). Ypel1: a novel nuclear protein that induces an epithelial-like morphology in fibroblasts. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 6, 619–629.

- Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., André, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., et al. (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat. Med.* *15*, 68–74.
- Fisher, D.T., Appenheimer, M.M., and Evans, S.S. (2014). The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment. *Semin. Immunol.* *26*, 38–47.
- Folgiero, V., Avetrani, P., Bon, G., Carlo, S.E.D., Fabi, A., Nisticò, C., Vici, P., Melucci, E., Buglioni, S., Perracchio, L., et al. (2008). Induction of ErbB-3 Expression by  $\alpha 6\beta 4$  Integrin Contributes to Tamoxifen Resistance in ER $\beta$ 1-Negative Breast Carcinomas. *PLOS ONE* *3*, e1592.
- Frame, M.C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1602*, 114–130.
- Frasor, J., Weaver, A., Pradhan, M., Dai, Y., Miller, L.D., Lin, C.-Y., and Stanculescu, A. (2009). Positive Crosstalk between Estrogen Receptor and NF $\kappa$ B in Breast Cancer. *Cancer Res.* *69*, 8918–8925.
- Freida, D., Lecourt, S., Cras, A., Vanneaux, V., Letort, G., Gidrol, X., Guyon, L., Larghero, J., and They, M. (2013). Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Regulate Biased DNA Segregation in Response to Cell Adhesion Asymmetry. *Cell Rep.* *5*, 601–610.
- Fürstenberger, G., and Senn, H.-J. (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol.* *3*, 298–302.
- Futrega, K., Atkinson, K., Lott, W.B., and Doran, M.R. (2017). Spheroid Coculture of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and Monolayer Expanded Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Polydimethylsiloxane Microwells Modestly Improves In Vitro Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Expansion. *Tissue Eng. Part C Methods* *23*, 200–218.
- Gao, W., McCormick, J., Connolly, M., Balogh, E., Veale, D.J., and Fearon, U. (2015). Hypoxia and STAT3 signalling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1275–1283.
- Gascard, P., and Tlsty, T.D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* *30*, 1002–1019.
- Ge, S., MAO, Y., YI, Y., XIE, D., CHEN, Z., and XIAO, Z. (2012). Comparative proteomic analysis of secreted proteins from nasopharyngeal carcinoma-associated stromal fibroblasts and normal fibroblasts. *Exp. Ther. Med.* *3*, 857–860.
- Giaccia, A.J., and Schipani, E. (2010). Role of carcinoma-associated fibroblasts and hypoxia in tumor progression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *345*, 31–45.
- Greene, J., and Hennessy, B. (2015). The role of anthracyclines in the treatment of early breast cancer. *J. Oncol. Pharm. Pract.* *21*, 201–212.
- Griffiths, C.L., and Olin, J.L. (2012). Triple Negative Breast Cancer: A Brief Review of its Characteristics and Treatment Options. *J. Pharm. Pract.* *25*, 319–323.
- Guedj, M., Marisa, L., de Reynies, A., Orsetti, B., Schiappa, R., Bibeau, F., MacGrogan, G., Lerebours, F., Finetti, P., Longy, M., et al. (2012). A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* *31*, 1196–1206.
- Guilherme, A., Torres, K., and Czech, M.P. (1998). Cross-talk between Insulin Receptor and Integrin  $\alpha 5\beta 1$  Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* *273*, 22899–22903.
- Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A.C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., and Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res. Treat.* *123*, 725–731.
- Györfy, B., Surowiak, P., Budczies, J., and Lánckzy, A. (2013). Online Survival Analysis Software to Assess the Prognostic Value of Biomarkers Using Transcriptomic Data in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLOS ONE* *8*, e82241.
- Han, Y.-F., and Cao, G.-W. (2012). Role of nuclear receptor NR4A2 in gastrointestinal inflammation and cancers. *World J. Gastroenterol. WJG* *18*, 6865–6873.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hawsawi, Y., Humphries, M.P., Wright, A., Berwick, A., Shires, M., Al-Kharobi, H., El-Gendy, R., Jove, M., Twelves, C., Speirs, V., et al. (2016). Deregulation of IGF-binding proteins -2 and -5 contributes to the development of endocrine resistant breast cancer in vitro. *Oncotarget* *7*, 32129–32143.
- Heon Ryu, M., Hee Park, J., Eun Park, J., Chung, J., Hun Lee, C., and Ryoung Park, H. (2010). Cobalt chloride stimulates phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling through the epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinoma. *Biocell* *34*, 15–21.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* *8*, R76.

- Hillier, L.W., Graves, T.A., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Pepin, K.H., Minx, P., Wagner-McPherson, C., Layman, D., Wylie, K., Sekhon, M., et al. (2005). Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4. *Nature* *434*, 724–731.
- Hiscox, S., Jordan, N.J., Jiang, W., Harper, M., McClelland, R., Smith, C., and Nicholson, R.I. (2006). Chronic exposure to fulvestrant promotes overexpression of the c-Met receptor in breast cancer cells: implications for tumour–stroma interactions. *Endocr. Relat. Cancer* *13*, 1085–1099.
- Hu, M., and Polyak, K. (2008). Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *18*, 27–34.
- Hu, M., Yao, J., Carroll, D.K., Weremowicz, S., Chen, H., Carrasco, D., Richardson, A., Violette, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., et al. (2008). Regulation of In Situ to Invasive Breast Carcinoma Transition. *Cancer Cell* *13*, 394–406.
- Huang, C., Park, C.C., Hilsenbeck, S.G., Ward, R., Rimawi, M.F., Wang, Y., Shou, J., Bissell, M.J., Osborne, C.K., and Schiff, R. (2011).  $\beta 1$  integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res.* *13*, R84.
- Huang, C.-M., Wang, C.-C., Barnes, S., and Elmets, C.A. (2006). In vivo detection of secreted proteins from wounded skin using capillary ultrafiltration probes and mass spectrometric proteomics. *Proteomics* *6*, 5805–5814.
- Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R.G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* *20*, 761–787.
- Ishida-Yamamoto, A., and Igawa, S. (2015). The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res.* *360*, 477–482.
- Jacob, M., Chang, L., and Puré, E. (2012). Fibroblast activation protein in remodeling tissues. *Curr. Mol. Med.* *12*, 1220–1243.
- Jiang, L., LIU, X., CHEN, Z., JIN, Y., HEIDBREder, C.E., KOLOKYTHAS, A., WANG, A., DAI, Y., and ZHOU, X. (2010). MicroRNA-7 targets IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) in tongue squamous cell carcinoma cells. *Biochem. J.* *432*, 199–205.
- Ju, J.A., Godet, I., Ye, I.C., Byun, J., Jayatilaka, H., Lee, S.J., Xiang, L., Samanta, D., Lee, M.H., Wu, P.-H., et al. (2017). Hypoxia Selectively Enhances Integrin Receptor Expression to Promote Metastasis. *Mol. Cancer Res. MCR* *15*, 723–734.
- Jue, S.F., Bradley, R.S., Rudnicki, J.A., Varmus, H.E., and Brown, A.M. (1992). The mouse Wnt-1 gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 321–328.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 422–433.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 582–598.
- Kamat, P., Schweizer, R., Kaenel, P., Salemi, S., Calcagni, M., Giovanoli, P., Gorantla, V.S., Eberli, D., Andres, A.-C., and Plock, J.A. (2015). Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells May Promote Breast Cancer Progression and Metastatic Spread. *Plast. Reconstr. Surg.* *136*, 76–84.
- Kawada, M., Inoue, H., Masuda, T., and Ikeda, D. (2006). Insulin-like Growth Factor I Secreted from Prostate Stromal Cells Mediates Tumor-Stromal Cell Interactions of Prostate Cancer. *Cancer Res.* *66*, 4419–4425.
- Keely, S., Glover, L.E., MacManus, C.F., Campbell, E.L., Scully, M.M., Furuta, G.T., and Colgan, S.P. (2009). Selective induction of integrin  $\beta 1$  by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing. *FASEB J.* *23*, 1338–1346.
- Kessler, J., Hahnel, A., Wichmann, H., Rot, S., Kappler, M., Bache, M., and Vordermark, D. (2010). HIF-1 $\alpha$  inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *BMC Cancer* *10*, 605.
- Kim, H.-S., Lee, W.J., Lee, S.W., Chae, H.-W., Kim, D.H., and Oh, Y. (2010). Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 Induces G1 Cell Cycle Arrest with Inhibition of Cyclin-dependent Kinase 2 and 4 in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Horm. Metab. Res.* *42*, 165–172.
- Kim, H.-S., Choi, D.-Y., Yun, S.J., Choi, S.-M., Kang, J.W., Jung, J.W., Hwang, D., Kim, K.P., and Kim, D.-W. (2012). Proteomic Analysis of Microvesicles Derived from Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Proteome Res.* *11*, 839–849.
- Kirkegaard, T., Hansen, S.K., Larsen, S.L., Reiter, B.E., Sørensen, B.S., and Lykkesfeldt, A.E. (2014). T47D breast cancer cells switch from ER/HER to HER/c-Src signaling upon acquiring resistance to the antiestrogen fulvestrant. *Cancer Lett.* *344*, 90–100.
- Klemm, F., and Joyce, J.A. (2015). Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* *25*, 198–213.
- Kluge, A., Zimmermann, R., Weihrauch, D., Mohri, M., Sack, S., Schaper, J., and Schaper, W. (1997). Coordinate expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc. Res.* *33*, 324–331.
- Kojima, H., Kunimoto, H., Inoue, T., and Nakajima, K. (2012). The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle* *11*, 730–739.

- Korkaya, H., Kim, G., Davis, A., Malik, F., Henry, N.L., Ithimakin, S., Quraishi, A.A., Tawakkol, N., D'Angelo, R., Paulson, A., et al. (2012). Activation of an IL-6 Inflammatory Loop Mediates Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancers by Expanding the Cancer Stem Cell Population. *Mol. Cell* *47*, 570–584.
- Kruijf, E.M. de, Nes, J.G.H. van, Velde, C.J.H. van de, Putter, H., Smit, V.T.H.B.M., Liefers, G.J., Kuppen, P.J.K., Tollenaar, R.A.E.M., and Mesker, W.E. (2011). Tumor–stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res. Treat.* *125*, 687–696.
- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4966–4971.
- Lacroix, M. (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* *13*, 1033–1067.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lai, A.C., and Crews, C.M. (2017). Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 101–114.
- Lamb, R., Harrison, H., and Clarke, R.B. (2008). Mammary Development, Carcinomas and Progesterone: Role of Wnt Signalling. In *Progesterins and the Mammary Gland*, O. Conneely, and C. Otto, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 151–170.
- Larsen, S.L., Yde, C.W., Laenkholm, A.-V., Rasmussen, B.B., Duun-Henriksen, A.K., Bak, M., Lykkesfeldt, A.E., and Kirkegaard, T. (2015). Aurora kinase B is important for antiestrogen resistant cell growth and a potential biomarker for tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer* *15*.
- Lazennec, L. (2016). Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1866*, 290–299.
- Leboulleux, S., Gaston, V., Boule, N., Bouc, Y.L., and Gicquel, C. (2001). Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis. *Eur. J. Endocrinol.* *144*, 163–168.
- Lebrun, J.-J. (2012). The Dual Role of TGF in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis.
- Lee, C.I., Goodwin, A., and Wilcken, N. (2017). Fulvestrant for hormone-sensitive metastatic breast cancer. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* *121*, 2750–2767.
- LeRoith, D., and Roberts, C.T. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* *195*, 127–137.
- Leung, E.Y., Askarian-Amiri, M.E., Sarkar, D., Ferraro-Peyret, C., Joseph, W.R., Finlay, G.J., and Baguley, B.C. (2017). Endocrine Therapy of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells: Early Differential Effects on Stem Cell Markers. *Front. Oncol.* *7*.
- Leyh, B., Dittmer, A., Lange, T., Martens, J.W.M., Dittmer, J., Leyh, B., Dittmer, A., Lange, T., Martens, J.W.M., and 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, H., Fan, X., and Houghton, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell. Biochem.* *101*, 805–815.
- Li, T., Li, T., Zhang, C., Zhang, C., Ding, Y., Ding, Y., Zhai, W., Zhai, W., Liu, K., Liu, K., et al. (2015). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and migration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of the ERK pathway. *Oncol. Rep.* *34*, 1469–1477.
- Li, Z., Levine, K.M., Bahreini, A., Wang, P., Chu, D., Park, B.H., Oesterreich, S., and Lee, A.V. (2018). Upregulation of IRS1 Enhances IGF1 Response in Y537S and D538G ESR1 Mutant Breast Cancer Cells. *Endocrinology* *159*, 285–296.
- Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.-F., and Lian, Q. (2014). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant.* *23*, 1045–1059.
- Liu, Q., XU, Z., MAO, S., CHEN, W., ZENG, R., ZHOU, S., and LIU, J. (2015). Effect of hypoxia on hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , insulin-like growth factor I and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Oncol. Lett.* *9*, 1142–1148.
- Liu, S., Ginestier, C., Ou, S.J., Clouthier, S.G., Patel, S.H., Monville, F., Korkaya, H., Heath, A., Dutcher, J., Kleer, C.G., et al. (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* *71*, 614–624.

- Longobardi, L., Granero-Moltó, F., O'Rear, L., Myers, T.J., Li, T., Kregor, P.J., and Spagnoli, A. (2009). Subcellular localization of IRS-1 in IGF-I-mediated chondrogenic proliferation, differentiation and hypertrophy of bone marrow mesenchymal stem cells. *Growth Factors* 27, 309–320.
- Lorusso, G., and Rüegg, C. (2008). The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem. Cell Biol.* 130, 1091–1103.
- Lovitt, C.J., Shelper, T.B., and Avery, V.M. (2014). Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. *Biology* 3, 345–367.
- Lu, Y., Liu, S., Zhang, S., Cai, G., Jiang, H., Su, H., Li, X., Hong, Q., Zhang, X., and Chen, X. (2011). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Promotes NIH3T3 Fibroblast Proliferation by Activating p-Akt and Cell Cycle Progression. *Mol. Cells* 31, 225–230.
- Luo, H., Yang, G., Yu, T., Luo, S., Wu, C., Sun, Y., Liu, M., and Tu, G. (2014a). GPER-mediated proliferation and estradiol production in breast cancer-associated fibroblasts. *Endocr. Relat. Cancer* 21, 355–369.
- Luo, H., Tu, G., Liu, Z., and Liu, M. (2015). Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett.* 361, 155–163.
- Luo, J., Li, C., Xu, T., Liu, W., Ba, X., Wang, X., and Zeng, X. (2014b). PI3K is involved in  $\beta$ 1 integrin clustering by PSGL-1 and promotes  $\beta$ 1 integrin-mediated Jurkat cell adhesion to fibronectin. *Mol. Cell. Biochem.* 385, 287–295.
- Luqmani, Y.A. (2005). Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Med. Princ. Pract.* 14, 35–48.
- Luther, G.A., Lamplot, J., Chen, X., Rames, R., Wagner, E.R., Liu, X., Parekh, A., Huang, E., Kim, S.H., Shen, J., et al. (2013). IGFBP5 Domains Exert Distinct Inhibitory Effects on the Tumorigenicity and Metastasis of Human Osteosarcoma. *Cancer Lett.* 336, 222–230.
- Mallepell, S., Krust, A., Chambon, P., and Brisken, C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor  $\alpha$  is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2196–2201.
- Mao, Y., Keller, E.T., Garfield, D.H., Shen, K., and Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 303–315.
- Margadant, C., Monsuur, H.N., Norman, J.C., and Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 607–614.
- Marsh, T., Pietras, K., and McAllister, S.S. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 1070–1078.
- Martens, J.W.M., Sieuwerts, A.M., Vries, J.B., Bosma, P.T., Swiggers, S.J.J., Klijn, J.G.M., and Foekens, J.A. (2003). Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression. *Thromb. Haemost.* 89, 393–404.
- Martin, J.L., and Baxter, R.C. (2007). Expression of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 by MCF-7 Breast Cancer Cells Is Regulated through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Endocrinology* 148, 2532–2541.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Goldberg, A.F., Lin, Z., Ko, Y.-H., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R.G., Howell, A., Sotgia, F., et al. (2011). 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 Biol. Ther.* 12, 924–938.
- Masoud, G.N., and Li, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 378–389.
- Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630.
- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G.N., and Ueno, N.T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 136, 331–345.
- McAnulty, R.J. (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 666–671.
- McDonald, P.C., and Dedhar, S. (2014). Carbonic Anhydrase IX (CAIX) as a Mediator of Hypoxia-Induced Stress Response in Cancer Cells. In *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, S.C. Frost, and R. McKenna, eds. (Springer Netherlands), pp. 255–269.
- McGuire, W.L., Jackson, J.G., Figueroa, J.A., Shimasaki, S., Powell, D.R., and Yee, D. (1992). Regulation of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) expression by breast cancer cells: use of IGFBP-1 as an inhibitor of insulin-like growth factor action. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1336–1341.
- McLatchie, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G., and Foord, S.M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393, 333–339.
- Meads, M.B., Gatenby, R.A., and Dalton, W.S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* 9, 665–674.

- Mimeault, M., and Batra, S.K. (2013). Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 30–54.
- Mirkin, S., and Pickar, J.H. (2015). Selective estrogen receptor modulators (SERMs): a review of clinical data. *Maturitas* *80*, 52–57.
- Mkhikian, H., Grigorian, A., Li, C.F., Chen, H.-L., Newton, B., Zhou, R.W., Beeton, C., Torossian, S., Tatarian, G.G., Lee, S.-U., et al. (2011). Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* *2*, 334.
- Mo, Z., Liu, M., Yang, F., Luo, H., Li, Z., Tu, G., and Yang, G. (2013). GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer. *Breast Cancer Res.* *15*, R114.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., and D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* *123*, 1603–1611.
- Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 631–643.
- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., et al. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* *6*, 117–127.
- Nandy, A., Gangopadhyay, S., and Mukhopadhyay, A. (2014). Individualizing breast cancer treatment-The dawn of personalized medicine. *Exp. Cell Res.* *320*, 1–11.
- Network, T.C.G.A. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *490*, 61–70.
- Niero, E.L., Rocha-Sales, B., Lauand, C., Cortez, B.A., de Souza, M.M., Rezende-Teixeira, P., Urabayashi, M.S., Martens, A.A., Neves, J.H., and Machado-Santelli, G.M. (2014). The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *CR 33*, 37.
- Noman, M.Z., Buart, S., Pelt, J.V., Richon, C., Hasmim, M., Leleu, N., Suchorska, W.M., Jalil, A., Lecluse, Y., Hage, F.E., et al. (2009). The Cooperative Induction of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and STAT3 during Hypoxia Induced an Impairment of Tumor Susceptibility to CTL-Mediated Cell Lysis. *J. Immunol.* *182*, 3510–3521.
- Oerlecke, I., Bauer, E., Dittmer, A., Leyh, B., and Dittmer, J. (2013). Cyclic AMP Enhances TGF $\beta$  Responses of Breast Cancer Cells by Upregulating TGF $\beta$  Receptor I Expression. *PLoS ONE* *8*.
- Ohnishi, S., Sumiyoshi, H., Kitamura, S., and Nagaya, N. (2007). Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett.* *581*, 3961–3966.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335–348.
- Osborne, C.K., and Schiff, R. (2011). MECHANISMS OF ENDOCRINE RESISTANCE IN BREAST CANCER. *Annu. Rev. Med.* *62*, 233–247.
- Papa, V., Gliozzo, B., Clark, G.M., McGuire, W.L., Moore, D., Fujita-Yamaguchi, Y., Vigneri, R., Goldfine, I.D., and Pezzino, V. (1993). Insulin-like Growth Factor-I Receptors Are Overexpressed and Predict a Low Risk in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* *53*, 3736–3740.
- Park, J., and Schwarzbauer, J.E. (2014). Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* *33*, 1649–1657.
- Patocs, A., Zhang, L., Xu, Y., Weber, F., Caldes, T., Mutter, G.L., Platzer, P., and Eng, C. (2007). Breast-Cancer Stromal Cells with TP53 Mutations and Nodal Metastases. *N. Engl. J. Med.* *357*, 2543–2551.
- Pavlidis, S., Vera, I., Gandara, R., Sneddon, S., Pestell, R.G., Mercier, I., Martinez-Outschoorn, U.E., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., et al. (2012). Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 1264–1284.
- Pawłowski, K.M., Majewska, A., Szyszko, K., Dolka, I., Motyl, T., and Król, M. (2011). Gene expression pattern in canine mammary osteosarcoma. *Pol. J. Vet. Sci.* *14*, 11–20.
- Pawlus, M., Wang, L., and Hu, C.-J. (2014). STAT3 and HIF1 $\alpha$  cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene* *33*, 1670–1679.
- Pérez-Palma, E., Andrade, V., Caracci, M.O., Bustos, B.I., Villaman, C., Medina, M.A., Ávila, M.E., Ugarte, G.D., and De Ferrari, G.V. (2016). Early Transcriptional Changes Induced by Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Hippocampal Neurons. *Neural Plast.* *2016*.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.

- Pickup, M., Novitskiy, S., and Moses, H.L. (2013). The roles of TGF $\beta$  in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 788–799.
- Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 915–928.
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 159–169.
- Polyak, K., and Filho, O.M. (2012). SnapShot: Breast Cancer. *Cancer Cell* *22*, 562-562.e1.
- Polyak, K., Haviv, I., and Campbell, I.G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet.* *25*, 30–38.
- Pontiggia, O., Sampayo, R., Raffo, D., Motter, A., Xu, R., Bissell, M.J., Joffé, E.B. de K., and Simian, M. (2012). The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through  $\beta$ 1 integrin. *Breast Cancer Res. Treat.* *133*, 459–471.
- Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem. Pharmacol.* *64*, 755–763.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* *5*, 5–23.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* *12*, R68.
- Prat, A., Karginova, O., Parker, J.S., Fan, C., He, X., Bixby, L., Harrell, J.C., Roman, E., Adamo, B., Troester, M., et al. (2013). Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res. Treat.* *142*, 237–255.
- Pratt, M.A.C., Bishop, T.E., White, D., Yasvinski, G., Ménard, M., Niu, M.Y., and Clarke, R. (2003). Estrogen Withdrawal-Induced NF- $\kappa$ B Activity and Bcl-3 Expression in Breast Cancer Cells: Roles in Growth and Hormone Independence. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6887–6900.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* *19*, 1423–1437.
- Rafii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., Faussat, A.-M., Simon, A., Ducros, E., Mery, E., Couderc, B., Lis, R., Capdet, J., et al. (2008). Oncologic Trogocytosis of an Original Stromal Cells Induces Chemoresistance of Ovarian Tumours. *PLOS ONE* *3*, e3894.
- Rajaram, S., Baylink, D.J., and Mohan, S. (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev.* *18*, 801–831.
- Raz, Y., and Erez, N. (2013). An inflammatory vicious cycle: Fibroblasts and immune cell recruitment in cancer. *Exp. Cell Res.* *319*, 1596–1603.
- Rosenfeld, R.G. (2005). The IGF System: New Developments Relevant to Pediatric Practice. *9*, 1–10.
- Rosenfield, S.M., and Smith, G.H. (2013). Redirection of Human Cancer Cells upon the Interaction with the Regenerating Mouse Mammary Gland Microenvironment. *Cells* *2*, 43–56.
- Sabatier, R., Gonçalves, A., and Bertucci, F. (2014). Personalized medicine: present and future of breast cancer management. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *91*, 223–233.
- Salgado, R., Junius, S., Benoy, I., Van Dam, P., Vermeulen, P., Van Marck, E., Huget, P., and Dirix, L.Y. (2003). Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int. J. Cancer* *103*, 642–646.
- Samanta, D., Gilkes, D.M., Chaturvedi, P., Xiang, L., and Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E5429–E5438.
- Samuelov, L., and Sprecher, E. (2014). Peeling off the genetics of atopic dermatitis-like congenital disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 808–815.
- Sansone, P., Storci, G., Tavolari, S., Guarnieri, T., Giovannini, C., Taffurelli, M., Ceccarelli, C., Santini, D., Paterini, P., Marcu, K.B., et al. (2007). IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J. Clin. Invest.* *117*, 3988–4002.
- Sarkissyan, S., Sarkissyan, M., Wu, Y., Cardenas, J., Koeffler, H.P., and Vadgama, J.V. (2014). IGF-1 Regulates Cyr61 Induced Breast Cancer Cell Proliferation and Invasion. *PLoS ONE* *9*.
- Sasser, A.K., Sullivan, N.J., Studebaker, A.W., Hendey, L.F., Axel, A.E., and Hall, B.M. (2007). Interleukin-6 is a potent growth factor for ER- $\alpha$ -positive human breast cancer. *FASEB J.* *21*, 3763–3770.
- Schmidt, F., and Efferth, T. (2016). Tumor Heterogeneity, Single-Cell Sequencing, and Drug Resistance. *Pharmaceuticals* *9*.
- Schuster, M., Annemann, M., Plaza-Sirvent, C., and Schmitz, I. (2013). Atypical I $\kappa$ B proteins – nuclear modulators of NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Commun. Signal. CCS* *11*, 23.

- Scott, S.M., Brown, M., and Come, S.E. (2011). Emerging data on the efficacy and safety of fulvestrant, a unique antiestrogen therapy for advanced breast cancer. *Expert Opin. Drug Saf.* *10*, 819–826.
- Sedlakova, O., Svastova, E., Takacova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2014). Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front. Physiol.* *4*.
- Semenza, G.L. (2015). Regulation of the breast cancer stem cell phenotype by hypoxia-inducible factors. *Clin. Sci.* *129*, 1037–1045.
- Sheng, L., Mao, X., Yu, Q., and Yu, D. (2017). Effect of the PI3K/AKT signaling pathway on hypoxia-induced proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Ther. Med.* *13*, 55–62.
- Siddle, K. (2012). Molecular Basis of Signaling Specificity of Insulin and IGF Receptors: Neglected Corners and Recent Advances. *Front. Endocrinol.* *3*.
- Simões, B.M., O'Brien, C.S., Eyre, R., Silva, A., Yu, L., Sarmiento-Castro, A., Alferez, D.G., Spence, K., Santiago-Gómez, A., Chemi, F., et al. (2015). Anti-estrogen Resistance in Human Breast Tumors Is Driven by JAG1-NOTCH4-Dependent Cancer Stem Cell Activity. *Cell Rep.* *12*, 1968–1977.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., Rijn, M. van de, Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 10869–10874.
- Sotiropoulou, P.A., Christodoulou, M.S., Silvani, A., Herold-Mende, C., and Passarella, D. (2014). Chemical approaches to targeting drug resistance in cancer stem cells. *Drug Discov. Today* *19*, 1547–1562.
- Steinbrenner, H. (2013). Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* *65*, 1538–1547.
- Stoker, A., Hatier, C., and Bissell, M.J. (1990). The embryonic environment strongly attenuates v-src oncogenesis in mesenchymal and epithelial tissues, but not in endothelia. *J. Cell Biol.* *111*, 217–228.
- Studebaker, A.W., Storci, G., Werbeck, J.L., Sansone, P., Sasser, A.K., Tavolari, S., Huang, T., Chan, M.W.Y., Marini, F.C., Rosol, T.J., et al. (2008). Fibroblasts Isolated from Common Sites of Breast Cancer Metastasis Enhance Cancer Cell Growth Rates and Invasiveness in an Interleukin-6-Dependent Manner. *Cancer Res.* *68*, 9087–9095.
- Sudo, T., Iwaya, T., Nishida, N., Sawada, G., Takahashi, Y., Ishibashi, M., Shibata, K., Fujita, H., Shirouzu, K., Mori, M., et al. (2013). Expression of mesenchymal markers vimentin and fibronectin: the clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* *20 Suppl 3*, S324–335.
- Sun, Y. (2016). Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. *Cancer Lett.* *380*, 205–215.
- Sun, X., Mao, Y., Wang, J., Zu, L., Hao, M., Cheng, G., Qu, Q., Cui, D., Keller, E.T., Chen, X., et al. (2014). IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer. *Oncogene* *0*.
- Sureshbabu, A., Okajima, H., Yamanaka, D., Tonner, E., Shastri, S., Maycock, J., Szymanowska, M., Shand, J., Takahashi, S.-I., Beattie, J., et al. (2012). IGFBP5 induces cell adhesion, increases cell survival and inhibits cell migration in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cell Sci* *125*, 1693–1705.
- Surowiak, P., Murawa, D., Materna, V., Maciejczyk, A., Pudelko, M., Ciesla, S., Breborowicz, J., Murawa, P., Zabel, M., Dietel, M., et al. (2007). Occurrence of Stromal Myofibroblasts in the Invasive Ductal Breast Cancer Tissue is an Unfavourable Prognostic Factor. *Anticancer Res.* *27*, 2917–2924.
- Tafreshi, N.K., Lloyd, M.C., Proemsey, J.B., Bui, M.M., Kim, J., Gillies, R.J., and Morse, D.L. (2016). Evaluation of CAIX and CAXII Expression in Breast Cancer at Varied O<sub>2</sub> Levels: CAIX is the Superior Surrogate Imaging Biomarker of Tumor Hypoxia. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* *18*, 219–231.
- Takahashi, H., Tsuboi, H., Asashima, H., Hirota, T., Kondo, Y., Moriyama, M., Matsumoto, I., Nakamura, S., and Sumida, T. (2017). cDNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* *190*, 96–109.
- Tan, E.Y., Yan, M., Campo, L., Han, C., Takano, E., Turley, H., Candiloro, I., Pezzella, F., Gatter, K.C., Millar, E.K.A., et al. (2009). The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *Br. J. Cancer* *100*, 405–411.
- Tan, T.Y., Gordon, C.T., Miller, K.A., Amor, D.J., and Farlie, P.G. (2015). YPEL1 overexpression in early avian craniofacial mesenchyme causes mandibular dysmorphogenesis by up-regulating apoptosis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *244*, 1022–1030.
- Teratani-Ota, Y., Yamamizu, K., Piao, Y., Sharova, L., Amano, M., Yu, H., Schlessinger, D., Ko, M.S.H., and Sharov, A.A. (2016). Induction of specific neuron types by overexpression of single transcription factors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *52*, 961–973.

- Thomssen, C., Harbeck, N., Dittmer, J., Abraha-Spaeth, S.R., Papendick, N., Paradiso, A., Lisboa, B., Jaenicke, F., Schmitt, M., and Vetter, M. (2009). Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens. *J. Natl. Cancer Inst.* *101*, 1028–1029.
- Toriola, A.T., and Colditz, G.A. (2013). Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. *Breast Cancer Res. Treat.* *138*, 665–673.
- Trimboli, A.J., Cantemir-Stone, C.Z., Li, F., Wallace, J.A., Merchant, A., Creasap, N., Thompson, J.C., Caserta, E., Wang, H., Chong, J.-L., et al. (2009). Pten in Stromal Fibroblasts Suppresses Mammary Epithelial Tumors. *Nature* *461*, 1084–1091.
- Tripathi, G., Salih, D.A.M., Drozd, A.C., Cosgrove, R.A., Cobb, L.J., and Pell, J.M. (2009). IGF-independent effects of insulin-like growth factor binding protein-5 (Igfbp5) in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 2616–2626.
- Vaupel, P., Mayer, A., and Höckel, M. (2004). Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol.* *381*, 335–354.
- Vaupel, P., Höckel, M., and Mayer, A. (2007). Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 1221–1235.
- Walter, P.L., Steinbrenner, H., Barthel, A., and Klotz, L.-O. (2008). Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *365*, 316–321.
- Watkins, H.A., Chakravarthy, M., Abhayawardana, R.S., Gingell, J.J., Garelja, M., Pardamwar, M., McElhinney, J.M.W.R., Lathbridge, A., Constantine, A., Harris, P.W.R., et al. (2016). Receptor Activity-modifying Proteins 2 and 3 Generate Adrenomedullin Receptor Subtypes with Distinct Molecular Properties. *J. Biol. Chem.* *291*, 11657–11675.
- Weberpals, J.I., O'Brien, A.M., Niknejad, N., Garbuio, K.D., Clark-Knowles, K.V., and Dimitroulakos, J. (2011). The effect of the histone deacetylase inhibitor M344 on BRCA1 expression in breast and ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int.* *11*, 29.
- Weigelt, B., Lo, A.T., Park, C.C., Gray, J.W., and Bissell, M.J. (2010). HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res. Treat.* *122*, 35–43.
- Werner, H., and LeRoith, D. (2000). New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *57*, 932–942.
- Werner, H., Weinstein, D., and Bentov, I. (2008). Similarities and differences between insulin and IGF-I: Structures, receptors, and signalling pathways. *Arch. Physiol. Biochem.* *114*, 17–22.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *283*, E413–E422.
- Whitfield, M.L., George, L.K., Grant, G.D., and Perou, C.M. (2006). Common markers of proliferation. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 99–106.
- Wilcken, N., Zdenkowski, N., White, M., Snyder, R., Pittman, K., Mainwaring, P., Green, M., Francis, P., De Boer, R., Colosimo, M., et al. (2014). Systemic treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: a systematic review. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* *10 Suppl S4*, 1–14.
- Wu, G., Xing, M., Mambo, E., Huang, X., Liu, J., Guo, Z., Chatterjee, A., Goldenberg, D., Gollin, S.M., Sukumar, S., et al. (2005). Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* *7*, R609–R616.
- Wu, Y., Shang, X., Sarkissyan, M., Slamon, D., and Vadgama, J.V. (2010). FOXO1A is a target for HER2 Overexpressing Breast Tumors. *Cancer Res.* *70*, 5475–5485.
- Xu, C., Li, X., Guo, P., and Wang, J. (2017). Hypoxia-Induced Activation of JAK/STAT3 Signaling Pathway Promotes Trophoblast Cell Viability and Angiogenesis in Preeclampsia. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *23*, 4909–4917.
- Xu, X., Xu, Z., Xu, Y., and Cui, G. (2005). Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron. Artery Dis.* *16*, 245–255.
- Yamashita, M., Ogawa, T., Zhang, X., Hanamura, N., Kashikura, Y., Takamura, M., Yoneda, M., and Shiraishi, T. (2012). Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* *19*, 170–176.
- Yan, S., Jiao, X., Li, K., Li, W., and Zou, H. (2015). The impact of IGF-1R expression on the outcomes of patients with breast cancer: a meta-analysis. *OncoTargets Ther.* *8*, 279–287.
- Yeung, A., Bhargava, R.K., Ahn, R., Bahna, S., Kang, N.H., Lacoul, A., and Niles, L.P. (2012). HDAC inhibitor M344 suppresses MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Biomed. Pharmacother.* *66*, 232–236.
- Youssef, A., Aboalola, D., and Han, V.K.M. (2017). The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells Int.* *2017*.
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., and Millhorn, D.E. (2003). Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* *278*, 15911–15916.
- Zha, J., and Lackner, M.R. (2010). Targeting the Insulin-like Growth Factor Receptor-1R Pathway for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* *16*, 2512–2517.

Zhang, G.J., and Adachi, I. (1999). Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res.* 19, 1427–1432.

Zhang, C., ZHAI, W., XIE, Y., CHEN, Q., ZHU, W., and SUN, X. (2013). Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line in vitro. *Oncol. Lett.* 6, 1577–1582.

Zhang, J., Li, Y., Chen, J., Yang, M., Katakowski, M., Lu, M., and Chopp, M. (2004). Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Res.* 1030, 19–27.

Zhang, M., Gao, C.E., Li, W.H., Yang, Y., Chang, L., Dong, J., Ren, Y.X., and Chen, D.D. (2017). Microarray based analysis of gene regulation by mesenchymal stem cells in breast cancer. *Oncol. Lett.* 13, 2770–2776.

Zong, C.S., Chan, J., Levy, D.E., Horvath, C., Sadowski, H.B., and Wang, L.-H. (2000). Mechanism of STAT3 Activation by Insulin-like Growth Factor I Receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 15099–15105.

Zubor, P., Hatok, J., Moricova, P., Kajo, K., Kapustova, I., Mendelova, A., Racay, P., and Danko, J. (2015). Gene expression abnormalities in histologically normal breast epithelium from patients with luminal type of breast cancer. *Mol. Biol. Rep.* 42, 977–988.

MCF7 ATCC® HTB-22™.

## 7. Anhang

Tabelle 1. Auflistung der signifikant regulierten Gene (fold change  $\geq 2,0$ ) des *Microarrays* von MCF-7/MSK-Kulturen (50:1) vs. MCF-7-Zellen alleine

	Experiment #1	Experiment #2	Experiment #1	Experiment #2	
Gen	Log(Ratio)	Log(Ratio)	p-Wert	p-Wert	NCBI Reference Sequence
SEPP1	-0,73070	-0,71183	8,92E-03	1,16E-02	NM_001093726
CALCR	-0,56273	-0,53378	1,26E-01	1,07E-01	NM_001742
RAMP3	-0,50298	-0,51768	2,83E-04	0,00059	NM_005856
KLHL4	-0,43897	-0,66141	0,00013	1,96E-04	NM_057162
LOC100130930	-0,42342	-0,47978	0,00005	0,00001	AK126579
UGT2B15	-0,41752	-0,53876	5,41E-03	6,64E-05	NM_001076
TMEM26	-0,34609	-0,44857	7,93E-01	9,36E-03	NM_178505
MGAT1	-0,34469	-0,36531	0,00011	0,00013	NM_001114618
TGFBR3	-0,34437	-0,32902	4,71E-01	2,14E-06	NM_003243
KLK11	-0,34369	-0,48773	2,65E-07	3,20E-18	NM_144947
CDSN	-0,34088	-0,54351	1,26E-01	1,15E-15	NM_001264
FAM84A	-0,33461	-0,34014	1,41E-01	8,86E-02	NM_145175
SCGB2A1	-0,32005	-0,57203	2,14E-02	0,00083	NM_002407
KIF12	-0,31850	-0,35768	3,60E-01	4,49E-02	NM_138424
YPEL1	-0,31559	-0,70491	0,00204	0,00088	NM_013313
RAB30	-0,30936	-0,35806	7,17E-01	3,93E-02	NM_014488
NR4A2	-0,30926	-0,54699	0,00005	3,79E-05	NM_006186
FGF18	-0,30276	-0,34890	7,19E-05	1,24E-07	NM_003862
BHLHE40	0,30222	0,33835	9,24E-05	5,73E-07	NM_003670
S100A12	0,30223	0,38764	7,70E-05	0,00017	NM_005621
XLOC_006252	0,30313	0,56949	0,00032	6,07E-03	
LEPREL1	0,30322	0,30423	0,00017	0,00004	NM_018192
SH3PXD2A	0,30644	0,59361	0,00003	4,22E-07	NM_014631
LMCD1	0,30903	0,45846	0,00001	1,40E-04	NM_014583
CHAC1	0,30940	0,42269	4,79E-01	5,91E-04	NM_024111
COL5A2	0,30955	0,40855	2,97E-05	9,18E-12	NM_000393
EMP1	0,31142	0,35803	2,33E-05	3,18E-08	NM_001423
MXRA7	0,31378	0,39484	0,00006	1,01E-01	NM_001008528
TRIP6	0,31575	0,54534	7,71E-04	1,27E-23	NM_003302
HAS2	0,31665	0,42917	0,00011	2,08E-12	NM_005328
MYLK	0,32575	0,52348	1,38E-05	1,67E-21	NM_053025
EPAS1	0,32671	0,42246	2,94E-06	8,12E-13	NM_001430
IGFBP3	0,32992	0,62033	1,89E-06	1,54E-31	NM_001013398
SPOCD1	0,33013	0,70333	0,00099	6,08E-06	NM_144569
FAM129A	0,33092	0,30749	1,76E-01	8,80E-01	NM_052966
MAP1A	0,33152	0,57712	0,00002	6,37E-10	NM_002373
ENC1	0,33705	0,39924	6,90E-07	1,69E-09	NM_003633
AXL	0,34005	0,55827	5,06E-04	8,31E-12	NM_021913
DLX2	0,34279	0,34739	3,03E-07	1,55E-07	NM_004405
DSE	0,34303	0,38911	1,19E-01	6,24E-03	NM_013352
RASD1	0,34423	0,45633	2,46E-07	1,58E-15	NM_016084
ATP10A	0,34655	0,88183	0,00710	1,43E-19	NM_024490
ABCC3	0,34773	0,54422	1,47E-07	1,64E-23	NM_003786
C8orf31	0,35045	0,38959	0,00528	0,00176	NM_173687
GABRE	0,35606	0,61205	0,00060	4,63E-11	NM_004961
LOC100131355	0,36909	0,34462	0,00057	0,00260	AK124217
C5orf13	0,37247	0,46886	0,00695	0,00001	NM_001142483
BST1	0,37513	101,269	0,00558	1,53E-31	NM_004334
RECK	0,37549	0,49843	2,03E-01	1,13E-07	NM_021111
RUNX2	0,38443	0,44018	6,92E-01	0,00007	NM_004348
DLX5	0,38474	0,50247	1,14E-06	2,99E-12	NM_005221
TMEM45A	0,38649	0,62714	0,00016	1,49E-05	NM_018004
FAM83A	0,38729	0,38621	3,57E-02	1,61E-02	NM_207006
ADAMTS4	0,38924	0,54218	0,00040	6,68E-02	NM_005099
DDR2	0,39061	0,65185	0,00453	0,00006	NM_001014796
KIAA1462	0,39193	0,44427	3,12E-01	8,66E-02	NM_020848
EGR1	0,39420	0,52951	1,03E-10	4,44E-22	NM_001964
STRA6	0,39715	0,65422	6,32E-11	1,90E-35	NM_001142620
KLHDC7B	0,39738	0,32725	2,97E-03	2,37E-01	NM_138433
RAB34	0,39881	0,96801	0,00052	0	NM_001142625
C4B	0,40157	0,64289	3,01E-11	7,71E-28	NM_001002029
SSC5D	0,40241	0,87271	0,00011	1,80E-10	NM_001144950
LOC100130548	0,40425	0,83910	0,00440	1,03E-01	XR_110579
SNURF	0,40762	108,901	0,00892	1,06E-05	NM_022804
TRPV2	0,41036	0,60373	6,72E-12	6,26E-25	NM_016113

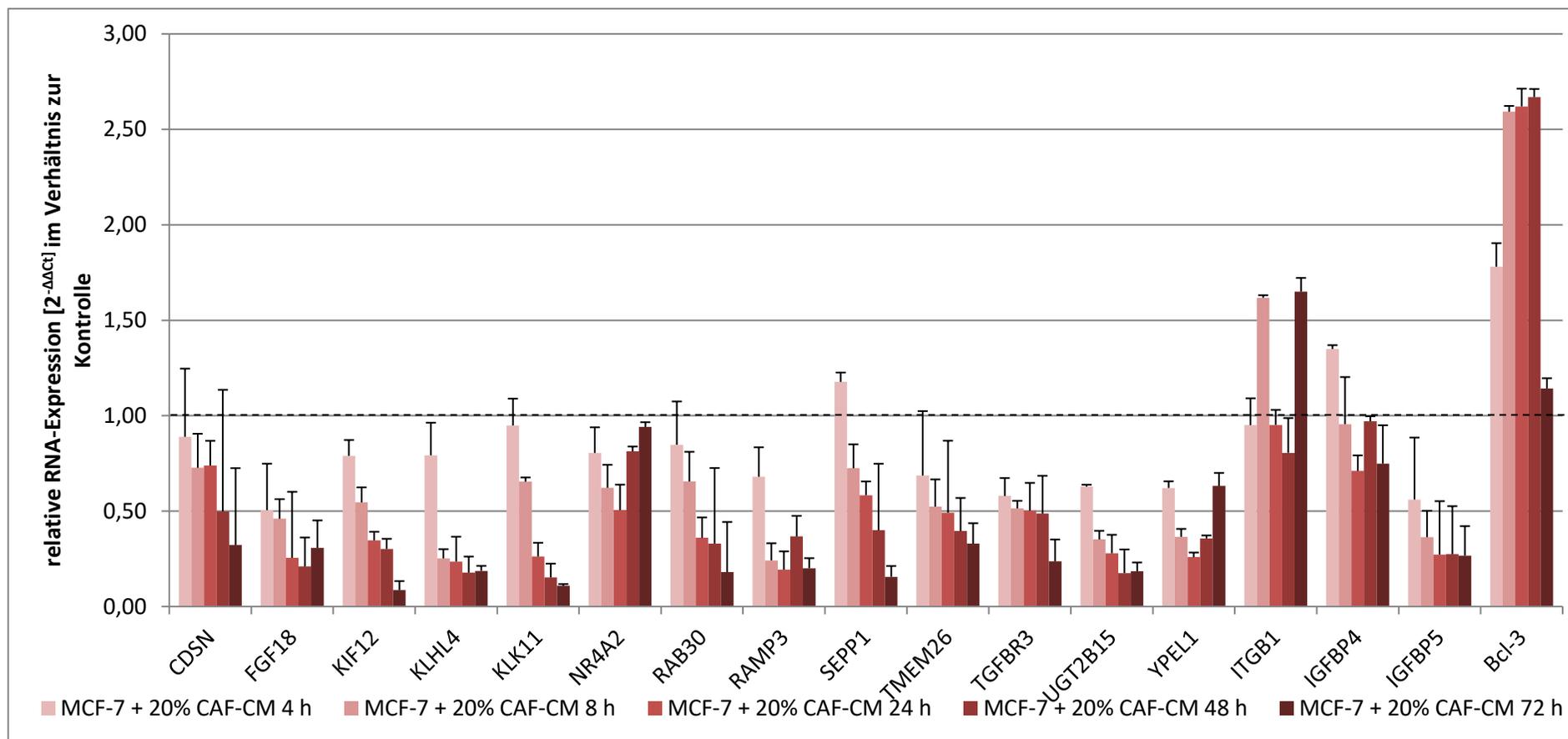
HEG1	0,41811	112,653	0,00003	2,24E-13	NM_020733
FBLN5	0,41907	0,84253	6,01E-02	8,38E-07	NM_006329
COX1	0,42427	-0,38072	5,88E-13	9,31E-10	AK074742
TGM2	0,42556	0,63663	4,67E-13	2,15E-33	NM_198951
LIMS2	0,43112	112,368	1,52E-03	5,12E-15	NM_001161404
CYR61	0,43165	0,43472	1,56E-13	8,94E-14	NM_001554
COL6A3	0,43308	0,85239	0,00080	3,48E-15	NM_004369
MCAM	0,43590	0,54532	7,22E-14	3,66E-08	NM_006500
KCNMA1	0,43984	0,41185	3,17E-03	0,00373	NM_002247
COL6A1	0,44217	0,62121	2,27E-14	1,22E-31	NM_001848
PGF	0,45369	0,68230	2,62E-15	7,71E-39	NM_002632
CDH13	0,45372	0,95208	0,00059	4,31E-17	NM_001257
NDN	0,45447	0,52042	4,14E-08	0,00808	NM_002487
KRT32	0,45911	0,43567	0,00007	0,00035	NM_002278
EFEMP2	0,46811	0,81680	1,62E-16	0	NM_016938
IFFO1	0,47039	0,75012	1,66E-01	2,12E-09	NM_001039670
RCN3	0,47463	0,69273	9,27E-02	1,69E-08	NM_020650
AKR1B10	0,47724	0,83625	2,03E-03	2,81E-21	NM_020299
XLOC_011592	0,47787	0,47805	0,00005	0,00034	
C3	0,47797	0,80260	0,00780	0,00012	NM_000064
	0,47910	0,85431	0,00884	0,00002	
MGC4294	0,48590	100,935	0,00511	9,90E-04	XR_109628
SEMA5A	0,49407	101,774	0,00001	8,04E-25	NM_003966
CCDC33	0,49675	0,67918	0,00594	0,00017	
SERPINF1	0,49681	0,69192	4,93E-19	3,00E-10	NM_002615
EGR3	0,49918	0,52226	0,00003	0,00005	NM_004430
TPM2	0,50411	0,80021	5,66E-06	9,41E-12	NM_213674
S100A9	0,50679	0,53680	6,07E-20	3,85E-17	NM_002965
SCG5	0,51054	0,63605	0,00249	1,01E-04	NM_003020
CSPG4	0,51588	0,77830	0,00799	2,03E-08	NM_001897
NEK9	0,52500	0,99641	2,75E-01	1,22E-07	NM_033116
ACOX2	0,52651	0,62332	8,60E-22	7,07E-32	NM_003500
LTBP2	0,53947	110,798	0,00366	0	NM_000428
ETV4	0,54471	0,51996	0,00010	0,00004	NM_001079675
AKR1B15	0,54677	0,94211	1,60E-02	2,00E-08	NM_001080538
SERPINE1	0,54715	0,78573	4,21E-15	9,98E-16	NM_000602
ANXA1	0,55224	0,79589	2,62E-24	0	NM_000700
WNT11	0,55225	0,39133	0,00038	0,00375	NM_004626
TNC	0,55277	0,70091	0,00001	2,57E-12	NM_002160
ADAMTSL1	0,55738	0,85126	0,00116	7,78E-04	NM_001040272
SPRY4	0,55786	0,59589	0,00544	4,97E-10	NM_030964
TWIST1	0,56172	0,39116	0,00634	0,00798	NM_000474
ZEB1	0,56766	0,69433	0,00003	2,80E-40	NM_001128128
VIM	0,56925	0,85107	4,89E-26	0	NM_003380
NT5E	0,57809	0,89590	1,40E-02	9,47E-17	NM_002526
SLIT3	0,57880	100,495	2,20E-02	9,17E-08	NM_003062
S100A8	0,59653	0,69726	5,94E-17	1,14E-12	NM_002964
TM4SF1	0,60069	0,55400	5,10E-03	0,00517	NM_014220
MMP14	0,60298	0,77247	1,58E-02	1,92E-01	NM_004995
LCN2	0,60313	0,66695	1,32E-19	5,70E-31	NM_005564
HHIPL1	0,61137	0,80913	0,00991	0,00011	NM_001127258
CALD1	0,61301	0,82842	1,85E-30	0	NM_033138
PTGDS	0,61430	0,73299	1,35E-03	1,60E-24	NM_000954
DKK3	0,61992	0,68962	5,78E-07	0,00426	NM_015881
LDHB	0,63191		6,44E-01		NM_001174097
CPNE5	0,63426	0,45893	0,00007	0,00196	NM_020939
HOXA9	0,64164	105,911	5,24E-08	0	NM_152739
WNT5A	0,64210	0,70917	2,60E-05	9,30E-04	NM_003392
	0,64526	0,32047	0,00188	0,00599	
	0,64615	0,46024	0,00886	0,00468	
EDIL3	0,65102	100,465	0,00763	1,28E-03	NM_005711
LOC100128252	0,65494	106,237	0,00685	4,46E-05	NR_036522
	0,65513	0,32024	7,20E-01	0,00494	
PTPRM	0,65672	0,86925	7,40E-08	2,05E-27	NM_002845
ACTA2	0,66026	0,96336	1,18E-25	0	NM_001613
SMO	0,66482	0,43483	4,93E-05	9,23E-02	NM_005631
ABI3BP	0,66642	104,214	0,00509	1,33E-04	NM_015429
XLOC_009582	0,66990	0,55913	0,00528	0,00004	
CDH11	0,67259	151,023	0,00048	0	NM_001797
COL3A1	0,67481	118,997	1,69E-07	0	NM_000090
CLMP	0,67641	111,832	2,59E-06	2,66E-13	NM_024769
C16orf5	0,67656	0,49244	9,20E-01	4,96E-04	NM_001199054
CTHRC1	0,67747	0,96327	8,79E-29	0	NM_138455
PLAC9	0,67884	0,90821	0,00398	1,70E-01	NM_001012973

KCNMA1	0,67972	0,74338	0,00246	2,82E-08	NM_002247
CFH	0,68672	0,97304	0,00249	7,49E-03	NM_001014975
	0,69020	-0,39606	9,82E-01	0,00624	
LOC729444	0,69171	0,42485	0,00258	0,00829	NR_038388
NID1	0,69886	0,90407	0,00241	1,90E-01	NM_002508
TAGLN	0,69974	0,78869	5,29E-10	1,47E-11	NM_001001522
PLXNC1	0,70520	0,67298	0,00026	0,00536	NM_005761
LOC728392	0,70733	106,516	0,00207	4,74E-05	NM_001162371
PPAPDC1A	0,70910	138,848	0,00178	9,71E-13	NM_001030059
WNT5B	0,70910	110,440	5,02E-34	0	NM_030775
	0,70978	0,96803	0,00194	1,05E-02	
SRPX2	0,71267	103,322	7,82E-11	5,18E-16	NM_014467
FBXL7	0,71412	0,98104	0,00169	2,10E-04	NM_012304
OPLAH	0,71428	0,57569	0,00145	2,20E-01	NM_017570
LOC151484	0,71546	0,68568	0,00165	0,00426	NR_038238
NPR3	0,74073	110,448	1,43E-03	4,23E-06	NM_001204375
CRYAB	0,74731	111,842	0	3,32E-16	NM_001885
	0,74857	0,87922	0,00063	5,28E-02	
LOC730755	0,75099	0,48356	0,00051	0,00151	NM_001165252
LOXL2	0,75756	116,945	0	0	NM_002318
NID2	0,75795	144,314	0,00006	1,40E-13	NM_007361
ADAMTS1	0,77066	0,86111	4,66E-09	3,81E-24	NM_006988
AKT3	0,77790	105,427	4,90E-14	2,80E-40	NM_005465
GOS2	0,78126	0,84251	0,00021	0,00003	NM_015714
SERPINE2	0,78380	113,597	1,01E-26	0	NM_006216
BCAT1	0,78635	130,842	1,88E-06	7,75E-35	NM_005504
HLA-B	0,79356	0,42817	0,00012	0,00003	AF298582
GNG11	0,79441	129,145	0	0	NM_004126
PRX	0,80422	0,72345	0,00134	0,00476	NM_181882
SPOCK1	0,80461	149,458	7,75E-16	0	NM_004598
	0,80875	0,70787	0,00030	0,00218	
MXRA8	0,81396	128,925	0,00007	1,33E-10	NM_032348
THBS2	0,81683	0,97762	0,00005	4,09E-03	NM_003247
PLAU	0,82939	113,705	3,99E-11	0	NM_002658
MFAP2	0,83048	142,464	4,74E-14	0	NM_017459
TIMP3	0,83162	112,510	0	0	NM_000362
MEG3	0,83354	128,793	3,03E-10	6,52E-16	NR_003531
SCRG1	0,83431	123,611	0,00003	2,14E-09	NM_007281
DCN	0,85745	109,749	0	3,30E-36	NM_001920
ODZ2	0,86505	0,67188	9,31E-01	3,07E-01	NM_001122679
SRGN	0,86571	135,942	2,22E-15	0	NM_002727
	0,87719	128,292	5,81E-01	1,83E-10	
PAMR1	0,87806	138,293	4,65E-01	1,35E-12	NM_015430
HSPB2	0,87871	136,720	3,55E-25	1,40E-40	NM_001541
ITGBL1	0,88235	129,500	0	0	NM_004791
TGFBI	0,88993	156,800	0	0	NM_000358
RPS4Y2	0,89299	116,818	2,55E-01	2,56E-09	NM_001039567
SLC14A1	0,90424	0,84447	1,10E-06	2,48E-09	NM_001146037
SIGMAR1	0,90647	0,96212	1,39E-30	8,48E-20	NM_005866
CNN3	0,90767	120,553	1,34E-01	1,27E-08	NM_001839
ANTXR2	0,91246	0,83041	5,49E-08	0	NM_058172
TCEAL8	0,91637	125,059	0	0	NM_153333
CD248	0,93063	0,81133	3,37E-29	1,34E-13	NM_020404
VEGFC	0,93612	141,911	7,32E-08	0	NM_005429
MIR100HG	0,94614	126,244	1,85E-02	4,85E-10	NR_024430
TAGLN	0,95026	113,830	0	0	NM_001001522
	0,95081	132,265	3,14E-12	4,52E-16	
TCF4	0,95641	126,365	8,18E-17	1,05E-14	NM_003199
TNFRSF10D	0,96021	149,460	0	0	NM_003840
	0,96353	149,606	1,14E-12	6,10E-17	
KRTAP1-5	0,98313	0,82510	3,35E-03	0,00007	NM_031957
PDGFRB	100,274	133,654	4,36E-26	0	NM_002609
ISLR	100,582	125,901	6,60E-14	4,27E-16	NM_005545
	101,297	166,843	4,03E-04	2,82E-16	
PAPPA	102,169	122,977	3,08E-29	0	NM_002581
COL4A2	103,349	131,749	0	0	NM_001846
LAYN	103,544	121,333	1,78E-04	7,74E-09	NM_178834
PTX3	104,436	0,66607	0	7,30E-37	NM_002852
FN1	105,793	172,589	0	0	NM_054034
PDGFC	106,669	148,825	0	0	NM_016205
POSTN	107,155	175,441	2,38E-35	0	NM_006475
KRTAP1-1	107,597	109,172	1,33E-05	9,79E-06	NM_030967
LOX	111,092	179,009	7,82E-14	0	NM_002317
TMEM119	111,612	0,92896	1,13E-06	4,42E-11	NM_181724

C1S	112,982	122,915	3,13E-26	2,86E-04	NM_001734
MMP2	116,650	168,368	0	0	NM_004530
NRG1	117,641	170,847	5,08E-08	1,66E-16	AF176921
DAB2	118,616	153,874	0	0	NM_001343
RPS4Y1	119,299	135,260	1,96E-08	4,93E-13	NM_001008
CNN1	119,330	109,610	1,40E-40	2,64E-05	NM_001299
GREM2	120,480	104,684	8,24E-09	1,43E-04	NM_022469
COL1A1	121,734	149,305	0	0	NM_000088
GPX1	121,844	124,834	0	2,33E-38	NM_201397
MSN	122,265	163,012	0	0	NM_002444
MFAP5	122,835	196,679	7,88E-14	1,03E-17	NM_003480
FAP	124,082	174,734	0	0	NM_004460
DPYSL3	126,181	164,731	5,90E-06	0	NM_001387
MYL9	129,765	140,786	2,57E-12	2,29E-16	NM_181526
MFAP4	132,336	161,133	1,25E-11	8,86E-16	NM_002404
HAPLN1	133,358	187,398	0	0	NM_001884
FNDC1	133,598	0,80906	6,72E-12	2,05E-11	NM_032532
COL4A1	135,324	187,426	1,47E-18	0	NM_001845
GREM1	137,234	175,112	1,62E-12	8,36E-17	NM_001191323
CCDC80	140,065	181,144	6,40E-16	1,06E-17	NM_199511
ITGA11	142,549	184,381	0	7,27E-34	NM_001004439
COX7A1	143,375	158,451	0	1,82E-26	NM_001864
PRRX1	144,869	175,597	0	0	NM_006902
CDH2	145,022	143,538	0	1,43E-13	NM_001792
THY1	150,709	151,019	0	3,05E-34	NM_006288
KRT34	154,334	140,762	0	0	NM_021013
HAS1	156,923	184,755	1,90E-15	9,14E-18	NM_001523
THBS2	159,870	177,423	0	0	NM_003247
INHBA	160,884	196,785	4,49E-37	0	NM_002192
KRTAP1-5	163,324	120,549	4,91E-16	9,45E-09	NM_031957
GSTP1	169,482	203,066	0	0	NM_000852
UCHL1	169,682	236,313	0	0	NM_004181
PRKCDBP	171,312	185,956	1,24E-16	8,07E-18	NM_145040
NNMT	192,674	237,107	0	0	NM_006169
FSTL1	195,684	244,356	0	0	NM_007085
COL8A1	199,928	192,375	0	0	NM_001850
SPARC	202,841	223,707	0	8,00E-32	NM_003118
IGFBP7	239,209	240,234	0	0	NM_001553
COL1A2	252,083	236,758	0	0	NM_000089

Tabelle 2. Heatmap mit Standardabweichungen und p-Werten.

Inhibitor / Aktivator		Relative Expressionen von MCF-Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle, gemessen mit RT-qPCR nach 2 Tagen Inkubation.													
		CALCR	CDSN	FGF18	KIF12	KLHL4	KLK11	NR4A2	RAB30	RAMP3	SEPP1	TGFB3R	TMEM26	UGT2B15	YPEL1
2 µM M344	fold change	8,36	20,36	2,26	0,94	2,30	16,57	2,98	1,43	0,90	17,39	0,61	3,53	2,49	0,91
	Standardabw.	1,41	2,02	0,22	0,13	0,39	4,17	0,22	0,24	0,63	0,84	0,01	0,81	0,15	0,09
	p-Wert	2,00E-02	7,69E-05	8,88E-04	4,75E-01	5,69E-03	2,94E-03	1,78E-04	6,27E-02	8,25E-01	4,57E-06	1,10E-02	5,86E-03	3,52E-04	4,24E-01
10 µM U0126	fold change	0,94	1,31	0,46	0,71	1,38	1,08	1,07	1,10	0,93	1,37	0,79	1,51	1,40	3,37
	Standardabw.	0,37	0,10	0,06	0,10	0,45	0,24	0,12	0,10	0,26	0,23	0,13	0,04	0,22	0,64
	p-Wert	8,84E-01	1,20E-01	1,98E-03	4,17E-02	2,83E-01	7,32E-01	5,53E-01	2,45E-01	7,30E-01	2,24E-01	5,64E-02	3,88E-01	2,08E-01	4,63E-03
10 µM Ly364947	fold change	1,75	2,08	1,11	1,64	0,77	1,46	1,24	1,54	1,00	1,43	0,70	1,32	1,62	
	Standardabw.	0,06	3,23	0,20	0,10	0,09	0,92	0,74	1,03	0,75	0,06	0,13	0,22	0,19	0,86
	p-Wert	1,48E-01	1,09E-02	4,48E-01	3,14E-03	2,66E-01	7,56E-02	3,55E-01	2,34E-01	3,00E-01	9,94E-01	6,48E-03	5,34E-01	2,82E-01	3,07E-01
1 µM RKI	fold change	0,99	1,02	0,91	0,93	1,00	0,79	0,55	0,98	0,81	0,86	0,94	0,92	0,74	0,87
	Standardabw.	0,25	0,17	0,15	0,18	0,56	0,15	0,02	0,15	0,09	0,17	0,07	0,12	0,13	0,10
	p-Wert	9,85E-01	9,22E-01	4,36E-01	5,80E-01	1,00E+00	3,39E-01	7,67E-03	8,79E-01	2,27E-01	6,05E-01	3,11E-01	4,63E-01	3,46E-01	5,37E-01
0,2 µM Ki11502	fold change	1,43	1,35	0,88	0,80	0,89	0,79	0,87	1,25	0,90	0,84	1,04	0,99	0,82	1,19
	Standardabw.	0,69	0,08	0,02	0,12	0,13	0,16	0,25	0,60	0,15	0,19	0,05	0,08	0,04	0,12
	p-Wert	4,36E-01	8,93E-02	1,48E-01	9,97E-02	5,71E-01	3,40E-01	4,79E-01	5,20E-01	5,51E-01	5,60E-01	4,68E-01	3,81E-01	4,92E-01	4,02E-01
0,5 µM SRCi	fold change	1,59	1,46	0,87	0,68	1,12	0,93	0,86	1,09	1,16	1,18	1,04	1,19	1,00	1,23
	Standardabw.	0,55	0,34	0,10	0,05	0,51	0,12	0,15	0,13	0,37	0,68	0,24	0,08	0,46	0,11
	p-Wert	2,45E-01	1,36E-01	2,21E-01	9,83E-03	7,41E-01	7,97E-01	3,25E-01	3,91E-01	5,52E-01	7,16E-01	7,98E-01	3,42E-01	9,99E-01	3,20E-01
0,2 µM ERBBi	fold change	2,55	1,41	0,96	0,70	0,86	0,85	0,91	1,13	1,16	1,15	1,23	1,19	0,93	1,47
	Standardabw.	1,03	0,33	0,19	0,10	0,11	0,33	0,19	0,07	0,11	1,07	0,17	0,12	0,30	0,49
	p-Wert	8,13E-02	1,64E-01	7,94E-01	2,42E-02	4,88E-01	5,83E-01	5,38E-01	1,20E-01	3,10E-01	8,25E-01	9,20E-02	3,82E-01	8,31E-01	2,42E-01
0,2 µM PD173074	fold change	1,11	1,65	0,83	0,85	1,09	1,16	3,59	1,45	1,25	1,19	1,21	1,19	1,09	1,39
	Standardabw.	0,60	0,20	0,17	0,36	0,44	0,08	0,12	0,33	0,16	0,25	5,59	0,33	0,07	0,13
	p-Wert	8,21E-01	6,67E-01	7,44E-01	5,66E-01	6,25E-01	3,97E-01	5,81E-02	2,22E-01	2,11E-01	3,62E-02	4,67E-01	3,28E-01	2,59E-03	1,93E-01
0,1 µM Fulvestrant	fold change	1,04	2,29	0,96	0,58	1,88	0,27	3,86	0,91	0,11	3,72	0,35	0,71	1,74	3,95
	Standardabw.	0,53	0,06	0,14	0,06	0,17	0,07	1,06	0,16	0,07	0,03	0,01	0,05	0,39	0,09
	p-Wert	9,20E-01	2,60E-05	6,65E-01	7,13E-03	7,24E-03	5,37E-03	9,70E-03	4,20E-01	3,68E-05	4,20E-07	7,65E-04	2,03E-02	4,95E-02	2,01E-05
0,01 µM DHT	fold change	0,67	0,76	3,12	0,66	0,53	1,18	0,81	0,89	0,38	0,64	1,14	1,58	1,40	0,72
	Standardabw.	0,23	0,31	0,19	0,04	0,08	0,21	0,08	0,05	0,05	0,15	0,14	0,21	0,14	0,10
	p-Wert	1,47E-01	2,68E-01	5,34E-05	1,19E-02	3,49E-02	3,73E-01	1,29E-01	8,53E-02	5,22E-05	1,72E-02	2,50E-01	1,51E-02	7,46E-02	9,64E-02
0,01 µM Estrogen	fold change	0,91	0,93	1,38	0,71	0,67	1,51	0,81	0,65	0,95	0,71	1,15	0,82	1,47	0,58
	Standardabw.	0,48	0,12	0,16	0,05	0,18	0,07	0,10	0,13	0,17	0,21	0,20	0,08	0,30	0,03
	p-Wert	7,78E-01	4,50E-01	2,26E-02	2,32E-02	1,37E-01	1,89E-02	1,49E-01	1,70E-02	6,32E-01	9,18E-02	3,28E-01	1,04E-01	1,10E-01	2,18E-02
20 µM PQ401	fold change	0,89	1,27	0,43	0,24	0,62	0,43	1,74	1,16	0,21	1,73	0,29	0,94	0,72	3,26
	Standardabw.	0,41	0,09	0,16	0,05	0,09	0,23	0,61	0,25	0,08	0,74	0,11	0,21	0,30	0,50
	p-Wert	8,33E-01	2,71E-01	1,69E-02	3,79E-03	3,77E-02	2,37E-02	1,28E-01	4,07E-01	2,52E-04	2,49E-01	1,56E-03	6,49E-01	1,90E-01	2,74E-03
0,33 µM Shikonin	fold change	1,75	0,97	0,94	0,72	1,02	0,76	1,31	0,74	1,02	0,95	0,59	1,86	0,48	
	Standardabw.	0,58	0,17	0,18	0,53	0,17	0,05	0,15	0,15	0,14	0,04	0,24	0,19	0,06	0,18
	p-Wert	1,52E-01	8,41E-01	6,05E-01	4,14E-01	9,37E-01	1,21E-01	7,18E-02	2,11E-01	8,65E-01	7,37E-01	8,32E-02	6,12E-02	3,95E-03	4,28E-02
1 µM FAKi	fold change	2,09	1,41	2,47	0,17	0,19	0,36	0,74	0,71	1,00	1,17	1,08	0,69	0,90	0,16
	Standardabw.	1,46	0,25	0,18	0,04	0,11	0,04	0,15	0,19	0,43	0,33	0,23	0,10	0,26	0,06
	p-Wert	4,11E-01	5,80E-02	2,29E-04	6,64E-03	1,10E-01	9,44E-03	1,10E-01	3,10E-01	9,96E-01	6,21E-01	7,17E-01	1,03E-01	6,72E-01	4,79E-02
50 µM CoCl2	fold change	0,42	0,50	0,55	0,42	0,59	0,46	0,81	0,38	0,31	0,55	0,61	0,47	0,62	0,63
	Standardabw.	0,08	0,03	0,06	0,14	0,11	0,04	0,05	0,07	0,06	0,07	0,01	0,16	0,19	0,13
	p-Wert	2,37E-02	1,12E-03	8,58E-04	1,83E-02	3,07E-02	1,80E-03	1,27E-02	1,10E-02	1,47E-03	1,09E-02	2,55E-02	1,21E-02	3,51E-02	8,32E-02
1,7 µM Insulin	fold change	0,93	0,97	0,67	0,37	0,50	0,53	0,75	0,25	0,39	0,47	0,61	0,83	0,44	0,21
	Standardabw.	0,60	0,23	0,14	0,06	0,04	0,21	0,13	0,04	0,06	0,19	0,04	0,19	0,20	0,10
	p-Wert	8,72E-01	9,23E-02	7,49E-02	1,49E-02	1,07E-02	4,10E-02	1,47E-01	2,01E-03	1,47E-02	8,71E-03	3,35E-02	4,21E-01	2,00E-02	1,53E-02



**Abbildung 1. RT-qPCR-Analysen des Zeitverlaufs der Wirkung von 20% CAF-CM auf MCF-7-Zellen.**

Relative Expression in MCF-7 mit 20% konditioniertem Medium von 19TT Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF-CM) nach 4 h (■), 8 h (■), 24 h (■), 48 h (■) und 72 h (■) Kulturdauer, ermittelt mit RT-qPCR-Analysen. Alle Genexpressionen sind relative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Verhältnis zur Kontrolle (unbehandelte MCF-7-Zellen mit Bezugsgröße 1). Fehlerbalken visualisieren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (Zweistichproben-t-Test, im Vergleich zur Kontrolle). Bcl-3 = *B-cell lymphoma 3-encoded protein*, CAF-CM = konditioniertes Medium von Karzinom-assoziierten Fibroblasten, CDSN = *Corneodesmosin*, FGF18 = *fibroblast growth factor 18*, IGFBP4 = *insulin-like growth factor-binding protein 4*, IGFBP5 = *insulin-like growth factor-binding protein 5*, ITGB1 = *Integrin beta 1*, KIF12 = *kinesin family member 12*, KLHL4 = *kelch-like family member 4*, KLK11 = *kallikrein-related peptidase 11* (auch bekannt als Kallikrein 11), NR4A2 = *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*, RAB30 = *ras-related in brain 30*, RAMP3 = *receptor activity modifying protein 3*, SEPP1 = *Selenoprotein P Plasma 1*, TGFB3 = *transforming growth factor beta receptor 3*, TMEM26 = *transmembrane protein 26*, UGT2B15 = *UDP-glucuronosyltransferase 2B15*, YPEL1 = *yippee-like*

## 8. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name Benjamin Leyh  
 Adresse Im oberen Dorf 16, 99510 Eckolstädt  
 Geburtsdatum 20.07.1984  
 Geburtsort Schmalkalden  
 Familienstand ledig, keine Kinder

### Bildungsweg

01/2011 – vsl. 2018 **Promotion:** „Wirkmechanismen der Interaktion mesenchymaler Stammzellen und Karzinom-assoziierten Fibroblasten mit Brustkrebszellen“  
 10/2004 – 09/2009 **Diplomstudium Biochemie**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Note: 1,1  
 Diplomarbeit: „Einzelzellanalytik und Zellspeziierung der pilzlichen Modellorganismen *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 und *Clavariopsis aquatica* Stamm WD(A)-00-01“. Note: 1,0  
 1996 – 2003 **Allgemeine Hochschulreife**, „Werratal-Gymnasium“ Schwallungen

### Praktische Erfahrungen

11/2017 – **Medical Science Liaison Manager** bei Bayer für die Indikation Kardiologie/Hämostaseologie  
 07/2016 – 10/2017 **Pharmaberater** bei Berlin-Chemie in der Arbeitnehmerüberlassung (Ashfield Healthcare) für die Indikationen Diabetes, Gicht und Hypercholesterinämie  
 01/2014 – 06/2016 **Landesgraduierstipendiat** des Landes Sachsen-Anhalt im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie (MLU), Halle  
 08/2010 – 12/2013 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie (MLU), Halle  
 10/2010 – 11/2010 **Forschungsaufenthalt** am Synchrotron in **Paris und Grenoble**  
 01/2010 – 07/2010 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle

### Stipendien

01/2014 – 6/2016 **Landesgraduierstipendium** des Landes Sachsen-Anhalt

## 9. Publikationen

### 9.1. Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

**Isaure M.-P., Leyh B., Salomé M., Krauss G.-J., Schaumlöffel D., Dobritzsch D.** The aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* protects its hyphae tip cells from cadmium: A micro X-ray fluorescence and X-ray absorption near edge structure spectroscopy study. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* Volume 137, November 2017, Pages 85-92

**Nass N., Dittmer A., Hellwig V., Lange T., Beyer J.M., Leyh B., Ignatov A., Weißenborn C., Kirkegaard T., Lykkesfeldt A.E., Kalinski T. and Dittmer J.** Expression of transmembrane protein 26 (TMEM26) in breast cancer and its association with drug response. *Oncotarget* Juni 2016; 21;7(25) Pages 38408-38426

**Leyh B., Dittmer A., Lange T., Martens J.W.M. und Dittmer J.** Stromal cells promote anti-estrogen resistance of breast cancer cells through an IGFBP5/Bcl-3 axis. *Oncotarget* November 2015; 6(36): Pages 39307–39328

**Dittmer J. & Leyh B.** The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. *Seminars in Cancer Biology* April 2015, Volume 31, Pages 3–15

**Dittmer J. & Leyh B.** Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (Review). *International Journal of Oncology* Juni 2014; 44(6): Pages 1789-982014

**Oerlecke I., Bauer E., Dittmer A., Leyh B. und Dittmer J.** Cyclic AMP enhances TGF $\beta$  responses of breast cancer cells by upregulating TGF $\beta$  receptor 1 expression. *PLoS One* 2013; 8(1): e54261

**Dittmer A., Fuchs A., Oerlecke I., Leyh B., Kaiser S., Martens J., Lützkendorf J., Müller L., Dittmer J.** Mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts sensitize breast cancer cells in 3D cultures to kinase inhibitor. *International Journal of Oncology* September 2011; 39(3): Pages 689-96

**Dittmer J., Oerlecke I., Leyh, B.** Involvement of mesenchymal stem cells in breast cancer progression, in Breast Cancer-Focusing Tumor microenvironment, Stem cells and Metastasis, M. & E. Gunduz (edit.), *INTECH Open Access Publisher* (ISBN: 978-953-307-766-6) 2011, Rijeka (Croatia), Pages 247-272

## 9.2. Kongress- und Tagungsbeiträge

### 9.2.1. Vorträge

Der Einfluss mesenchymaler Stammzellen und Karzinom-assoziiierter Fibroblasten auf die Aktivität des PI3K/AKT-Weges und die Anti-Estrogenresistenz in Brustkrebszellen“, TraFo-Meeting der AGO, 21. - 22. Oktober 2015, Düsseldorf

“Stromal cells promote anti-estrogen resistance of breast cancer cells through an IGFBP5/Bcl-3 axis.” *Tenth EORTC Patho-Biology Group-Annual Meeting*, September 2015, Paris

„Tumor-Stroma-Interaktion und Brustkrebsprogression“, 35. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, 25 – 27 Juni, Leipzig

„Der Einfluss mesenchymaler Stammzellen und Karzinom-assoziiierter Fibroblasten auf die Aktivität des PI3K/AKT-Weges und die Anti-Östrogenresistenz in Brustkrebszellen.“ MGFG Meeting, Juni 2015, Halle (Saale)

“The impact of intratumoral heterogeneity on the interaction between breast cancer cells and stromal cells.” *Ninth EORTC Patho-Biology Group-Annual Meeting*, September 2014, München

„Die Bedeutung von Mikrovesikeln in der Tumor-Stroma-Interaktion beim Mammakarzinom.“ TRAFO Symposium 2013 der AGO, 02. - 04. Mai 2013, Bergisch Gladbach

„Mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts sensitize breast cancer cell cultures to kinase inhibitors.“ 7. Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research and 7<sup>th</sup> Fraunhofer Life Science Symposium, 29. - 30. November 2012, Leipzig

„Mesenchymale Stammzellen und Karzinom-assoziierte Fibroblasten sensibilisieren Brustkrebszellen in 3D-Kulturen gegenüber Kinaseinhibitoren.“ TRAFO Symposium 2012 der AGO, 17. - 19. Mai 2012, Bergisch Gladbach

„Mesenchymale Stammzellen und Karzinom-assoziierte Fibroblasten sensibilisieren Brustkrebszellen in 3D-Kulturen gegenüber Everolimus und RAF265.“ 6. Jahrestagung der mitteldeutschen Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, 4. April 2012, Halle (Saale)

„Modulation of breast cancer cell responses to kinase inhibitors by mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts.“ *Sixth EORTC Patho-Biology Group-Annual Meeting*, 08. - 10. September, 2011, Rotterdam

### 9.2.2. Poster

„Bcl-3 (B-cell leukemia/lymphoma 3) vermittelt die durch stromale Zellen induzierte Desensibilisierung von Brustkrebszellen gegenüber Fulvestrant.“ 10. Jahrestagung MGFG, 2015, Erfurt

„Einfluss und Wirkmechanismen mesenchymaler Stammzellen und Karzinom-assoziiierter Fibroblasten auf die Genexpression, Migration und Anti-Östrogen-Sensitivität von Mammakarzinomzellen.“ 8. Jahrestagung der MGFG, 2014, Dresden

„Die Bedeutung von Mikrovesikeln in der Tumor-Stroma-Interaktion beim Mammakarzinom.“ 6. Combating, 2013, Lübeck

„Die Bedeutung von Mikrovesikeln in der Tumor-Stroma-Interaktion beim Mammakarzinom.“ 5. Sachsenanhaltinischer Krebskongresses 2013, Halle (Saale)

„Die Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in der Brustkrebsprogression.“ 2. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der MLU, 2012, Halle (Saale)

„Rolle mesenchymaler Stammzellen in der Brustkrebsprogression.“ 1. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der MLU, 2011, Halle (Saale)

„Tracking cancer pathways in 3D cell cultures“ 14. Bilaterales Symposium „Molecular Medicine“, 2011, Halle (Saale)

## 10. Danksagung

Prof. Dr. Jürgen Dittmer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des spannenden Projektes, die exzellente Unterstützung und die stetige Förderung in allen Zeiten. Ich danke ihm besonders für die moralische und akademische Hilfe bei der Bewerbung und dem Erhalt des Landesgraduierten-Stipendiums. Des Weiteren möchte ich ihm dafür danken immer ansprechbar, hilfsbereit und geduldig gewesen zu sein.

Ich danke Prof. Dr. Ingo Heilmann für die Übernahme des Gutachtens, für das Interesse an dem Projekt, für die anregenden und produktiven Diskussionen sowie die gute und freundliche Zusammenarbeit.

Ganz herzlicher Dank geht an Angela für ihren unermüdlichen Einsatz, ihren Rat, ihre Hilfe und ihre Kompetenz. Ich danke ihr für das entscheidende Voranbringen des Projekts sowie für ihre seelische und moralische Unterstützung.

Bei Ilka und Katrin bedanke ich mich besonders für die Unterstützung im Labor und die angenehme Zusammenarbeit sowie die Unterstützung bei methodischen Problemen.

Ein großes Dankeschön gilt allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Gynäkologie.

Bei Dr. Thomas Greither bedanke ich mich für die angenehme Atmosphäre im Büro und die zahlreichen akademischen Ratschläge.

Dann bedanke ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des FG5/E01 für die gute Zeit und die Gruppenübergreifende Zusammenarbeit.

Dem Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Sachsen-Anhalt danke ich für die finanzielle Förderung (Landesgraduierten-Stipendium).

Zuletzt möchte ich mich bei herzlichst meiner Familie bedanken. Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung, den Rückhalt und die Möglichkeit überhaupt studiert haben zu können. Meiner lieben Kerstin danke ich für das stetige Vorantreiben des schriftlichen Teils und dafür einfach für mich da zu sein.

## 11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist und ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen und zulässigen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Textstellen, die von mir wörtlich oder inhaltlich aus anderen Werken entnommen wurden, sind eindeutig als Zitate gekennzeichnet. Die verwendeten Quellen sind im Literaturverzeichnis alphabetisch geordnet.

Die Hersteller von Materialien, die ich nicht selbst hergestellt habe bzw. herstellen konnte, sind an den entsprechenden Stellen eindeutig gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich mich niemals zuvor um einen Doktorgrad beworben habe. Diese Dissertation wurde weder in der vorliegenden noch einer anderen Fassung an einer anderen Hochschule oder Fakultät zur Promotion eingereicht.

*Eckolstädt, den 23.07.18*

Benjamin Leyh