



Technische Universität München

Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

**Das uPAR-System:
Identifizierung neuer uPAR-Interaktionspartner und ihre Relevanz beim
triple-negativen Brustkrebs**

Michaela Christina Huber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.rer.nat.habil. Siegfried Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Angelika Schnieke, Ph.D.
2. apl.Prof. Dr.rer.nat. Dr.rer.nat.habil. Jochen Graw
3. apl.Prof. Dr.rer.nat. Michaela Aubele

Die Dissertation wurde am 19.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.09.2016 angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

München, den 19.05.2016

Michaela Huber

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Doktorarbeit

Posterpräsentationen

- 05/2015 „The impact of the uPAR system and its interaction partners as potential therapeutic targets in TNBC“
IMPAKT 2015 Breast Cancer Conference, Brussels, Belgium
- 07/2014 „uPAR and its Interaction Partners: Potential New Therapy Targets in Triple Negative Breast Cancer“
23rd Biennial Congress of the European Association of Cancer Research (EACR-23), Munich, Germany

Veröffentlichungen

- 2016 **Huber M.C.**, N. Falkenberg, S.M. Hauck, M. Priller, H. Braselmann, A. Feuchtinger, A. Walch, M. Schmitt and M. Aubele (2016). Cyr61 and YB-1 are novel interacting partners of uPAR and elevate the malignancy of triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 7(28), 44062-44075
- 2016 **Huber M.C.**, R. Mall, H. Braselmann, A. Feuchtinger, S. Molatore, K. Lindner, A. Walch, E. Gross, M. Schmitt, N. Falkenberg and M. Aubele (2016). uPAR enhances malignant potential of triple-negative breast cancer by directly interacting with uPA and IGF1R. *BMC Cancer*, 16:615. doi:10.1186/s12885-016-2663-9

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung..... II
 Veröffentlichungen im Rahmen dieser Doktorarbeit..... III
 Inhaltsverzeichnis..... IV
 Abkürzungsverzeichnis..... VIII
 Tabellenverzeichnis..... X
 Abbildungsverzeichnis..... XI
 Zusammenfassung..... XIII
 Abstract XIV

1 Einleitung - 1 -
 1.1 Krebs - 1 -
 1.1.1 Epidemiologie von Brustkrebs..... - 1 -
 1.1.2 Klassifizierung von Brustkrebssubtypen..... - 2 -
 1.1.3 Therapiemöglichkeiten beim Brustkrebs - 3 -
 1.1.4 Triple-negativer Brustkrebs (TNBC)..... - 5 -
 1.2 Der uPAR - Signalweg - 6 -
 1.2.1 Der Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ (uPAR) - 9 -
 1.2.2 Der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA) - 10 -
 1.2.3 Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) - 11 -
 1.2.4 Vitronektin und weitere Interaktionspartner von uPAR - 12 -
 1.2.5 Gerichtete Therapieansätze im uPAR-System bei Tumoren - 12 -
 1.3 Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (IGF-1R) - Signalweg..... - 14 -
 1.4 RNA-Interferenz - 16 -
 1.4.1 Natürlicher miRNA-Mechanismus..... - 16 -
 1.4.2 Anwendung der RNAi in der Biotechnologie..... - 18 -
 1.5 Zielsetzung - 21 -

2 Material und Methoden - 22 -
 2.1 Material..... - 22 -
 2.1.1 Geräte..... - 22 -
 2.1.2 Verbrauchsmaterialien..... - 23 -
 2.1.3 Verwendete Reagenzien - 24 -
 2.1.4 Verwendete Kits - 26 -
 2.1.5 Eingesetzte Puffer - 27 -
 2.1.6 Verwendete Software - 28 -
 2.1.7 Die TNBC-Kohorte - 28 -

2.2 Zellkulturtechniken	- 29 -
2.2.1 Subkultur von Zellen.....	- 29 -
2.2.2 Kontaminationstests	- 31 -
2.3 Zellkultur Experimente.....	- 34 -
2.3.1 Proliferationstest (WST-1 Test)	- 34 -
2.3.2 Wundheilungs-Migrationstest.....	- 34 -
2.3.3 Boyden-Kammer-Migrationstest.....	- 35 -
2.3.4 Matrigel-Invasionstest.....	- 36 -
2.3.5 Apoptoseinduktionstest	- 36 -
2.4 Durch lentivirale Vektoren vermittelte RNA-Interferenz (RNAi)	- 37 -
2.5 Genexpressionsanalyse-Techniken	- 42 -
2.5.1 DNA-Extraktion.....	- 42 -
2.5.2 RNA-Extraktion	- 43 -
2.5.3 Reverse Transkription.....	- 43 -
2.5.4 Quantitative PCR (qPCR).....	- 44 -
2.6 Proteinbiochemische Techniken.....	- 46 -
2.6.1 Analyse von Proteinen aus Zellen und Zellkulturüberständen	- 46 -
2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	- 47 -
2.6.3 Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 48 -
2.6.4 Western Blot.....	- 50 -
2.7 Co-Immunpräzipitation	- 53 -
2.8 Isotope-Coded Protein Label (ICPL) und Massenspektrometrie.....	- 56 -
2.8.1 ICPL-Markierung und Gelelektrophorese.....	- 56 -
2.8.2 ICPL Quantifizierung und Netzwerkanalyse	- 58 -
2.9 Histologische Analysen	- 59 -
2.9.1 Herstellung von Zellblöcken	- 59 -
2.9.2 Entparaffinieren und Antigen-Demaskierung	- 60 -
2.9.3 Immunhistochemie	- 61 -
2.9.4 <i>In situ</i> PLA	- 62 -
2.10 Statistische Auswertungen.....	- 66 -
3 Ergebnisse.....	- 67 -
3.1 Kontaminationstests der verwendeten Brustkrebszelllinien.....	- 67 -
3.2 Expression von relevanten Signalproteinen in Brustkrebszelllinien	- 68 -

3.3	Evaluierung der Langzeiteffekte der Expressionsreduzierung von uPAR und uPA.....	- 72 -
3.3.1	Bestimmung der optimalen Puromycinkonzentration zur Selektion lentiviral infizierter Zellen	- 72 -
3.3.2	Etablierung einer stabilen uPAR-, uPA- sowie uPAR- und uPA-RNAi in MDA-MB-231-Zellen.....	- 73 -
3.3.3	Reduzierte Zellproliferation nach kombinierter uPA- und uPAR-RNAi ohne Apoptoseinduktion.....	- 75 -
3.3.4	Verminderte Migration der MDA-MB-231-Zellen nach kombinierter uPA- und uPAR-RNAi	- 76 -
3.3.5	Reduzierte Zellinvasion der MDA-MB-231-Zellen nach kombinierter uPA- und uPAR-RNAi	- 77 -
3.3.6	Immunhistochemische uPAR-Expressionsanalyse in relevanten Brustkrebszelllinien ...	- 78 -
3.3.7	Verminderung der Protein-Protein-Komplexe aus uPAR und uPA nach uPAR-RNAi	- 79 -
3.4	Evaluierung von uPAR und IGF-1R als potentielle Ziele einer Kombinationstherapie.....	- 81 -
3.4.1	Etablierung einer permanenten RNAi von IGF-1R mit uPAR oder uPA.....	- 81 -
3.4.2	Reduzierte <i>in vitro</i> -Proliferation der MDA-MB-231- und BT549- Zellen nach RNAi	- 85 -
3.4.3	Reduzierte <i>in vitro</i> -Migration der MDA-MB-231-Zellen nach uPAR- , IGF-1R- und kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi.....	- 89 -
3.4.4	Reduzierte <i>in vitro</i> -Invasion der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach RNAi.....	- 90 -
3.4.5	Immunhistochemische IGF-1R- und uPAR- Expressionsanalysen in MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R- und uPAR-RNAi	- 91 -
3.4.6	Verminderte Anzahl von Protein-Protein-Komplexen aus uPAR und IGF-1R nach RNAi in MDA-MB-231- und BT549-Zellen	- 96 -
3.5	Effekte der uPAR- und uPA-RNAi auf Komponenten des Gesamtproteoms der MDA-MB-231- und BT549-Zellen.....	- 98 -
3.5.1	Anti-apoptotisches Zellverhalten nach uPAR-RNAi in MDA-MB-231-, nach uPA-RNAi und uPAR-RNAi in BT549-Zellen.....	- 98 -
3.5.2	Induzierte Migrations- und Invasionsproteine nach uPAR-RNAi und uPA-RNAi in BT549-Zellen.....	- 101 -
3.6	Identifizierung neuer Interaktionspartner von uPAR.....	- 103 -
3.6.1	Optimierung der co-Immunpräzipitation mit uPAR und Identifizierung von uPA im co-IP Präzipitat	- 103 -
3.6.2	Identifizierung von IGF-1R im co-Immunpräzipitat von uPAR	- 106 -
3.6.3	Identifizierung neuer Interaktionspartner von uPAR mit Massenspektrometrie	- 106 -

3.6.4 Charakterisierung der neu identifizierten und direkten Interaktionspartner in Brustkrebszellen	- 108 -
3.6.4.1 Cyr61 - ein potentieller und neuer Interaktionspartner von uPAR.....	- 109 -
3.6.4.2 YB-1 - ein potentieller neuer Interaktionspartner von uPAR.....	- 111 -
3.6.4.3 Caprin-1 - ein potentieller neuer Interaktionspartner von uPAR.....	- 114 -
3.7 Therapeutische Relevanz der neuen uPAR-Interaktionspartner Cyr61 und YB-1 im TNBC..	- 117 -
3.7.1 Korrelation der Proteinexpression von Cyr61 mit den Komponenten des uPAS und mit dem histologischen Grad in TNBC.....	- 117 -
3.7.2 Korrelation der Proteinexpression von YB-1 mit dem histologischen Grad in TNBC....	- 119 -
4 Diskussion	- 121 -
4.1 uPAR und uPA - potentielle Therapiezielmoleküle im triple-negativen Brustkrebs	- 121 -
4.2 Therapeutische Relevanz einer simultanen und stabilen Herunterregulierung von uPAR und IGF-1R im TNBC.....	- 124 -
4.3 Erstmalige Identifizierung neuer direkter uPAR-Interaktionspartner im uPAS und deren Potential als Therapieziele in TNBC	- 126 -
4.3.1 Korrelation der neu identifizierten Cyr61-uPAR-Komplexe mit tumor-assoziierten Biomarkern und mit der Malignität beim TNBC.....	- 127 -
4.3.2 Korrelation der neu identifizierten YB-1-uPAR-Komplexe mit der Malignität beim TNBC	- 129 -
4.3.3 Caprin-1 – ein potentieller neuer Interaktionspartner im uPAR-System.....	- 130 -
4.4 Relevanz der Erkenntnisse dieser Doktorarbeit für eine zielgerichtete Therapie von TNBC-	131 -
Literaturverzeichnis.....	- 133 -
Danksagung	- 152 -
Appendix.....	- 153 -
Lebenslauf	- 163 -

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril	FASP	<i>filter-added sample preparation</i>
Ago	Argonaut Protein	FCS	Fötale Kälberserum
APS	Ammoniumsulfat	FFPE	formalin-fixiert, paraffin- eingebettet
AS	Aminosäure	FRET	Förster- Resonanzenergietransfer
ASCO	<i>American Society for Clinical Oncology</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
ATF	<i>Amino Terminal Fragment</i>	GFD	Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne
BCA	Bicinchoninid Säure	GFP	grün-fluoreszierendes Protein
bp	Basenpaare	GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
<i>BRCA1/2</i>	Breast Cancer 1 / 2 (Gen)	GPI	Glykosylphosphatidylinositol
BSA	Bovines Serumalbumin	HBV	Hepatitis B-Virus
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
cDNS	komplementäre DNS	HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
cMet	Hepatocyten Wachstumsfaktor- Rezeptor	HIV	Human immunodeficiency virus
CMV	Cytomegalievirus	HMW	<i>high-molecular weight</i>
co-IP	co-Immunpräzipitation	HMWK	HMW-Kininogen
Cy3	<i>Cyanine Dye 3</i>	HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Cyr61	<i>cystein-rich angiogenic inducer</i>	IAA	Iodacetamid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	ICPL	<i>isotope coded protein label</i>
DCIS	ductal carcinoma <i>in situ</i>	IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	IGF-1 / 2R	<i>Insulin-like growth factor receptor 1 / 2</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	IGFBP	IGF Bindepotein
DNS	Desoxyribonukleinsäure	IHC	Immunhistochemie
DTT	Dithiothreitol	IPA	<i>Ingenuity pathway analysis</i>
dNTPs	Desoxyribose- Nukleosidtriphosphate	IR	Insulin Rezeptor
ds	doppelsträngig	IRS	Insulin Rezeptor Substrat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	LCIS	lobular carcinoma <i>in situ</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix	LMW	<i>low-molecular weight</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	LRP-1	<i>LDL receptor related protein</i>
EGFR	Epithelialer Wachstumsfaktor- Rezeptor	LTR	<i>long-terminal repeat</i>
eIF	<i>eukariotic Initiation Factors</i>	Ly6	<i>lymphocyte antigen 6</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition	MAPK/MEK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
ER	Östrogen-Rezeptor		
FAM	Carboxy-Fluoresceinphosphoamid		

NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>	TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
miRNA	microRNA	TFA	Trifluoressigsäure
MMP	Matrixmetalloprotease	TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	TN	triple-negativ
mRNA	messenger RNA	TNBC	Triple-negativer Brustkrebs
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher	tPA	Plasminogenaktivator vom Gewebe-typ
NIH	<i>National Institute of Health</i>	TU	transduzierende Einheiten
NK	Negativ-Kontrolle	uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
OT	Objektträger	uPAR	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ-Rezeptor
p-	phospho-	uPAS	Urokinase Plasminogen-Aktivator-System
P/S	Penicillin/Streptomycin	UTR	<i>untranslated region</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	ÜN	Über Nacht
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor	VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase	YB-1	Y-box Bindeprotein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung		
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PLA	<i>proximity ligation assay</i>		
PR	Progesteron-Rezeptor		
pre-miRNA	<i>preliminary miRNA</i>		
PTEN	Phosphatase and tensin homolog		
qPCR	quantitative PCR		
RK	Reaktions-Kontrolle (Mock)		
RNAi	RNA Interferenz		
RNA/RNS	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium		
RT	Raumtemperatur		
RT	Reverse Transkription		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
Shc	Src homology 2 domain containing transforming protein		
shRNA	short hairpin RNA		
SIN	selbst-inaktivierend		
siRNA	small interfering RNA		
ss	Einzelstrang		
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3		
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer		

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Geräte	- 22 -
Tabelle 2: Verwendetes Material	- 23 -
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Chemikalien	- 24 -
Tabelle 4: Kits.....	- 26 -
Tabelle 5: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.....	- 27 -
Tabelle 6: Verwendete Software	- 28 -
Tabelle 7: Klinische Parameter der verwendeten TNBC-Kohorte (n=174).....	- 28 -
Tabelle 8: Proteinexpressionsintensitäten (0-3) der Tumore der TNBC-Kohorte (n=174).....	- 28 -
Tabelle 9: Verwendete Brustkrebszelllinien	- 29 -
Tabelle 10: Einstellungen am Luna-Zellzählergerät.....	- 31 -
Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Mixes	- 32 -
Tabelle 12: Ablauf der Mykoplasmentest-PCR.....	- 32 -
Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Mixes	- 33 -
Tabelle 14: Ablauf der SMRV-Test-PCR	- 33 -
Tabelle 15: Zur Transduktion eingesetzte lentivirale Vektoren	- 40 -
Tabelle 16: Zusammensetzung der Transduktionsmedien	- 41 -
Tabelle 17: Zusammensetzung des RT-Mixes	- 44 -
Tabelle 18: Programm zur Reversen Transkription.....	- 44 -
Tabelle 19: Zusammensetzung des qPCR-Mixes	- 45 -
Tabelle 20: Programm zur qPCR.....	- 46 -
Tabelle 21: qPCR Gene Expression Assays	- 46 -
Tabelle 22: Zusammensetzung des Lysepuffers.....	- 47 -
Tabelle 23: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	- 49 -
Tabelle 24: Im Western Blot eingesetzte Primärantikörper	- 52 -
Tabelle 25: Im Western Blot eingesetzte Sekundärantikörper	- 53 -
Tabelle 26: In der Immunhistochemie eingesetzte Primärantikörper	- 62 -
Tabelle 27: Für den PLA eingesetzte Primärantikörper.....	- 65 -
Tabelle 28: Mit IPA-Analyse identifizierte, am stärksten regulierte, zelluläre Netzwerke	- 99 -
Tabelle 29: Relevante Protokolle zur Etablierung der co-IP mit uPAR.....	- 104 -
Tabelle 30: Mit Massenspektrometrie identifizierte Proteine, die potentiell mit uPAR interagieren (Anova $p \leq 0,151$)	- 107 -
Tabelle 31: Mit Cyr61-Expression signifikant korrelierende Parameter	- 118 -
Tabelle 32: Mit YB-1 Expression signifikant korrelierende Parameter	- 120 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktion und Regulation von uPAR im Plasminogen-Aktivator System	- 8 -
Abbildung 2: Die Struktur von uPAR.....	- 9 -
Abbildung 3: Zentrale Komponenten des IGF-Systems.....	- 15 -
Abbildung 4: Essentielle Prozessierungsschritte von miRNA und siRNA.....	- 17 -
Abbildung 5: Durch lentivirale Transduktion vermittelte RNAi.....	- 20 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung der eingesetzten lentiviralen Vektoren	- 38 -
Abbildung 7: Formel zur Errechnung des einzusetzenden Volumens der Virussuspension	- 39 -
Abbildung 8: Zentrale Schritte der PLA-Methode	- 63 -
Abbildung 9: Mykoplasmen-Kontaminationstest in ausgewählten humanen Krebszelllinien.....	- 67 -
Abbildung 10: SMRV-Kontaminationstest in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien	- 68 -
Abbildung 11: Proteinexpression von Hormon- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien.....	- 69 -
Abbildung 12: Proteinexpression der Schlüsselmoleküle des uPAR-Systems in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien	- 70 -
Abbildung 13: Proteinexpression bzw. -phosphorylierung von tumorrelevanten Signalmarkern in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien.....	- 72 -
Abbildung 14: Optimale Puromycinkonzentration zur Selektion lentiviral transduzierter MDA-MB-231- bzw. BT549-Zellen	- 73 -
Abbildung 15: Protein- und mRNA-Expression nach uPAR- und uPA-RNA-Interferenz in MDA-MB-231-Zellen	- 74 -
Abbildung 16: Reduzierte Proliferation von MDA-MB-231-Zellen und kein Effekt auf Apoptoseinduktion nach uPAR-, uPA- und kombinierter uPAR- und uPA-RNAi.....	- 76 -
Abbildung 17: <i>In vitro</i> -Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-, uPA- und kombinierter uPAR- und uPA-RNAi.....	- 77 -
Abbildung 18: <i>In vitro</i> -Invasionsverhalten von MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-, uPA- und kombinierter uPAR- und uPA-RNAi.....	- 78 -
Abbildung 19: Expression von uPAR in MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-RNAi und in MCF7-Zellen	- 79 -
Abbildung 20: Verminderte Anzahl von Protein-Protein-Komplexen aus uPAR und uPA nach uPAR-RNAi in MDA-MB-231-Zellen.....	- 80 -
Abbildung 21: Fluoreszierende MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach Transduktion der Zellen mit lentiviralen Vektoren	- 82 -
Abbildung 22: Reduzierte Proteinexpression und mRNA-Level nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, und kombinierter IGF-1R- und uPAR- bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi in MDA-MB-231-Zellen	- 83 -
Abbildung 23: Reduzierte Proteinexpression und mRNA-Level nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, und kombinierter IGF-1R- und uPAR- bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi in BT549-Zellen	- 85 -
Abbildung 24: Reduzierte <i>in vitro</i> -Proliferation von MDA-MB-231-Zellen und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi.....	- 86 -
Abbildung 25: Keine PARP- Spaltung bzw. induzierte Apoptose in MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach uPAR-, IGF-1R-, uPA-, kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi bzw. uPA- und IGF-1R-RNAi	- 86 -

Abbildung 26: Expression von, für u.a. Zellproliferation, relevanten Proteinen in MDA-MB-231- und BT549-Zellen	- 87 -
Abbildung 27: Zunahme der p27-Expression und reduzierte Phosphorylierung von p42/44 MAPK in BT549-Zellen	- 88 -
Abbildung 28: Reduzierte <i>in vitro</i> -Migration der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi	- 89 -
Abbildung 29: Reduzierte <i>in vitro</i> -Migration der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi	- 90 -
Abbildung 30: Reduzierte <i>in vitro</i> -Invasion der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi	- 91 -
Abbildung 31: Reduzierte Expression von IGF-1R in MDA-MB-231-Zellen nach IGF-1R- und kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi	- 92 -
Abbildung 32: Reduzierte Expression von IGF-1R in BT549-Zellen nach IGF-1R- und kombinierter IGF-1R und uPAR-RNAi	- 93 -
Abbildung 33: Reduzierte Expression von uPAR in MDA-MB-231-Zellen nach uPAR- und kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi	- 94 -
Abbildung 34: Reduzierte Expression von uPAR in BT549-Zellen nach uPAR- und kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi	- 95 -
Abbildung 35: Reduzierte uPAR-IGF-1R Komplexanzahl infolge der uPAR-, IGF-1R- und kombinierter uPAR- und IGF1R-RNAi in MDA-MB-231- bzw. BT549-Zellen	- 97 -
Abbildung 36: Unterdrückung von Apoptoseinduktion in BT549- und MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-RNAi und uPA-RNAi	- 100 -
Abbildung 37: Induktion von Migration- und Invasion-involvierten Genen/Proteinen in BT549- Zellen nach uPAR-RNAi und uPA-RNAi	- 102 -
Abbildung 38: Erfolgreiche co-IP von uPAR mit uPA in den Präzipitaten verschiedener IP-Ansätze des Protokolls co-IP 3	- 105 -
Abbildung 39: IGF-1R interagiert direkt mit uPAR	- 106 -
Abbildung 40: Proteinexpression der neu identifizierten und potentiellen Interaktionspartner von uPAR - Cyr61, YB-1 und Caprin - in humanen Brustkrebszelllinien	- 108 -
Abbildung 41: Differentielle Expression von Cyr61 in humanen Brustkrebszelllinien	- 109 -
Abbildung 42: Reduzierte uPAR-Cyr61 Komplexanzahl infolge der uPAR-RNAi in MDA-MB-231- Zellen	- 110 -
Abbildung 43: Interaktion von Cyr61 in uPAR-co-IP aus MDA-MB-231-Zelllysaten	- 111 -
Abbildung 44: Starke Expression von YB-1 in humanen Brustkrebszelllinien	- 112 -
Abbildung 45: Reduzierte uPAR-YB1-Komplexanzahl infolge der uPAR-RNAi in MDA-MB-231-Zellen	- 113 -
Abbildung 46: Interaktion von YB-1 in uPAR-co-IP aus MDA-MB-231-Zelllysaten	- 114 -
Abbildung 47: Differentielle Expression von Caprin-1 in humanen Brustkrebszelllinien	- 115 -
Abbildung 48: Reduzierte uPAR-Caprin-1-Komplexanzahl infolge der uPAR-RNAi in MDA-MB-231- Zellen	- 116 -
Abbildung 49: Differentielle Expression von Cyr61 in TNBC-Tumoren	- 117 -
Abbildung 50: Differentielle Expression von YB-1 in TNBC-Tumoren	- 119 -

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die weltweit am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung bei Frauen. Etwa 16% dieser Tumore sind triple-negativ, da bei diesen die Rezeptoren für Östrogen, Progesteron und HER2 nicht bzw. nur schwach ausgeprägt sind. Vorangegangene Studien zeigten, dass in diesen Tumoren der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA) und dessen Rezeptor uPAR häufig stark exprimiert sind, was dieses System zu einem möglichen Therapieziel beim triple-negativen Brustkrebs (TNBC) werden lässt. Auch der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (IGF-1R) ist u.a. im Mammakarzinom häufig überexprimiert und deshalb ebenfalls ein vielversprechender Angriffspunkt für Therapie. In dieser Doktorarbeit wurde die Proteinexpression von uPAR, uPA und IGF-1R mit lentiviral vermittelter RNA-Interferenz (RNAi) stabil in den zwei TNBC-Modellzelllinien MDA-MB-231 und BT549 reduziert. Die Verminderung von uPAR und uPA hatte auch nach acht Wochen eine signifikant reduzierte Zellproliferation, -migration und -invasion zur Folge. Vor allem die kombinierte Herunterregulierung von uPAR und IGF-1R führte zu einer signifikant reduzierten Invasion bzw. Migration der Zellen im Vergleich zu den Einzel-RNAi-Ansätzen. Die Analyse des Gesamtproteoms mit der ICPL-Methode wies darauf hin, dass die Zellen infolge der uPAR- und v.a. der uPA-RNAi die reduzierte Migration bzw. Invasion zu kompensieren und Apoptoseinduktion zu unterdrücken versuchten. Des Weiteren konnte mit der hier für uPAR etablierten co-Immunpräzipitation (co-IP) IGF-1R in dem co-IP-Präzipitat mit Western Blot nachgewiesen werden. Diese Komplexbildung von uPAR und IGF-1R wurde mit dem *proximity ligation assay* (PLA) bestätigt. Außerdem wurden mit massenspektrometrischen Analysen des co-IP-Präzipitats Cyr61, YB-1 und Caprin-1 als mögliche neue Interaktionspartner von uPAR identifiziert. Mit dem PLA wurde die Komplexbildung von uPAR mit Cyr61 bzw. YB-1 oder Caprin-1 an Zellblock-Paraffinschnitten erstmalig demonstriert. Außerdem korrelierte die Expression von Cyr61 und YB-1 in TNBC-Tumoren signifikant mit relevanten Proteinen und dem histologischen Grad der Tumore. In dieser Doktorarbeit wurde erstmalig die Relevanz einer Langzeit-Herunterregulierung von Komponenten des uPAR-Systems und einer kombinierten Reduzierung von uPAR und IGF-1R analysiert. IGF-1R wurde als direkter Interaktionspartner von uPAR bestätigt. Darüber hinaus wurden drei neue mögliche Interaktionspartner von uPAR identifiziert und in einer TNBC-Kohorte bzgl. ihrer klinischen bzw. therapeutischen Relevanz analysiert.

Abstract

Breast cancer is the most common cancer leading to death among women world-wide. About 16% of these tumors are triple-negative as the receptors for estrogen, progesterone and HER2 are completely or almost undetectable. Former studies have shown that the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor uPAR are frequently overexpressed in these tumors. Thus, this system could be a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer (TNBC). Furthermore, the insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) is overexpressed in breast cancer and, because of that, it is a promising therapy target. In this doctoral thesis uPAR, uPA and IGF-1R were steadily depleted in the TNBC-model cell lines MDA-MB-231 and BT549 by using lentiviral-mediated RNA-interference (RNAi). Even after a period of eight weeks, the downregulation of uPAR and uPA caused a significantly reduced cellular proliferation, migration and invasion. Especially the combined RNAi of uPAR and IGF-1R led to a significantly reduced invasion and migration of the cells compared to the single- RNAi approaches. The analysis of the whole proteome by ICPL-method indicated the fact that the cells tried to compensate the reduced migration and invasion, following the uPAR- and especially the uPA-RNAi. Furthermore, with the for this context established co-Immunoprecipitation (co-IP) with uPAR, IGF-1R could be detected in the co-IP-precipitate by Western Blot. The complex formation of uPAR and IGF-1R was confirmed by proximity ligation assay (PLA). Moreover, based on mass spectrometry analyses of the co-IP-precipitate, Cyr61, YB-1 and Caprin-1 were identified as potential new interaction partners of uPAR. For the first time the complex formation of uPAR with Cyr61, YB-1 or Caprin-1 was demonstrated on cell block-paraffin sections with PLA. Furthermore, the protein expression of Cyr61 as well as YB-1 in the TNBC- cohort significantly correlated with relevant proteins and with the histological grade of these tumors.

In this doctoral thesis, the relevance of a long-term downregulation of components of the uPAR-system and of a combined downregulation of uPAR and IGF-1R were analysed for the first time. Furthermore, IGF-1R was confirmed as a direct interaction partner of uPAR. In addition three new potential interaction partners of uPAR were identified and analysed concerning their clinical and therapeutical relevance in a TNBC- cohort.

1 Einleitung

1.1 Krebs

Das *National Cancer Institute* der amerikanischen Behörde *National Institutes of Health* (NIH) definiert Krebs bzw. maligne Neoplasien allgemein als eine Krankheit, ausgelöst durch deregulierte Zellen, die sich unkontrolliert teilen und in umgebendes Gewebe einwandern können (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0015630/>, 01.04.2016). Bei einem Tumor handelt es sich um eine Neubildung von Körpergewebe, die als Neoplasie bezeichnet wird und in gutartige (benigne) bzw. bösartige (maligne) Formen differenziert werden kann (Wagener und Müller 2010). Im Gegensatz zu den benignen Tumoren durchbrechen maligne Tumore die umgebenden Gewebsbarrieren und können in umliegendes Gewebe und durch Metastasierung in entfernte Organe einwandern (Wagener und Müller 2010).

1.1.1 Epidemiologie von Brustkrebs

Das Mammakarzinom ist weltweit die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung bei Frauen (Ferlay *et al.* 2013). Weltweit wurden 2012 - das Jahr, aus dem die letzten umfassenden Statistiken vorliegen - ca. 1,7 Mio. neue Fälle diagnostiziert, was 25% aller diagnostizierten Krebsfälle bei Frauen ausmacht (Ferlay *et al.* 2013). Etwa 0,5 Mio. Frauen starben 2012 weltweit in Folge dieser Erkrankung. In Deutschland wurden im selben Jahr ca. 72.000 neue Fälle diagnostiziert und ca. 17.000 Frauen starben an Brustkrebs (Ferlay *et al.* 2013).

In den Jahren 1980 bis 2000 war in westlichen Ländern wie den USA, Kanada, Großbritannien und Frankreich ein Anstieg der Brustkrebsinzidenz um ca. 30% zu verzeichnen, der sicher dem vermehrten Screening (Shapiro *et al.* 1998), aber auch dem negativen Einfluss der gestiegenen hormonellen Behandlung von Frauen in der Menopause zuzuschreiben war (Chlebowski *et al.* 2009, Rossouw *et al.* 2002, American Cancer Society 2015). In den Folgejahren stagnierte diese Zunahme an Inzidenzen bzw. war zunehmend rückläufig, vermutlich auch aufgrund der selteneren post-menopausalen Therapien u.a. in den USA (Ravdin *et al.* 2007), Großbritannien (Parkin 2009) und Frankreich (Seradour *et al.* 2009, American Cancer Society 2015). Seit etwa 1990 ist u.a. in diesen Ländern auch ein Rückgang der Mortalität infolge von Brustkrebs zu verzeichnen (American Cancer Soc. 2015),

was sicherlich auch auf die verbesserten Therapiemöglichkeiten und die frühe Diagnose zurückzuführen ist (Berry *et al.* 2005). In vielen lateinamerikanischen, asiatischen oder afrikanischen Ländern ist ein solcher Rückgang von Inzidenz und Mortalität nicht zu beobachten, sondern eine Zunahme zu verzeichnen (American Cancer Society 2015). So werden für das Jahr 2025 ca. 2,2 Mio. neue Brustkrebsfälle weltweit, ca. 78.000 neue Fälle in Deutschland, sowie 0,7 Mio. Todesfälle weltweit und ca. 19.000 Todesfälle in Deutschland infolge dieser Erkrankung prognostiziert (Ferlay *et al.* 2013).

1.1.2 Klassifizierung von Brustkrebssubtypen

Beim Mammakarzinom ist das Epithelgewebe der Brust, v.a. die Milchgänge (duktal) bzw. Drüsenläppchen (lobulär) von der Neoplasie betroffen (Buchta *et al.* 2004). Hierbei werden *in situ* (lat.: am Ort, noch nicht die Basalmembran durchbrechende/invasive) und invasive (lat.: *invadere*, eindringen) Tumorformen unterschieden (American Cancer Society 2013). Erstere werden aufgrund ihres Gewebsursprungs in duktales *in situ* Karzinome (*ductal carcinoma in situ*, DCIS) und lobuläre *in situ* Karzinome (*lobular carcinoma in situ*, LCIS) unterteilt (Baltzer *et al.* 2000). DCIS Tumore sind mit ca. 83% der diagnostizierten *in situ*-Fälle häufiger als LCIS Tumore (ca. 12%) (American Cancer Society 2013). Die übrigen *in situ*-Brusttumore weisen Charakteristika von duktales und lobulären Karzinomen auf oder sind unbekanntes Ursprungs (American Cancer Society 2013). Die *in situ*-Tumore können sich zu invasiven Tumoren entwickeln (Allred 2010). Die meisten Mammakarzinome sind invasiv, d.h. sie haben die umgebenden Gewebebarrieren durchbrochen und sind in das benachbarte Gewebe eingewachsen (American Cancer Society 2013).

Zur Therapieplanung und um eine Prognose für die Patientin stellen zu können, werden die Tumore anhand der TNM-Klassifikation zum Zeitpunkt der Diagnose histopathologisch eingeteilt. Hierbei wird die Tumorgroße und der Ausbreitungsgrad in der Brust (T), der Befall von naheliegenden Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) definiert (Edge *et al.* 2010). Darüber hinaus werden Tumore nach ihrem Differenzierungsgrad unterschieden, der Auskunft darüber gibt, wie wenig differenziert die Tumorzellen bereits sind, d.h. wie stark sie sich von den Zellen des Ausgangsgewebes unterscheiden (Wagener and Müller 2010).

Neben den histopathologischen Kriterien gibt die Einteilung des Mammakarzinoms in molekulare Subtypen wesentliche Hinweise für die Entscheidung über die effektivste Therapie. Anhand von DNA-Mikroarray-Analysen wurden fünf Mammakarzinom-Subtypen (Luminal A, Luminal B, Basal-ähnlich, HER2-überexprimierend, normal Brust-ähnlich) unterschieden (Perou *et al.* 2000, Sorlie *et al.* 2001, Sorlie *et al.* 2003). Etwa 50% der Mammakarzinome werden dem Luminal A Subtyp zugeordnet (Carey *et al.* 2006, Morris *et al.* 2007) und sind durch eine starke Expression des Östrogen-Rezeptors (*estrogen receptor*, ER) und ER-regulierter Proteine charakterisiert (Sorlie *et al.* 2001). Außerdem ist dieser Subtyp durch ein langsames Wachstum und geringere Aggressivität gekennzeichnet (Breast Cancer Facts and Figures, 2013). Die Luminal B-Tumore stellen ca. 10% (Morris *et al.* 2007) bis ca. 20% (Carey *et al.* 2006) der Tumore; sie sind u.a. durch eine niedrigere ER- und ER-regulierte Proteinexpression charakterisiert (Sorlie *et al.* 2001) und zeigen teils eine starke HER2- oder Ki67-Expression (Cheang *et al.* 2009). Etwa 4-7% der Tumore sind negativ bzgl. der Expression von Hormon-Rezeptoren, jedoch positiv für die Expression von HER2 (Carey *et al.* 2006, Morris *et al.* 2007) und durch eine - im Vergleich zu anderen Subtypen - schlechtere Prognose gekennzeichnet (Cheang *et al.* 2009, Blows *et al.* 2010). Die vierte Gruppe der basal-ähnlichen Tumore (ca. 20% aller Brusttumore) (Carey *et al.* 2006, Morris *et al.* 2007) ist u.a. durch die Expression einer sogenannten „basal“-Gruppe von Proteinen (z.B. der epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epithelial growth factor receptor*, EGFR), Zytokeratine, Vimentin) und der nur schwach exprimierten therapeutischen Zielstrukturen ER, PR und HER2 charakterisiert (Perou and Borresen-Dale 2011). Die Brust-ähnlichen Tumore sind eine weniger klar definierte, heterogene Gruppe, die u.a. durch einen großen Anteil normaler Epithelzellen in Tumoren charakterisiert sind und weniger maligne Zellen enthalten (Perou and Borresen-Dale 2011).

1.1.3 Therapiemöglichkeiten beim Brustkrebs

Für die Behandlung von Patientinnen mit Mammakarzinom stehen verschiedene Behandlungsmethoden zur Verfügung. Hierzu zählt die operative Entfernung des Tumors, wobei entweder eine brusterhaltende Operation oder eine Mastektomie, d.h. die komplette Entfernung der Brust, durchgeführt wird (American Cancer Society 2013). Nach einer brusterhaltenden Therapie folgt meist eine lokale Therapie mit ionisierender Strahlung, die

die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens des Tumors um ca. 50% reduziert (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative *et al.* 2011).

Wenn die Zielstrukturen hierfür in den Tumoren vorhanden sind, werden Anti-Hormontherapien gegen ER bzw. PR und gerichtete Therapien (*targeted therapies*) gegen Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie HER1 oder HER2 angewandt. Die Anti-Hormon-Therapien richten sich gegen das tumorwachstum-induzierende Östrogen und zeigen deshalb in erster Linie bei ER-positiven Tumoren einen positiven Effekt für das Überleben der Frauen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, Meier *et al.* 1998). Das von ICI Pharmaceuticals entwickelte Tamoxifen konkurriert zum Beispiel mit Östrogen um die Bindung an Östrogen-Rezeptoren, die dadurch für das natürliche Körper-Östrogen blockiert sind (Jordan and Koerner 1975). Auch werden Analoga des Gonadotropin-Releasing Hormons (GnRH) (LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview group 2007) oder Aromatasehemmer (Campos 2004) eingesetzt. In ca. 10% der Tumore ist der HER2-Rezeptor stark überexprimiert (Carey *et al.* 2006). Diese Patientinnen profitieren von der Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Roche, Basel, CH) (Slamon *et al.* 2001), der extrazellulär an HER2 bindet und dadurch die Zellproliferation verringert (Hudziak *et al.* 1989). Zum anderen werden Tyrosinkinaseinhibitoren wie Lapatinib angewandt, die an die intrazelluläre Domäne der Rezeptortyrosinkinasen (z.B. HER2) binden und dadurch ebenfalls das Zellwachstum hemmen (Rusnak *et al.* 2001) und von dessen Einsatz v.a. Patientinnen mit fortgeschrittenen (u.a. gegen den Antikörper Trastuzumab resistenten) HER2-positiven Tumoren profitieren (Geyer *et al.* 2006).

Sind diese Zielstrukturen nicht vorhanden, werden systemische Therapien angewandt. Hier wird zwischen der neoadjuvanten (vor der Operation) und der adjuvanten (nach der Operation) Therapie unterschieden (Mauri *et al.* 2005). Je nach Tumorklassifikation werden verschiedene Kombinationen von Chemotherapeutika eingesetzt, wie Antimetabolite (5-Fluoruracil) oder Platinanaloga (Cisplatin) (DeGregorio and Wiebe 1999).

1.1.4 Triple-negativer Brustkrebs (TNBC)

Zum ersten Mal wurde die Bezeichnung „triple-negativ“ von Brenton *et al.* für diesen Brustkrebssubtyp verwendet, der durch die geringe oder nicht vorhandene Expression des ER, PR und HER2 charakterisiert ist (Brenton *et al.* 2005). Auch wenn einigen Autoren den triple-negativen und den basal-ähnlichen Phänotyp als quasi gleichbedeutend darstellen (Sotiriou and Pusztai 2009, Kreike *et al.* 2007), zeigte der Vergleich von immunhistochemischen und Microarray-Analysen Unterschiede zwischen den beiden Gruppierungen (Foulkes *et al.* 2010). Obwohl ein Großteil der TNBC-Fälle basal-ähnlich ist, sind einige auch dem *claudin-low* Subtyp zugeordnet (Herschkowitz *et al.* 2007). Dieser ist u.a. durch eine geringere Expression von Claudin 3, Claudin 4, Claudin 7 bzw. E-Cadherin charakterisiert (Perou and Borresen-Dale 2011). Dieser Subtyp unterscheidet sich von den basal-ähnlichen Tumoren auch u.a. durch die Expression von stammzell-ähnlichen Markerproteinen und solchen für die epitheliale-mesenchymale Transition (*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) (Sabatier *et al.* 2014). Die Prognose für die Patientinnen mit Tumoren dieses Typs ist ähnlich schlecht wie die der Patientinnen mit basal-ähnlichen Tumoren (Perou 2010).

Etwa 16% aller diagnostizierten Brustkrebsfälle sind triple-negativ (Blows *et al.* 2010). Häufig sind die Frauen zum Prognosezeitpunkt unter 40 Jahre alt und haben - unabhängig vom Tumorstatus - eine schlechtere Überlebensprognose im Vergleich zu anderen Brustkrebstypen (Bauer *et al.* 2007). Außerdem waren in der Studie Afroamerikanerinnen häufiger betroffen und hatten bei einer TNBC-Diagnose zum fortgeschrittenen Zeitpunkt die schlechteste Fünf-Jahres-Überlebensrate (Bauer *et al.* 2007). Ein Hauptgrund für diese schlechte Prognose ist das Fehlen von Zielstrukturen für Hormon- und HER2-gerichtete Therapien. Bis zu 20% der TNBC-Patientinnen hatte Deletionen in den Tumorsuppressorgenen *breast cancer 1* bzw. *2* (*BRCA1/2*) (Gonzalez-Angulo *et al.* 2011). Eine solche *loss-of-function*-Mutation führt zum Verlust der Funktionalität der kodierten Proteine BRCA1 bzw. BRCA2, die u.a. auch für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen notwendig sind (Venkitaraman 2002). Der Verlust der Funktionalität des Tumorsuppressors kann durch eine Mutation auftreten und das Risiko einer Tumorerkrankung erhöhen (Hall *et al.* 1990, Turner *et al.* 2004, Satagopan *et al.* 2001). In einer Studie von Greenup *et al.* hatten

ca. 30% der untersuchten TNBC-Patientinnen *BRCA1/2*-Mutationen und hierbei hauptsächlich *BRCA1*-Mutationen (Greenup *et al.* 2013). Etwa 57% der Patientinnen, die *BRCA1*-Mutationen hatten, und ca. 23% mit *BRCA2*-Mutationen erkrankten an TNBC-Tumoren (Atchley *et al.* 2008).

Die unter 1.1.3 beschriebenen Therapieansätze richten sich gegen Hormonrezeptor-positive bzw. HER2-positive Tumore, weshalb sie für die TNBC-Therapie nicht geeignet sind. Auch aufgrund der innerhalb der TNBC-Gruppe unterschiedlichen molekularen Subtypen (Du *et al.* 2015, Lehmann *et al.* 2011) ist bisher keine zielgerichtete Therapie speziell gegen diese Mammakarzinome verfügbar. Es gibt Ansätze, TNBC mit Kombinationen aus konventioneller Chemotherapie und gerichteten Therapien zu behandeln, die im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie von Vorteil zu sein scheinen (Clark *et al.* 2014). Wichtige Zielmoleküle sind u.a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epithelial growth factor receptor*, EGFR) und die Poly(*adenosine diphosphate-ribose*)-Polymerase (PARP). Hier wird der EGFR-Antikörper Cetuximab eingesetzt (Baselga *et al.* 2013), ebenso wie der PARP-Inhibitor Iniparib (O'Shaughnessy *et al.* 2011) und der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Cameron *et al.* 2013). Alle diese Therapieansätze reduzieren Zellwachstum, -überleben und Angiogenese der Tumore. Um wirkungsvoll gegen die aggressive Metastasierung der Tumore, einem Charakteristikum des TNBC, therapeutisch vorgehen zu können, ist die Identifizierung weiterer Zielmoleküle von großer Bedeutung.

1.2 Der uPAR - Signalweg

Ein solches mögliches Zielsystem für eine gerichtete Therapie im TNBC stellt das Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ (uPAR)-System dar. Die zentralen Komponenten dieses Systems sind u.a. der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA), dessen Rezeptor uPAR und der Inhibitor des Komplexes, der Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1 (*urokinase-type plasminogen activator inhibitor 1*, PAI-1) (Smith and Marshall 2010). Zunehmend wurde die Bedeutung dieses Systems als mögliches Therapieziel und als prognostischer Faktor deutlich, auch aufgrund seiner Expression in zahlreichen Tumorentitäten, wie Ösophaguskarzinom (Shiomi *et al.* 2000), Pankreaskarzinom (Harvey *et al.* 2003) und Mammakarzinom (Duffy *et al.* 1988). So

zeigten Patientinnen mit Brustkrebs-Primärtumoren, die eine starke uPA-Expression aufwiesen eine schlechtere Prognose für ein Tumor-freies Überleben im Vergleich zu uPA-schwach exprimierenden Tumoren (Duffy *et al.* 1988). Für das Mammakarzinom wurde 2007 von der Amerikanischen Gesellschaft für Klinische Onkologie (*American Society for Clinical Oncology, ASCO*), neben ER, PR (Hammond *et al.* 2010) und HER2 (Wolff *et al.* 2007), auch uPA und PAI-1 als prognostische Biomarker für die Entscheidung über das therapeutische Vorgehen beim nodal-negativen Brustkrebs empfohlen (Harris *et al.* 2007). Aufgrund der nicht vorhandenen Zielstrukturen - wie ER, PR und HER2 - sind im TNBC neue therapeutische Biomarker und Therapieansätze von großer Bedeutung (Blows *et al.* 2010). Umso interessanter scheint also die Tatsache, dass laut vorangegangener Studien die Proteinexpression von ER und PR häufig invers mit der Expression von uPAR, uPA und PAI-1 korreliert (Foekens *et al.* 2000). So zeigten Untersuchungen von Prof. Manfred Schmitt von der Frauenklinik der TU München, dass die zentralen Komponenten des uPAR-Systems beim TNBC stark überexprimiert, und deshalb als biologische Marker und Ziele für eine gerichtete Therapie äußerst interessant sind.

Das uPAR-System ist an einigen physiologischen Prozessen beteiligt, u.a. an Wundheilung, Fibrinolyse, Gewebeerneuerung (Blasi and Carmeliet 2002) und an der Proteolyse der Extrazellulären Matrix (*extra-cellular matrix, ECM*) auch in Tumorzellen, einer der Voraussetzungen für die Metastasierung von Tumoren (Smith and Marshall 2010). Die Abb. 1 zeigt die zentralen Komponenten und Zusammenhänge des uPAR-Systems in Tumoren. Der Rezeptor uPAR ist durch einen Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker extrazellulär an der Zytoplasmamembran lokalisiert (Ploug *et al.* 1991) und bindet das Zymogen pro-uPA und das aktive uPA (Vassalli *et al.* 1985). Als Folge dieser Bindung entsteht ein aktiver Komplex, der zur Spaltung von Plasminogen zu dem proteolytisch aktiven Plasmin führt (Ellis *et al.* 1991). Plasmin spaltet und aktiviert wiederum Matrix-Metalloproteasen (MMP) wie MMP9 oder MMP13 (Carmeliet *et al.* 1997), die durch Spaltung der Komponenten der ECM zu deren Umstrukturierung führen (Sternlicht and Werb 2001). Ein Nebeneffekt dieses Abbaus ist auch die Plasmin-induzierte Freisetzung von in der ECM gebundenen Wachstumsfaktoren wie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) (Houck *et al.* 1992). Inhibiert wird die uPA/uPAR-Aktivität von dem Inhibitor PAI-1, der

an den Komplex bindet (van Mourik *et al.* 1984). Ein weiterer Ligand von uPAR ist Vitronektin, ein Glykoprotein, das sowohl in der ECM als auch im Plasma nachweisbar ist (Schvartz *et al.* 1999). Vitronektin steuert die Verteilung von uPAR auf der Zelloberfläche, v.a. in fokalen Adhäsionen (Ciambrone and McKeown-Longo 1992), die aus vielen Integrinen bestehen (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka 1996). uPAR kann -aufgrund seiner GPI-Verankerung an der Zellmembran - selbst keine intrazellulären Signaltransduktionskaskaden auslösen. Deshalb ist es auf die Interaktion mit Transmembranproteinen, wie Integrinen (Simon *et al.* 2000) oder Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR (Liu *et al.* 2002) angewiesen, um u.a. Einfluss auf die Zellproliferation oder -migration zu nehmen.

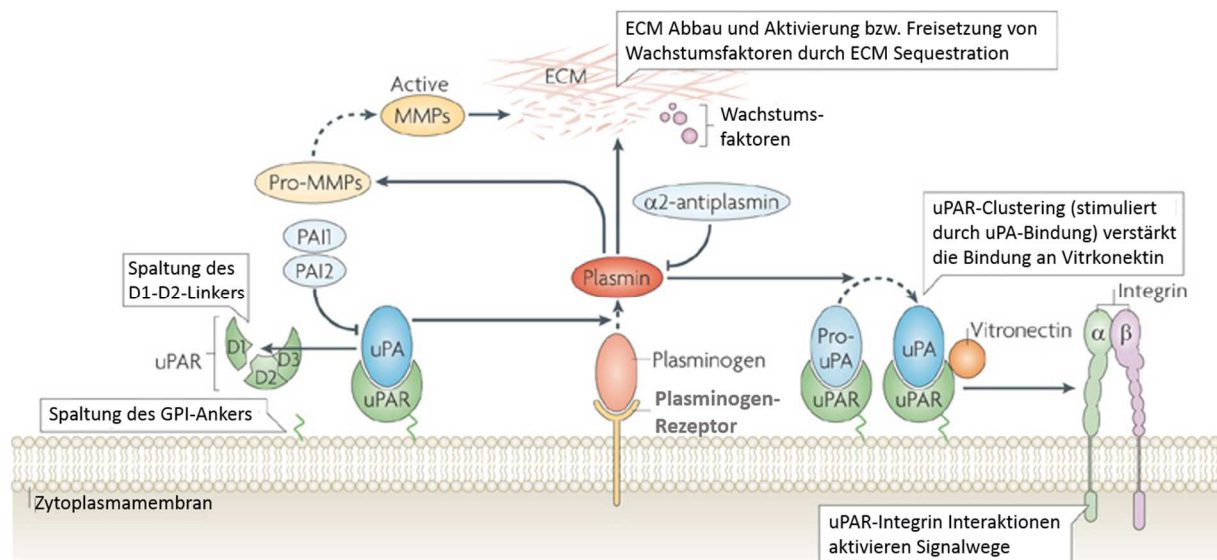


Abbildung 1: Funktion und Regulation von uPAR im Plasminogen-Aktivatoren System (adaptiert nach Smith and Marshall 2010)

Die für die Zellinvasion wichtigsten Liganden und Abläufe im uPAR-System: uPAR bindet uPA; uPA spaltet Plasminogen, wodurch aktives Plasmin entsteht. Plasmin aktiviert MMPs, die neben Plasmin zum Abbau der Komponenten der ECM und dadurch auch zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen. Die proteolytische Aktivität von uPA wird durch PAI-1 und die von Plasmin durch $\alpha 2$ -Antiplasmin gehemmt. Durch die Interaktion mit Integrinen werden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden ausgelöst.

1.2.1 Der Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ (uPAR)

Die zentrale Komponente des uPAR-Systems ist der über einen GPI-Anker extrazellulär an der Zytoplasmamembran assoziierte uPA-Rezeptor (Ploug *et al.* 1991). Dieses Glykoprotein gehört aufgrund seiner Gensequenzähnlichkeit zur Familie der *lymphocyte antigen 6* (Ly-6) Proteine (Wang *et al.* 1995, Ploug and Ellis 1994). Wie in Abbildung 2 gezeigt, besteht uPAR aus drei Domänen (D1, D2, D3) (Behrendt *et al.* 1991, Ploug *et al.* 1991), die über zwei Linkerregionen (*linker-1*, *linker-2*) miteinander verbunden sind (Eden *et al.* 2011). Die drei Domänen bilden eine taschenartige Struktur, in der uPA binden kann (Huai *et al.* 2006). Die Bindestelle für Vitronektin ist an der D1 und dem Linker-1 lokalisiert, wodurch uPA und Vitronektin gleichzeitig an uPAR binden können (Huai *et al.* 2008).

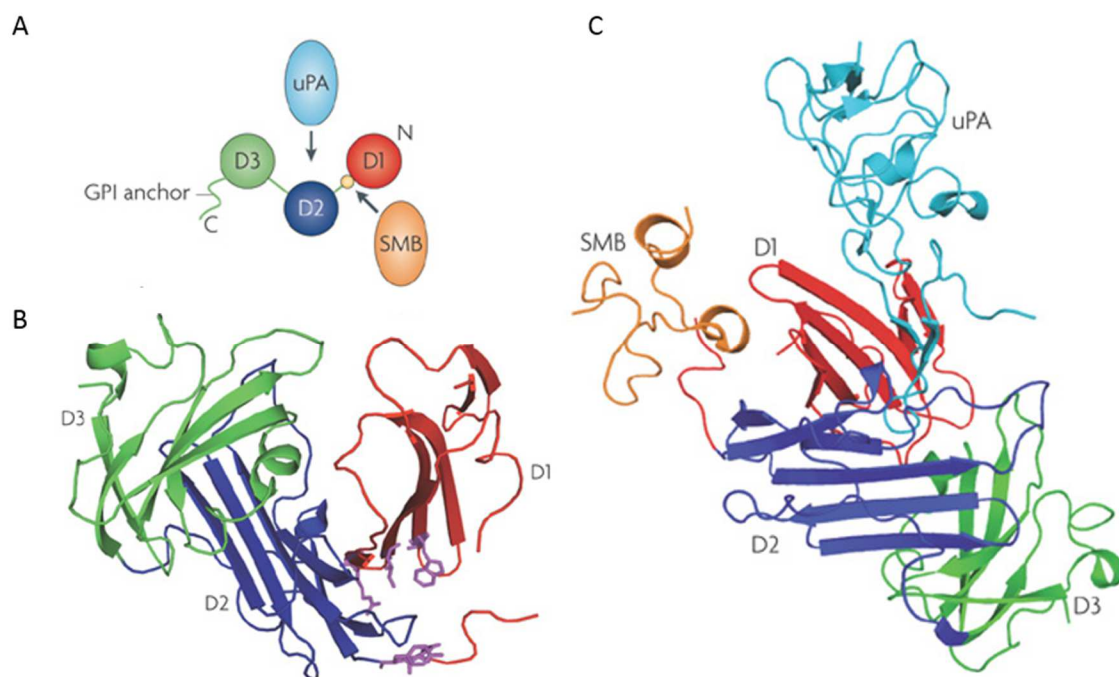


Abbildung 2: Die Struktur von uPAR (adaptiert nach Smith and Marshall 2010)

A: Die Struktur von uPAR, bestehend aus den drei Domänen D1, D2, D3, sowie der an D3 C-terminal assoziierte GPI-Anker. uPA bindet an uPAR, ebenso wie Vitronektin, dessen Somatomedin-Bindestelle dargestellt ist. **B:** Dreidimensionale Struktur der Domänen D1 (rot), (blau) und D3 (grün) der uPAR-Isoform ohne GPI-Anker. **C:** Dreidimensionale Darstellung von uPA (türkis) und die Somatomedin-Bindestelle des Vitronektin (orange), die in dieser Darstellung an suPAR binden.

Das für uPAR kodierende Gen - *plasminogen activator urokinase receptor (PLAUR)* - ist auf dem Chromosom 19q13 lokalisiert (Borglum *et al.* 1992) und besteht aus sieben Exons und 6 Introns (Wang *et al.* 1995). Es wird ein 335 Aminosäuren langes Polypeptid transkribiert, wobei die ersten 21 Aminosäuren das Signalpeptid sind (Roldan *et al.* 1990). Während der

posttranslationalen Modifikation im Endoplasmatischen Retikulum wird der GPI-Rest an den C-Terminus der Domäne 3 von uPAR angefügt, wodurch ein Protein mit ca. 283 Aminosäuren entsteht (Ulisse *et al.* 2009) mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa (Behrendt *et al.* 1990). uPAR enthält fünf mögliche N-Glykosylierungsstellen, an denen uPAR unterschiedlich stark glykosyliert wird, weshalb das Molekulargewicht dieses Proteins je nach Modifizierungsgrad zwischen 35 und 60 kDa schwankt (Ploug *et al.* 1998). Die Glykosylierung von uPAR scheint u.a. dessen Affinität für die Bindung von uPA zu verstärken (Moller *et al.* 1993). Laut dem *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) sind bisher vier Transkriptvarianten von uPAR beschrieben (Quelle:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5329>, Stand: 01.04.2016). Von diesen Isoformen sind die Varianten 1, 3 und 4 mit dem GPI-Anker an der Zytoplasmamembran verankert während die Isoform 2 sekretiert wird (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5329>, Stand: 01.04.2016). Außerdem existieren noch weitere Isoformen aufgrund von alternativem Splicing, wie u.a. in humanen Atemwegszellen beschrieben wurde (Stewart and Sayers 2009). In natürlichen physiologischen Prozessen wie Plazentaentwicklung oder Wundheilung ist die Expression von uPAR erhöht, ebenso während Entzündungsreaktionen (Smith and Marshall 2010). Von großer Bedeutung ist die Expression von uPAR in vielen soliden Tumoren (Dass *et al.* 2008).

1.2.2 Der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA)

Der wichtigste Ligand von uPAR ist ein Mitglied der Familie der Serinproteasen, uPA. Neben dem Plasminogen-Aktivator vom Gewebe-typ (*tissue-type plasminogen activator*, tPA) (Bachmann and Kruithof 1984), das v.a. an intravaskulärer Thrombolyse beteiligt ist, setzt uPA Plasminogen zu Plasmin um (Ellis *et al.* 1991) und ist dadurch an dem Umbau der ECM beteiligt (Schmitt *et al.* 1992). uPA wird von dem *PLAU*-Gen kodiert, das auf dem Chromosom 10q24 lokalisiert ist und aus 11 Exons und 10 Introns besteht (Riccio *et al.* 1985, Mengele *et al.* 2010). Es kodiert für eine 431 Aminosäuren (AS) lange Vorläufer-Form. Nach der Abspaltung des Signalpeptids (20 AS) wird diese als enzymatisch fast inaktives, einzelkettiges Zymogen, pro-uPA sekretiert, das aus 411 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 50-55 kDa hat (Mengele *et al.* 2010). Die posttranslationalen Modifikationen von uPA umfassen Phosphorylierung, O-Fucosylierung (Buko *et al.* 1991) und N-Glykosylierung (Mengele *et al.* 2010).

Das Glykoprotein uPA wird von Serinproteasen, wie Plasmin oder Trypsin und Cysteinproteasen gespalten, wodurch das hoch-molekulare uPA (*high-molecular weight uPA*, HMW-uPA) entsteht (Schmitt *et al.* 1992). Dieses aktive Enzym besteht aus der 158 Aminosäuren beinhaltenden A-Kette mit einem Molekulargewicht von 20 kDa und der aus 253 Aminosäuren zusammengesetzten B-Kette mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, die über Disulfidbrücken verbunden sind (Schmitt *et al.* 1992). Neben dieser Form wird, durch eine weitere proteolytische Spaltung durch Plasmin, die nieder-molekulare Form (*low-molecular weight uPA*, LMW-uPA) gebildet (Schmitt *et al.* 1992). Hierbei wird von der A-Kette das aminoterminal Fragment (*amino-terminal fragment*, ATF) abgetrennt, das aus 135 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 16 kDa hat. Das ATF enthält zwei Domänen, die Kringle- und die Wachstumsfaktor-ähnliche- (*growth factor-like domain*, GFD) Domäne (Schmitt *et al.* 1992). Letztere fungiert als Bindestelle für uPAR, weshalb nur pro-uPA, HMW-uPA und ATF an den Rezeptor binden können (Schmitt *et al.* 1992). Jedoch kann LMW-uPA auch Plasminogen in Plasmin umsetzen, weshalb es neben HMW-uPA auch als aktives uPA bezeichnet wird (Eden *et al.* 2011). uPA wird von vielen Zelltypen, wie Endothelzellen, Muskelzellen oder auch Fibroblasten sekretiert, aber auch von Tumorzellen, in denen die Expression teils stark erhöht ist (Mengele *et al.* 2010).

1.2.3 Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)

Die proteolytische Aktivität von uPA wird u.a. von dem Serinproteaseinhibitor PAI-1 reguliert, der unter normalen physiologischen Bedingungen auch eine entscheidende Rolle bzgl. der Regulation von Fibrinolyse bzw. Thrombolyse spielt (Mengele *et al.* 2010). Er gehört der Proteinfamilie der Serpine an, die u.a. auch PAI-2, Nexin-1 und den Protein-C Inhibitor umfasst und die uPA-Aktivität inhibieren (Ulisse *et al.* 2009).

PAI-1 wird von dem Gen *SERPINE1* kodiert, das auf dem Chromosom 7q21.3-q22 lokalisiert ist und aus 9 Exons besteht (Ginsburg *et al.* 1986, Mengele *et al.* 2010). Es wird eine einzelsträngige pro-Form des PAI-1 translatiert, die aus 402 Aminosäuren besteht (Mengele *et al.* 2010). Nach Abspaltung des Signalpeptids mit 23 Aminosäuren entsteht ein Protein mit einem Molekulargewicht von 45-50 kDa (Mengele *et al.* 2010). Dieses variiert aufgrund unterschiedlich starker *N*-Glykosylierung an den drei hierfür möglichen Aminosäuren (Mengele *et al.* 2010). Hierbei handelt es sich um die aktive S-Form, die die Zielproteinasen

(uPA oder tPA) bindet (Mengele *et al.* 2010, Eden *et al.* 2011). Diese Komplexbildung führt zu einer Inhibierung der uPA-Aktivität und zur Endozytose von uPAR durch die direkte Interaktion mit dem LDL-Rezeptor-verwandten Protein-1 (*LDL receptor related protein-1*, LRP-1) (Nykjaer *et al.* 1992). Durch eine spontane Konformationsänderung wird diese aktive Form in die latente inaktive R-Form umgewandelt (Eden *et al.* 2011). PAI-1 wird von vielen Zelltypen hergestellt, u.a. von Endothelzellen, Stromazellen, Hepathozyten und Tumorzellen (Mengele *et al.* 2010).

1.2.4 Vitronektin und weitere Interaktionspartner von uPAR

Ein weiterer direkter Interaktionspartner von uPAR ist Vitronektin, ein adhäsives Glykoprotein der ECM (Schvartz *et al.* 1999), das die Verteilung von uPAR auf der Zelloberfläche mitreguliert (Ciambrone and McKeown-Longo 1992). Darüberhinaus gibt es noch einige direkte Interaktionspartner von uPAR (Eden *et al.* 2011). Zu diesen zählen der Faktor XII, der aufgrund seiner uPAR-Bindung die Bildung eines Komplexes aus uPAR-EGFR-Integrin ermöglicht und somit intrazelluläre Signalwege zu Zellproliferation und Angiogenese anregt (LaRusch *et al.* 2010). Als uPAR-Antagonist kann das gespaltene hoch-molekular-Kininogen (*high-molecular weight kininogen*, HKa), angesehen werden, das wiederum mit Vitronektin um seine Bindestelle bei uPAR konkurriert und u.a. uPAR-induzierte Zellmigration und Proliferation verhindert (Liu *et al.* 2008, Eden *et al.* 2011). Außerdem wurden Interaktionen mit Rezeptortyrosinkinase wie EGFR (Liu *et al.* 2002) oder dem *platelet derived growth factor receptor-β* (PDGFR-β) beschrieben (Kiyari *et al.* 2005).

1.2.5 Gerichtete Therapieansätze im uPAR-System bei Tumoren

Aufgrund seiner teils sehr starken Expression in verschiedenen Tumoren wird das uPAR-System als möglicherweise prädiktives bzw. prognostisches System (Kolben *et al.* 2016) sowie als mögliches Zielsystem für neue Therapien betrachtet. Zentrale Ansatzpunkte sind die Verhinderung der Expression der Komponenten des Systems, deren Aktivität oder die Inhibition der Interaktion von uPA und uPAR (Ulisse *et al.* 2009).

Ein zur uPA-Inhibierung eingesetzter niedermolekularer Serinproteaseninhibitor ist WX-UK1, das als Medikamentenkandidat Mesupron® (Wilex, München) oral verabreicht wird (<http://www.wilex.de/portfolio/mesupron/ueberblick-mesupron/>, Stand: 01.04.2016).

Laut den Informationen der Firma Wilex (<http://www.wilex.de/portfolio/mesupron/phase-i-ii-mit-mesupron/>, Stand: 01.04.2016) wurde Mesupron® in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin (Eli Lilly and Company, USA) bei „lokal fortgeschrittenem, inoperablem, nicht metastasiertem Bauchspeicheldrüsenkrebs“ getestet. Die Ergebnisse der klinischen Phase II-Studie ergaben, dass u.a. die mediane Überlebensrate der Patienten infolge der Kombinationstherapie mit 400 mg Mesupron® von 9,9 Monaten (bei alleiniger Gabe von Gemcitabin) auf 12,5 Monate anstieg (<http://www.wilex.de/portfolio/mesupron/phase-i-ii-mit-mesupron/>, Stand: 01.04.2016). Außerdem wurde Mesupron® in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Capecitabin (Hoffmann La Roche AG, CH) bei „metastasiertem, HER2-Rezeptor-negativem Brustkrebs“ in einer klinischen Phase II-Studie getestet (<http://www.wilex.de/portfolio/mesupron/phase-i-ii-mit-mesupron/>, Stand: 01.04.2016). Diese zeigte, dass die Zugabe von Mesupron® im Vergleich zu der Verabreichung des Capecitabin alleine eine Zunahme des medianen progressionsfreien Überlebens von 7,5 Monaten auf 8,3 Monate zur Folge hatte (<http://www.wilex.de/portfolio/mesupron/phase-i-ii-mit-mesupron/>, Stand: 01.04.2016). Dies zeigt, dass uPA ein vielversprechender Therapieansatzpunkt ist, hier jedoch noch eine intensive Weiterentwicklung stattfinden muss, um diese Wirksamkeit zu verstärken.

Darüber hinaus gibt es zahlreiche Ansätze, die Interaktion von uPAR mit uPA bzw. mit anderen Interaktionspartnern mit Hilfe spezifischer Antikörper zu verhindern. Rabbani *et al.* zeigten, dass die Zugabe des monoklonalen Antikörpers ATN-658 die Invasion, Migration und Proliferation von humanen Prostatakarzinomzellen *in vitro* und das Tumorstadium *in vivo* reduzierte (Rabbani *et al.* 2010).

1.3 Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (IGF-1R) - Signalweg

Neben den etablierten Therapieansätzen werden neue Möglichkeiten für eine gerichtete Therapie zur Behandlung des Mammakarzinoms und anderer Tumorarten angestrebt. Als ein vielversprechendes Therapieziel wurde auch der IGF-Signalweg identifiziert, da die Komponenten dieses Systems in einigen Tumoren, u.a. in Mammakarzinomen, sehr stark exprimiert werden (Shimizu *et al.* 2004).

Die zentralen Komponenten des Netzwerks (Abb. 3) sind die Wachstumsfaktoren IGF-1, IGF-2 und Insulin, die als Liganden an die Transmembranrezeptoren IGF-1R, IGF-2R/ M6PR (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) und den Insulin Rezeptor (IR) binden und intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden induzieren (Pollak 2012). Außerdem gehören die homologen IGF-Bindeproteine 1-6 (*Insulin-like growth factor binding proteins 1-6*, IGFBP1-6) zu dem System, die zwar strukturell sehr ähnlich sind, jedoch unterschiedliche Funktionen haben (Brahmkhatri *et al.* 2015). Bei IGF-1R und IR handelt es sich um Rezeptortyrosinkinasen, die sich als Heterotetramere aus jeweils zwei extrazellulären α - und zwei transmembranen β -Ketten zusammensetzen und miteinander über Disulfidbrücken verbunden sind (Dupont and LeRoith 2001, Singh *et al.* 2014). IGF-1R und IR sind zu 60% strukturell identisch (Brahmkhatri *et al.* 2015) und bilden neben Homo- auch Heterodimere, die als Hybridrezeptoren bezeichnet werden (Pollak 2012). Die Liganden Insulin und IGF-1 binden an die extrazelluläre α -Untereinheit beider Rezeptoren, jedoch mit stärkerer Affinität für deren jeweiligen Rezeptor (Brahmkhatri *et al.* 2015). Wie von Brahmkhatri zusammengefasst, wird im weiteren Verlauf des Signalwegs das Insulin Rezeptor Substrat (*insulin receptor substrate*, IRS) phosphoryliert und führt zu einer zur Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, PI3K) und des Akt/mTOR-Signalweges, der Zellwachstum und -überleben beeinflusst (Brahmkhatri *et al.* 2015). Zum anderen wird über die Phosphorylierung des Src-Homologie-2-Domäne-enthaltende-transformierenden Proteins (*Src homology 2 domain containing transforming protein*, Shc), das zur Aktivierung des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalwegs führt, u.a. die Zellproliferation beeinflusst (Brahmkhatri *et al.* 2015). Im Gegensatz zu IR und IGF-1R besteht IGF-2R aus einem transmembranen Monomer (Morgan *et al.* 1987). IGF-2R ist keine Rezeptortyrosinkinase und führt zur Endozytose von IGF-2 (Alberini and Chen 2012).

Es gibt einige Ansätze zur Inhibierung der IR- bzw. IGF-1R-vermittelten Signalwege mit neutralisierenden Antikörpern, Tyrosinkinaseinhibitoren oder auch IGF-1 bindenden Proteinen (Singh *et al.* 2014). Zahlreiche Ansätze befinden sich zur Evaluierung in klinischen Studien, allerdings zeigten die bisherige Ergebnisse, dass viele Ansätze eher weniger geeignet sind als ursprünglich angenommen (Singh *et al.* 2014).

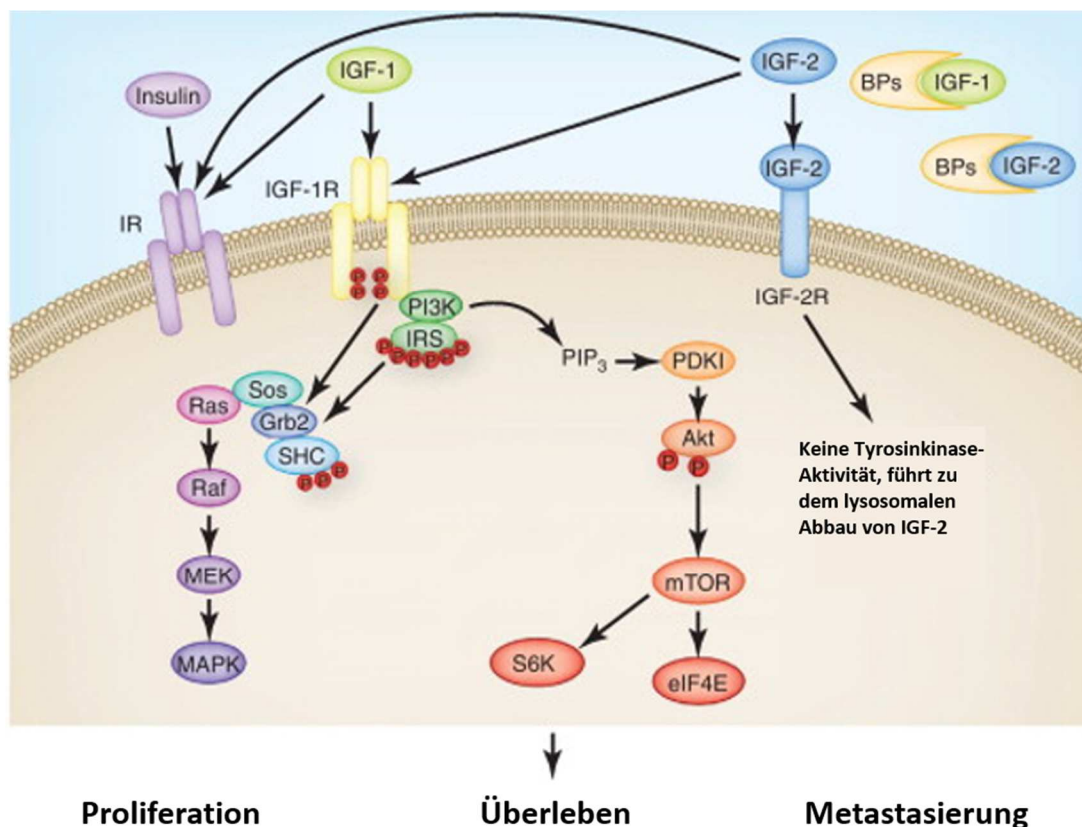


Abbildung 3: Zentrale Komponenten des IGF-Systems (adaptiert nach Alberini and Chen 2012)

Die wichtigsten Liganden im IGF-System sind Insulin, IGF-1 und IGF-2. Der IGF-1- und IGF-2- Spiegel wird durch die Bindeproteine (BP) reguliert. Der IR und IGF-1R sind Rezeptortyrosinkinasen. Die Aktivierung von IR und IGF-1R führt zur Phosphorylierung des Adapterproteins IRS oder SHC. Die Aktivierung des IRS führt zur Initiierung des Raf/Ras/MEK/MAPK-Signalweges und des PI3K-Signalweges. Die Phosphorylierung von Akt führt zu einer Aktivierung von mTOR, den Komplex eIF4E und der p70S6 Kinase. Die Aktivierung der Signalwege führt in der Folge zu Proliferation, Überleben und Metastasierung der Zellen.

1.4 RNA-Interferenz

1.4.1 Natürlicher miRNA-Mechanismus

Andrew Fire und Craig Mello wurde 2006 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin für ihren Beitrag zur Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) verliehen. Im Jahr 1998 beschrieben sie diesen Mechanismus - der u.a. der Regulierung der Genexpression dient - in dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Es zeigte sich, dass die Zugabe von doppelsträngigen RNA-Fragmenten (*double-stranded RNA*, dsRNA) zu sequenzspezifischem Genabschalten führte und effektiver war als die Zugabe von *sense*- oder *antisense*-RNA-Fragmenten (Fire *et al.* 1998). Bereits 1991 hatten Fire *et al.* beschrieben, dass die Expression von *antisense*-RNA, durch das Einschleusen eines Vektors mit der spezifischen DNA-Sequenz, zu einer Inhibierung der Expression des Zielgens führte (Fire *et al.* 1991). Weitere Studien zeigten, dass es sich bei diesem Abschalten von Genen um einen zellulären Mechanismus handelt, der u.a. als Schutz vor der Infektion durch RNA-Viren (Lindbo and Dougherty 1992, Chotkowski *et al.* 2008) oder der Regulation der Bewegung von Transposons dient (Sijen and Plasterk 2003). So fanden Lee *et al.* in *C. elegans* kurze (22-61 Nukleotide, nt) RNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zu ihrer spezifischen mRNA war, und sie vermuteten eine Regulation basierend auf einer RNA-RNA-Interaktion (Lee *et al.* 1993). In den Folgejahren wurden zahlreiche Sequenzen auch im humanen Genom identifiziert, die für mehr als 1000 *microRNAs* (miRNAs) kodieren, die wiederum durch RNA-Interferenz die Expression von mindestens 30% der humanen Gene regulieren (Wilson and Doudna 2013).

Wie in der Abb. 4 schematisch dargestellt, entstehen die miRNAs häufig durch die Transkription eines ca. 1000 nt langen, primären RNA-Stranges (*primary miRNA*, pri-miRNA), der sich durch Basenpaarung teilweise zu doppelsträngigen RNA-Konstrukten mit einer oder mehreren haarnadelähnlichen Strukturen (*short-hairpin RNA*, shRNA) zusammenlagert (Wilson and Doudna 2013). Diese pri-miRNA wird von dem RNase III-Enzym Drosha durch Endonukleolyse in ca. 70 nt lange Vorläufer-miRNAs (*precursor miRNAs*, pre-miRNA) gespalten, die an Exportin-5 binden und in das Zytoplasma exportiert werden können (Wilson and Doudna 2013). Dort spaltet die Endoribonuklease Dicer (enthält eine Helikase- und RNase III-Domänen) diese Vorläuferformen in 21-25 bp lange, doppelsträngige RNA

(*small/short interfering RNAs*, siRNAs) (Wilson and Doudna 2013). Diese wiederum werden in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingeschleust, der u.a. das Protein Argonaut enthält (Wilson and Doudna 2013). Dieses lagert sich an den *guide*-RNA-Strang an, der als miRNA bezeichnet wird und meist spezifisch die 3'UTR und selten die 5'UTR der einzelsträngigen Ziel-RNA (*single stranded RNA*, ssRNA) bindet (Wilson and Doudna 2013). Die ATP-abhängige Helikase löst die Bindung des Doppelstranges und führt in der Folge zu einem Abbau des *passenger*-RNA-Stranges (miRNA*) (Wilson and Doudna 2013). Das Argonaut-Protein veranlasst dann die Bindung des komplementären ssRNA-Stranges wie mRNA an die miRNA (Wilson and Doudna 2013). Die Bindung der miRNA verhindert entweder die Translation der mRNA oder führt durch Deadenylierung zu deren Abbau (Wilson and Doudna 2013).

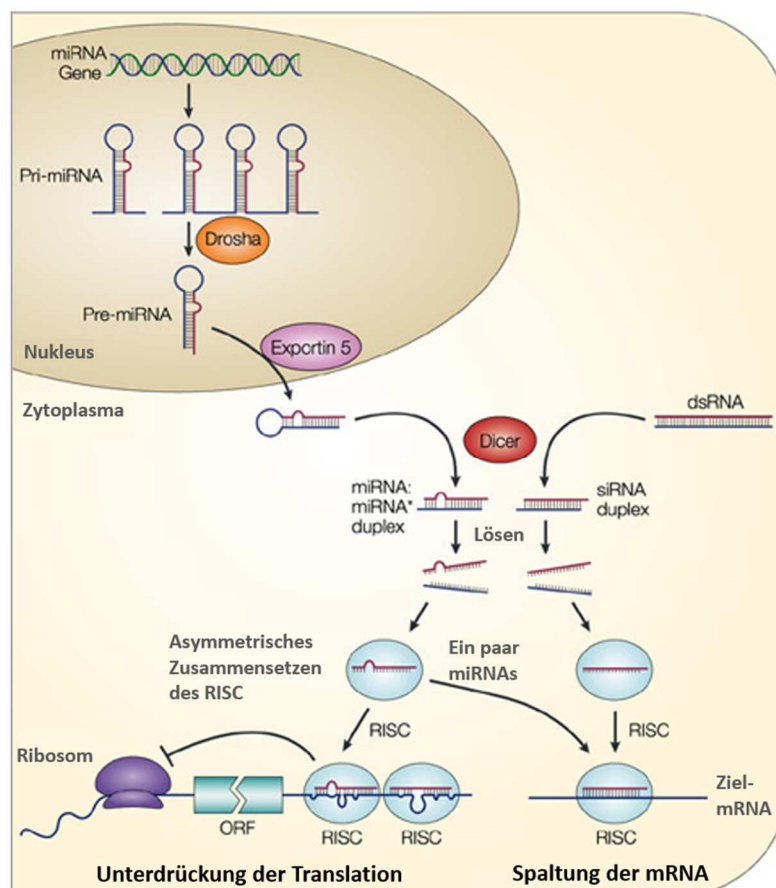


Abbildung 4: Essentielle Prozessierungsschritte von miRNA und siRNA (adaptiert nach He and Hannon 2004)

Die pri-miRNA-Transkripte werden zuerst von Drosha im Nucleus in 70 nt pre-miRNAs gespalten. Diese werden von Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert und dort vom Dicer in miRNA-miRNA* Duplex-Fragmente gespalten. Das Dicer-Enzym spaltet auch lange dsRNA Moleküle in siRNAs. Im RISC-Komplex bindet die miRNA oder siRNA an die Ziel-mRNA und führt entweder zur Unterdrückung der Translation oder zum Abbau der mRNA.

1.4.2 Anwendung der RNAi in der Biotechnologie

Der RNAi-Mechanismus wird in der Biotechnologie gezielt zur Expressionsreduzierung von Proteinen eingesetzt und ist deshalb insbesondere für verschiedene Therapieansätze in der Virologie und in der Onkologie von großer Bedeutung (Hannon and Rossi 2004). So wurden u.a. siRNAs und Sequenzen für shRNAs - in Anlehnung an die endogenen miRNAs für spezifische mRNA-Sequenzen - generiert und für eine gezielte Verminderung der Expression von bestimmten Proteinen eingesetzt (Elbashir *et al.* 2001, Paddison *et al.* 2002). Der zelluläre Mechanismus zur Prozessierung solcher synthetischen dsRNAs ist dem der endogenen miRNA-basierten RNAi sehr ähnlich, jedoch lassen sich verschiedene Möglichkeiten zur Einschleusung der dsRNAs in die eukaryotischen Zellen unterscheiden.

Die einfachste und am leichtesten zugängliche Methode ist die transiente Reduzierung eines Zielproteins mit siRNA, die durch Transfektion in die eukaryotische Zelle eingeschleust wird und zur einer Verminderung der Expression des Zielproteins führt (Hannon and Rossi 2004). Da die Zellen jedoch selbst keinen Mechanismus zur Amplifikation von siRNAs haben, ist diese Expressionsverminderung – u.a. abhängig von der Zellteilungsrate der Wirtszelle – zeitlich begrenzt (Hannon and Rossi 2004). Diese Proteinexpressionsreduzierung kann durch die Einschleusung von Vektoren, die für eine spezifische shRNA kodieren, stabilisiert werden (Hannon and Rossi 2004). Im Falle der Plasmid-vermittelten Transfektion wird die shRNA von einer spezifischen Genkassette in der Plasmidsequenz von der Wirtszelle exprimiert (Sui *et al.* 2002) und hierzu in den Nukleus eingeschleust (McAnuff *et al.* 2007). Durch ein auf dem Plasmid kodiertes Antibiotika-Resistenzgen können transfizierte Zellen selektiert werden, um die Zellen mit den Plasmiden langfristig zu kultivieren (Liu *et al.* 2005).

Eine weitere Möglichkeit zur stabilen RNAi-basierten Expressionsverminderung von Zielproteinen ist der Einsatz von viralen Vektoren (Abb. 5). Hierbei werden zumeist lentivirale Vektoren eingesetzt, die ihr Genom in das des Wirts integrieren und auch ruhende Zellen infizieren können (Rubinson *et al.* 2003). Infolge der viralen Infektion gelangt das RNA-Genom zuerst in das Zytoplasma der Zelle, wo es revers in DNA transkribiert wird und im Nukleus der Zelle in das Wirtsgenom integriert (Whitcomb and Hughes 1992). Dieser stabile Einbau der viralen DNA in das Wirtsgenom ist die Voraussetzung für die langfristige Expressionsverminderung des Zielproteins (Manjunath *et al.* 2009). Denn dadurch wird die

shRNA-Sequenz fortlaufend in den Zellen transkribiert und durch den zellulären RNAi-Mechanismus prozessiert (Manjunath *et al.* 2009). Auf diese Weise ist eine Überprüfung der Effekte der Herunterregulierung auch nach Monaten oder Jahren über die Selektion mit Antibiotika noch möglich, was im Hinblick auf eine therapeutische Relevanz von großer Bedeutung ist. Für diese Form der RNAi werden jedoch keine natürlichen Lentiviren eingesetzt sondern modifizierte Vektoren, welche sich nicht replizieren können (Manjunath *et al.* 2009). Im Abschnitt 2.4 werden im Detail die im Zuge dieser Arbeit eingesetzten lentiviralen Vektoren und deren genetische Komponenten beschrieben. Im Gegensatz zu den zeitlich begrenzten Effekten einer RNAi mit synthetischen siRNA, welche aufgrund von Verdünnungseffekten infolge der Zellteilung und von Inaktivierung kurz-lebiger sind, bleiben die Effekte der lentiviral-basierten RNAi lang nachweisbar (Manjunath *et al.* 2009). Dies ermöglicht eine langfristige Untersuchung der durch die RNAi verursachten Effekte. Neben den Vorteilen dieser post-transkriptionalen Regulierung können jedoch auch Nebeneffekte auftreten, wie eine unspezifische Bindung der RNA-Fragmente, eine zytotoxische Wirkung der Konstrukte und Zusatzreagenzien, die die Infektion verbessern oder eine Immunantwort der Zellen (Rao *et al.* 2009). Jedoch lassen sich die spezifischen Effekte mit entsprechenden Kontrollansätzen verifizieren und deshalb stellt die RNAi eine vielversprechende Methode zur Analyse von potentiellen Therapiezielen dar. So existieren bereits zahlreiche Ansätze und klinische Studien zum Einsatz von RNAi bei verschiedenen Erkrankungen, wie viralen Infektionen (HIV, HBV) oder Tumorerkrankungen (Hannon and Rossi 2004).

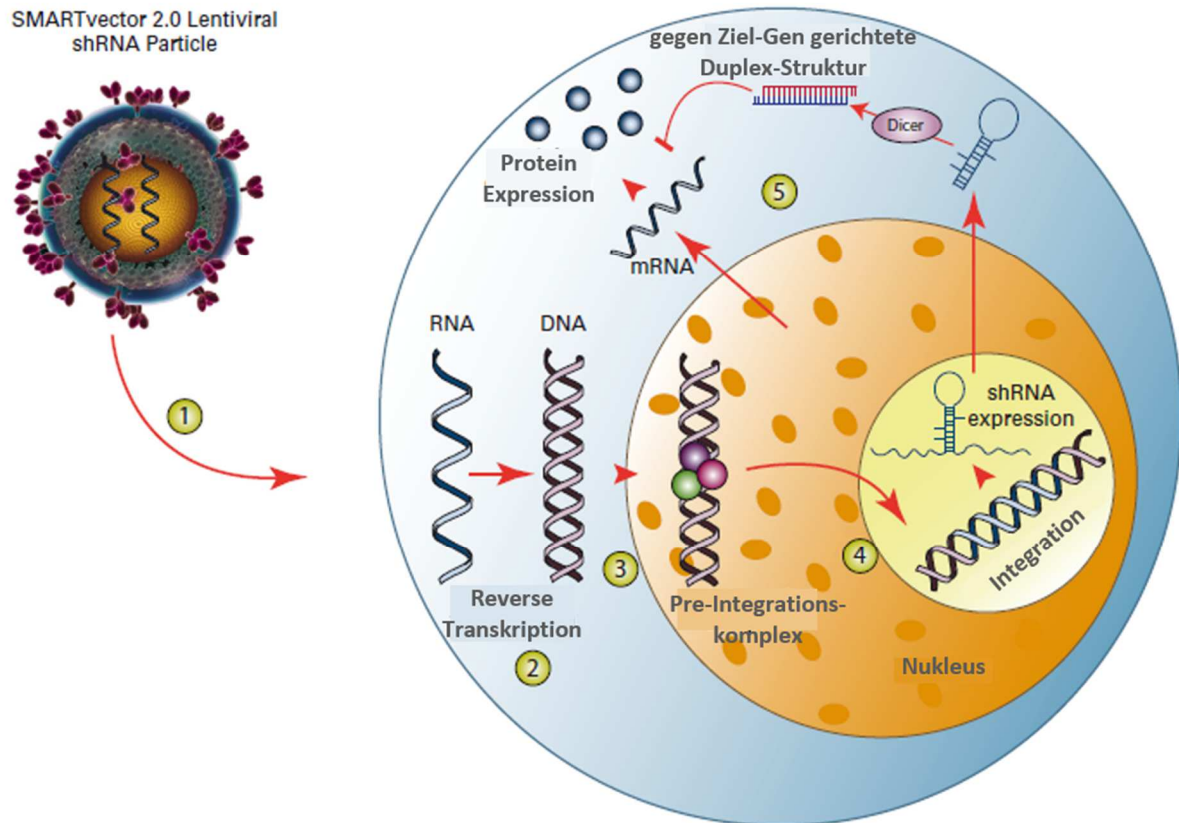


Abbildung 5: Durch lentivirale Transduktion vermittelte RNAi (adaptiert nach Thermo Scientific SMARTchoice Lentiviral shRNA, Technical Manual, 2012)

Nach der Infektion der Wirtszelle durch die lentiviralen Vektoren (1) wird das virale Genom im Zytoplasma revers von RNA in DNA transkribiert (2). Die DNA wird in den Nucleus der Wirtszelle importiert (3) und integriert stabil in das Wirtsgenom (4). Das integrierte Konstrukt wird stabil exprimiert und in die shRNA durch die endogene RNAi prozessiert, was zur Reduzierung der Expression des Zielproteins führt (5).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es eine mögliche therapeutische Relevanz des uPAR-Systems im TNBC genauer zu analysieren. Dies beinhaltete eine stabile lentiviral vermittelte RNAi der zentralen Komponenten des Systems, uPAR und uPA in TNBC-Modellzelllinien und die Untersuchung der Effekte dieser reduzierten Proteinexpression auf Zellproliferation, -invasion und -migration mit *in vitro*-Experimenten. Mit Western Blot Analysen sollte der Effekt der RNAi auf die Proteinexpression von Markerproteinen der assoziierten zellulären Signalwege überprüft werden. Neben einer kombinierten RNAi-basierten Expressionsverminderung (co-RNAi) von uPAR und uPA sollte auch die Relevanz einer noch nicht beschriebenen stabilen co-RNAi von uPAR und IGF-1R hinsichtlich einer potentiellen kombinierten Therapie analysiert werden. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung neuer direkter Interaktionspartner von uPAR, die zukünftig als potentielle Therapieziele dienen könnten. Hierzu sollte eine co-Immunpräzipitation von uPAR mit anschließender massenspektrometrischer Analyse etabliert werden und eine relativ neue Methode zur Darstellung von Protein-Protein-Komplexen auf Gewebeschnitten angewendet werden. Die identifizierten Proteine wurden im Anschluss immunhistochemisch in einer TNBC-Kohorte analysiert und deren klinische Relevanz ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller	Unternehmenssitz
Analysenwaage ABJ 1204M	Kern & Sohn GmbH	Balingen, DE
CO ₂ Inkubator Galaxy 170S	New Brunswick, Eppendorf	Hamburg, DE
Drehrad Test Tube Rotator	Labinco	Breda, NL
Einbettstation	RWW Medizintechnik	Forchheim, DE
Entwicklerkassette	Dr. Goos-Suprema GmbH	Heidelberg, DE
Flatbed-Scanner	Canon	Tokio, JP
Gefrierschrank - 20°C	Siemens	München, DE
Heizblock Thermomix 5436	Eppendorf	Hamburg, DE
Infinite 200 Pro multimode reader	Tecan	Männedorf, CH
Kühlschrank	Liebherr	Kirchdorf, DE
Labcycler	SensoQuest GmbH	Göttingen, DE
Luna™ automated cell counter	Logos Biosystems	Annandale, USA
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Werke GmbH	Staufen, DE
Microplate reader 680	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
Mikroskope AxioVert 35 AxioVert 200M Axio Imager Z1 EVOS® XL Mikroskop Olympus BX43F	Carl Zeiss Carl Zeiss Carl Zeiss Thermo Scientific Olympus	Jena, DE Jena, DE Jena, DE Waltham, USA Tokio, JP
Mikrotom	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Mikrowelle	Panasonic	Osaka, JP
Milli-Q Direct 8	Merck, Millipore	Darmstadt, DE
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad	Hercules, USA
NanoZoomer-XR Digital slide scanner	Hamamatsu Photonics	Hamamatsu, J
ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Thermo Scientific	Waltham, USA
Olympus Kamera DP25	Olympus	Tokio, JP
PCR-Gerät <i>T-Personal</i>	Biometra GmbH	Göttingen, DE
pH-Meter inolab	WTW GmbH	Weilheim, DE
Pipettierhilfe	Gilson, Inc.	Middleton, USA
Pipetten Discovery 0,5 - 10 µl 10 - 100 µl 20 - 200 µl 100 - 1000 µl	Abimed, Kinesis GmbH Abimed, Kinesis GmbH Abimed, Kinesis GmbH Abimed, Kinesis GmbH	Langenfeld, DE Langenfeld, DE Langenfeld, DE Langenfeld, DE
Präzisionswaage U4100	Satorius	Göttingen, DE
Rotor-Gene®Q	Qiagen	Venlo, NL
Schnellkochtopf	Nordic Ware	Minneapolis, USA
Schüttler see-saw rocker SSL4	Stuart, Bibby Scientific Limited	Staffordshire, GB

Sterilbank Uniflow	Uniequip Laborgeräte	Planegg, DE
Stickstofftank	Tec-lab	Taunusstein, DE
Tiefkühltruhe - 80°C	Unity lab Services, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Ultraschall Homogenisator Sonoplus	Bandelin electronic GmbH & Co KG	Berlin, DE
Ultraschallbad Sonorex TK30	Bandelin electronic GmbH & Co KG	Berlin, DE
UV-Lampe	Viber Lourmat Deutschland GmbH	Ebhardzell, DE
Vakuumentrifuge Concentrator Plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Ventana Discovery XT	Roche	Basel, CH
VIP™ Vakuum Infiltrationsprozessor	Sakura	Torrance, USA
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, IKA	Staufen, DE
Wasserbad SW21	Julabo Labortechnik	Seelbach, DE
Wide Mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
Zentrifugen: Hettich EBA12R Pico17 Rotanata 560R Mini Centrifuge	Hettich Eppendorf Hettich LMS Consult	Tuttlingen, DE Hamburg, DE Tuttlingen, DE Brigachtal, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendetes Material

Material	Produktnummer	Hersteller	Unternehmenssitz
Bechergläser		Schott Zwiesel	Zwiesel, DE
BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers	354480	Corning B.V.	Corning, USA
Deckgläser	1870	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Einfrierboxen		Thermo Scientific	Waltham, USA
Falcon® Membraneinsätze	353097	Corning B.V.	Corning, USA
Glasflaschen		Schott Zwiesel	Zwiesel, DE
Handschuhe	Nitril® NextGen	Meditrade	Kiefersfelden, DE
Millex® GS 0,22 µm Filtereinheiten	SLGS033SS	Merck Millipore	Darmstadt, DE
Nitrozellulosemembran	106003	Amersham Protran GE Healthcare	Chalfont St Giles, GB
Omnifix® 50 ml Spritzen	4617509F	B. Braun	Melsungen, DE
PCR Tubes stripe 0,2 ml	951010022	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipettenspitzen TipOne™ 10 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	S1121-3810 S1120-1840 S1120-8810 S1126-7810	Starlab Starlab Starlab Starlab	Hamburg, DE Hamburg, DE Hamburg, DE Hamburg, DE
Pipetten Cellstar™ 5 ml 10 ml 25 ml	606180 607180 760180	Greiner bio-one Greiner bio-one Greiner bio-one	Kremsmünster, AT Kremsmünster, AT Kremsmünster, AT
Plastikkassetten	NC2015	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Polypropylen konische Röhrchen, Falcon™ 15 ml 50 ml	352070 352096	Becton Dickinson Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA Franklin Lakes, USA
Safe-lock Röhrchen 1,5 ml 2 ml	0030 120.086 0030 120.094	Eppendorf Eppendorf	Hamburg, DE Hamburg, DE
Tücher	Kimtech Science	Kimberly-Clark	Irving, USA
Whatman-Papier	10426994	GE Healthcare	Chalfont St Giles, GB
Zählkammer Neubauer improved		Karl Hecht GmbH	Sondheim, DE
Zellkulturflaschen CellStar® 50 ml 250 ml 650 ml	690175 658175 661175	Greiner bio-one Greiner bio-one Greiner bio-one	Kremsmünster, AT Kremsmünster, AT Kremsmünster, AT
Zellkulturplatten: 6-well Nunclon™ Surface 12-well Nunclon™ Delta Surface 24-well Falcon™ 96-well Nunclon™ Delta Surface	140685 150628 353047 167008	Nalge Nunc International Thermo Scientific Becton Dickinson Thermo Scientific	Penfield, USA Waltham, USA Franklin Lakes, USA Waltham, USA
Zellschaber	3010	R&D Systems	Minneapolis, USA

2.1.3 Verwendete Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Chemikalie	Produktnummer	Hersteller	Unternehmenssitz
0,05%-Trypsin-EDTA	25300-054	Life Technologies	Carlsbad, USA
0,4%-Trypanblaulösung	872030	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, DE
Acetonitril	73301	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Agarose	A9414-100 µg	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
A/G PLUS Agarose bead Suspension	sc2003	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Ammoniumbicarbonat	A6141	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat	1337505	Serva	Heidelberg, DE
Ampuwa-H ₂ O, Plastipur®	7151-5	Fresenius	Bad Homburg v.d. Höhe, DE
β-Mercaptoethanol	63689	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bis-Tris Gradientgel NuPAGE®Novex® 4-12%	NP0335BOX	Thermo Scientific	Waltham, USA
Borsäure	5935.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Bovines Insulin	I6634	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	A2153-100g	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bovines Thrombin	T4648-10KU	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bromphenolblau	B3268-5ML	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Coomassie Blue	95981	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Dako REAL™ antibody diluent	S2022	Dako, Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Dimethylsulfoxid	D8418-100ml	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DMEM GlutaMax Medium	61965-026	Life Technologies	Carlsbad, USA

DNA-loading dye 6x	R0611	Thermo Scientific	Waltham, USA
1 kb und 100bp-DNA-Gene Ruler-Markers	SM0313 und SM0324	Thermo Scientific	Waltham, USA
DTT (Dithiothreitol)	6908.4	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Dulbecco's PBS (DPBS)	14040-091	Life Technologies	Carlsbad, USA
Duolink® in situ PLA probe anti-Mouse MINUS	DUO92004-100RXN	Olink Bioscience	Uppsala, S
Duolink® in situ PLA probe anti-rabbit PLUS	DUO92002-100RXN	Olink Bioscience	Uppsala, S
EDTA 0,5M pH 8,0	15575-038	Life Technologies	Carlsbad, USA
Entwicklerlösung	G153DEV	AGFA	Mortsel, BEL
Ethanol	20821.321	VWR International	Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	300306	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
FBS	10270106	Life Technologies	Carlsbad, USA
Fixierlösung	G354FIX	AGFA	Mortsel, BEL
Formalin	05-K01004/CO	Bio-Optica	Mailand, ITA
Glycerol	3783.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Glycin	G-6388	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
goat serum	16210-064	Life Technologies	Carlsbad, USA
Harnstoff	2317.2	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
HPLC-H ₂ O	W/0110/PB15	Fisher Scientific	Waltham, USA
humanes Plasma	P9523-5ML	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Iodacetamid	A166825	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
2-Propanol	CP41.3	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Lämmli Sample Buffer (2x)	42526	SERVA Electrophoresis	Heidelberg, DE
Magermilchpulver		Saliter	Obergünzburg
MEM NEAA (100x)	11140-035	Life Technologies	Carlsbad, USA
Methanol	32213-2,5l	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Mounting medium w. DAPI	DUO82040-5ML	Olink Bioscience	Uppsala, S
Natriumchlorid (NaCl)	71380-1kg	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	6771.3	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
NonidetP40 Substitute	74385	Fluka, Sigma-Aldrich	Hercules, USA
Paraffin	6642.6	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
PBS Tablets	18912-014	Thermo Scientific	Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	15140122	Life technologies	Carlsbad, USA
Pertex-Eindecklösung	PER30000	Melite GmbH	Burgdorf, DE
Polybrene®	107689-10mg	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ponceau S	81460	Sigma-Aldrich	Hercules, USA
Protein G Sepharose Fast Flow beads	17-0618-05	GE Healthcare	Chalfont St Giles, GB
ProtoGel (Polyacrylamid)	EC-890	National Diagnostics	Atlanta, USA
Puromycin	P8833-25MG	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	3060.2	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
RPMI GlutaMax Medium	61870-010	Life Technologies	Carlsbad, USA
Running Buffer 20x NuPAGE® Novex® MESDS	NP0002	Thermo Scientific	Waltham, USA
Salzsäure (HCl)	9280.3	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	1610302	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA

SDS-Lösung 20%	161-0416	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
Staurosporin	S6942-200µl	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
TMED	443083G	VWR International	Darmstadt, DE
Toluidinblau	348600250	Acros organics	Geel, BEL
Trifluoressigsäure	CP05.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Tris Base	T1503-1Kg	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Triton X-100	93420	Fluka, Sigma-Aldrich	Hercules, USA
Tween20	9127.2	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	1.072091000	Merck	Darmstadt, DE
Xylol	2662.4	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE

2.1.4 Verwendete Kits

Tabelle 4: Kits

Kit	Produktnummer	Hersteller	Unternehmenssitz
Cell Proliferation Reagent WST-1	05015944001	Roche	Basel, CH
cOmplete Mini Proteinaseinhibitoren	11836153001	Roche	Basel, CH
Discovery DAB Map Detection Kit	760-124	Roche	Basel, CH
DNeasy Blood & Tissue Kit	69504	Qiagen	Venlo, NL
Duolink® in situ Detection Reagents Kit Red	DUO92008-100RXN	Olink Bioscience	Uppsala, S
High-capacity RNA-to-cDNA Kit	4387406	Applied Biosystems	Waltham, USA
mirVana miRNA Isolation Kit	AM1561	Life technologies	Carlsbad, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix	304437	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26619	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PCR Mycoplasma Test Kit II	PK-CA20-700-23	PromoKine	Heidelberg, DE
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726-5ML	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	P0044-5ML	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pierce™ Coomassie Bradford Protein Assay Kits	23200	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffers	46430	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
SERVA ICPL™ Triplex Kit	39231.01	SERVA Electrophoresis	Heidelberg, DE
Squirrel Monkey Retrovirus Detection Kit	PP-403S	Jena Bioscience	Jena, DE
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	34078	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Kits	34094	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Tissue-Protein Extraction Reagent (T-PER)	78510	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.5 Eingesetzte Puffer

Tabelle 5: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
IP-Puffer A	1% NonidetP40 5 mM EDTA ad 50 ml PBS
IP-Puffer B	0,5% NonidetP40 5 mM EDTA ad 50 ml PBS
Lämmli-Puffer 4x	2 g Tris Base 20 ml 20% SDS 20 ml 100% Glycerol 10 ml 100% β -Mercaptoethanol 0,05 g Bromphenolblau
Lämmli-Puffer 2x	6,25 ml 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8) 10 ml 20% SDS 10 ml 100% Glycerol 5 ml 100% β -Mercaptoethanol 0,05 g Bromphenolblau
Laufpuffer 1x	100 ml Rotiphorese® 10x SDS-PAGE Ad 1 l MilliQ-H ₂ O
PLA-Waschpuffer A (pH 7,4, steril)	8,8 g NaCl 1,2 g Tris Base 0,5 ml Tween 20 Ad 1 l MilliQ-H ₂ O
PLA-Waschpuffer B (pH 7,5, steril)	5,84 g NaCl 4,24 g Tris Base 26 ml Tris HCl Ad 1 l MilliQ-H ₂ O
Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris (pH 6,8)	6 g Tris Base 100 ml MilliQ-H ₂ O
TBS-T 10x (pH 7,6)	24,2 g Tris Base 80,2 g NaCl 10 ml Tween20 Ad 1 l MilliQ-H ₂ O
TBS-T 1x	100 ml 10x TBS-T 900 ml MilliQ-H ₂ O
Transferpuffer 10x	31,2 g Tris Base 144 g Glycin Ad 1 l MilliQ-H ₂ O
Transferpuffer 1x	100 ml 10x Transferpuffer 700 ml MilliQ-H ₂ O 100 ml Methanol
Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris (pH 8,8)	36,3 g Tris Base 200 ml MilliQ-H ₂ O
TBE-Puffer 5x	270 g Tris Base 137,5 g Borsäure 100 ml 0,5M EDTA, pH 8,0 Ad 5l MilliQ-H ₂ O
TBE-Puffer 1x	20 ml 5x TBE-Puffer 80 ml MilliQ-H ₂ O

2.1.6 Verwendete Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Hersteller	Herstellersitz
AxioVision	Carl Zeiss	Jena, DE
Definiens Developer XD	Definiens AG	München, DE
ImageJ 1.47v	NIH	USA
Image Studio Lite v5.0	LI-COR	Lincoln, USA
INGENUITY Pathway Analysis (IPA)	INGENUITY System, Qiagen	Venlo, NL
labSens 1.1v	Olympus	Tokio, JP
Mascot 2.5	Matrix Science	Boston, USA
NDP.view2	Hamamatsu Photonics	Hamamatsu, JP
Proteome Discoverer 1.3	Thermo Scientific	Waltham, USA
SigmaPlot 12.0	Systat Software, Inc.	n.v.

2.1.7 Die TNBC-Kohorte

Für die immunhistochemischen Analysen wurde eine Kohorte aus 174 TNBC-Fällen verwendet, die im Rahmen eines Gesamtprojektes der Arbeitsgruppe (in Kooperation mit Prof. Dr. Manfred Schmitt, Frauenklinik, TUM) für diese Doktorarbeit zur Verfügung stand. Für diese Tumoren lagen klinische Daten zu Tumorgröße, histologischem Grad, Nodalstatus und zum Auftreten von Fernmetastasen (Beobachtungszeitraum: Mittelwert 57 Monate) vor, die in Tabelle 7 dargestellt sind. Außerdem waren die Tumorgewebe bzgl. der für die vorliegende Arbeit relevanten Proteinexpressionen von uPAR, uPA, PAI-1 und IGF-1R charakterisiert (Tab. 8). Der TNBC-Status der Kohorte war immunhistochemisch bestätigt.

Tabelle 7: Klinische Parameter der verwendeten TNBC-Kohorte (n=174)

Parameter	Klassifikation	Anzahl Tumore
Histologischer Grad	1	3
	2	21
	3	150
Tumorgröße	≤ 2 cm	52
	> 2 cm ≤ 5 cm	93
	> 5 cm	29
Nodalstatus	Negativ	90
	Positiv	84
Auftreten von Fernmetastasen	Ja	52
	Nein	122

Tabelle 8: Proteinexpressionsintensitäten (0-3) der Tumore der TNBC-Kohorte (n=174)

Protein	0	1+	2+	3+
uPAR	6	51	80	37
uPA	97	80	15	0
PAI-1	68	83	23	0
IGF-1R	19	78	57	20

2.2 Zellkulturtechniken

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden verschiedene projektrelevante Brustkrebszelllinien verwendet (Tab. 9). Zur Authentifizierung der Zelllinien wurde aus diesen DNA isoliert und je 50 µl mit 50 ng/µl zur Erstellung von DNA-Profilen, basierend auf *short tandem repeats* (STR) an die Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, DE) geschickt. Das Ergebnis dieser Analyse wurde in der Datenbank des Leibniz-Instituts DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen-GmbH (Braunschweig, DE) auf Übereinstimmungen mit DNA-Profilen von bereits bekannten Zelllinien hin überprüft.

Tabelle 9: Verwendete Brustkrebszelllinien

Zelllinie	Gewebsursprung	Tumortyp	ER	PR	HER2	Kulturvollmedium	Quelle
BT474	Brustdrüse	Duktales Karzinom	+	(+)	+	DMEM GlutaMAX, 10% FCS, 0,5% Pen/Strep	ATCC® HTB-20™ PATH, HMGU
BT549	Brustdrüse	Duktales Karzinom	-	-	-	RPMI 1640 GlutaMAX, 10% FCS, 0,5% Pen/Strep, 10 µg/ml bovines Insulin	ATCC® HTB-122™ Prof. Manfred Schmitt, TUM
MCF7	Brustdrüse, bei Pleuraerguss einer Metastase entnommen	Duktales Karzinom	+	+	-	DMEM GlutaMAX, 10%FCS, 0,5% Pen/Strep	ATCC® HTB-22™ PATH, HMGU
MDA-MB-231	Brustdrüse, bei Pleuraerguss einer Metastase entnommen	Adeno-karzinom	-	-	-	DMEM GlutaMAX, 10% FCS, 0,5% Pen/Strep, 1% MEM NEAA	ATCC® HTB-26™ Prof. Manfred Schmitt, TUM
MDA-MB-361	Einer Metastase im Gehirn entnommen	Adeno-karzinom	+	-	+	DMEM GlutaMAX, 10% FCS, 0,5% Pen/Strep, 1% MEM NEAA	ATCC® HTB-27™ PATH, HMGU
SKBR3	Brustdrüse, bei Pleuraerguss einer Metastase entnommen	Adeno-karzinom	-	-	+	DMEM GlutaMAX, 10%FCS, 0,5% Pen/Strep	ATCC® HTB-30™ PATH, HMGU
T47D	Brustdrüse, bei Pleuraerguss einer Metastase entnommen	Duktales Karzinom	+	+	-	RPMI 1640 GlutaMAX, 10% FCS, 0,5% Pen/Strep, 10 µg/ml bovines Insulin	ATCC® HTB-133™ PATH, HMGU

(Quellen: (Neve *et al.* 2006), ATCC, CLS cell lines service)

2.2.1 Subkultur von Zellen

In Kulturnahme von Zellen

Zellen können für einen langen Zeitraum in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank bei -196 °C gelagert werden. Um die tiefgefrorenen Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Kryokonservierungsröhrchen, die die Zellsuspension enthielten, zügig aufgetaut. Die Zellen

wurden in ein 15 ml-Röhrchen mit 9 ml des jeweiligen Kulturvollmediums (Tab. 9) aufgenommen. Um das bei Raumtemperatur zytotoxische Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen, wurden sie bei 1000 rpm, 5 min in der Rotanata 560R Zentrifuge mit dem Rotor 5655 zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine 25 ml-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Passagieren der Zellen

Sobald die Zellen eine 90-100% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie unter der Sterilbank subkultiviert, d.h. in größere Zellkulturflaschen verdünnt überführt, um optimale Kulturbedingungen zu gewährleisten. Da alle für diese Arbeit verwendeten Zelllinien adhärent wachsen, mussten diese enzymatisch abgelöst werden. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen je nach Flaschengröße mit 2– 10 ml der Magnesium- und Kalziumfreien phosphatgepufferten Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS, gelöste PBS-Tablette) kurz gewaschen, um das Medium und v.a. das den tryptischen Verdau verhindernde Fötale Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) zu entfernen. Das PBS wurde abgesaugt, je nach Flaschengröße 0,5 ml – 3 ml 0,05%-Trypsin-EDTA (1x) zugegeben und bei 37 °C 5 min inkubiert. Die Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bindet Magnesium- und vor allem Kalziumionen, wodurch - für die Zellsubkultur relevant - die Zell-Zell-Verbindungen gelöst werden (Gstraunthaler und Lindl 2013). Das Trypsin spaltet an den Carboxylenden von Arginin bzw. Lysin der Peptidbindungen. Hierdurch werden Zell-Matrix-Verbindungen und die Zellen vom Flaschenboden gelöst (Gstraunthaler und Lindl 2013). Mit mindestens dem - im Verhältnis zum eingesetzten Trypsin - zweifachen Volumen Vollkulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Je nach Zelldichte wurde dann ein Teil der Zellen in eine mit Kulturvollmedium (Tab. 9) versehene Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in 15 ml-Röhrchen überführt und mit 1000 rpm 5 min in der Rotanata 560R Zentrifuge mit dem Rotor 5655 zentrifugiert. Dann wurde der Überstand

verworfen und die Zellen in Kryokonservierungsmedium (Kulturvollmedium, 10% FCS, 10% DMSO) aufgenommen. Das DMSO verhindert die für Zellen schädliche Eiskristallbildung in bzw. um die Zellen und deren teilweise Dehydrierung während des Einfrierens (Gstraunthaler und Lindl 2013). Die Röhrchen wurden in Einfrierboxen, die 2-Propanol zum langsameren Absenken der Temperatur enthielten, 48 h bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Kryokonservierungsröhrchen in den Stickstofftank auf -196 °C zur Langzeitlagerung überführt.

Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl der Zellen in einer Suspension zu bestimmen, wurde die Neubauer *improved* Zählkammer bzw. der Zellzählautomat Luna™ *automated cell counter* verwendet. In beiden Fällen wurde eine 1:1-Verdünnung der Zellen mit 20 µl 0,4%-Trypanblaulösung angesetzt und 10 µl davon in die Zählkammer gegeben. Der Farbstoff kann ausschließlich in geschädigte bzw. tote Zellen eindringen, da deren Membran porös ist, weshalb deren Zytoplasma in der Folge unter dem Mikroskop dunkelblau erscheint (Schmitz 2011). Die Membran lebender Zellen lässt dies nicht zu, weshalb diese unter dem Mikroskop hell erscheinen (Schmitz 2011). In der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl der lebenden (hellen) Zellen in den vier Quadranten addiert, der Mittelwert berechnet und mit 10 (Kammerfaktor) x 2 (wegen der Verdünnung) x 1000 (für 1 ml) multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu bestimmen. Der Zählautomat Luna liefert automatisch die Zellzahl der lebenden, toten und die Gesamtzahl pro ml unter Berücksichtigung unterschiedlicher Parameter wie Zellgröße und –rundheit (Tab. 10).

Tabelle 10: Einstellungen am Luna-Zellzählgerät

Zelllinie	Zellgröße	Rauschreduzierung	Rundheit	Declustering
MDA-MB-231	10-27 µm	6	85%	mittel
BT549	5-35 µm	5	60%	hoch

2.2.2 Kontaminationstests

Mykoplasmen-Kontaminationstest

Bei Mykoplasmen handelt es sich um Bakterien der Klasse der *Mollicutes*, deren Wirtsorganismus u.a. eukaryotische Zellen sind und die die Lebensfähigkeit der Zellen

beeinträchtigen können (Rottem and Barile 1993). Um auszuschließen, dass beobachtete Effekte auf eine Kontamination mit diesen, nur unter dem Elektronenmikroskop erkennbaren Bakterien zurückzuführen waren, wurden die Zellen während der Zellkulturarbeiten auf Mykoplasmen getestet. Hierzu wurde der PCR Mycoplasma Test Kit II verwendet. 1 ml des Kulturmediumüberstandes von Zellen, die mindestens eine Woche in Kultur waren, wurde in ein steriles 2 ml-Röhrchen gegeben, bei 1500 rpm für 1 min mit der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml-Röhrchen überführt. Vorhandene Mykoplasmen wurden bei 13.000 rpm 10 min mit der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl der Pufferlösung aus dem Kit aufgenommen und bei 95 °C 3 min die DNA isoliert. Der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)-Test basiert auf der Vervielfältigung einer Mykoplasmen-spezifischen 16S ribosomalen DNA (rDNA) Gensequenz. Für die PCR wurden die für diese benötigten Komponenten (Tab. 11) vermengt und die PCR (Tab. 12) wurde im PCR-Gerät *T-Personal* durchgeführt. Je 20 µl des PCR-Produkts wurden mit 6x *DNA-loading dye* Ladepuffer versehen, auf ein 2% Agarosegel (Agarose + 1x TBE-Puffer + 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) mit 5 µl des 100bp- bzw. des 1 kb-DNA-*Gene Ruler*-Markers geladen, bei 100 V 60 min in einer *Wide Mini Sub Cell GT* Gelkammer aufgetrennt und unter der UV-Lampe detektiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Mixes

Reagenz	Volumen
DNA-Isolat	5 µl
Reaktionslösung	10 µl
Ampuwa-H ₂ O	35 µl

Tabelle 12: Ablauf der Mykoplasmentest-PCR

Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
94°C	30 Sek	1
94°C	30 Sek	35
60°C	120 Sek	
72°C	60 Sek	
94°C	30 Sek	1
60°C	120 Sek	1
72°C	300 Sek	1
4°C	∞	

Totenkopffächen-Retrovirus-Kontaminationstest

Das aus Lungengewebe des Totenkopffächchens isolierte Retrovirus infiziert als Wirt auch humane Zelllinien (Heberling *et al.* 1977). Um auszuschließen, dass die hier verwendeten Zelllinien mit dem Virus des Totenkopffächchens kontaminiert waren, wurde ebenfalls ein PCR-basierter Test mit dem *Squirrel Monkey Retrovirus Detection*-Kit durchgeführt. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen in ein steriles 1,5 ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert und die Zellen in 500 μ l Ampuwa-H₂O aufgenommen. Die Ansätze wurden 15 min bei 95 °C inkubiert und 1 min mit 10.000 rpm in der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Röhrchen überführt und auf Eis inkubiert. Für die PCR wurden zwei Lösungen (Mastermix 1 bzw. Mastermix 2) angesetzt mit 2,5 μ l der DNA bzw. Positiv- und Negativ-Kontrolle (Tab. 13) und die PCR (Tab. 14) im PCR-Gerät *T-Personal* durchgeführt. Zu jedem PCR-Produkt wurden 5 μ l 6x *DNA-loading dye*-Ladepuffer gegeben, davon je 12 μ l auf ein 2%-Agarosegel (Agarose + 1x TBE-Puffer + 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid) geladen und 5 μ l 100 bp-DNA-*Gene Ruler*-Markers aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V für 60 min in einer *Wide Mini Sub Cell GT* Gelkammer durchgeführt und unter der UV-Lampe überprüft.

Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Mixes

Mastermix 1/ 2	Volumen
DNA-Isolat	2,5 μ l
Polymerase	0,5 μ l
Mastermix 1/2	22 μ l

Tabelle 14: Ablauf der SMRV-Test-PCR

Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
94°C	180 Sek	1
94°C	30 Sek	35
66°C	30 Sek	
72°C	60 Sek	
72°C	300 Sek	1
4°C	∞	

2.3 Zellkultur Experimente

Zur Überprüfung von Effekten auf die zelluläre Viabilität, Migration und Invasion, sowie der Induktion von Apoptose wurden *in vitro* Tests durchgeführt.

2.3.1 Proliferationstest (WST-1 Test)

Um Zellen auf ihre Proliferationsfähigkeit zu überprüfen, wurde ein WST-1 (*Water soluble tetrazolium-1*) Test mit dem *Cell Proliferation Reagent WST-1* - Kit durchgeführt. Hierbei wird die Funktionalität der Atmungskette der Zellen überprüft. Auf der extrazellulären Seite der Zytoplasmamembran wird das hellrote Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in das dunkelrote Formazan reduziert. Dies ist nur bei einer intakten Atmungskette möglich, die auf eine unbeeinträchtigte zelluläre Lebensfähigkeit schließen lässt (Berridge *et al.* 2005). Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes lässt sich spektrofotometrisch ermitteln. Ein reduzierter Farbumschlag weist auf eine reduzierte Proliferationsfähigkeit der Zellen hin (Mosmann 1983). Hierzu wurden in einer 96-Loch Platte 1×10^4 Zellen pro 100 μ l Kulturvollmedium in je sechs Vertiefungen pro Ansatz gegeben und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Um die Werte abzüglich der Absorption des Mediums analysieren zu können, wurden zwei Vertiefungen mit dem entsprechenden Kulturvollmedium gefüllt. Nach 48 h wurden 10 μ l des WST-1-Reagenz in jede Vertiefung gegeben und nach 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min und 180 min die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer vom Hersteller empfohlenen Referenzwellenlänge von 655 nm mit dem *Microplate Reader 680* vermessen. Zur Quantifizierung wurde von den Einzelwerten der Mittelwert der Medium-Kontrollansätze subtrahiert. Dann wurden die Einzelwerte auf den Mittelwert der Reaktions-Kontrollwerte normalisiert und hieraus der Mittelwert der Ansätze berechnet. Aus den normalisierten Werten wurde die Standardabweichung berechnet.

2.3.2 Wundheilungs-Migrationstest

Um Zellen auf ihre Migrationsfähigkeit hin zu überprüfen, wurde ein Wundheilungs-Migrationstest (*scratch wound migration assay*) durchgeführt. Hierzu wurden in Triplikaten - abhängig vom Migrationsverhalten der Zellen - $3,5 \times 10^5$ MDA-MB-231 Zellen/Vertiefung bzw. 5×10^5 BT549 Zellen/Vertiefung in 6-Loch Platten ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂

kultiviert, damit nach 24 h die Zellen eine Konfluenz von 90% erreichten. Zu Beginn des Experiments (0 h) wurde pro Vertiefung mit einer sterilen 200 µl Pipettenspitze eine künstliche Wunde in Kreuzform gezogen, das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt, mit je 2 ml PBS kurz inkubiert und anschließend je 2 ml Serum-reduziertes Medium (Zusammensetzung wie Kulturvollmedium, jedoch mit nur 0,1% FCS) zugegeben, damit die Zellen tatsächlich migrieren und nicht proliferieren (Liang *et al.* 2007). Anschließend wurden die Wunden mit dem EVOS® XL Mikroskop fotografiert und die Ansätze weiter inkubiert. Weitere Aufnahmen erfolgten 24 h, 48 h und 72 h nach Beginn des Experiments. Mit der Software *TScratch* (Geback *et al.* 2009) wurde die offene Fläche zum jeweiligen Zeitpunkt vermessen. Zur Auswertung der Effekte wurde der Zeitpunkt 0 h als 100% gesetzt und die übrigen Werte zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

2.3.3 Boyden-Kammer-Migrationstest

Eine weitere Möglichkeit, die Migrationsfähigkeit der Zellen zu analysieren, stellt der Boyden-Kammer-Migrationstest dar. Hierbei handelt es sich um einen von Stephen Boyden entwickelten Test, der den chemotaktischen Effekt von Substanzen im Medium auf die Migration von Leukozyten analysierte (Boyden 1962). Der Test wurde weiterentwickelt und für verschiedene Zelltypen etabliert. Die Membranen bestehen aus Polypropylen und sind mit Poren versehen, durch die die Tumorzellen, angezogen von einem Chemoattraktanten, auf die andere Seite der Membran wandern. Die Anzahl der - im Verhältnis zu einer unbehandelten (Mock-/Reaktions-) Kontrolle - migrierten Zellen lässt einen Rückschluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen zu. Hier wurden Falcon® Membraneinsätze mit einem Porendurchmesser von 8 µm verwendet. Je Ansatz wurden Triplikate verwendet und die Membraneinsätze in die Vertiefungen von 24 Loch-Kulturplatten gestellt, in denen je 700 µl Vollkulturmedium vorgelegt worden war. 1×10^4 Zellen wurden in 500 µl Serum-reduziertem Medium pro Membraneinsatz gegeben und die Kammern bei 37 °C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h bzw. 48 h wurde der Test beendet. Die Überstände wurden aus den Kammern abgenommen, je 600 µl PBS zugegeben und in neue, mit 500 µl PBS gefüllte Vertiefungen gestellt. Mit einem Wattestäbchen wurden die noch nicht migrierten Zellen aus der Innenseite der Kammern durch 2x fünfmalige Kreisbewegungen und zusätzlichem Drehen um die eigene Achse entfernt. Das PBS wurde abgenommen und die Zellen 2 min in

Vertiefungen mit je 500 µl bereits vorgelegtem Methanol fixiert. Dann wurde das Methanol entfernt und die Kammern in 600 µl Ampuwa-H₂O kurz inkubiert, um das Methanol zu entfernen. Nach 30 sek wurde das Wasser aus den Kammern abgenommen und die Membran 10-15 min in 500 µl 1,5%-Toluidinblau-H₂O-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Färbelösung mit destilliertem Wasser entfernt und die Membranen trockneten lichtgeschützt ÜN bei RT. Dann wurden die Membranen aus den Kammern mit einer Kanüle herausgetrennt, auf ein mit Pertex-Eindecklösung versehenen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas fixiert. Zur Auswertung wurde ein repräsentativer Querschnitt von 13 Bildern durch die Membranen unter dem Mikroskop Olympus BX43F mit der Kamera Olympus DP25 unter Verwendung der Software *labSens 1.1v* aufgenommen und die Zellzahl mit der Software *ImageJ 1.47v* bestimmt. Die Werte wurden auf den Mittelwert der Reaktions-Kontrolle normalisiert, der Mittelwert aus je drei Ansätzen gebildet und die Standardabweichung berechnet.

2.3.4 Matrigel-Invasionstest

Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung des Boyden-Kammer-Migrationstests. Die Membranen der Kammern sind mit Matrigel beschichtet, das laut Hersteller Corning aus Maussarkomen gewonnen wird und aus Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM), wie Laminin und Collagen IV besteht (Ohashi *et al.* 2013). Um durch die Poren in der Membran wandern zu können, müssen die Zellen zunächst dieses Matrigel abbauen. Hierdurch soll *in vitro* der für die Invasion bzw. Metastasierung der Zellen entscheidende Abbau der ECM bzw. das Durchbrechen der Basalmembran der Tumorzellen dargestellt werden. Hier wurden die *BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers* verwendet. Es wurden 2×10^4 Zellen je Kammer eingesetzt. Die Vorgehensweise und Auswertung erfolgte bei diesem Test analog zum Boyden-Kammer-Migrationstest (2.3.3).

2.3.5 Apoptoseinduktionstest

Ein wichtiger Hinweis auf die potentielle Wirksamkeit z.B. von Medikamenten bei Tumoren ist das Induzieren von Apoptose. Ein Reagenz, das Apoptose auslöst, ist das von *Streptomyces staurosporeus* gebildete mikrobielle Alkaloid Staurosporin, das unspezifisch an Proteinkinasen wie Proteinkinase C bindet (Tamaoki *et al.* 1986). Diese ist von großer

Bedeutung unter anderem für die Zellproliferation (Nishizuka 1984). Durch die Aktivierung von Caspasen (Andersson *et al.* 2000) – infolge der Induktion von Apoptose - wird die Poly-Adenosindiphosphat (ADP)-Ribose Polymerase (PARP) gespalten. Da PARP ein Enzym ist, das an der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt ist, dient es in der gespaltenen und dadurch inaktivierten Form als Apoptosemarker im Western Blot (Boulares *et al.* 1999). Als Positiv-Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem Apoptose mit Staurosporin induziert worden war. In einer 25 ml-Kulturflasche wurden Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und dann das Kulturmedium mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Staurosporin versetzt. Die mikroskopische Kontrolle ergab Hinweise auf induzierte Apoptose und nach 24 h wurden die Überstände und noch adhärenen Zellen aus der Kulturflasche gesammelt und die Proteine isoliert. Im Zuge dieser Arbeit wurde überprüft, ob die RNAi der Zielproteine in den Zellen Apoptose auslöste. Hierzu wurden die jeweiligen Zellen in 25 ml-Zellkulturflaschen 48 h kultiviert und dann der Kulturüberstand in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die adhärenen Zellen wurden aus der Zellkulturflasche gelöst, Proteinlysate aus den Zellen gewonnen, deren Konzentration mit BCA-Test bestimmt und ein Western Blot mit einem Primärantikörper gegen PARP durchgeführt.

2.4 Durch lentivirale Vektoren vermittelte RNA-Interferenz (RNAi)

In dieser Doktorarbeit wurden lentivirale Vektoren zur stabilen Verminderung von Zielproteinen, basierend auf RNA-Interferenz, verwendet. Lentiviren gehören zu der Familie der Retroviren (*Retroviridae*) und besitzen die Fähigkeit auch in Zellen, die sich nicht in der Teilungsphase befinden, in das Wirtsgenom zu integrieren (Lewis *et al.* 1992). Die Vektoren (Abb. 6) wurden von Dharmacon (später Thermo Scientific, seit 2014 GE Healthcare) erworben (Tab. 15). Hierbei handelt es sich um *SMARTchoice shRNA*-Vektoren, die aufgrund von Deletionen in der Region von Promotor und Enhancer des 3`LTR (*long terminal repeat*) selbst-inaktivierend sind (*self-inactivating*, 3`SIN LTR) (Wu *et al.* 2000). Das einzelsträngige RNA-Genom der Retroviren wird durch Reverse Transkription in DNA umgeschrieben und anschließend in das Wirtsgenom integriert (Whitcomb and Hughes 1992). Dabei wird die Deletion im 3`LTR auf das 5`LTR überschrieben, wodurch nach der Insertion der DNA in das Wirtsgenom, keine weitere Replikation des Virus mehr möglich sein sollte (Zufferey *et al.* 1998).

Zusätzlich enthalten die verwendeten Vektoren eine Sequenz, die für ein Puromycinresistenzgen kodiert. Bei Puromycin handelt es sich um ein Antibiotikum, das von *Streptomyces alboniger* produziert wird und die Proteinbiosynthese durch verfrühte Termination der Translation inhibiert (Darken 1964). Außerdem kodiert der designte Vektor für ein grün fluoreszierendes Protein *turboGFP* bzw. rot fluoreszierendes Protein *turboRFP*, das eine Überprüfung der erfolgreichen Transduktion bereits 48h nach der Infektion unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Reguliert wird die Expression durch den hier ausgewählten Promotor des humanen Cytomegalovirus (hCMV). Die *microRNA* ähnliche Sequenz (Tab. 15), die spezifisch gegen die herunter zu regulierende mRNA-Sequenz gerichtet ist, liegt in einer Haarnadelstruktur (*short-hairpin* RNA, shRNA) vor. Des Weiteren enthält der Vektor eine ψ -Verpackungssequenz und ein *Rev Response Element* (RRE) – Elemente, die aus dem Herstellungsprozess stammen und für die Verpackung bzw. Transport des Virusgenom bedeutend sind (Kuzembayeva *et al.* 2014). Außerdem kodiert eine Sequenz für die *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES), die dazu führt, dass laut Hersteller hier das Puromycinresistenzgen und das Fluoreszenzgen als ein Transkript exprimiert werden (Gurtu *et al.* 1996). Darüber hinaus enthält der Vektor laut Hersteller eine Sequenz für die Expression des *Woodchuck hepatitis Post-transcriptional regulatory element* (WPRE), das die Expression der kodierten Sequenzen erhöht (Zufferey *et al.* 1999).

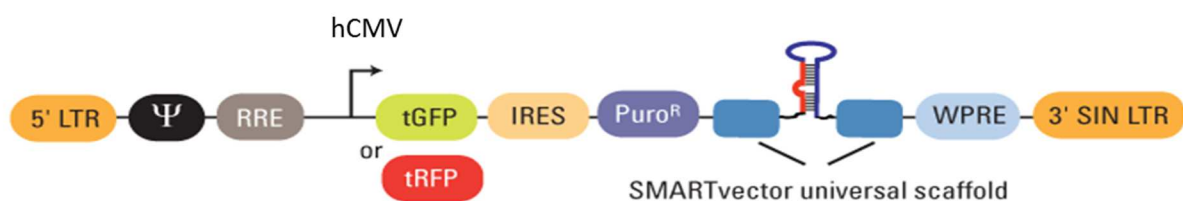


Abbildung 6: Schematische Darstellung der eingesetzten lentiviralen Vektoren (Thermo Scientific SMARTchoice Lentiviral shRNA, Technical Manual, 2012)

Der Vektor kodiert u.a. für eine 5' LTR, eine ψ -Verpackungssequenz, das *Rev Response Element* (RRE), das Fluoreszenzreporterprotein tGFP/tRFP, die *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES), das Puromycinresistenzprotein PuroR, das *Woodchuck hepatitis Post-transcriptional Regulatory Element* (WPRE) und das zur Selbst-Inaktivierung des Virus führende 3' SIN LTR.

Optimierung der lentiviral-vermittelten stabilen RNAi in MDA-MB-231- und BT549-Zellen

In dieser Arbeit wurde die stabile Herunterregulierung mittels lentiviral vermittelter RNAi für die Zelllinien MDA-MB-231 und BT549 optimiert. Vor der Verminderung der Zielgene wurde zur Bestimmung der optimalen Konzentration des Puromycin in WST-1 Test durchgeführt, um die Viabilität der Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Puromycinkonzentrationen (0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 3,5 µg/ml, 5 µg/ml) im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrolle (0 µg/ml) festzustellen. Außerdem waren Varianten des Transduktionsmediums (Voll- (10%-FCS), Serum-reduziertes- (1%-FCS), Serum-freies (0,1%-FCS) Kulturmedium) getestet worden. Auch wurde der Effekt einer Zugabe von Polybrene® überprüft. Hierbei handelt es sich um das kationische Polymer Hexadimetrin Bromid, das durch die Neutralisierung der Virionenladung und der Zytoplasmamembranladung die Abstoßung reduziert und die Membranfusion der retroviralen Vektoren fördert (Coelen *et al.* 1983, Davis *et al.* 2002). Die Konzentration des Polybrene® wurde von standardmäßig 1 µg/ml auf 2 µg/ml erhöht. Außerdem wurde die Zellzahl von erst 1×10^4 auf 3×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 12-Loch Zellkulturplatte erhöht. Auch wurde die eingesetzte Menge an Viruspartikeln pro Zelle, die als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet wird, im Laufe der Versuche von 10 bzw. 20 auf 30 Transduktionseinheiten (*transduction units*, TU) erhöht. Das eingesetzte Volumen an Viruspartikellösung errechnet sich aus der MOI, multipliziert mit der geschätzten zu transduzierenden Zellzahl pro Vertiefung, dividiert durch den vom Hersteller angegebenen Virustiter (VT) in der Virussuspension (Abb. 7).

$$\frac{\text{MOI} \times \text{Zellen pro Vertiefung}}{\text{Virustiter}} = \text{einzusetzendes Volumen der Virussuspension}$$

Abbildung 7: Formel zur Errechnung des einzusetzenden Volumens der Virussuspension

In ersten Versuchen wurde nur je ein lentiviraler Vektortyp, der an eine spezifische Sequenz der mRNA bindet, zur Herunterregulierung eingesetzt. Nachdem sich herausstellte, dass die Expressionsverminderung nicht effizient genug war, wurden in den Folgeversuchen je Infektionsansatz drei Vektortypen (Tab. 15) zur Bindung einer Ziel-mRNA eingesetzt (Appendix 1). In Anlehnung an die von D'Alessio *et al.* 2008 beschriebenen Methode zur

retroviralen Transduktion von Keratinozyten (vier Infektionsrunden binnen zwei Tagen), wurde hier die Transduktion einmal nach 20 h wiederholt und eine stabile Verminderung aller Zielproteine (uPAR, uPA und IGF-1R) erreicht. Als Kontrollen wurden zum einen ausschließlich mit Polybrene behandelte Reaktions-Kontrollansätze, als Negativ-Kontrolle ein Vektortyp, der laut Hersteller für eine nicht-zielgerichtete shRNA-Sequenz kodiert (*SMARTvector 2.0 Non-targeting hCMV-TurboGFP Particles*) und als Positiv-Kontrolle ein Vektor mit einer gegen die mRNA von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) gerichteten shRNA-Sequenz (*SMARTvector 2.0 Human GAPD hCMV-TurboGFP Control Particles*) verwendet. In 12-Loch Zellkulturplatten wurden je 3×10^4 BT549- bzw. MDA-MB-231-Zellen je Vertiefung ausgesät und 42 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Dann wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal kurz mit 1 ml PBS gewaschen und dieses wieder entfernt. Dann wurden je Vertiefung 300 µl Transduktionsmedium (Tab. 16) vorgelegt und 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. In je einem 1,5 ml-Röhrchen pro Transduktionsansatz wurden 300 µl Transduktionsmedium vorgelegt und mit 2 µg/ml Polybrene® versehen. Dann wurde das jeweilige Virussuspensionsvolumen für eine MOI von 30 TU je lentiviraler Vektortyp hinzugefügt und die Suspension in die Vertiefungen mit den Zellen gegeben. Nach 20 h wurden die Überstände abgenommen und erneut, für jeden Ansatz 600 µl Transduktionsmedium, 2 µg/ml Polybrene® und das Virussuspensionsvolumen für eine MOI von 30 TU pro Vektortyp in einem 1,5 ml-Röhrchen vermengt und auf die jeweiligen Zellansätze gegeben. Nach 24 h wurde der Überstand entfernt und die Zellen einmal mit PBS kurz gewaschen. Dieses wurde entfernt und das jeweilige Vollkulturmedium auf die Zellen gegeben. Wenn die Zellen 80% konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen in 25 ml-Zellkulturflaschen überführt und mit 5 µg/ml Puromycin selektiert. Diese Selektion wurde in der Folge einmal wöchentlich für mindestens 48 h durchgeführt.

Tabelle 15: Zur Transduktion eingesetzte lentivirale Vektoren (Dharmacon, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB)

Zielprotein	Vektorbezeichnung Clone ID	Katalognummer	shRNA-Sequenz
uPAR	SMARTvector 2.0 Human PLAUR hCMV-Turbo GFP shRNA	SH-006388-01-10 VSH6286-EG5329	TTCGGGAATAGGTGACAGC
uPAR	SMARTvector 2.0 Human PLAUR hCMV-Turbo GFP shRNA	SH-006388-02-10 VSH6286-EG5329	TCGGTAAGGCTGGTGATCT

uPAR	SMARTvector 2.0 Human PLAUR hCMV-Turbo GFP shRNA	SH-006388-03-10 VSH6286-EG5329	TTGCACAAGTCTAACCCAC
uPA	SMARTvector 2.0 Human PLAU hCMV-Turbo GFP shRNA	SH-006000-01-10 VSH6286-EG5328	TGCGTGTGGAGTTAAGCC
uPA	SMARTvector 2.0 Human PLAU hCMV-Turbo GFP shRNA	SH-006000-02-10 VSH6286-EG5328	TTCTCGATGGTGGTGAATT
uPA	SMARTvector 2.0 Human PLAU hCMV-Turbo GFP shRNA	SH-006000-03-10 VSH6286-EG5328	TCCGAATTTCTTTGGGCAG
IGF-1R	SMARTvector 2.0 Human IGF-1R hCMV-Turbo RFP shRNA	SH07-003012-04-10 VSH6287-EG3480	TCCTCCATGCGGTAAATTT
IGF-1R	SMARTvector 2.0 Human IGF-1R hCMV-Turbo RFP shRNA	SH07-003012-05-10 VSH6287-EG3480	TTCACAAGGGATGCAGTAC
IGF-1R	SMARTvector 2.0 Human IGF-1R hCMV-Turbo RFP shRNA	SH07-003012-06-10 VSH6287-EG3480	TGATGATGCGATTCTTCGA
GAPDH	SMARTvector 2.0 Human GAPD hCMV-Turbo GFP control particles	S-001000-01	Keine Angabe durch Firma
Non-targeting	SMARTvector 2.0 Non-targeting hCMV-TurboGFP control particles	S-005000-01	Keine Angabe durch Firma

Tabelle 16: Zusammensetzung der Transduktionsmedien

Zelllinie	BT549	MDA-MB-231
Medium	RPMI 1640 GlutaMAX	DMEM GlutaMAX
FCS	0,1%	0,1%
Bovines Insulin	10 µg/ml	-
MEM NEAA	-	1%

Detektion unter dem Fluoreszenzmikroskop

Um die erfolgreiche Transduktion der Zellen zu überprüfen, wurde am Fluoreszenzmikroskop AxioVert 200M die Expression des GFP (Exzitation: 482 nm, Emission: 502 nm) bzw. RFP (Exzitation: 553nm, Emission: 574 nm) überprüft. Als Exzitationsfilter wurden diejenigen für GFP bzw. Cy3 (Indocarbocyanin) verwendet. Zur Dokumentation wurden - neben denen mit Fluoreszenzdetektion - außerdem noch Durchlichtaufnahmen gemacht. Mit dem 10x-Objektiv wurden Aufnahmen im Hellfeld mit einer Belichtungszeit von ca. 300 ms, GFP Fluoreszenzaufnahmen mit einer Belichtungszeit von 700-800 ms und bei RFP Fluoreszenzaufnahmen mit einer Belichtungsdauer von 900-1000 ms aufgenommen. Als Software wurde für die Aufnahmen *AxioVision* verwendet.

2.5 Genexpressionsanalyse-Techniken

Für die Zellinientypisierung wurde DNA aus den eingesetzten Zelllinien isoliert. Außerdem wurden mRNA bzw. cDNA Quantifizierungsanalysen durchgeführt, um die Effizienz der RNA-Interferenz zu überprüfen. Hierzu wurde RNA aus Zellen isoliert, eine allgemeine Reverse Transkription (RT) und anschließend eine quantitative Polymerasekettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) durchgeführt.

2.5.1 DNA-Extraktion

DNA wurde mit dem *DNeasy Blood & Tissue* Kit nach dem Protokoll des Herstellers aus den Zellen isoliert. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen 5 min bei 2000 rpm in der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert und in 200 μ l PBS resuspendiert. Anschließend wurden 20 μ l Proteinase K zur Zelllyse hinzugefügt, die Proben mit 200 μ l des im Kit enthaltenen AL-Puffers versetzt und 10 min bei 56°C inkubiert. Dann wurden 200 μ l Ethanol (100%) zugegeben, vermischt und die Suspension auf die im Kit vorhandenen Säulchen (Kieselsäuremembran) gegeben und bei 8000 rpm 1 min in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert. Die DNA bindet an die Kieselsäuremembran. Um u.a. Enzyminhibitoren oder andere störenden Moleküle zu entfernen, wurden die Säulchen zuerst mit 500 μ l des mitgelieferten Waschpuffer AW1 versehen, bei 8000 rpm 1 min in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach der Zugabe von 500 μ l des mitgelieferten Waschpuffer AW2 und Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 min in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412, wurde der Durchfluss verworfen und zusätzlich noch ein zweites Mal ohne Zugabe von Puffer zentrifugiert um noch verbliebenen Waschpuffer aus der Säule zu entfernen. Dann wurden die Säulchen in neue 1,5 ml-Röhrchen überführt, 200 μ l des mitgelieferten AE-Puffer hinzugefügt, 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch die einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 eluiert. Die Konzentration der DNA wurde mit dem ND-1000 Spektrophotometer bestimmt und bei -20 °C gelagert.

2.5.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Isolation wurde das *mirVana miRNA Isolation* Kit verwendet, mit dem auch kleine RNAs wie microRNAs extrahiert werden können. Laut dem Hersteller Life Technologies verbindet die Vorgehensweise in diesem Kit die Vorteile der Acid-Phenol bzw. Phenol-Chloroform Aufreinigung (sehr reine RNA) mit den Vorteilen der Festphasenextraktion (schnell). Aufgrund der speziellen Glasfaserfilter werden auch sehr kleine RNAs isoliert. Die Zellen einer 250 ml-Zellkulturflasche wurden abgelöst. Ca. 1/10 dieser Zellen wurde in ein 2 ml-Röhrchen überführt, bei 2000 rpm 5 min in der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen, bei 2000 rpm 5 min in der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden sofort bei -80 °C eingefroren. Zur RNA-Extraktion wurden die Pellets auf Eis aufgetaut und dann nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die extrahierte RNA wurde in 100 µl Ampuwa-H₂O eluiert und deren Konzentration mit dem ND-1000 Spektrophotometer bestimmt. Hierbei wird die Absorption bei 260 nm photometrisch vermessen und daraus die Konzentration ermittelt. Das Verhältnis der Werte von 260 nm zu 280 nm zeigt die Reinheit der RNA an, wobei ein Bereich von 1,8-2,1 eine ausreichende Reinheit anzeigt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.5.3 Reverse Transkription

Um die Effizienz der RNAi-basierten Herunterregulierung der Zielmoleküle auf RNA-Ebene analysieren zu können, wurden qPCR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die isolierte mRNA mit Reverser Transkription (RT) in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Für diese wurde das *High-capacity RNA-to-cDNA*-Kit verwendet. Der Reaktionsmix enthält zum einen *oligo-dT-16 Primer*, die die Poly-A Sequenz der mRNA binden, und zum anderen eine Mischung aus zufällig gewählten Oktamer Oligonukleotid *Primern*. Letztere binden aufgrund ihrer Sequenz u.a. an alle vorhandenen mRNA Fragmente und gewährleisten, dass die gesamte in dem Ansatz vorhandene mRNA zu cDNA revers transkribiert wird (Feinberg and Vogelstein 1983). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und je Ansatz 100 ng extrahierter RNA (5 µl einer 20 ng/µl Verdünnung) in den RT-Mix eingesetzt (Tab. 17).

Die RT-Reaktion (Tab. 18) erfolgte im *Labcycler*. Die cDNA Ansätze wurden sofort weiter für qPCR-Analysen verwendet oder bei 4 °C gelagert.

Tabelle 17: Zusammensetzung des RT-Mixes

Mastermix	Volumen
RNA-Isolat	5 µl
RT-Puffer (2x)	10 µl
Enzym Mix (20x)	1 µl
Ampuwa H ₂ O	4 µl

Tabelle 18: Programm zur Reversen Transkription

Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
37°C	60 min	1
95°C	5 min	1
4°C	∞	

2.5.4 Quantitative PCR (qPCR)

Zur quantitativen mRNA Expressionsanalyse wurde hier das *TaqMan*[®] System von Applied Biosystems verwendet (Holland *et al.* 1991). Dieses basiert darauf, dass die *TaqMan*[®]-Sonden am 5`Ende mit einem Fluoreszenzreporter 6-Carboxyfluorescein-phosphoramidit (6-FAM-phosphoramidit, FAM) und am 3`Ende mit einem *Quencher* (*non-fluorescent quencher*, NFQ) versehen sind. Basierend auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-System emittiert das Reporterfluorochrom FAM nach Anregung zwar ein Photon bei einer Wellenlänge von 488 nm, der *Quencher* nimmt dieses aber - aufgrund der räumlichen Nähe - sofort auf und unterdrückt auf diese Weise die bei 518 nm detektierbare Fluoreszenzemission. Das heißt, solange die zwei Komponenten an der Sonde gebunden sind, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Die Sonden binden an spezifische Sequenzen der cDNA. Während der DNA-Amplifikation wird die Sonde aufgrund der 5`Exonuklease-Aktivität der TaqDNA-Polymerase zerstört und das Fluorochrom FAM freigesetzt. Durch diese räumliche Trennung von dem *Quencher* wird die Fluoreszenzemission des FAM nach einer Anregung nachweisbar. Da die Emission proportional zu der Amplifikation der cDNA ist, wird hieraus auf die Quantität der vorhandenen cDNA bzw. ursprünglich mRNA geschlossen (Bustin 2000).

Es wurden 40 Amplifikationszyklen durchgeführt und die detektierte Fluoreszenz zu jedem Zeitpunkt gespeichert. Für die Auswertung ist der exponentielle Kurvenverlauf entscheidend, der hier mit Bezug auf die in der Literatur beschriebenen relativ quantifizierenden C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)-Methode (Livak and Schmittgen 2001) berechnet wurde. Hierbei sind zum einen der Schwellenwert (*threshold*), der Punkt an dem die Fluoreszenz sich vom Hintergrund abhebt und zum anderen der C_T -Wert wichtig. Letzterer ist die Zyklenanzahl, an der die Fluoreszenzquantität den *threshold* überspringt. Als Kalibrator wurde das Referenzgen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (*HPRT1*) verwendet, das ein standardmäßiges Haushaltsgen ist. Die qPCR (Ablauf in Tab. 20) wurde in dem Rotor-Gene®Q durchgeführt. Es wurde TaqMan®Universal PCR Master Mix, der unter anderem dNTPs und die AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase enthält (Tab. 19), außerdem 1 µl des jeweiligen *Gene Expression Assays* (Tab. 21) mit den qPCR-Sonden und 5 µl Ampuwa-H₂O eingesetzt. Die cDNA-Ansätze aus der RT-PCR wurden 1:5 mit Ampuwa-H₂O verdünnt und hiervon 4 µl für die qPCR eingesetzt. Es wurden alle Ansätze in Triplikaten durchgeführt und als Negativ-Kontrolle dienten Ansätze, in denen statt 4 µl cDNA Ampuwa-H₂O verwendet wurde. Die Ansätze mit dem Kalibrator *HPRT1* wurden ebenfalls in Triplikaten und mit Negativ-Kontrollen durchgeführt. Auf den jeweiligen C_T -Wert von *HPRT1* wurden die C_T -Werte der Zielgene normalisiert (ΔC_T). Aus Triplikaten wurde der Mittelwert der ΔC_T -Werte gebildet und ins Verhältnis zu dem Mittelwert der unbehandelten Reaktions-Kontrolle gesetzt. Hieraus ergab sich je Ansatz der $\Delta\Delta C_T$, wobei wiederum aus den Triplikaten der Mittelwert (MW $\Delta\Delta C_T$) berechnet wurde. Durch die Ermittlung der Potenz dieses Wertes, $2^{-MW\Delta\Delta C_T}$ lässt sich die Effizienz der Expressionsverminderung des Zielgens im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrolle darstellen. Die Standardabweichung (SD) wurde aus den $\Delta\Delta C_T$ -Werten berechnet.

Tabelle 19: Zusammensetzung des qPCR-Mixes

Mastermix	Volumen
RT-Produkt	4 µl
Gene Expression Assays	1 µl
TaqMan®Universal PCR Master Mix	10 µl
Ampuwa-H ₂ O	5 µl

Tabelle 20: Programm zur qPCR

Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15 sek	40
60°C	1 min	1
4°C	∞	

Tabelle 21: qPCR Gene Expression Assays (mit genspezifischen PCR Primern bzw. Taqman-Sonden)

Produkt	Assay-Probe ID	Hersteller
uPAR-Assay	Hs00958880_m1	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
uPA-Assay	Hs01547054_m1	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IGF-1R-Assay	Hs00609566_m1	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPRT1-Assay	Hs02800695_m1	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.6 Proteinbiochemische Techniken

Zur Darstellung von Effekten der RNAi auf zelluläre Signalkaskaden wurde die Expression bzw. Phosphorylierung von Proteinen untersucht. Hierzu wurden Proteine aus Zellen extrahiert, deren Konzentration bestimmt und mit Immunblot analysiert.

2.6.1 Analyse von Proteinen aus Zellen und Zellkulturüberständen

Hierzu wurden die Zellen vom Kulturflaschenboden gelöst, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm, 5 min in der Rotanata 560R Zentrifuge mit dem Rotor 5655 zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und nochmals 5 min bei 1500 rpm in der Rotanata 560R Zentrifuge mit dem Rotor 5655 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in dem für die Zellzahl adäquaten Volumen (ca. 100 µl pro 1×10^6 Zellen) Lysepuffer (Tab. 22) aufgenommen. Die Proben wurden auf Eis 60 min inkubiert, das Lysat alle 15 min gevortext und dann mit dem Ultraschall Homogenisator *Sonoplus* bei einer Stärke von 30%, 30 sek behandelt, um Zellmembran und Zellkernmembran aufzuschließen und eine möglichst große Menge Protein zu extrahieren. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C mit 13.000 rpm in der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 10 min zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und in neue 1,5 ml-Röhrchen überführt. Die Proben wurden kurzzeitig bei -20 °C, für lange Zeit bei -80 °C gelagert.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Lysepuffers

Komponenten	Volumen
Tissue-Protein Extraction Reagent	600 µl
7x cOmplete Mini Proteinaseinhibitoren	100 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	7 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	7 µl

Neben den Effekten auf intrazelluläre Proteine wurde auch der Kulturüberstand der Zellen mit Western Blot analysiert. Hierzu wurde das Kulturmedium von den Zellen in 15 ml-Röhrchen überführt, 5 min bei 2000 rpm in der Rotanata 560R Zentrifuge mit dem Rotor 5655 zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt. 1,8 ml des Überstands wurden in 2 ml-Röhrchen überführt und mit 100 µl 7x cOmplete Mini Proteinaseinhibitoren versehen, um einen Abbau der Proteine zu verhindern. Anschließend wurden die Ansätze in der Vakuumzentrifuge *Concentrator Plus* auf ca. 200 µl konzentriert und bei -20 °C bzw. -80 °C eingefroren.

2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

BCA-Test

Die Konzentration der extrahierten Proteine wurde mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* bestimmt. Dieser basiert auf der Reduzierung von Cu^{2+} zu Cu^{1+} Ionen durch die Komplexbildung von Kupferatomen mit den Peptidbindungen der Proteine im alkalischen Milieu (Biuret Reaktion) (Gornall *et al.* 1949). Durch die Zugabe von Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) wird ein Komplex aus dieser und den freien Kupferionen im Verhältnis 2:1 geformt. Dies führt zu einem violetten Farbumschlag, der bei 562 nm die stärkste Absorption zeigt. Letztere ist linear zu der in dem Ansatz enthaltenen Proteinkonzentration (Smith *et al.* 1985). Bei diesem Vorgehen dient eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenzstandard. Es wurden Ansätze mit je 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 µg/µl BSA in 50 µl hergestellt. Die Proteinlysate wurden 1:10 in 50 µl Ampuwa-H₂O verdünnt. Dann wurden die im Kit enthaltenen Lösungen B und A im Verhältnis 1:50

vermischt und je 1 ml dieser Lösung zu Standard- und Probenansätzen gegeben. Die Ansätze wurden 15 min bei 60 °C und 800 rpm im Heizblock inkubiert. Je Ansatz wurden 200 µl in Quadruplikaten in eine 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert. Mit dem *microplate reader* 680 wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt und anhand des Standards die Proteinkonzentration in den Proben berechnet.

Bradford-Test

Eine alternative Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration, die in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der ICPL-Proteinmarkierung (*isotope-coded protein label*, ICPL™) standardmäßig durchgeführt wurde, ist die Analyse mittels Bradford-Test. Hierbei bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 an die in dem Lysat vorhandenen Proteine und bewirkt eine Verschiebung der Absorption des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Der Anstieg der Absorption wird fotometrisch analysiert und der mitgeführte BSA-Standard gibt Auskunft über die Proteinkonzentration in der vermessenen Probe (Bradford 1976). Hierzu wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,125 mg/ml als Proteinstandard hergestellt. Die zu vermessenden Proben wurden 1:5 in 15 µl mit HPLC-H₂O verdünnt. In Triplikaten wurden je 5 µl der Ansätze und Standards in eine 96-Loch-Kulturplatte pipettiert und 200 µl der Reaktionslösung des *Pierce™ Coomassie Bradford Protein Assay Kits* zugegeben. Die Platte wurde 10 min bei RT inkubiert, dann mit dem *Infinite 200 Pro multimode reader* die Extinktion bei 520 nm vermessen und anhand des Standards die Proteinkonzentration bestimmt.

2.6.3 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese von Ulrich K. Lämmli 1970 beschriebene Methode dient zur Auftrennung von Proteinen aus Proteingemischen, wie Zelllysaten (Laemmli 1970). Hierbei werden die eingesetzten Proteine nach ihrer Molekülmasse im Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennt. Der Lämmli-Puffer, der zu den Proteinproben gegeben wird, enthält Natriumdodecylsulfat (SDS), das zu einer negativen Ladung der Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung führt (Weber and Osborn 1969). Durch das Anlegen von elektrischer Spannung wandern die Proteine Richtung Anode im elektrischen Feld. Das in dem Puffer enthaltene, reduzierende β-Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken der Proteine

(Anfinsen and Haber 1961). Dies führt, zusätzlich zum Aufspalten von Wasserstoffbrückenbindungen durch die Inkubation bei 95 °C, zu einer Denaturierung bzw. Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstrukturen und damit zu einer Linearisierung der Proteine. Aufgrund der Feinmaschigkeit des Polyacrylamidgels wandern kleine Proteine schneller durch das Gel als größere. Hier wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet, die durch eine Aufteilung in Sammel- (4% Acrylamid)- und Trenngel (10% Acrylamid) (Tab. 23) charakterisiert ist. Im Sammelgel (pH 6,8), das eine größere Porengröße aufweist, werden die Proteine zuerst angereichert und anschließend im engmaschigeren Trenngel (pH 7,8) ihrer Molekülmasse nach aufgetrennt (Rehm and Letzel 2010). In dieser Arbeit wurden die Gele - außer die für die Auftrennung der ICPL-Ansätze - in Plastikkassetten gegossen. Je Ansatz wurden mit Ampuwa-H₂O 50 µg Protein verdünnt, mit 4x Lämmli-Puffer (Tab. 5) versehen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben 1 min bei 4 °C mit 13.000 rpm kurz in der Hettich EBA12R Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert und in die Geltaschen gegeben. Zusätzlich wurden 5 µl des *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* als Protein Marker aufgetragen, der sich aus gefärbten, rekombinanten Proteinen mit bekannter Molekülmasse zusammensetzt. Die Gele wurden in den Kammern fixiert und diese mit 1x Laufpuffer (Tab. 5) gefüllt. Für die Auftrennung im Sammelgel wurde für ca. 30 min eine elektrische Spannung von 85 V und im Trenngel von 135 V für ca. 2h angelegt.

Tabelle 23: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Reagenz	10% Trenngel	4% Sammelgel
30% Acrylamid/ Bis	3,3ml	0,66ml
0,5M Tris, pH 6.8	-	1,26ml
1,5M Tris, pH 8.8	2,5ml	-
10% SDS	100µl	50µl
H ₂ O	4,05ml	3,3ml
TMED	5µl	5µl
APS (10%, w/v)	50µl	25µl

2.6.4 Western Blot

Um weitere Analysen mit den mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen durchführen zu können wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin *et al.* 1979, Brunette 1981). Dies geschieht wiederum im elektrischen Feld (Elektrotransfer), sodass die Proteine zur Anode wandern. Hier wurde das Tank-Blot-System *Mini Trans-Blot Cell* verwendet, bei dem die elektrische Spannung (100 V) an einem Blottank angelegt wird. Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel und der unterste Teil des Trenngels des Polyacrylamidgels entfernt und dieses in 1x Transferpuffer (Tab. 5) 5 min inkubiert. Ebenso wurde die Nitrozellulosemembran erst 5 min in MilliQ-H₂O und anschließend 5 min in 1x Transferpuffer äquilibriert. Dann wurde unter ständig nassen Bedingungen die Kassette zusammengesetzt. Hierbei wurden auf der künftigen Anodenseite zuerst ein Schwamm, dann ein Blatt *Whatman*-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel, wieder ein *Whatman*-Papier und zuletzt ein Schwamm geschichtet und die Kassette verschlossen. Die Kassetten wurden in die Blotkammer gegeben und diese mit 1x Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte bei 4 °C, 100 V für 2,5 h. Zur Proteindetektion und Überprüfung des Transfers wurden die Membranen anschließend in 6 ml der Ponceau S-Färbelösung (0,5% Ponceau S + 5% Essigsäure + H₂O) inkubiert (Romero-Calvo *et al.* 2010), das an die positiv geladenen Seitenketten von Proteinen reversibel bindet und diese dadurch rot auf der Membran markiert. Das überschüssige Ponceau S wird durch 2-maliges Waschen mit 4 ml MilliQ-H₂O entfernt und die Membran zur Archivierung mit dem Flatbed-Scanner gescannt. Die unspezifischen Proteinbindestellen auf der Membran wurden mit je 6 ml 5%-Magermilch-1xTBS-T-Lösung bei 37 °C, 60 min blockiert.

Dann wurde die Membran mit Primärenantikörpern (Tab. 24) inkubiert, die gegen das Zielprotein gerichtet sind. Hierzu wurden die jeweiligen Primärantikörper in 7 ml 5%-Magermilch-1xTBS-T-, 3%-BSA-1xTBS-T- oder 5%-BSA-1xTBS-T-Lösung verdünnt und ÜN bei 4 °C oder 4 h bei RT inkubiert. Dann wurden alle ungebundenen Primärantikörper durch einen Waschschriff mit 1xTBS-T (Tab. 5) (zweimal kurz, zweimal 5 min) entfernt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Tab. 25), der gegen die Spezies des Primärantikörpers (z.B. Maus oder Hase) gerichtet ist und an den Primärantikörper bindet, 1:2000 in 5%-Magermilch-1xTBS-T-Lösung verdünnt und 60 min bei RT auf der Wippe

inkubiert. Durch einen erneuten Waschschrift mit 1xTBS-T (zweimal kurz, zweimal 5 min) wurden die überschüssigen Sekundärantikörper entfernt. An diese Sekundärantikörper ist eine Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Diese fungiert als Katalysator für die Umsetzung von Luminol zu 3-Aminophthalat, das durch die Freisetzung von Photonen in einen energetisch weniger angeregten Zustand übergeht (Khan *et al.* 2014). Zur Proteindetektion wurde das *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* verwendet, dessen Komponenten in der Verdünnung 1:1 eingesetzt wurden. 1 ml dieser Detektionslösung wurde auf der Membran verteilt und 5 min unter Lichtabschluss inkubiert. Die Membran wurde dann in eine Entwicklerkassette gegeben, ein Röntgenfilm unter Lichtabschluss aufgelegt und dieser manuell mit der Entwicklerlösung entwickelt und mit Fixierlösung fixiert. Die im Zuge der Chemilumineszenz-Reaktion emittierten Photonen wurden als schwarze Bande auf dem Film sichtbar und indizieren die Proteinexpression.

Wenn keine Banden erkennbar waren, wurden zur Erhöhung der Sensitivität der Detektion die Komponenten des *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Kits* 1:5 mit denen des *SuperSignal West Pico Kits* verdünnt. Um die Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurden die Membranen mit 5 ml des *Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffers* 5 min bei RT auf der Wippe inkubiert. Hierbei werden die Bindungen der Antikörper gegen die Proteine durch die Absenkung des pH-Werts gelöst. Anschließend wurde zweimal kurz mit MilliQ-H₂O der Puffer entfernt und die Membran erneut 1 h mit 5%-Magermilch-1xTBS-T-Lösung bei 37 °C zum Blockieren der unspezifischen Bindestellen inkubiert.

Zur densitometrischen Vermessung der auf den Filmen sichtbaren Banden, wurden diese mit dem Flatbed-Scanner gescannt und die Banden mit der Software *Image Studio Lite v5.0* analysiert. Die Werte wurden alle auf den densitometrischen Wert der zugehörigen α -Tubulin-Banden normalisiert und anschließend ins Verhältnis zu den Werten der Reaktions-Kontrolle gesetzt.

Tabelle 24: Im Western Blot eingesetzte Primärantikörper

Zielprotein	Verdünnung Lösung	kDa	Spezies	Produkt- nummer	Hersteller Unternehmenssitz
Akt	1:10.000 3% BSA	60	Hase	9272	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
phospho-Akt	1:500 3% BSA	60	Maus	4051	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
α -Tubulin	1:20.000 3% BSA	50	Maus	T5168	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cyr61	1:1000 3% BSA	40	Hase	sc-13100	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
ER	1:500	66	Maus	sc-8002	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
GAPDH	1:5000 3% BSA	37	Hase	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
GPIIb/IIIa	1:500 3% BSA	72	Hase	ab38859	Abcam, Cambridge, GB
HER1/EGFR	1:500 3% BSA	170	Maus	M7298	Dako, Agilent Technologies Santa Clara, USA
HER2	1:6000 3% BSA	185	Hase	A0485	Dako, Agilent Technologies Santa Clara, USA
IGF-1R β	1:2000 3% BSA	98	Hase	3027S	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
cMet	1:1000 3% BSA	160	Hase	Ab51067	Abcam, Cambridge, GB
phospho-Met	1:400 3% BSA	145	Hase	3126	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
p27	1:500 3% BSA	27	Maus	610242	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
p38 MAPK	1:2000 3% BSA	43	Hase	9212	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
phospho-p38 MAPK	1:2000 5% BSA	43	Hase	9211	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
p44/42 MAPK	1:10.000 3% BSA	42/44	Hase	4695	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
phospho-p44/42 MAPK	1:5000 5% BSA	42/44	Hase	4376	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
PAI-1	1:1000 5% MMP	45 48	Ziege	ab31280	Abcam, Cambridge, GB
PARP	1:1000 3% BSA	116 89	Hase	9532	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
Paxillin	1:500 3% BSA	68	Hase	2542	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
phospho-Paxillin	1:500 3% BSA	68	Hase	2541	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
PTEN	1:2000 5% BSA	54	Hase	9559	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB

phospho-PTEN	1:1000 3% BSA	54	Hase	9554	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
STAT3	1:2000 3% BSA	92	Maus	610190	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
phospho-STAT3	1:1000 5% BSA	86	Hase	9134	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
PR	1:1000 5% BSA	118	Hase	3157	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
uPA	1:1000 3% BSA	35 50	Hase	ab24121	Abcam, Cambridge, GB
uPAR	1:500 5% MMP	35-55	Maus	IID7	von V. Magdolen, FK, TUM zur Verfügung gestellt
uPAR	1:1000 3% BSA	35-55	Ziege	AF807	R&D Systems, Minneapolis, USA
YB-1	1:500 3% BSA	49	Hase	4202	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB

Tabelle 25: Im Western Blot eingesetzte Sekundärantikörper

Antikörper	Produktnummer	Hersteller	Unternehmenssitz
ECL™Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase Antibody (fom sheep)	NA9310-1ML	GE Healthcare	Chalfont St Giles, GB
ECL™Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase Antibody (fom donkey)	NA934-1ML	GE Healthcare	Chalfont St Giles, GB
Rabbit anti-goat IgG- HRP	sc-2768	Santa Cruz Biotechnologies	Dallas, USA

2.7 Co-Immunpräzipitation

Eine Methode zur Analyse von Protein-Protein-Komplexen stellt die co-Immunpräzipitation (co-IP) dar. Diese ist eine Weiterentwicklung der Immunpräzipitation, mit der Proteine spezifisch aus z.B. Zelllysaten gewonnen werden. Mit der co-IP werden nicht nur die Zielproteine, sondern auch interagierende Proteine in einem Ausfällungsvorgang mitisoliert. In dieser Doktorarbeit wurde basierend auf einer bereits beschriebenen Methode (Molatore *et al.* 2010) eine co-IP für uPAR und potentielle Interaktionspartner etabliert, um bisher nicht bekannte Interaktionspartner zu identifizieren.

Das co-IP Protokoll wurde für die massenspektrometrische Analyse (*Core Facility Proteomics*, HMGU) optimiert. So wurde u.a. die Zusammensetzung des IP-Puffers verändert.

Wie von Molatore S. *et al* 2010 beschrieben, wurde zur Zelllyse anfänglich 1,5% Triton X-100 eingesetzt, ein nicht-ionisches Detergenz, das die zelluläre Lipidschicht angreift (Koley and Bard 2010) und dessen Konzentration dann auf 0,5% reduziert. Für die massenspektrometrischen Analysen wurde anstatt Triton X-100, 1% bzw. 0,5% NonidetP40 Substitute eingesetzt. Es wurden die Anti-uPAR Antikörper IID7 (Luther *et al.* 1997) und #AF807 in unterschiedlichen Konzentrationen getestet und das Volumenverhältnis von Antikörper zu *beads*, die eingesetzte Proteinmenge, die Inkubationszeiten des Lysates und die Häufigkeit bzw. die eingesetzten Puffer der abschließenden Waschschriffe optimiert. In dem folgenden Absatz werden zwei Methoden beschrieben, die zu der co-IP von IGF-1R mit uPAR führte (A) bzw. die zur finalen Analyse in der Massenspektrometrie eingesetzt wurde (B).

Co-IP an MDA-MB-231-Zellen

Für je drei co-IP Ansätze mit uPAR als Zielprotein und je drei Kontrollansätze mit dem Anti-Ziege-IgG-Isotypantikörpers wurden MDA-MB-231-Zellen in einer 650 ml-Zellkulturflasche kultiviert, bis sie 80% konfluent gewachsen waren. Dann wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen 1 min in 8 ml PBS inkubiert.

Für Protokoll A wurden 500 µl IP-Puffer A und 1x *Complete Mini* Proteinaseinhibitoren zugegeben, die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von dem Flaschenboden gelöst und in ein 2 ml-Röhrchen überführt. Mit weiteren 500 µl IP-Puffer A wurden die restlichen Zellen aus der Flasche in das Gefäß überführt und 45 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Ansätze 10 min mit 13.000 rpm bei 4 °C in der Pico17 Eppendorf Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert, der Überstand in ein neues 2 ml-Röhrchen überführt und die Proteinkonzentration des Lysats mit dem BCA-Test bestimmt. Je Ansatz wurden 500 µg Protein in 500 µl IP-Puffer A (+1x *Complete Mini* Proteinaseinhibitoren) in ein 1,5 ml-Röhrchen gegeben. Es wurden 3 µg (15 µl) Anti-uPAR Antikörper #AF807 bzw. für die Kontrollansätze 3 µg (15 µl) des in PBS vorverdünnten Anti-Ziege-IgG-Isotypantikörpers zugegeben. Auf dem Drehrad wurden die Ansätze 1 h bei 4 °C inkubiert, sodass die Antikörper spezifisch an die Proteinantigene (uPAR) binden konnten. Währenddessen wurden je 60 µl der Protein A/G PLUS Agarose *bead*-Suspension mit je 500 µl IP-Puffer A für

5 min bei 4 °C auf dem Drehrad gewaschen, 1 min mit 2500 rpm bei 4 °C in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dies wurde weitere zweimal wiederholt und die *beads* in 30 µl IP-Puffer resuspendiert, um ein Endvolumen von 60 µl zu erhalten. Dann wurden je 30 µl gewaschene *bead*-Suspension zu den IP-Ansätzen gegeben und diese ÜN auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert, sodass die Antikörper an die *beads* binden konnten. Nach 20 h wurden die Ansätze 1 min mit 2500 rpm bei 4 °C in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert, der Überstand verworfen und 500 µl IP-Puffer A zugegeben, um ungebundene Antikörper oder unspezifisch gebundene Proteine von den *beads* zu entfernen. Dies wurde einmal wiederholt, anschließend die *beads* in 500 µl PBS resuspendiert und 1 min mit 2500 rpm, bei 4 °C in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die *beads* zur Proteinelution in 60 µl 2x Lämmli-Puffer (Tab. 5) aufgenommen. Die Ansätze wurden bei 95 °C 5 min inkubiert und 1 min mit 13.000 rpm bei 4 °C in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert. Sie wurden dann entweder bei -20 °C eingefroren oder mit einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt.

Für das Protokoll **B** wurden die Zellen in 800 µl IP-Puffer B (0,5% NonidetP40, 5mM EDTA, ad 50 ml PBS) - versehen mit 1x cOmplete Mini Proteinaseinhibitoren - mit dem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst und mit weiteren 800 µl IP-Puffer B die restlichen Zellen aus der Flasche in das 15 ml-Röhrchen überführt. Dann wurde weiterverfahren wie für Protokoll A beschrieben, wobei 750 µg Protein je Ansatz, 4 µg (20 µl) Antikörper und 40 µl *Protein G Sepharose Fast Flow beads* eingesetzt wurden. Außerdem wurde für die abschließenden Waschschrte zweimal mit PBS inkubiert und auf IP-Puffer verzichtet. Die Ansätze wurden mit 13.000 rpm, 1 min bei 4 °C in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 abzentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml-Röhrchen überführt. Aus diesen Ansätzen wurden je 10 µl auf ein 10% SDS-PAGE-Gel geladen und 30 µl für die massenspektrometrischen Analysen an die *Core Facility Proteomics* (PROT, HMGU) gegeben. Dort wurde die *filter-added sample preparation* (FASP) Methode (Wisniewski *et al.* 2009) mit den Proben durchgeführt und eine LC-MS/MS massenspektrometrische Analyse durchgeführt (Hauck *et al.* 2010, Merl *et al.* 2012).

2.8 Isotope-Coded Protein Label (ICPL) und Massenspektrometrie

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur vergleichenden Expressionsanalyse von Proteinen in verschiedenen Ansätzen, welche von der Firma TOPLAB GmbH lizenziert und als Kit kommerziell erhältlich ist. Aufgrund der Technik können z.B. Proteome von behandelten Zellen, mit denen von unbehandelten Zellen verglichen werden. Die Methode beruht auf der unterschiedlich starken Isotopen-Markierung freier Aminogruppen von Lysinen und N-Termini von intakten Proteinen. Hierzu enthält das Kit drei Ansätze mit unterschiedlich stark isotopenmarkierter Nikotinsäure. Deren ursprüngliche Molekülmasse von 105,0215 Da (ICPL_0) erhöht sich durch die Markierung um 4 Da (ICPL_4) bzw. 6 Da (ICPL_6). Durch die Zugabe der unterschiedlich markierten Nikotinsäuren zu verschiedenen modifizierten Protein-Ansätzen ist es möglich, eine veränderte Expressionsintensität bestimmter Proteine in diesen Ansätzen nachzuweisen.

2.8.1 ICPL-Markierung und Gelelektrophorese

Zur ICPL-Markierung wurde das *SERVA ICPL™ Triplex Kit* verwendet. Die verschiedenen Ansätze der MDA-MB-231-Zellen (Reaktions-Kontrolle, uPAR-RNAi) und BT549-Zellen (Reaktions-Kontrolle, uPAR-RNAi, uPA-RNAi) wurden in Triplikaten in 25 ml-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert, das Medium entfernt, 5 ml PBS zugegeben und die Zellen mit Zellschabern vom Flaschenboden gelöst. Dann wurden die Zellen in 1,5 ml-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm 5 min mit der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µl des im Kit gelieferten Guanidin-HCl-Lysepuffers, versehen mit 1x cOmplete Mini Proteinaseinhibitoren, zur Zelllyse resuspendiert. Wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, wurden die Proben 2 min gemischt, 20 min bei 25 °C und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert, 2 min gevortext und 4x 30 Sek im Ultraschallbad Sonorex TK30 aufgeschlossen. Dann wurden die Proben wieder 1 min gevortext, 15 min bei 25 °C und 300 rpm im Thermomix inkubiert und nochmals 2 min mit dem Vortexer vermischt. Dann wurden die Proben 30 min bei 13.000 rpm mit der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit dem Rotor 75003424 zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen in ein frisches 1,5 ml-Röhrchen überführt.

Mit dem Bradford-Test wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Die ICPL-Markierung wurde in Triplikaten je Ansatz durchgeführt und je 50 µg Protein in 20 µl Guanidin-HCl Lysepuffers eingesetzt. Die Reaktions-Kontroll-Ansätze wurden mit ICPL-0 markiert, die uPAR-RNAi-Ansätze mit ICPL-4 und die uPA-RNAi-Ansätze mit ICPL-6. Als interne Kontrolle wurde je Markierungsansatz 2 µl eines bestimmten Proteinmixes, mit bekannter aber unterschiedlicher Zusammensetzung aus bovinem Serumalbumin, Hühner Ovalbumin und boviner Carboanhydrase zugegeben.

Dann wurde 1 µl der im Kit enthaltenen „Reduktionslösung“ je Probe zugegeben und die Proteine bei 60 °C für 30 min inkubiert. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wurde 1 µl „Alkylierungslösung“ unter Lichtabschluss zugegeben, die die Cysteinreste alkyliert und dadurch die erneute Bildung von Disulfidbrücken verhindert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 25 °C wurde je 1 µl „Stopplösung 1“ zugegeben und die Ansätze für 15 min bei 25 °C inkubiert. Danach wurden je 3 µl des ICPL_0-Reagenz, des ICPL_4-Reagenz bzw. des ICPL_6-Reagenz zu den jeweiligen drei Proben gegeben. Anschließend wurden die Proben, um Oxidation zu verhindern, mit gasförmigem Stickstoff (N₂) überschichtet und 2 h bei 25 °C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 µl „Stopplösung 2“ beendet. Nach 20 min bei 25 °C wurden die drei unterschiedlich markierten Proben vermischt und 4 µl 2N Natriumhydroxid (NaOH) zugegeben, um Veresterungsprodukte zu zerstören und 20 min inkubiert. Um den pH-Wert wieder zu neutralisieren, wurden 4 µl 2N Salzsäure (HCl) zugegeben. Anschließend wurde das gleiche wie bereits vorhandene Volumen Apuwa-H₂O zur Neutralisierung zu den 3 Proben und der 5-fach Überschuss des Gesamtvolumens eiskaltes Aceton zugegeben und ÜN bei -20 °C inkubiert um die Proteine auszufällen.

Diese wurden am folgenden Tag bei 14.000 rpm, 4 °C für 20 min in der Hettich EBA12R-Zentrifuge mit dem Rotor 1412 zentrifugiert, das Aceton entfernt, die Proteinpellets in 50 µl 2x Lämmli-Puffer resuspendiert und bei RT 1 h im Schüttler inkubiert. Nach einer Inkubation von 95 °C für 5 min wurden die Proben in drei Taschen eines NuPAGE®Novex® 4-12% Bis-Tris Gradientengels geladen und in einer Gelkammer gefüllt mit 1x Laufpuffer 1 h bei 100 V mit Gelelektrophorese aufgetrennt. Dann wurde das Gel in Coomassie-20%-MeOH-Färbelösung ÜN bei RT inkubiert, wodurch die Proteine im Gel blau sichtbar werden. Nach 24 h wurde das Gel mit H₂O wieder soweit entfärbt, dass ausschließlich die Banden im Gel markiert

waren. Von der *core facility* PROT wurde mit diesen Proben ein In-Gel-Verdau mit Trypsin durchgeführt (Merl *et al.* 2012) und anschließend massenspektrometrisch analysiert (Azimzadeh *et al.* 2015).

2.8.2 ICPL Quantifizierung und Netzwerkanalyse

Die Daten aus der MS- und MS/MS- Analyse wurden mit der Software *Proteome Discoverer* (Version 1.3, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wie von Azimzadeh *et al.* im Detail beschrieben analysiert (Azimzadeh *et al.* 2011). Hierbei wurden erst die MS-Ergebnisse der jeweils fünf Gelstücke und dann die der Triplikate vereint, die Peptide quantifiziert und die Proteine anhand der Ensembl Datenbank Ensembl Human (100 158 sequences) von Mascot Version 2.5 identifiziert. Für die Auswertung wurde die Identifizierung von mindestens zwei einzigartigen (*unique*) Peptiden in zwei der drei Replikate vorausgesetzt. Der Varianzkoeffizient (*coefficient of variation*, CV) zeigte die Variabilität zwischen den Replikaten. Wie bereits beschrieben, wurde die Häufigkeit eines Proteins in zwei unterschiedlich stark Isotopen-markierten Ansätzen (z.B. ICPL_4 (uPAR) zu ICPL_0 (Reaktions-Kontrolle)) verglichen (Azimzadeh *et al.* 2013, Azimzadeh *et al.* 2015, Papaioannou *et al.* 2011). Wenn der Verhältniswert dieser Proteinexpression $\geq 1,3$ -fach oder $\leq 0,7$ -fach verändert war, wurden die Proteine als signifikant unterschiedlich exprimiert bezeichnet. Dies ergab sich aus der technischen Variabilität, die aus den Durchschnittswerten der CV der bekannten, im Versuch zugegebenen Standardproteinmische (BSA, Ovalbumin und Carboanhydrase), zwischen den unterschiedlichen isotopenmarkierten Ansätzen, berechnet wurde. Die Variabilität der Expression von 2-3 x CV% (30-40%) wurde als signifikant bezeichnet, um die technische Variabilität auszuschließen.

Um die von der Regulierung der als signifikant identifizierten Proteine betroffenen Netzwerke zu analysieren, wurde die Software *INGENUITY Pathway Analysis* (IPA) verwendet. IPA ist eine Datenbank, die aus wissenschaftlichen Publikationen generiert wurde und das Identifizieren von stark repräsentierten Funktionen und Signalwegen in großen, quantitativen Datensätzen ermöglicht (Wu *et al.* 2007).

2.9 Histologische Analysen

Die Immunhistochemie (IHC) ermöglicht die Charakterisierung von Proteinexpression im Gewebeschnitt. In der praktischen, täglich angewandten Pathologie können maligne, benigne und unveränderte Gewebe nach Hämatoxylin/Eosin (HE)-Markierung mikroskopisch unterschieden werden. Durch unterschiedliche Proteinmarkierungen mit IHC kann dann eine Differentialdiagnose erstellt werden, die eine Entscheidung über ein weiteres therapeutisches Vorgehen zulässt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Antikörper gegen verschiedene Proteine in IHC-Analysen eingesetzt, um die *in vitro* identifizierten Proteine im humanen Gewebe nachzuweisen und mit dem *proximity ligation assay* (PLA) die räumliche co-Lokalisation zweier Proteine zu demonstrieren.

2.9.1 Herstellung von Zellblöcken

Aus den eingesetzten Zelllinien wurden für IHC und PLA Zellblöcke hergestellt (Ludyga *et al.* 2012). Für die Herstellung der Zellpellets wurden die Zellen in zwei 650 ml-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5% CO₂ in je 20 ml Vollkulturmedium kultiviert und mit 5 µg/ml Puromycin selektiert (außer der nicht infizierten und deshalb Puromycin-sensitiven Reaktions-Kontrolle). Dann wurde das Medium aus den Flaschen abgenommen und die Zellen kurz mit 10 ml Dulbecco's PBS (DPBS) gewaschen. Dieses wurde entfernt und 5 ml DPBS je Flasche zugegeben. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber von dem Flaschenboden entfernt und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Mit weiteren 5 ml DPBS wurden die übrigen Zellen aus der Flasche aufgenommen und ebenfalls in das 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1500 rpm 5 min in der Rotanata 560R Zentrifuge mit dem Rotor 5655 zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Dann wurden die entstandenen Zellpellets nochmals in 20 ml DPBS resuspendiert und hiervon 3 ml in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt. Alle Röhrchen wurden bei 1500 rpm 5 min in der Rotanata 560R Zentrifuge mit dem Rotor 5655 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus den Zellpellets in den 15 ml-Röhrchen wurden, zur späteren Überprüfung der Expression mit Western Blot, Proteine isoliert und hierfür auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren. Die Zellpellets in den 50 ml-Röhrchen wurden je in 2 ml DPBS aufgenommen und in 2 ml-Röhrchen überführt, bei 2000 rpm 5 min in der Pico17 Eppendorf-Zentrifuge mit

dem Rotor 75003424 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jedes Zellpellet wurde in 200 µl humanem Plasma resuspendiert und dann zügig 200 µl bovines Thrombin ins Zentrum der Zell-Plasma-Lösung gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT waren die Ansätze verfestigt und die Pellets konnten in die vorbereiteten Einbettkassetten überführt werden. Diese wurden verschlossen und luftblasenfrei in 4% gepuffertem Formaldehyd (10% Formalin) ÜN fixiert. Im VIP™ Vakuum Infiltrationsprozessor wurde erst das Formaldehyd durch die Inkubation in H₂O entfernt, die fixierten Zellen in einer Alkoholreihe mit zunehmender Konzentration hin zu 100%-Xylol inkubiert und in Paraffin aufgenommen. Diese Schritte sind nötig, da sich H₂O und Paraffin nicht vermengen, der Block jedoch nach dem Einbetten von Paraffin durchtränkt sein soll, um Schnitte am Mikrotom herstellen zu können. Dann wurden die Zellblöcke in der Einbettstation in Paraffin eingebettet und ausgehärtet. Aus diesen Zellblöcken wurden Schnitte (3 µm) hergestellt, mindestens 2 h bei 60 °C inkubiert und dann mit Paraffin überschichtet.

2.9.2 Entparaffinieren und Antigen-Demaskierung

Die Fixierung mit Formaldehyd ist eine gängige Methode, um Gewebe und damit auch Antigene im Gewebe für einen sehr langen Zeitraum zu konservieren. Dadurch werden jedoch die Proteine des Gewebes vernetzt, wodurch die spezifischen Epitope, an die die Antikörper binden sollen, nicht mehr für deren Bindung zugänglich (Antigen-Maskierung) sind (Mulisch 2014). Die Überschichtung der Gewebeschnitte mit Paraffin dient zudem der Konservierung. Allerdings muss dann für IHC- und PLA-Techniken zuerst das Paraffin entfernt und danach die Proteinquervernetzungen wieder gelöst werden. Durch die Inkubation der Gewebeschnitte für dreimal 30 min bei 60 °C wurde das Paraffin verflüssigt. Sobald das Paraffin zum großen Teil entfernt war, wurden die Schnitte in eine Glasküvette gegeben und zum endgültigen Entparaffinieren für zweimal 30 min in Xylol gegeben. Dann wurde das Xylol durch absolutes Ethanol entfernt und die Zellen durch eine absteigende Alkoholreihe in wässriges Milieu überführt: 2x 5 min 100%-Ethanol (EtOH), 2x 5 min 96%-EtOH, 1x 5 min 80%-EtOH, 1x 10 Sek 70%-EtOH, 1x 10 Sek 50% EtOH und zuletzt 1x 10 Sek in deionisiertem VE-H₂O inkubiert. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Gewebeschnitte in ca. 1,5 l 10 mM Citratpuffer pH 6,0 überführt, der die Proteinquervernetzungen bricht und dadurch die Antigenstrukturen der Proteine wieder renaturiert. In einem Schnellkochtopf wurden die

Schnitte dann für 30 min bei 1000 W in der Mikrowelle erhitzt und danach für ca. 10 min in nicht erhitztem Citratpuffer auf RT abgekühlt.

2.9.3 Immunhistochemie

Im Zuge der Doktorarbeit wurden einige der IHCs teilweise an der Maschine Ventana Discovery XT mit dem *Discovery DAB Map Detection-Kit* durchgeführt, um eine Standardisierung der Markierungen zu gewährleisten. Die detaillierten Protokolle der Maschine sind in Anlage 2 dargestellt. Das Protokoll mit der Nummer #70 ist durch eine lange Primärantikörperinkubation (12 h) bei RT und eine lange Vorbehandlung charakterisiert. Hier unterscheidet sich das Protokoll #998 mit einer Primärantikörperinkubation von 1h bei RT. Das Protokoll #993 erforderte eine händische Vorbehandlung außerhalb der Maschine. Hier wurden in der Ventana-Maschine alle Schritte ab der Inkubation des Sekundärantikörpers durchgeführt, was unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationszeiten des Primärantikörpers (Tab. 26) zulässt.

Abhängig vom Markierungsprotokoll wurden die Gewebeschnitte in der Ventana-Maschine oder manuell entparaffiniert bzw. antigen-demaskiert. Nach der Inkubation im Citratpuffer wurden die Schnitte 10 min in 3% H₂O₂-Methanol-Puffer geblockt. Durch das H₂O₂ wird die endogene Peroxidaseaktivität im Gewebe reduziert und dadurch eine unspezifische Markierung verhindert. Dies war nötig, da Sekundärantikörper verwendet wurden, an denen zur Detektion eine Meerrettich-Peroxidase (*horse-raddish peroxidase*, HRP) gebunden ist. Dann wurden die Schnitte unter fließendem H₂O gewaschen und das H₂O₂ entfernt. Es folgte eine je nach Antikörper zeitlich variierende Inkubation in 3%- oder 5%-Ziegen Serum-1xTBS-Lösung zur Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen. Dann wurde - je nach Protokoll - der Primärantikörper (150 µl/ Objektträger) im Dako REAL™ *antibody diluent* verdünnt und in der Ventana-Maschine bei RT oder bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für die Titration des Sekundärantikörpers (Inkubationszeit 32 min) und zur Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und H₂O₂ (Inkubationszeit 8 min) in der Ventana-Maschine inkubiert. DAB wird durch die Peroxidaseaktivität - der an den Sekundärantikörper gekoppelten HRP - zu einem braunen Feststoff oxidiert und ausgefällt, der unter dem Mikroskop als Proteinmarkierung detektiert wird (Pukac *et al.* 1997).

Die Gegenfärbung wurde mit dem Farbstoff Hämatoxylin (Inkubationszeit 4 min) durchgeführt, der bei neutralem pH-Wert u.a. die Zellkerne blau markiert. Die Objektträger (OT) wurden in der Ventana mit einer Lipid-haltigen Pufferlösung überschichtet, um Evaporation zu vermeiden. Die OT wurden deshalb in eine Küvette gestellt und mit in Leitungswasser gelöstem Detergenz (Spülmittel) inkubiert. War die Ölschicht vollständig entfernt, wurden die Schnitte auf den OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 30 Sek 50% EtOH, 1x 30 Sek 70% EtOH, 1x 30 Sek 80% EtOH, 2x 5 min 96% EtOH, 2x 5 min 100% EtOH) und 2x 5 min in Xylol dehydriert. Dann wurde je ein Deckglas auf den Gewebeschnitten mit Pertex-Eindeckmedium fixiert und die OT bei 60 °C mindestens 1 h getrocknet. Die markierten Schnitte wurden im *NanoZoomer-XR Digital slide scanner* gescant und mit der Software *NDP.view2* analysiert.

Tabelle 26: In der Immunhistochemie eingesetzte Primärantikörper

Antikörper	Ventana-protokoll	Verdünnung	Produkt-nummer	Hersteller	Unternehmens-sitz
Anti-uPAR Antikörper, IID7, monoclonal	#58	1:200	IID7	Von Dr. Viktor Magdolen (Frauenklinik, TUM) gestellt.	
Anti-IGF1R (G11) rabbit polyclonal primary antibody	#301	gebrauchsfertig	#790-4346	Ventana Roche	Basel, CH
Cyr61 Antikörper (H-78), rabbit polyclonal	#58	1:800	sc-13100	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
YB1 (D299) Antibody, rabbit polyclonal	#70	1:200	#4202	Cell Signaling Technology	Cambridge, GB
Anti-GPIP137/ Caprin1 Antibody, rabbit polyclonal	#993	1:150	ab38859	Abcam	Cambridge, GB

2.9.4 *In situ* PLA

Bei dem *proximity ligation assay* (PLA) (Fredriksson *et al.* 2002), der unter dem Namen Duolink® *in situ Detection Reagents Kit Red* vertrieben wird, handelt es sich um eine Methode zur Markierung von zwei sehr eng co-lokalisierten Proteinen, was auf eine Interaktion dieser Proteine schließen lässt. Mit dieser Methode wurden bereits die co-Lokalisation von PTK6 und HER2 (Aubele *et al.* 2010) oder auch HER3 und HER2 gezeigt bzw.

bestätigt (Falkenberg *et al.* 2015). In dem vom Hersteller beschriebenen und hier angewandten Protokoll werden zwei Proteine mit dem jeweils gegen sie gerichtete Primärantikörper (Tab. 27) markiert, die aus zwei verschiedenen Spezies stammen müssen (Abb. 8A). Im zweiten Schritt werden gegen die zwei verschiedenen Spezies gerichteten Sekundärantikörper zugegeben, die je mit unterschiedlichen spezifischen Oligonukleotiden (Minus oder Plus) versehen sind (Abb. 8B). Verbindungs-Oligonukleotide hybridisieren an die komplementären Oligonukleotide am Sekundärantikörper und durch die Zugabe einer Ligase können die Verbindungs-Oligonukleotide und die Oligonukleotide der beiden Sekundärantikörper zum Ring geschlossen werden (Abb. 8C). Dieser Ringschluss ist nur möglich, wenn die Distanz zwischen den Primärantikörpern entsprechend gering ist (laut Hersteller kleiner als 40 nm). Nach Zugabe aller für eine DNA-Amplifikation notwendigen Reagenzien wird die Sequenz der Verbindungs-Oligonukleotide nach dem *rolling circle*-Prinzip amplifiziert und die mit Fluorochromen markierten Sonden hybridisieren an das Amplifikat (Abb. 8D). Diese Fluorochrome können bei der geeigneten Wellenlänge angeregt und detektiert werden und die markierten Amplifikate sind dann unter dem Fluoreszenzmikroskop als punktförmige Signale erkennbar (Soderberg *et al.* 2008). Die Anzahl der PLA-Signale kann mit der Software *Definiens Developer XD* quantifiziert werden.

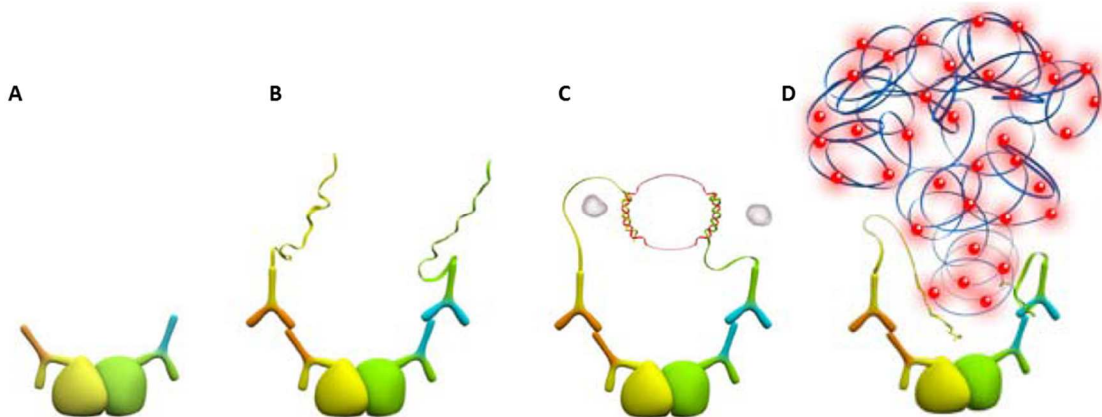


Abbildung 8: Zentrale Schritte der PLA-Methode (adaptiert von Olink Bioscience 2012)

Die Primärantikörper zweier unterschiedlicher Spezies binden spezifisch an die Zielproteine (A). Dann binden die Sekundärantikörper, die mit spezifischen Oligonukleotiden versehen sind, speziesspezifisch an die Primärantikörper (B). Verbindungs-Oligonukleotide hybridisieren an die komplementären Oligonukleotide am Sekundärantikörper. Bei einem Abstand ≤ 40 nm zwischen den Primärantikörpern bilden die Verbindungsnukleotide und die Oligonukleotide der Sekundärantikörper nach Zugabe der Ligaselösung einen Ringschluss (C). Nach Zugabe der Amplifikationslösung wird dieser Ringschluss nach dem *rolling circle* Prinzip amplifiziert und aufgrund der mit Fluorochromen versehenen zugegebenen Sonden, die an das Amplifikat hybridisieren, wird der Proteinkomplex unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierbar (D).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode für einige potentiell mit uPAR interagierende Proteine angewendet. Hierzu wurden Gewebeschnitte entparaffiniert und nach der Behandlung im Citratpuffer für zweimal 5 min in 1 M Glycin pH 8,5-1xTBS-T-Puffer und einmal 5 min in 1x TBS-T inkubiert.

Dann wurden die OT mit 3-4 Tropfen der 1x Blockierlösung aus dem PLA-Kit versehen und 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden zwei Primärantikörper, die gegen die zu markierenden Proteine gerichtet sind, in dem *Antibody diluent* verdünnt, je 150 µl auf die OT gegeben und ÜN bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach ca. 20 h wurde die Antikörperlösung entfernt und die OT zweimal 5 min mit Waschpuffer A bei RT inkubiert. Dann wurden die Sekundärantikörper aus dem Kit 1:5 verdünnt. Auf eine Auftragsfläche von 2 cm² je OT wurden je 16 µl Antikörper mit 48 µl 1x *Antibody diluent* gegeben. Diese wurde für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernen dieser Lösung folgte ein Waschschrift, in dem die OT für zweimal 5 min im Waschpuffer A und anschließend für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer mit 80 µl Ligationslösung inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen der OT für zweimal 5 min im Waschpuffer A, wurden je OT 80 µl der Amplifikationslösung zugegeben und 100 min bei 37 °C unter feuchten Bedingungen inkubiert. Danach wurden die OT zweimal 10 min in Waschpuffer B und 1 min in 1:100 verdünntem Waschpuffer B unter Lichtabschluss inkubiert. Im Dunkeln wurden die OT bei RT ca. 15 min getrocknet. Abschließend wurden 3-4 Tropfen Eindeckmedium (*mounting medium*), das DAPI zur Markierung der DNA in den Zellkernen enthält, auf die Schnitte gegeben und mit Deckgläsern eingedeckt.

Tabelle 27: Für den PLA eingesetzte Primärantikörper

Protein-Paar für PLA	Antikörper für Protein 1	Antikörper für Protein 2
uPA und uPAR	Anti-urokinase (uPA) antibody, rabbit polyclonal, ab24121, Abcam, Cambridge, GB → Verdünnung 1:375	Anti-uPAR, IID7, monoclonal mouse antibody → Verdünnung 1:250
IGF-1R und uPAR	Anti-IGF1R (G11) rabbit polyclonal primary antibody, #790-4346, Ventana Roche, Basel, CH → Verdünnung 1:2	Anti-uPAR, IID7, monoclonal mouse antibody → Verdünnung 1:300
Cyr61 und uPAR	Cyr61 Antikörper (H-78), rabbit polyclonal, sc-13100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA → Verdünnung 1:1200	Anti-uPAR, IID7, monoclonal mouse antibody → Verdünnung 1:200
YB-1 und uPAR	YB1 (D299) Antibody, rabbit polyclonal, #4202, Cell Signaling Technology, Cambridge, GB → Verdünnung 1:50	Anti-uPAR, IID7, monoclonal mouse antibody → Verdünnung 1:250
Caprin-1 und uPAR	Anti-GPIP137 Antibody, rabbit polyclonal, ab38859, Abcam, Cambridge, GB → Verdünnung 1:50	Anti-uPAR, IID7, monoclonal mouse antibody → Verdünnung 1:250

Bildaufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop

An dem *Laser Scanning* Mikroskop *Axio Imager Z1* wurden Aufnahmen aus mehreren optischen Schnittebenen aufgenommen (z-Stapel). Bei einem Schnittabstand von 0,3 µm wurden je ca. 20 Einzelabbildungen aufgenommen und danach zu einer Gesamtabbildung (Projektion) zusammengesetzt. Die Einzelabbildungen wurden mit den Objektiven 20x und 40x (Wasser als Immersionslösung) mit den Anregungsfiltern DAPI 49 und mPLUM aufgenommen. Die Fluorophore der PLA *probes* im Kit „red“ sind laut Hersteller Olink Bioscience bei einer Exzitationswellenlänge von 594 nm anregbar und haben eine Emissionswellenlänge von 624 nm. Die Exzitationswellenlänge liegt für DAPI bei 358 nm und die Emissionswellenlänge bei 461 nm. Die Belichtungszeit war für die DAPI-Markierungen bei 20-30 ms und bei den dsRed-Markierungen bei ca. 800 ms. Es wurden je Gewebeareal drei repräsentative Blickfelder aufgenommen.

Quantifizierung der PLA-Signale

Die Quantifizierung der PLA-Signale erfolgte mit der Software *Definiens Developer XD*. Hierbei ermittelte die Software die Anzahl der PLA-Fluoreszenzsignale und die der Zellkerne, woraus sich jeweils der Mittelwert der Signalfrequenz aus drei Blickfeldern der Reaktionskontrolle errechnen lässt. Die Mittelwerte (Signalfrequenz/Zellkerne) der durch RNAi veränderten Ansätze wurden dann auf den Mittelwert der Reaktionskontrolle normalisiert und wiederum aus diesen Werten der Mittelwert und Standardabweichung berechnet. So konnten die Effekte der Expressionsverminderung auf die Interaktionen durch einen relativen Wert dargestellt werden.

2.10 Statistische Auswertungen

Für die Berechnung der Signifikanzen der durchgeführten *in vitro*-Experimente wurde die Software SigmaPlot 12.0 verwendet. Es wurden student's *t*-Tests durchgeführt.

Für die statistischen Analysen der generierten und gesammelten Daten zu der Tumorkohorte wurden Spearman Rang Korrelationen durchgeführt (von H. Braselmann, HMGU).

Als statistisch signifikant wurden alle *p*-Werte mit $p \leq 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Kontaminationstests der verwendeten Brustkrebszelllinien

Kontaminationen mit Mykoplasmen oder dem Retrovirus des Totenkopffähchens (*squirrel-monkey retrovirus*, SMRV) können zu unspezifischen Effekten bei *in vitro*-Experimenten führen, weshalb diese regelmäßig mit Hilfe von Kontaminationstests ausgeschlossen wurden. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Überprüfung der Brustkrebszelllinien auf Mykoplasmen mit einem - auf PCR basierenden - Test Kit. Die im Kit enthaltene Positiv-Kontrolle und die Zelllinie CAMA1 zeigten nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel die für Mykoplasmen charakteristische DNA-Bande bei 270 bp. Die Zelllinie CAMA1 wurde von den weiteren Versuchen ausgeschlossen. Alle übrigen Zelllinien und die Negativ-Kontrolle, bei der H₂O in der PCR anstelle von DNA eingesetzt wurde, waren negativ für eine Kontamination mit Mykoplasmen und konnten für die weiteren *in vitro*-Experimente verwendet werden. Die RNAi-Ansätze der mit lentiviralen Vektoren durchgeführten Transduktionen wurden ebenfalls auf eine Kontamination mit Mykoplasmen hin überprüft und unspezifische Effekte aufgrund einer solchen Infektion ausgeschlossen (Appendix 3).

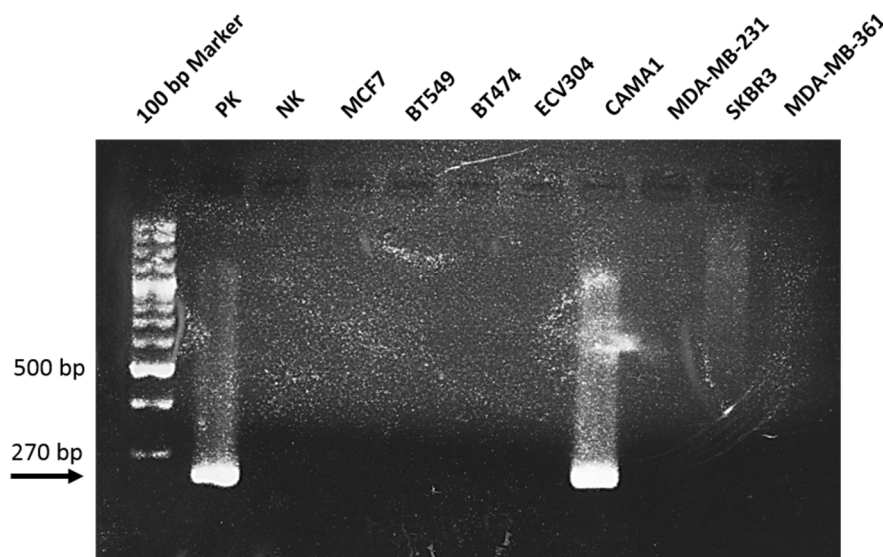


Abbildung 9: Mykoplasmen-Kontaminationstest in ausgewählten humanen Krebszelllinien

Gelelektrophorese-Analyse der Mykoplasmentest-PCR-Amplifikate der überprüften Krebszelllinien MCF7, BT549, BT474, ECV304, CAMA1, MDA-MB-231, SKBR3 und MDA-MB-361; Positiv-Kontrolle (PK): im Kit enthaltene Kontrolle (270 bp), Negativ-Kontrolle (NK): H₂O.

Die Zelllinien wurden auch auf eine Kontamination mit dem SMRV überprüft (Abb. 10). Es wurde auch hier ein auf PCR-basierender Test-Kit verwendet und die PCR-Produkte der mit je zwei unterschiedlichen Mastermixen durchgeführten Amplifikationen mit Gelelektrophorese aufgetrennt. Hier zeigten lediglich die im Kit enthaltenen Positiv-Kontrollen bei 186 bp bzw. 197 bp die für eine SMRV-Kontamination charakteristischen DNA-Banden. Die untersuchten Brustkrebszelllinien waren SMRV-frei.

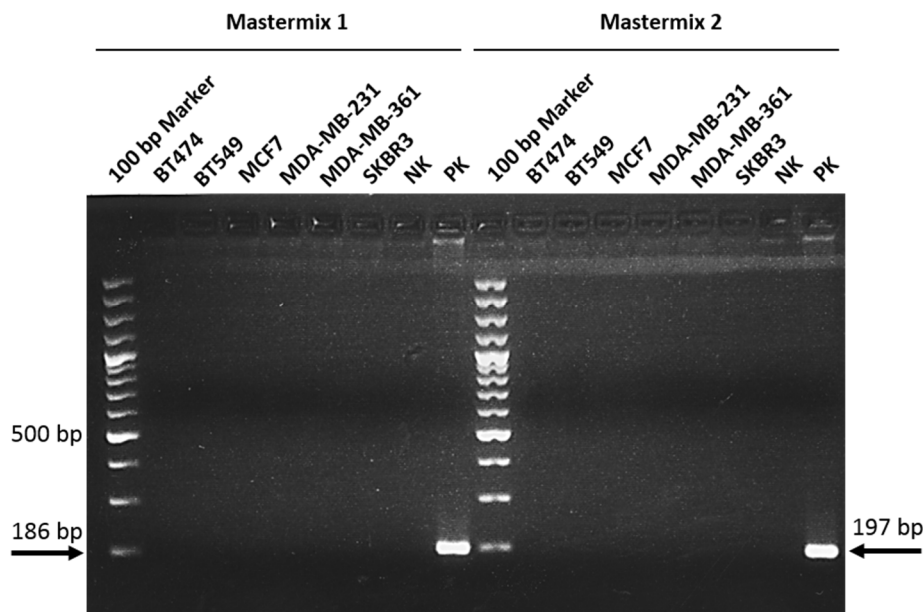


Abbildung 10: SMRV-Kontaminationstest in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien

Gelelektrophorese-Analyse der SMRV-PCR-Amplifikate mit je Mastermix 1 und Mastermix 2 der überprüften Brustkrebszelllinien BT474, BT549, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-361 und SKBR3. Positiv-Kontrolle (PK): im Kit enthaltene Kontrolle (186 bp (links) und 197 bp (rechts)), Negativ-Kontrolle (NK): H₂O.

3.2 Expression von relevanten Signalproteinen in Brustkrebszelllinien

Um aus den zur Verfügung stehenden Brustkrebszelllinien die TNBC-Modellzelllinien für die *in vitro* Experimente zu identifizieren, wurden Proteinlysate aus den Zellen gewonnen und Proteinexpressionsanalysen mit Western Blots durchgeführt. Hierzu wurden die Zelllinien BT474, BT549, MCF7, MDA-MB-231, MB-MDA-361, SKBR3 und T47D hinsichtlich der Expression der Hormon-Rezeptoren ER und PR bzw. der Expression des HER2-Rezeptors überprüft. Die Zelllinien BT474 und SKBR3 zeigen eine starke, die MDA-MB-361-Zellen hingegen eine schwache Expression des HER2. Von den überprüften Zelllinien produzieren nur die T47D-Zellen den Progesteron-Rezeptor (PR), während der Östrogen-Rezeptor (ER)

von den MDA-MB-361-Zellen und den T47D-Zellen gebildet wird. Die Zelllinien MDA-MB-231 und BT549 exprimieren HER2 sehr schwach und sind negativ hinsichtlich der Expression von ER und PR (Abb. 11).

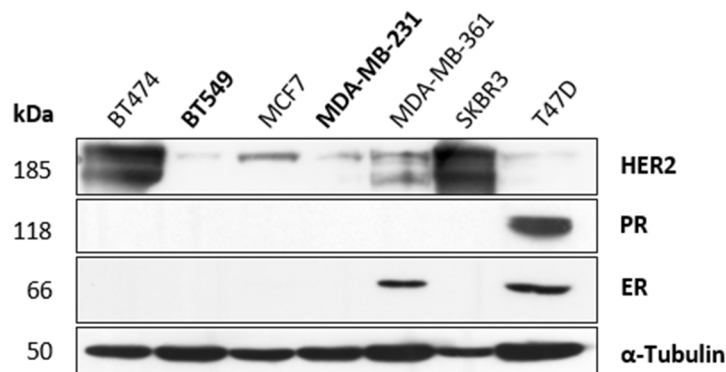


Abbildung 11: Proteinexpression von Hormon- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien

Western Blot-Analyse der Östrogen- (ER), Progesteron-Rezeptoren (PR) und des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2) in den Zelllinien BT474, BT549, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-361, SKBR3 und T47D; Ladekontrolle: α -Tubulin.

Außerdem wurden diese Zelllinien auf die Proteinexpression der Schlüsselkomponenten des uPAR-Systems: uPA, PAI-1 und uPAR mit Western Blots überprüft (Abb. 12). Die MDA-MB-231 und BT549-Zellen sind im Vergleich zu den übrigen Zelllinien stark positiv für uPAR und uPA. Da uPA von den Tumorzellen als schwach aktives Zymogen (pro-uPA, 52 kDa) sezerniert wird und anschließend durch Spaltung in proteolytisch aktives zweikettiges HMW-uPA (52 kDa) umgewandelt wird, wurde dessen Expression in den Kulturmediumüberständen der Zelllinien analysiert (Schmitt *et al.* 1992). Der Inhibitor PAI-1 wird in allen getesteten Brustkrebszelllinien gebildet. Aufgrund der fehlenden bzw. schwachen Expression von ER, PR und HER2 (Abb. 11) aber einer sehr starken uPAR und uPA Expression wurden die BT549 und MDA-MB-231 als TNBC-Modellzelllinien für die folgenden *in vitro* Experimente ausgewählt.

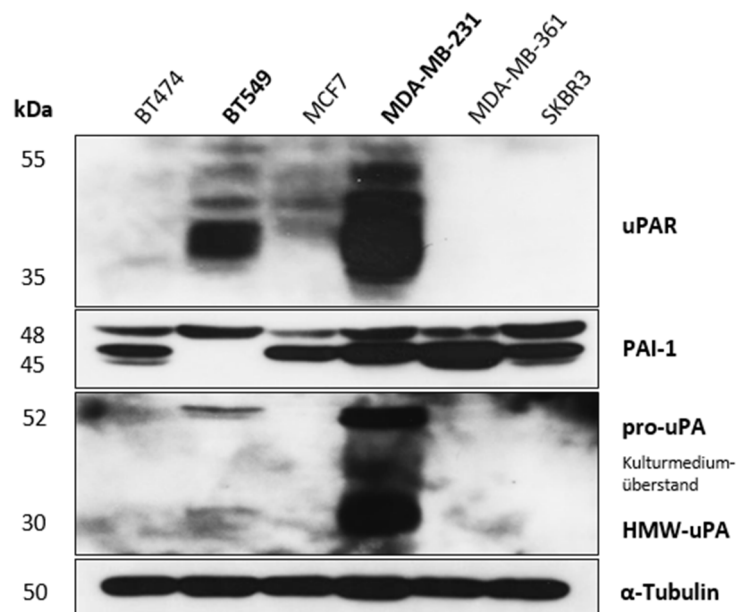


Abbildung 12: Proteinexpression der Schlüsselmoleküle des uPAR-Systems in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien

Western Blot-Analyse der zentralen Komponenten des uPAS: uPAR, PAI-1 und uPA (im Kulturmediumüberstand), Ladekontrolle: α -Tubulin

Die sechs Brustkrebszelllinien wurden außerdem bzgl. der Proteinexpression bzw. -aktivierung (Phosphorylierung) tumorrelevanter Signalproteine, die an zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration bzw. Invasion von Tumorzellen beteiligt sind, mit den jeweiligen Primärantikörpern (Tab. 24) im Western Blot analysiert.

Die analysierten Rezeptoren, die an der Zytoplasmamembran verankert sind, leiten nach ihrer Aktivierung durch die Bindung von extrazellulären Liganden Signale in das Zellinnere weiter (Heinrich *et al.* 2014). So aktiviert u.a. der Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*) den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (*human epidermal growth factor receptor 1*, HER1) und führt dadurch zur Zellproliferation und -überleben (Chandra *et al.* 2013). HER1 ist vor allem in den TNBC-Zelllinien BT549 und MDA-MB-231 stark exprimiert, im Gegensatz zu dem niedrigen Vorkommen in der MCF7 und der MDA-MB-361 Zelllinie (Abb. 13). Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (*insulin-like growth factor receptor 1*, IGF-1R) wird vor allem von IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) aktiviert und führt u.a. durch die intrazelluläre Aktivierung des Akt Signalweges zur Zellproliferation (Pollak 2012). Er ist in der MCF7-Zelllinie sehr stark, in der MDA-MB-231 stark, hingegen in der BT549 schwach bzw. in der SKBR3 nicht nachweisbar (Abb. 13).

Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor cMet (*hepatocyte growth factor receptor*) wird in allen untersuchten Brustkrebszelllinien ähnlich stark gebildet, aber am Tyrosin 1234/1235 einzig in der MDA-MB-231-Zelllinie phosphoryliert (Abb. 13). cMet wird von HGF (*hepatocyte growth factor*) aktiviert und reguliert u.a. die Zellmigration und –proliferation (Organ and Tsao 2011).

Der Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and transcription activator 3*) wird u.a. als Folge der Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren phosphoryliert und induziert die Transkription von für die Zellproliferation relevanten Proteinen (Yu *et al.* 2014). STAT3 wird in den analysierten Zelllinien unterschiedlich synthetisiert und verschieden stark am Serin727 phosphoryliert (Abb. 13). Das Phosphatase und Tensin Homolog PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) ist ein Tumorsuppressor, der bei vielen Brustkrebstypen mutiert bzw. deletiert ist (Song *et al.* 2012). Er wird in allen getesteten Zelllinien exprimiert, außer in der BT549 (Abb. 13). Die Phosphorylierungsintensität am Serin380/Threonin382/Threonin383 variiert zwischen den Zelllinien, wobei sie in den MCF7-, BT474-, MDA-MB-231-Zellen stärker und in der MDA-MB-361 bzw. SKBR3 schwächer ist.

Alle getesteten Zelllinien exprimieren die Serin/Threonin Kinase Akt, die nur in der MDA-MB-231-Zelllinie nicht am Serin473 phosphoryliert wird (Abb. 13). Die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) p44/42 und p38, die u.a. an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind (Roux and Blenis 2004), wurden in allen getesteten Zelllinien nachgewiesen (Abb. 13). Die Kinasen werden jedoch unterschiedlich stark an den Aminosäuren Threonin202/Tyrosin182 (p44/42 MAPK) bzw. Threonin180/Tyrosin182 (p38 MAPK) und in der MDA-MB-361 die p44/42 MAPK nicht phosphoryliert. Der Signaltransduktionsadapter Paxillin wird in Zusammenhang mit der Regulation von Proliferation und Invasion von Tumorzellen beschrieben (Jagadeeswaran *et al.* 2008) und wird in den TNBC-Zelllinien BT549 und MDA-MB-231, sowie in der MCF7 und der MDA-MB-361 exprimiert (Abb. 13). Die Phosphorylierung am Tyrosin118 konnte in den Zelllinien BT549, MDA-MB-231 und MCF7 gezeigt werden.

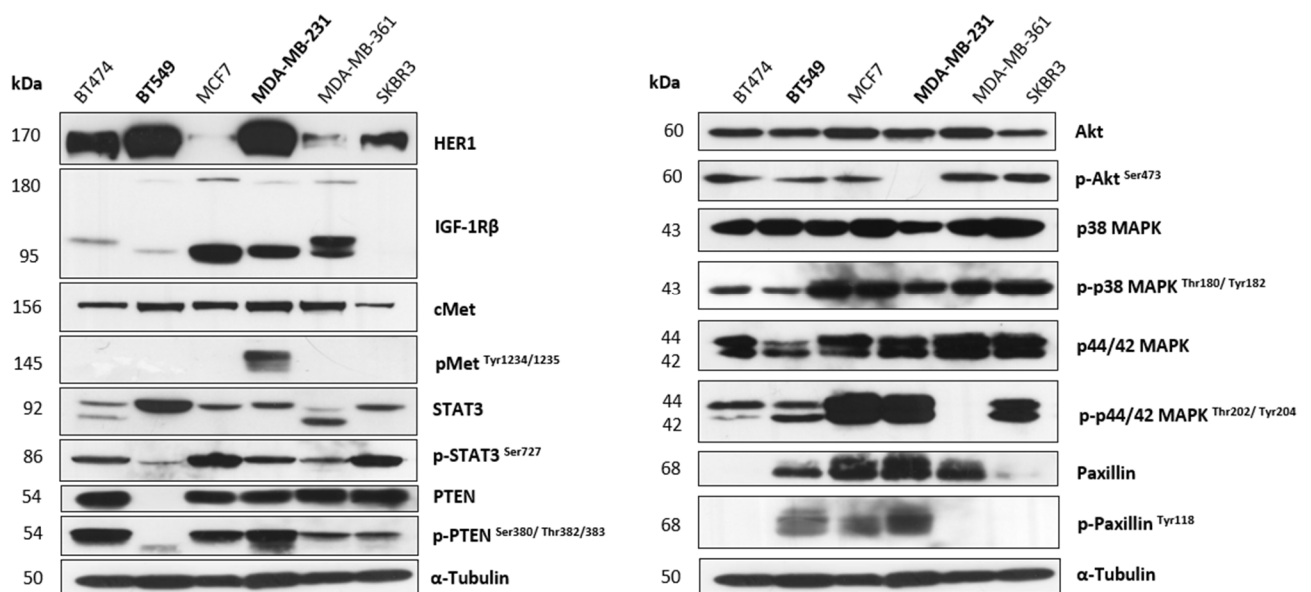


Abbildung 13: Proteinexpression bzw. -phosphorylierung von tumorrelevanten Signalmarkern in ausgewählten humanen Brustkrebszelllinien

Western Blot-Analyse der Proteinexpression bzw. -phosphorylierung (p-) von HER1, IGF-1R (β -Kette), cMET, STAT3, PTEN, Akt, MAPK p44/42, MAPK p38 und Paxillin; Ladekontrolle: α -Tubulin.

3.3 Evaluierung der Langzeiteffekte der Expressionsreduzierung von uPAR und uPA

Um die potentielle therapeutische Relevanz einer permanenten Expressionsreduzierung von uPAR und uPA, einzeln und in Kombination, *in vitro* zu evaluieren, wurde die Expression der zentralen Proteine des uPAR-Systems durch lentivirale Vektoren-vermittelte RNA-Interferenz reduziert. Im Zuge der Etablierung der optimalen Infektionsbedingungen wurde auch die Puromycinkonzentration zur Selektion der infizierten Zellen angepasst.

3.3.1 Bestimmung der optimalen Puromycinkonzentration zur Selektion lentiviral infizierter Zellen

Die lentiviralen Vektoren, die hier zur Herunterregulierung von z.B. uPAR eingesetzt wurden, enthalten eine Sequenz, die ein Puromycin-Resistenzgen kodiert (Vara *et al.* 1986). Deshalb konnten die transduzierten Zellen regelmäßig mit Puromycin selektiert werden, um eine möglichst homogene Population von stabil transduzierten Zellen zu erhalten. Es wurde ein WST-1-Test durchgeführt, um die Puromycinkonzentration zu bestimmen, bei der die Viabilität der Zellen sehr stark reduziert war, die nicht mit einem Puromycin-Resistenzgenhaltigen Vektor transduziert waren. Obwohl bei einer Puromycinkonzentration von

2,5 µg/ml die Lebensfähigkeit der beiden Zelllinien um 80% reduziert war (Abb. 14), zeigten Proteinexpressionsanalysen mit Western Blot, dass die Expressionsreduzierung der Zielproteine - bei der Selektion mit der Konzentration von 2,5 µg/ml Puromycin - nicht ausreichend gewährleistet war. Deshalb wurde die Puromycinkonzentration zur Selektion auf 5 µg/ml erhöht, bei der sowohl die Zellviabilität der nicht-infizierten Zellen sehr stark reduziert war als auch eine stabile Herunterregulierung der Zielproteine in den infizierten Zellen erzielt wurde.

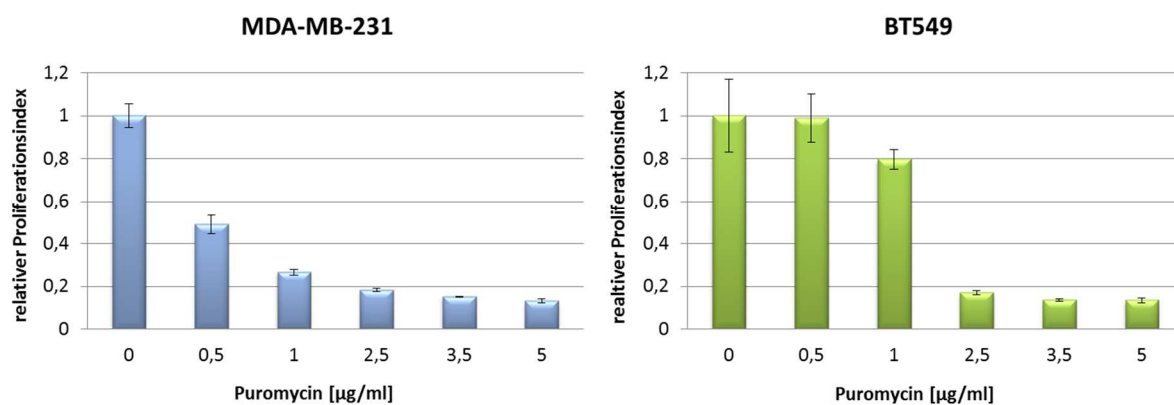


Abbildung 14: Optimale Puromycinkonzentration zur Selektion lentiviral transduzierter MDA-MB-231- bzw. BT549-Zellen

WST-1 Test nach 48h Inkubation mit den Puromycinkonzentrationen 0, 0,5, 1,0, 2,5, 3,5, 5,0 µg/ml in den Zelllinien MDA-MB-231 und BT549. Relativer Proliferationsindex mit Standardabweichung, n=3

3.3.2 Etablierung einer stabilen uPAR-, uPA- sowie uPAR- und uPA-RNAi in MDA-MB-231-Zellen

Nachdem die RNAi mit nur einem lentiviralen Vektortyp nicht dauerhaft zu einer effizienten Unterdrückung der Proteinexpression der Zielproteine uPAR und uPA führte, wurden simultan je drei Vektoren gegen unterschiedliche Sequenzen innerhalb der Ziel-mRNA eingesetzt (Appendix 1). Darüber hinaus wurde, wie von D'Alessio *et al.* 2008 beschrieben, eine wiederholte Infektion nach 24h durchgeführt. Auf diese Weise konnte auch in der MDA-MB-231-Zelllinie, die uPAR und uPA stark überexprimiert, eine für die gesamte Versuchsdauer von mind. 8 Wochen stark reduzierte Proteinexpression infolge der RNAi gewährleistet werden. Zur Bestimmung des Proteinexpressionslevels der Zielproteine uPAR und uPA wurden Proteinlysate gewonnen und Western Blots durchgeführt.

Außerdem wurde RNA aus den unterschiedlichen Ansätzen isoliert und revers zu cDNA transkribiert. Die qPCR-Analysen zur Amplifikation der cDNA Sequenzen von *PLAUR* bzw. *PLAU* wurden mit spezifisch synthetisierten *Primern* durchgeführt.

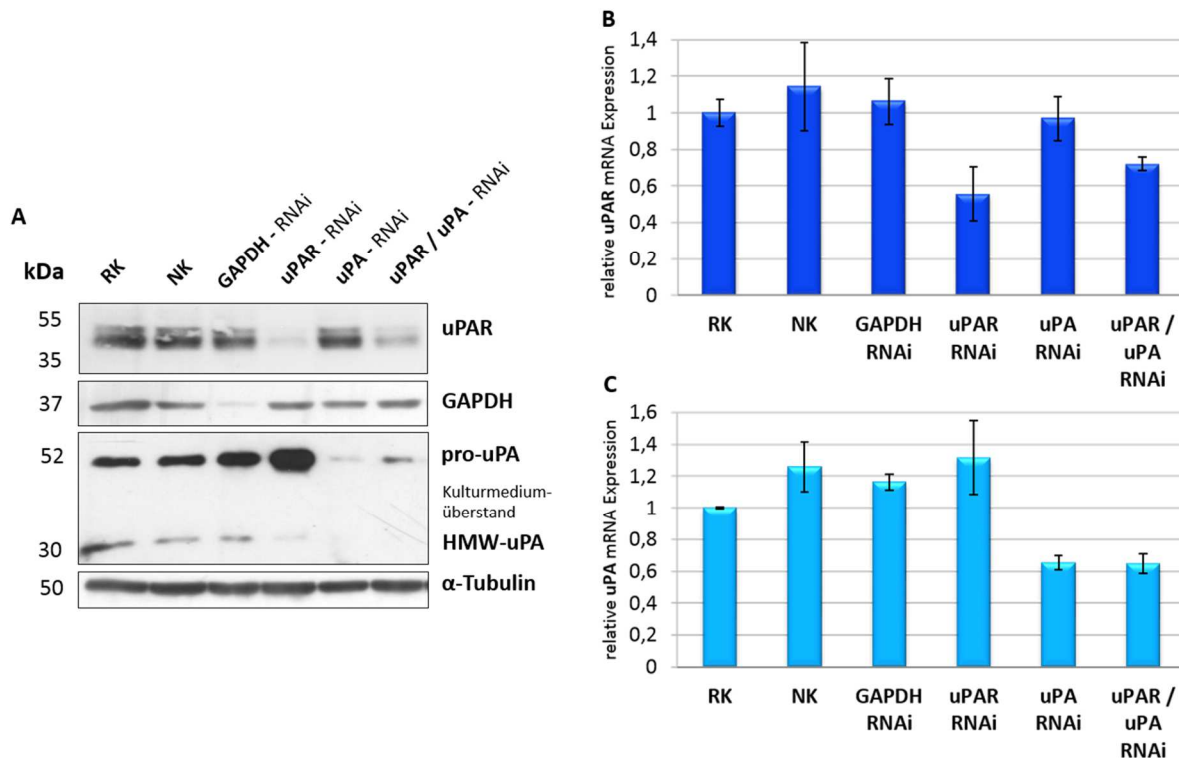


Abbildung 15: Protein- und mRNA-Expression nach uPAR- und uPA-RNA-Interferenz in MDA-MB-231-Zellen

A: Western Blot-Analyse der uPAR, uPA und GAPDH (Positiv-Kontrolle)-Proteinexpression nach RNAi, RK: Reaktions-Kontrolle, NK: *non-targeting vector* RNAi, Ladekontrolle: α -Tubulin; **B:** relative **uPAR** bzw. **uPA** (**C**) mRNA Expression bestimmt mit qPCR Analyse des mRNA-Niveaus nach RNAi, Standardabweichung $n = 3$.

Sowohl die Proteinexpressionsanalyse mit Western Blot (Abb. 15A) als auch die Bestimmung des mRNA-Niveaus mit qRT-PCR zeigten (Abb. 15B), dass infolge der Verminderung die uPAR-Expression im Einzelansatz im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) um 45% reduziert war (Abb. 15B). In der kombinierten Herunterregulierung mit uPA war die uPAR mRNA-Expression im Verhältnis zur Reaktions-Kontrolle (RK) um 28% (Abb. 15B) und die Proteinexpression ebenfalls verringert. Die Reduzierung von uPA führte sowohl einzeln als auch kombiniert mit uPAR zu einem im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle reduzierten uPA mRNA- (Abb. 15C) bzw. Protein-Level (Abb. 15A). Die Herunterregulierung von uPAR führte

zu einer starken Induktion der Proteinexpression von pro-uPA (52 kDa), des Proenzym von uPA (Abb. 15A). Das proteolytisch aktive HMW-uPA, das durch die Bindung des pro-uPA an den uPAR und eine damit einhergehende Spaltung entsteht, wird als Bande bei 30 kDa und 22 kDa (hier nicht detektiert) im Western Blot identifiziert. Infolge der uPAR-RNAi wurde weniger pro-uPA zu HMW-uPA umgesetzt, wie der Western Blot (Abb. 15A) zeigt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Vektor mit einer laut Herstellerangaben nicht-zielgerichteten Sequenz eingesetzt, die leicht unspezifische uPAR-induzierende Effekte zeigte. Um eine erfolgreiche Infektion dieser Zelllinie zu bestätigen, wurde ein Vektor, der zur GAPDH-RNAi führt, eingesetzt. Die Analyse mit Western Blot zeigte eine reduzierte Proteinexpression von GAPDH (Abb. 15A).

3.3.3 Reduzierte Zellproliferation nach kombinierter uPA- und uPAR-RNAi ohne Apoptoseinduktion

Hanahan und Weinberg definierten im Jahr 2000 sechs Kennzeichen für Krebs (*hallmarks of cancer*) (Hanahan and Weinberg 2000). Zu diesen zählen unter anderem das Aufrechterhalten von Proliferation, das Entgehen der Apoptose und das Auslösen von Migration bzw. Invasion von Zellen (Hanahan and Weinberg 2000). Die im Zuge der Doktorarbeit durchgeführten Zellkulturexperimente adressieren die Effekte der Expressionsverminderungen von Zielproteinen auf diese krebsspezifischen Kennzeichen *in vitro*. Dies dient als Grundlage, um über die Eignung des vermindert exprimierten Proteins als mögliches Zielmolekül für eine gerichtete Therapie zu entscheiden. Der Effekt der RNAi-basierten Reduzierung von uPAR und uPA auf das Proliferationsverhalten der TNBC-Modellzellen MDA-MB-231 wurde 8 Wochen nach der lentiviral vermittelten RNAi mit dem WST-1-Test überprüft. Die Proliferation der Zellen war infolge der uPAR-RNAi im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) um ca. 35% höchst signifikant ($p \leq 0,001$) reduziert (Abb. 16A). Die Herunterregulierung von uPA bzw. von uPA in Kombination mit uPAR führte im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) zu einer hoch signifikanten ($p = 0,008$) Reduktion der Zellproliferation um ca. 42% nach der uPA-RNAi und um ca. 32% infolge der kombinierten uPA- und uPAR-RNAi (Abb. 16A). Darüber hinaus wurde keine PARP-Spaltung im Western Blot beobachtet und damit auch keine Apoptose induziert (Abb. 16B). Als Positiv-Kontrolle wurde hierzu ein Lysat von MDA-MB-231-Zellen eingesetzt, in denen zuvor Apoptose

- durch die Zugabe von Staurosporin - induziert worden war. Hier konnte die mit Apoptose einhergehende PARP-Spaltung nachgewiesen und deshalb neben der des intakten PARPs bei 116 kDa die durch die Spaltung verursachte zusätzliche Bande bei 89 kDa im Western Blot gezeigt werden (Abb. 16B).

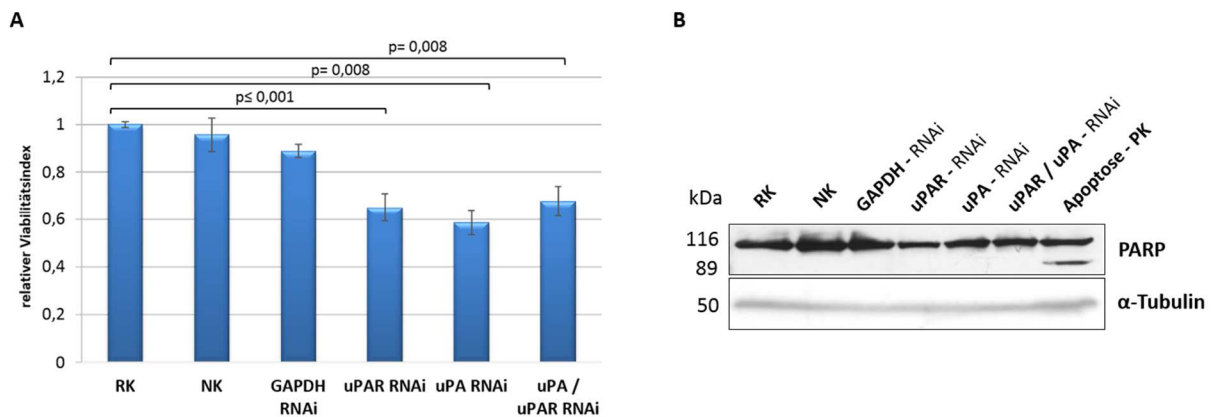


Abbildung 16: Reduzierte Proliferation von MDA-MB-231-Zellen und kein Effekt auf Apoptoseinduktion nach uPAR-, uPA- und kombinierter uPAR- und uPA-RNAi

A: WST-1-Analyse, nach 8-wöchiger permanenter RNAi der Zielproteine, WST-1 Test 48 h nach Aussaat der Zellen, zur Reaktions-Kontrolle (RK) relative Viabilität mit Standardabweichung, 30 min Inkubtion des WST-1-Reagenz, n=3; **B:** Western Blot-Analyse von PARP-Proteinexpression bzw. Spaltprodukten nach RNAi, in Positiv-Kontrolle (PK) durch Staurosporin induzierte PARP-Spaltung, NK: *non-targeting vector* RNAi, Ladekontrolle: α -Tubulin

3.3.4 Verminderte Migration der MDA-MB-231-Zellen nach kombinierter uPA- und uPAR-RNAi

Ein weiteres Charakteristikum von Tumorzellen ist ihr im Vergleich zu gesunden Zellen erhöhtes Migrationspotential. Sowohl mit dem Wundheilungs-Migrationstest (*scratch wound migration assay*) als auch mit dem Boyden-Kammer-Migrationstest wurde die Migration der MDA-MB-231-Zellen infolge der uPAR-, uPA-, uPAR- und uPA- RNAi acht Wochen nach der Transduktion überprüft. Die Analyse des Wundheilungs-Migrationstests zeigte, dass die Herunterregulierung von uPAR im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) eine höchst signifikant ($p \leq 0,001$) und nach uPA-RNAi eine hoch signifikant ($p = 0,005$) reduzierte Zellmigration um je ca. 10% zur Folge hatte (Abb. 17A). Außerdem war die Zellmigration nach der kombinierten RNAi von uPAR mit uPA im Vergleich zu uPAR-RNAi signifikant ($p = 0,012$) und im Vergleich zu uPA-RNAi hoch signifikant ($p = 0,009$) um je ca. 12% reduziert (Abb. 17A).

Die Analyse des Boyden-Kammer-Migrationstests bestätigte verminderte Migrationsfähigkeit der Zellen nach uPA-RNAi, hier war diese höchst signifikant ($p \leq 0,001$) im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) um 58% reduziert (Abb. 17B). Ebenso verursachte die kombinierte RNAi von uPAR und uPA im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle einen hoch signifikanten ($p=0,021$) Rückgang der Zellmigration um 31% (Abb. 17B).

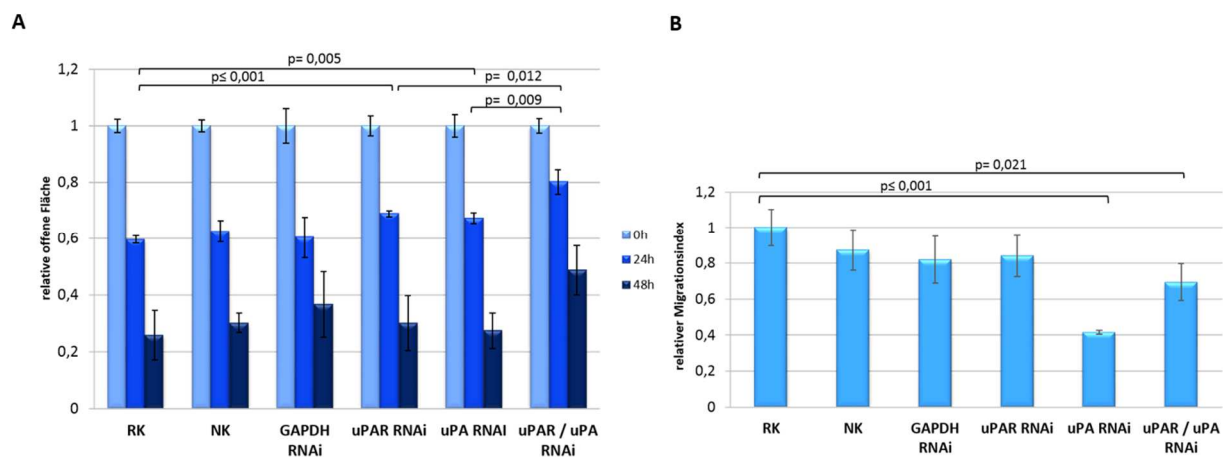


Abbildung 17: *In vitro*-Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-, uPA- und kombinierter uPAR- und uPA-RNAi

A: Wundheilungs-Migrationstest (*scratch wound healing test*) nach RNAi, relative offene Fläche mit Standardabweichung gezeigt 0 h, 24 h und 48 h nach Testbeginn, $n=3$, Analysesoftware: *TScratch*, **B:** Boyden-Kammer-Migrationstest nach RNAi, zur Reaktions-Kontrolle (RK) relative Migration mit Standardabweichung, 48 h nach Testbeginn, NK: *non-targeting vector* RNAi, $n=3$.

3.3.5 Reduzierte Zellinvasion der MDA-MB-231-Zellen nach kombinierter uPA- und uPAR-RNAi

Die zelluläre *in vitro*-Invasion wurde in dieser Doktorarbeit mit dem Matrigel-Boyden-Kammer-Invasionstest analysiert. Dieser Test unterscheidet sich von dem Boyden-Kammer-Migrationstest darin, dass die Membran, durch die die Zellen migrieren sollen, mit Matrigel beschichtet ist, das sich aus Bestandteilen der extrazellulären Matrix (*extra cellular matrix*, ECM) zusammensetzt und diese simulieren soll. Die Zellen müssen dieses Matrigel abbauen, um durch die Poren in der Membran wandern zu können, was den Abbau der ECM *in vivo* darstellen soll. Acht Wochen nach der uPAR-, uPA- und kombinierten uPAR- und uPA-RNAi wurde dieser Test durchgeführt. Die Analyse der zellulären *in vitro*-Invasion zeigte, dass lediglich die Herunterregulierung von uPA zu einer höchst signifikant ($p \leq 0,001$) reduzierten

Zellinvasion führte (Abb. 18). Die uPAR-RNAi und die simultane uPAR- und uPA-RNAi zeigten zwar einen leichten, jedoch nicht signifikanten Effekt auf das Invasionspotential der Zellen.

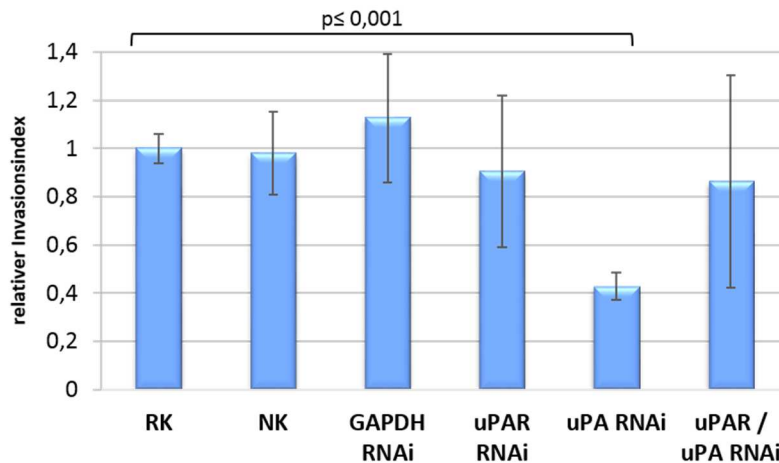


Abbildung 18: *In vitro*-Invasionsverhalten von MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-, uPA- und kombinierter uPAR- und uPA-RNAi

Matrigel-Boyden-Kammer-Invasionstest nach RNAi, zur Reaktions-Kontrolle (RK) relative Invasion mit Standardabweichung, 48h nach Testbeginn, NK: *non-targeting vector* RNAi, n=3

3.3.6 Immunhistochemische uPAR-Expressionsanalyse in relevanten Brustkrebszelllinien

Aus den MDA-MB-231-Zellen, in denen die Proteinexpression von uPA bzw. uPAR permanent vermindert war, wurden FFPE-Zellblöcke und anschließend Schnitte hergestellt, um an diesen die uPAR-Proteinexpression und Lokalisation mit immunhistochemischer Analyse zu zeigen. Außerdem dient hier die IHC als Grundlage zur Optimierung des *proximity ligation assay* (PLA). uPAR ist sowohl an der Zytoplasmamembran lokalisiert, was mit IHC an der membranständigen Markierung erkennbar wird (Abb. 19) als auch im Zytoplasma der Zellen vorhanden, wie die zytoplasmatische IHC Markierung zeigt und mit bisherigen Daten aus der Literatur übereinstimmt (Magnussen *et al.* 2014). Die immunhistochemische Markierung von uPAR zeigte außerdem im Vergleich zu den Reaktions-Kontrollzellen (RK, Abb. 19) die verminderte uPAR-Expression infolge der lentiviral vermittelten RNAi (uPAR-RNAi, Abb. 19). Die als Kontrollen eingesetzten MCF7- bzw. SKBR3-Zellen, die uPAR laut Western Blot-Analysen nur schwach exprimieren, zeigten dies auch in der immunhistochemischen Analyse (Abb. 19).

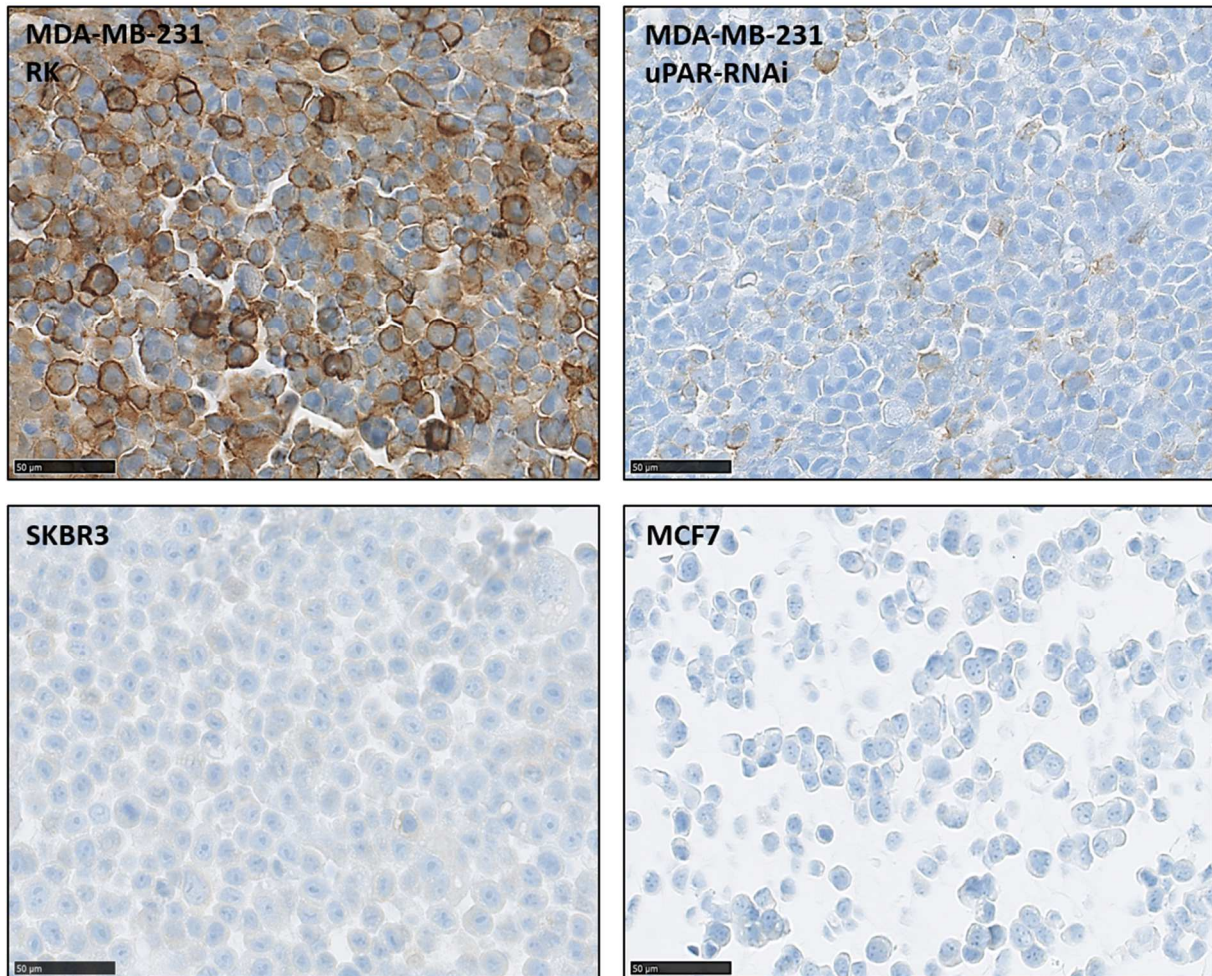


Abbildung 19: Expression von uPAR in MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-RNAi und in Kontroll-Zellen
 Immunhistochemische Analyse der uPAR-Expression in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, SKBR3 und MCF7; DAB-basierte Braunmarkierung von uPAR, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; RK: Reaktionskontrolle, Maßstabsleiste: 50 µm

3.3.7 Verminderung der Protein-Protein-Komplexe aus uPAR und uPA nach uPAR-RNAi

Eine relativ neue Methode zur Darstellung bzw. zum Nachweis von Protein-Protein-Komplexen ist der *proximity ligation assay* (PLA). Diese Methode zeigt u.a. die räumliche co-Lokalisation von zwei Proteinen (Soderberg *et al.* 2008), wenn diese laut Hersteller eine maximale Distanz von 40 nm zueinander haben (Olink Bioscience 2012) und wird unter dem Mikroskop als ein Fluoreszenzsignal dargestellt. Dies kann als Hinweis für eine mögliche direkte Interaktion der beiden Proteine gewertet werden. Hier wurde die Methode an den Paraffinschnitten der MDA-MB-231 FFPE-Zellblöcke (Reaktions-Kontrollzellblöcke, uPAR-RNAi-Zellblöcke) für die beschriebene Interaktion von uPAR und uPA optimiert.

Die Herunterregulierung von uPAR (Abb. 20B) hatte in den MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (Abb. 20A) eine starke Reduzierung der Protein-Protein-Komplex-Anzahl aus uPAR und uPA auf ca. 53% ($p=0,052$) zur Folge (Abb. 20C).

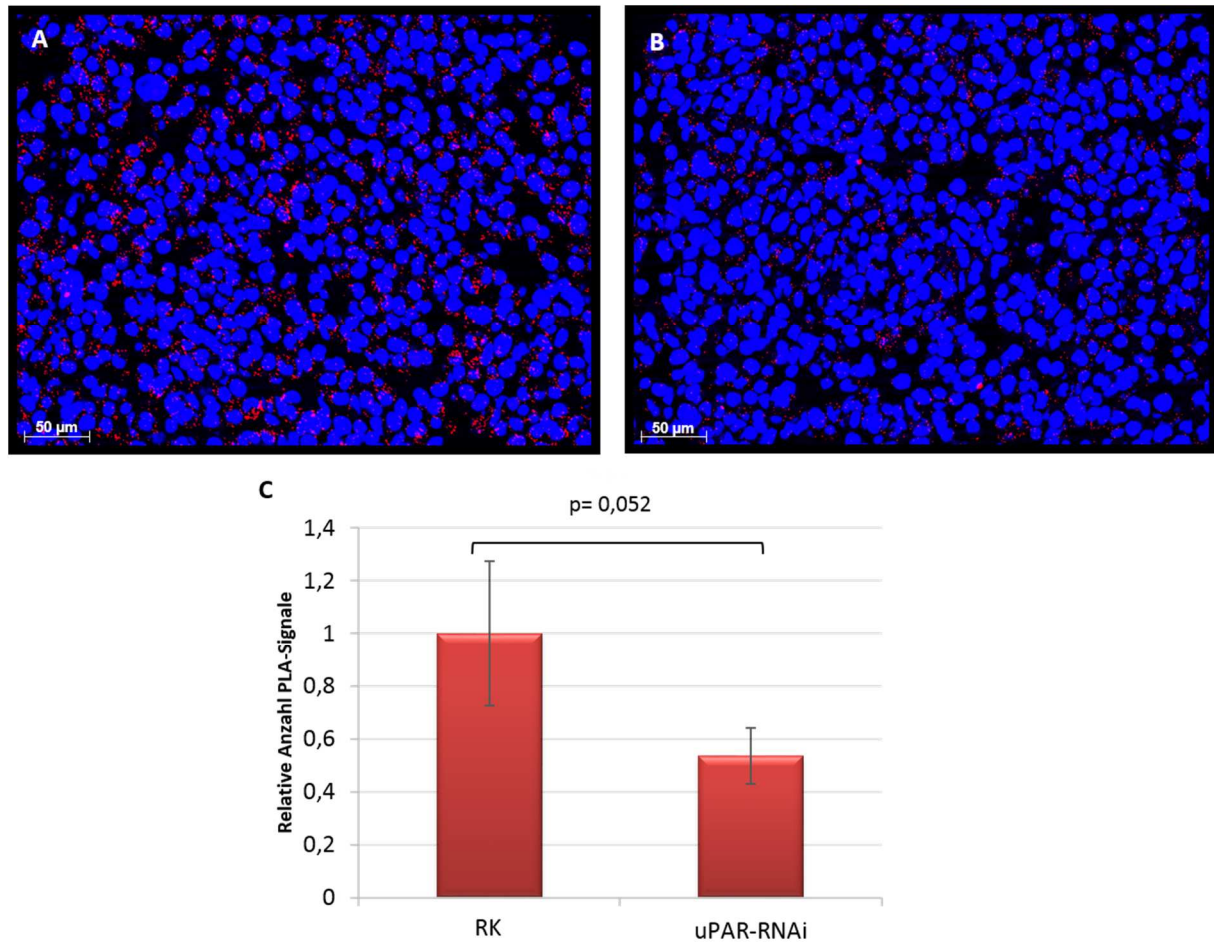


Abbildung 20: Verminderte Anzahl von Protein-Protein-Komplexen aus uPAR und uPA nach uPAR-RNAi in MDA-MB-231-Zellen

PLA-Analyse der uPAR und uPA Protein-Protein-Komplexe in Reaktions-Kontrollzellen (A) und uPAR-RNAi-Zellen (B) mit Fluoreszenzmikroskop; Maßstabsleiste: 50 µm; C: Relative Anzahl der PLA-Signale (Exzitationsfilter Cy3, rot) pro Nukleus/Zelle (Exzitationsfilter DAPI, blau) von uPAR-RNAi-Zellen im Verhältnis zu Reaktions-Kontrollzellen (RK) mit Standardabweichung, Analyse aus je 3 Blickfeldern, Bildanalysesoftware: *Definiens Developer XD*, Statistische Analysesoftware: *SigmaPlot*.

3.4 Evaluierung von uPAR und IGF-1R als potentielle Ziele einer Kombinationstherapie

Ein wechselseitiger Einfluss und Assoziation zwischen uPAR-System und IGF-1R-System wurde bereits beschrieben (Gallicchio *et al.* 2001, Nielsen *et al.* 2004, Bauer *et al.* 2005). Jedoch eine direkte Interaktion der Rezeptoren wurde noch nicht berichtet. In dieser Arbeit sollte diese mit einer optimierten co-Immunpräzipitation und PLA analysiert werden. Außerdem wurde mit *in vitro*-Analysen die Relevanz von uPAR und IGF-1R als mögliche Zielmoleküle einer Kombinationstherapie im TNBC evaluiert.

3.4.1 Etablierung einer permanenten RNAi von IGF-1R mit uPAR oder uPA

Um die Effekte einer simultanen RNAi von uPAR und IGF-1R, bzw. uPA und IGF-1R zu analysieren, wurde eine permanente, lentiviral vermittelte RNA-Interferenz gegen die mRNA der drei Zielproteine in den Zelllinien MDA-MB-231 und BT549 etabliert. Eine permanente Herunterregulierung der Zielproteine wurde nach dem Einsatz von je drei Vektortypen erreicht, die an unterschiedliche Sequenzabschnitte innerhalb der mRNA des Zielproteins binden (Appendix 1). Da die eingesetzten Vektoren ein turboGFP (uPAR-RNAi) oder turboRFP (IGF-1R-RNAi) Reporter gen enthalten, konnte deren Expression, die nur mit einer erfolgreichen Transduktion der Zellen einhergeht, mit dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt werden.

Die Zellen, die mit RFP-kodierenden Vektoren transduziert worden waren, zeigten nach Anregung mit dem Filter Cy3 rote Fluoreszenzsignale (Abb. 21). Die Zellen, die mit den GFP-kodierenden Vektoren transduziert worden waren, fluoreszierten nach der Exzitation mit dem GFP-Filter grün. Die kombinierte Transduktion mit beiden Vektortypen führte zu roten, grünen bzw. gelb/orangen Fluoreszenzsignalen. Die Zellen der Reaktions-Kontrollen, die lediglich mit dem Transduktionsmedium ohne virale Vektoren inkubiert worden waren, wurden ebenfalls unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Exzitation betrachtet. Sie zeigten, wie erwartet, keine Fluoreszenzsignale, weshalb die Aufnahmen hier nicht dargestellt werden. Sowohl die Zellen, die mit dem nicht-zielgerichteten Vektor (Negativ-Kontrolle) als auch solche, die mit dem gegen GAPDH-mRNA gerichteten Vektor transduziert worden waren, zeigten aufgrund der auf den beiden Vektoren kodierten GFP-Reportersequenz nach

Exzitation mit dem GFP-Filter grüne Fluoreszenzsignale (Aufnahmen werden hier nicht gezeigt), ähnlich den uPAR-RNAi Ansätzen in der Abb. 21.

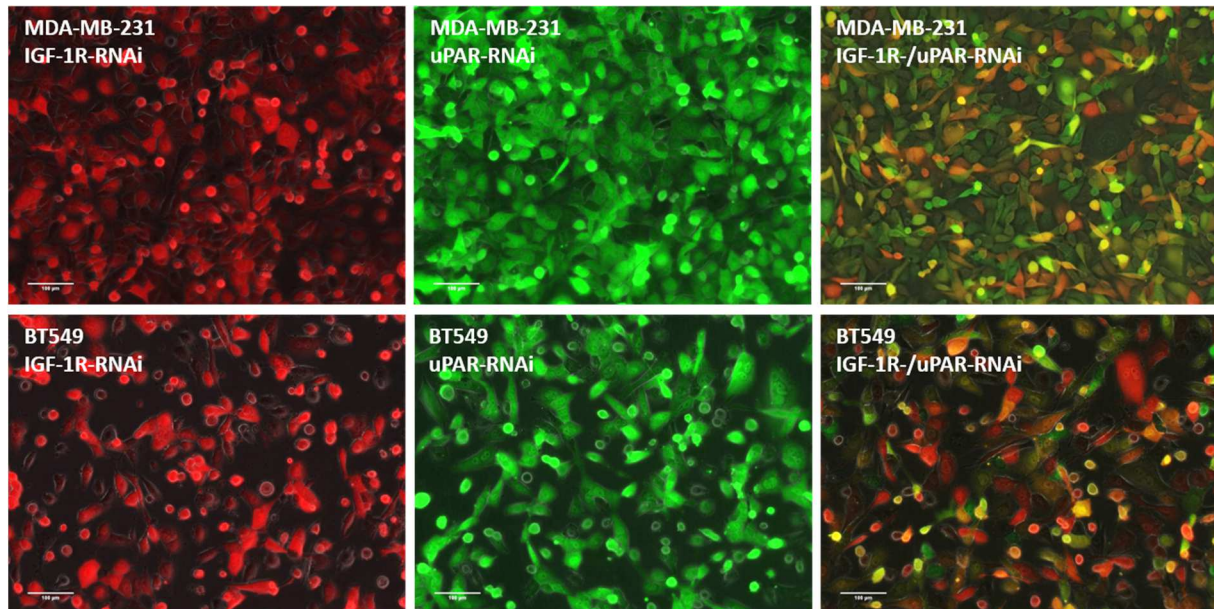


Abbildung 21: Fluoreszierende MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach Transduktion der Zellen mit lentiviralen Vektoren

Fluoreszenzaufnahmen der MDA-MB-231- und der BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, und simultaner IGF-1R und uPAR-RNAi. Exzitationsfilter: Cy3 (rot) und GFP (grün), Maßstabsleiste: 100 µm.

Anschließend wurde die Herunterregulierung von uPAR, IGF-1R und uPA in Zelllysaten auf Proteinexpressionsebene mit Western Blot überprüft. Außerdem wurde RNA aus den Zellen isoliert, revers transkribiert und qRT-PCR-Analysen mit spezifischen zur Amplifikation der cDNA-Sequenzen von *PLAUR*, *IGF-1R* bzw. *PLAU* synthetisierten, kommerziell erworbenen Primern durchgeführt. In der MDA-MB-231-Zelllinie führte die Expressionsverminderung von IGF-1R im Einzelansatz im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) zu einer starken Reduzierung der Proteinexpression (Abb. 22A) bzw. zu einem auf ca. 45% verringertes mRNA-Level (Abb. 22B). In den Ansätzen der Herunterregulierung von IGF-1R in Kombination mit uPAR war die IGF-1R-Proteinexpression verringert (Abb. 22A) und das mRNA-Level infolge der IGF-1R-RNAi auf ca. 60% (Abb. 22B) reduziert. In der simultanen Reduzierung von IGF-1R mit uPA war die Proteinexpression ebenfalls verringert (Abb. 22A) und das mRNA-Level auf ca. 76% (Abb. 22B) reduziert. Die Proteinexpression von uPAR war sowohl im Einzelansatz als auch zusammen mit IGF-1R infolge der RNAi im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle stark reduziert (Abb. 22A). Außerdem war das uPAR-mRNA-Level im Vergleich zur

Reaktions-Kontrolle auf 41% im Einzelansatz (Abb. 22C) bzw. 57% im mit IGF-1R kombinierten Ansatz (Abb. 22C) verringert. Die Reduzierung von uPA führte im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle im Einzelansatz zu einer und bei der simultanen Herunterregulierung mit IGF-1R zu einer reduzierten Proteinexpression (Abb. 22A). Auch hier zeigte sich, dass nach uPAR-RNAi die Expression von pro-uPA induziert war (Abb. 22A). Das uPA-mRNA-Level war infolge der RNAi im Einzelansatz auf ca. 40% und bei der simultanen Reduzierung mit IGF-1R auf etwa 57% reduziert (Abb. 22D). Als Negativ-Kontrolle wurde ein Vektor eingesetzt, der laut Angaben des Herstellers eine nicht-zielgerichtete Sequenz enthält und der in den RNAi-Ansätzen keine Effekte zeigte. Als Infektions-Positiv-Kontrolle wurde ein Vektor verwendet, der zur GAPDH-RNAi führt und die GAPDH-Proteinexpression stark reduzierte (Abb. 22A).

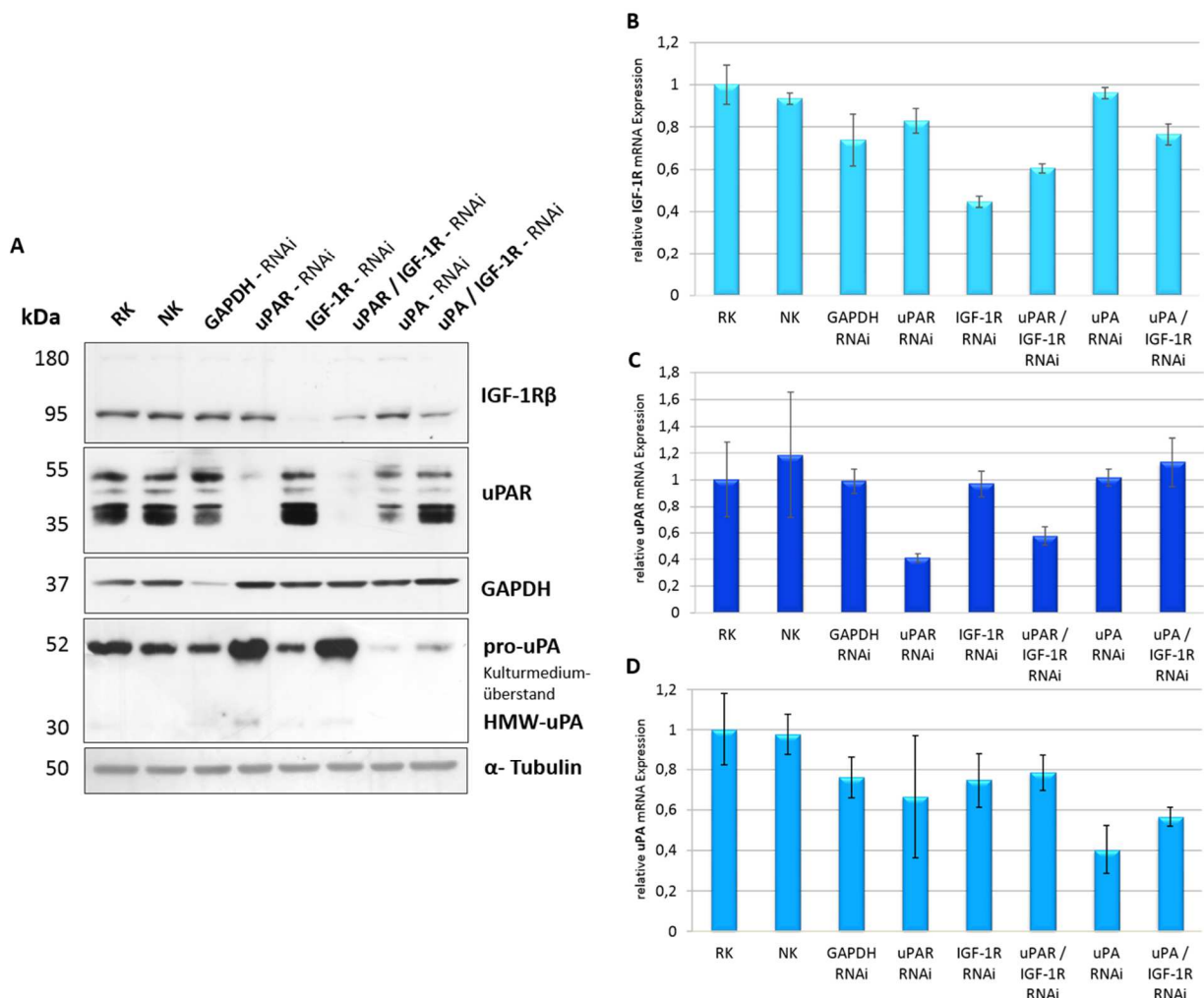


Abbildung 22: Reduzierte Proteinexpression und mRNA-Level nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, und kombinierter IGF-1R- und uPAR- bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi in MDA-MB-231-Zellen

A: Western Blot-Analyse von IGF-1R β -, uPAR- und uPA-Proteinexpression nach RNAi, Ladekontrolle: α -Tubulin **B:** qRT-PCR-Analyse des mRNA-Niveaus mit Standardabweichung von **IGF-1R**, **uPAR** (**C**) und **uPA** (**D**) nach RNAi, RK: Reaktions-Kontrolle, NK: *non-targeting vector* RNAi, n = 3.

Auch in der zweiten TNBC-Zelllinie BT549 führte die Herunterregulierung von IGF-1R im Einzelansatz, im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) und in den Ansätzen mit simultaner IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. kombinierter IGF-1R- und uPA-RNAi zu einer reduzierten Proteinexpression (Abb. 23A). Die IGF-1R-mRNA-Levels waren nach IGF-1R-RNAi bzw. nach simultaner uPAR- und IGF-1R-RNAi auf 61% (Abb. 23B) und nach kombinierter uPA- und IGF-1R-RNAi auf 36% reduziert (Abb. 23B). Die Proteinexpression von uPAR war sowohl im Einzelansatz als auch infolge der kombinierten RNAi mit IGF-1R im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) stark reduziert (Abb. 23A). Das mRNA-Level war nach uPAR-RNAi auf 20% bzw. nach kombinierter uPAR- und IGF1R-RNAi auf 30% im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) verringert (Abb. 23C).

Die Herunterregulierung von uPA führte, im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK), im Einzelansatz und nach der simultanen RNAi mit IGF-1R zu einer reduzierten uPA-Proteinexpression (Abb. 23A). Auch in der BT549- Zelllinie war die pro-uPA Proteinexpression infolge der uPAR-RNAi induziert (Abb. 23A). Das uPA-mRNA-Level war aufgrund der RNAi im Einzelansatz auf ca. 57% und in dem simultanen uPA- und IGF-1R-RNAi-Ansatz auf etwa 80% reduziert (Abb. 23D). Als Negativ-Kontrolle wurde ein Vektor eingesetzt, der laut Herstellerangaben eine nicht-zielgerichtete Sequenz enthält, der einen leicht reduzierenden Effekt auf die Proteinexpression von uPAR zeigte (Abb. 23A). Als Positiv-Kontrolle für die Infektion wurde ein Vektor verwendet, der eine shRNA-Sequenz für GAPDH-RNAi kodiert und in den BT549-Zellen zu einem Absterben der Zellen führte, weshalb für diese Zelllinie die Positiv-Kontrolle in den anhängenden Experimenten nicht eingesetzt wurde.

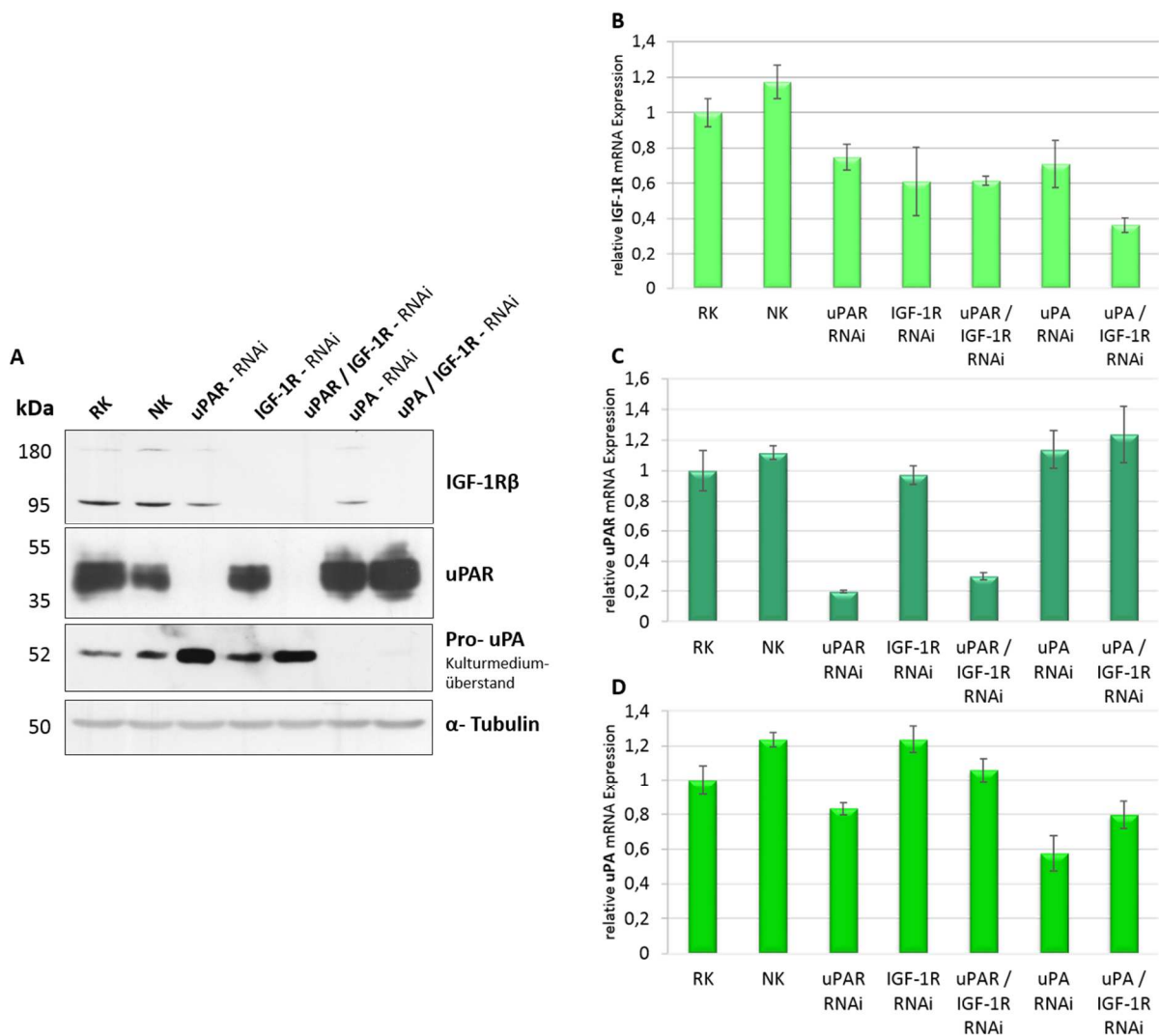


Abbildung 23: Reduzierte Proteinexpression und mRNA-Level nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, und kombinierter IGF-1R- und uPAR- bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi in BT549-Zellen

A: Western Blot-Analyse von IGF-1R β -, uPAR- und uPA-Proteinexpression nach RNAi, Ladekontrolle: α -Tubulin **B:** qRT-PCR-Analyse des mRNA-Levels mit Standardabweichung von **IGF-1R**, **uPAR** (**C**) und **uPA** (**D**) nach RNAi, RK: Reaktions-Kontrolle, NK: *non-targeting vector* RNAi, n = 3.

3.4.2 Reduzierte *in vitro*-Proliferation der MDA-MB-231- und BT549- Zellen nach RNAi

Der Effekt der Herunterregulierung von IGF-1R einzeln oder in Kombination mit uPAR bzw. uPA in den MDA-MB-231- und BT549-Zellen auf deren Proliferationsverhalten wurde mit dem WST-1-Test überprüft. Die *in vitro*-Proliferation der MDA-MB-231-Zellen war infolge der IGF-1R-RNAi höchst signifikant ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) auf etwa 33% reduziert (Abb. 24A). Die Verminderung der uPA-Proteinexpression führte zu einer

höchst signifikanten ($p \leq 0,001$) Reduzierung der Zellviabilität auf etwa 46% (Abb. 24A). Die kombinierte RNAi von IGF-1R mit uPAR führte im Verhältnis zu uPAR-RNAi ebenfalls zu einer höchst signifikant ($p \leq 0,001$) verringerten Lebensfähigkeit der Zellen auf etwa 50% (Abb. 24A). In den BT549-Zellen zeigten lediglich die Zellen nach uPA-RNAi eine hoch signifikante ($p = 0,003$) aber nur leicht auf etwa 86% verringerte Zellproliferation im Vergleich zu den Reaktions-Kontrollzellen (RK) (Abb. 24B).

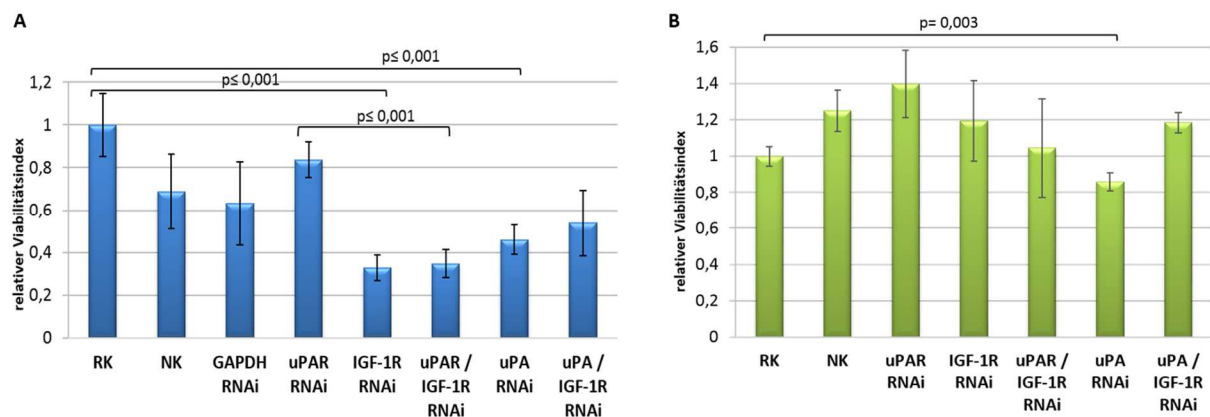


Abbildung 24: Reduzierte *in vitro*-Proliferation von MDA-MB-231-Zellen und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi

WST-1-Analyse mit Standardabweichung von MDA-MB-231-Zellen (A) und BT549-Zellen (B) nach RNAi der Zielproteine, 48 h nach Testbeginn, 30 min Inkubation des WST-1-Reagenz, RK: Reaktions-Kontrolle, NK: *non-targeting vector* RNAi n=5.

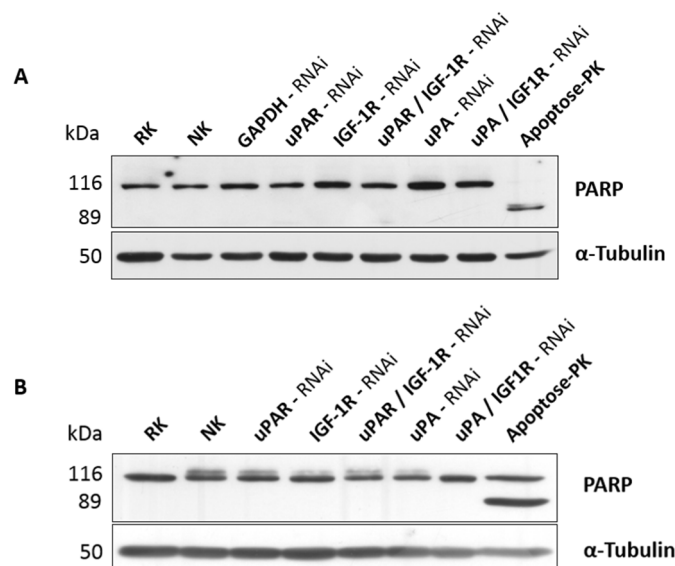


Abbildung 25: Keine PARP- Spaltung bzw. induzierte Apoptose in MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach uPAR-, IGF-1R-, uPA-, kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi bzw. uPA- und IGF-1R-RNAi

Western Blot-Analyse von PARP-Proteinexpression bzw. -Spaltprodukten nach RNAi in MDA-MB-231-Zellen (A) und BT549-Zellen (B), in Positiv-Kontrolle (Apoptose-PK) durch Staurosporin induzierte PARP-Spaltung, RK: Reaktions-Kontrolle, NK: *non-targeting vector* RNAi, Ladekontrolle: α-Tubulin

Um eine Apoptoseinduktion zu zeigen, wurde mit Western Blot die PARP-Spaltung in den RNAi-Ansätzen der MDA-MB-231-Zellen (Abb. 25A) und der BT549-Zellen (Abb. 25B) überprüft. Diese ergab, dass in keiner der beiden Zelllinien PARP gespalten bzw. Apoptose ausgelöst worden war (Abb. 25).

Außerdem wurden die Effekte der RNAi auf die Expression bzw. Phosphorylierung von, für die Zellproliferation relevanten Proteinen, im Western Blot überprüft. In der MDA-MB-231-Zelllinie zeigten die Zellen nach RNAi im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) keine sichtbar veränderte Proteinexpression bzw. -aktivierung der überprüften Proteine (Abb. 26).

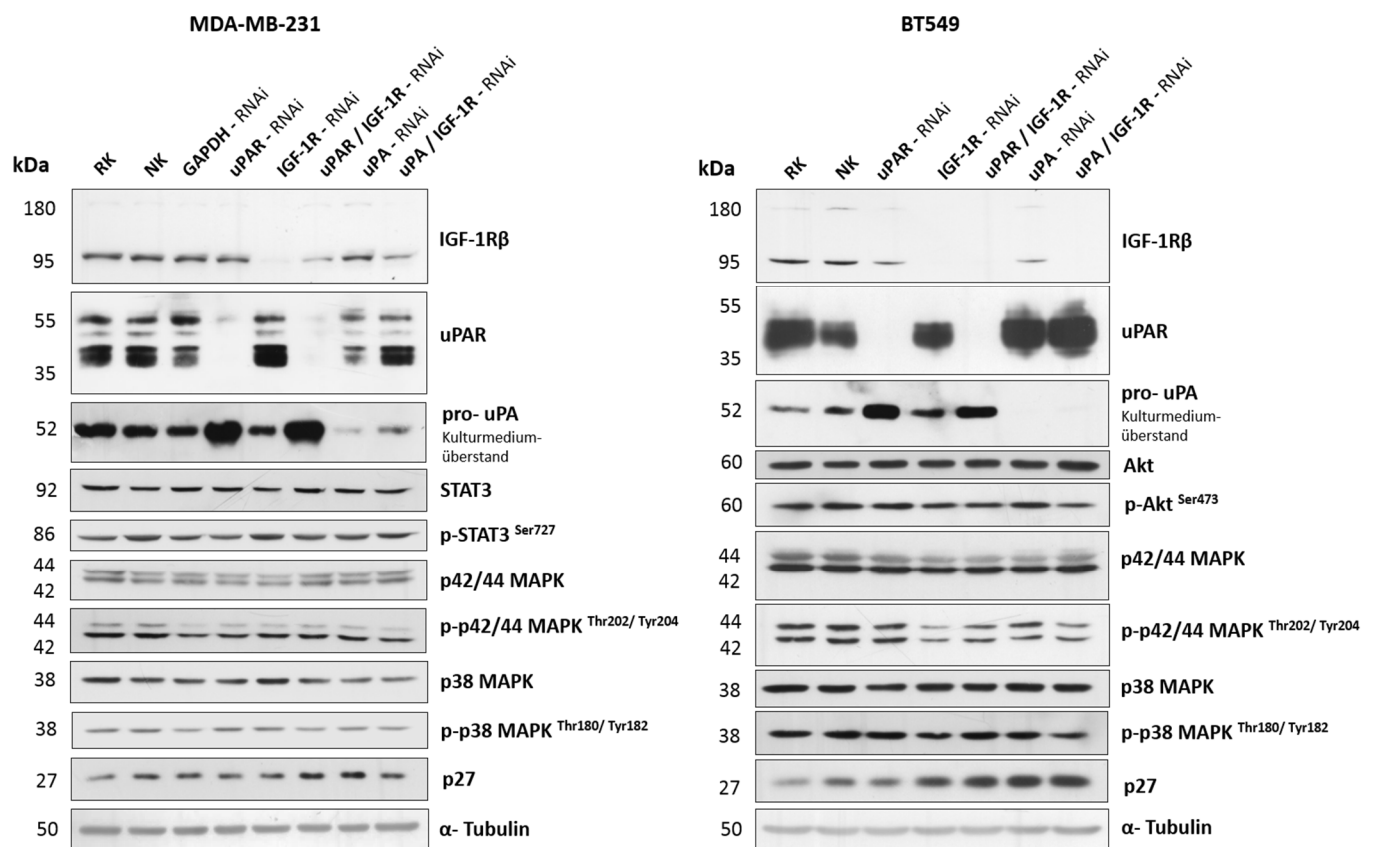


Abbildung 26: Expression von, für u.a. Zellproliferation, relevanten Proteinen in MDA-MB-231- und BT549-Zellen

Western Blot-Analyse der Proteinexpression bzw. -phosphorylierung (p-) von IGF-1R (β -Kette), uPAR, uPA, cMet, STAT3, p42/44 MAPK, p38 MAPK, p27, Akt nach uPAR-, IGF-1R-, uPA- kombinierter uPAR und IGF1R- bzw. uPA- und IGF-1R-RNAi in MDA-MB-231-Zellen und BT549-Zellen, RK: Reaktions-Kontrolle, NK: *non-targeting vector* RNAi, Ladekontrolle: α -Tubulin.

In den BT549-Zellen war die Expression von p27 infolge der RNAi induziert. Die densitometrische Vermessung der Bandenstärke der Western Blot Filme aus Abbildung 26 zeigte, dass die Expression von p27 nach IGF-1R-RNAi (3,15) und uPA-RNAi (3,26) sowie kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi (2,82) sowie uPA- und IGF-1R-RNAi (2,86) im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (1,00) induziert war (Abb. 27), was eine reduzierte Zellproliferation anzeigt. Auch die densitometrische Vermessung der Banden der phosphorylierten p44/42-MAPK aus Abbildung 26 zeigte, dass dessen Aktivierung infolge der IGF-1R-RNAi (0,31) auch in Kombination mit uPAR-RNAi (0,55) und uPA-RNAi (0,48) im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (1,00) reduziert war (Abb. 27), was ebenfalls auf eine verringerte Zellproliferation hinweist. Gezeigt wird hier exemplarisch die Vermessung jeweils eines Western Blots, die zwei weiteren Replikate zeigten dieselbe Expressionstendenz und sind im Appendix 4 abgebildet.

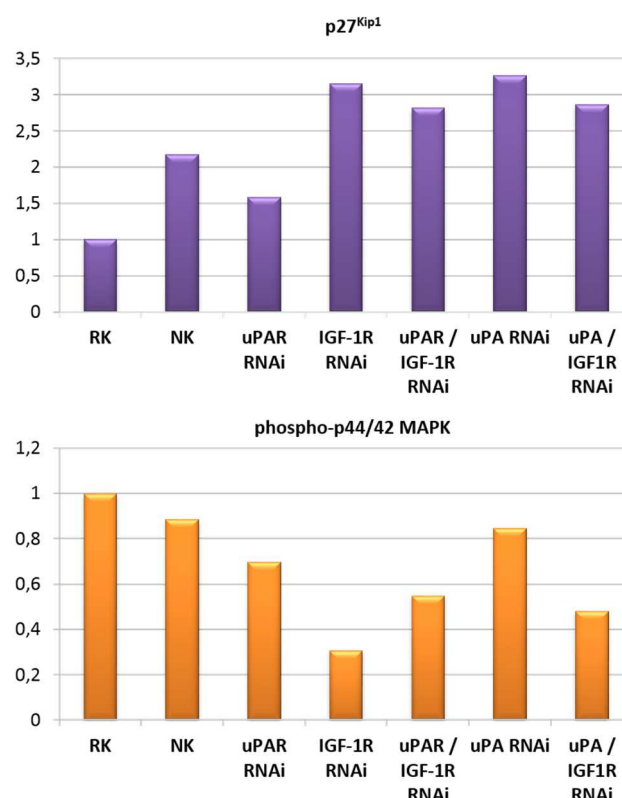


Abbildung 27: Zunahme der p27-Expression und reduzierte Phosphorylierung von p42/44 MAPK in BT549-Zellen

Densitometrische Vermessung der Bandenstärke der p27-Expression und Phosphorylierung von p44/42 MAPK aus Western Blot-Analysen (Abb. 26). Verhältnisswerte auf die Werte der Reaktions-Kontrolle (RK) bezogen. Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses aus einem von 3 Experimenten, NK: *non-targeting vector* RNAi, Normalisierung auf α -Tubulin; Densitometrie Software: *Image Studio Lite 5.0* (LI-COR)

3.4.3 Reduzierte *in vitro*-Migration der MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-, IGF-1R- und kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi

Mit sowohl dem Wundheilungs-Migrationstest (*scratch wound migration assay*) als auch dem Boyden-Kammer-Migrationstest wurde die Migration der MDA-MB-231- und der BT549-Zellen infolge der IGF-1R-, uPAR-, uPA-, der kombinierten IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA- RNAi überprüft.

Wundheilungs-Migrationstest

24 h nach Testbeginn war die Migration der MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-RNAi und IGF-1R-RNAi höchst signifikant ($p \leq 0,001$) um ca. 19% bzw. 26% im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) reduziert (Abb. 28A). Auch die uPA-RNAi führte im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) zu einer hoch signifikanten ($p=0,002$) Reduzierung der Zellmigration um etwa 22% (Abb. 28A). Die kombinierte IGF-1R- und uPAR-RNAi führte im Vergleich zu der uPAR-RNAi ebenfalls zu einer signifikanten ($p=0,027$) Reduzierung der Zellmigration um ca. 7% (Abb. 28A). Auch die Herunterregulierung von IGF-1R kombiniert mit uPA führte im Vergleich zu uPA-RNAi zu einer signifikant ($p=0,028$) verminderten Migration um ca. 8% (Abb. 28A). In den BT549-Zellen führte lediglich die uPAR-RNAi im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) zu einer hoch signifikanten ($p=0,001$) Reduzierung der Zellmigration um ca. 25% (Abb. 28B).

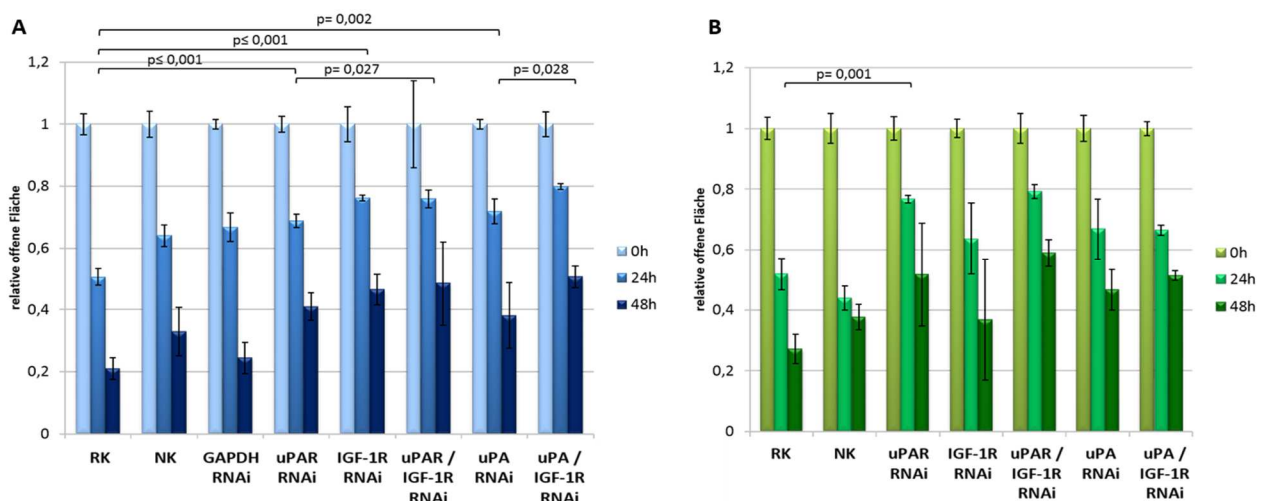


Abbildung 28: Reduzierte *in vitro*-Migration der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi

Wundheilungs-Migrationstest (*scratch wound healing assay*) mit MDA-MB-231-Zellen (**A**) und BT549-Zellen (**B**) nach RNA-Interferenz; Im Verhältnis zur Reaktionskontrolle (RK) relative offene Fläche mit Standardabweichung 0h, 24h und 48h nach Testbeginn; NK: *non-targeting vector* RNAi, $n=3$; Analysesoftware: *TScratch*.

Boyden-Kammer-Migrationstest

Die Analyse des Boyden-Kammer-Migrationstests der MDA-MB-231-Zellen zeigte, dass uPAR-RNAi und uPA-RNAi zu einer höchst signifikant ($p \leq 0,001$) reduzierten Zellmigration auf 40% (uPAR-RNAi) und 26% (uPA-RNAi) im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) führte (Abb. 29A). Die IGF-1R-RNAi verursachte eine hoch signifikant ($p=0,011$) reduzierte Migration um ca. 50% im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) (Abb. 29A). Die kombinierte RNAi von uPAR und IGF-1R verringerte die Migration nochmals hoch signifikant ($p=0,003$) im Vergleich zu uPAR-RNAi und signifikant ($p=0,018$) im Vergleich zu IGF-1R-RNAi auf ca. 12% (Abb. 29A). Die RNAi von IGF-1R, uPAR, uPA und den Kombinationen aus IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R und uPA-RNAi führte in den BT549-Zellen zu keiner Reduzierung sondern nach uPA-RNAi zu einer Zunahme der Zellmigration (Abb. 29B).

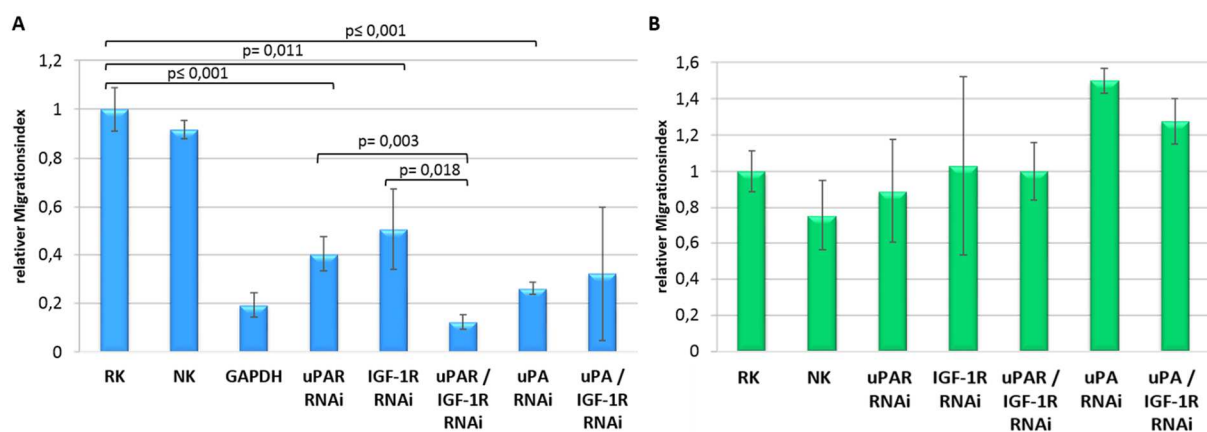


Abbildung 29: Reduzierte *in vitro*-Migration der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi

Boyden-Kammer-Migrationstest mit Standardabweichung mit MDA-MB-231-Zellen (**A**) und BT549-Zellen (**B**) nach RNA-Interferenz im Verhältnis zur Reaktions-Kontrolle (RK); Analyse 48 h nach Testbeginn; NK: *non-targeting vector* RNAi, $n=3$.

3.4.4 Reduzierte *in vitro*-Invasion der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach RNAi

Das Invasionspotential der MDA-MB-231-Zellen war infolge der IGF-1R-RNAi hoch signifikant ($p=0,006$) auf ca. 70% im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) reduziert (Abb. 30A). Auch die uPA-RNAi verursachte, wenn auch nicht signifikant, eine verringerte Zellinvasion (Abb. 30A). Außerdem war die Invasion der Zellen infolge der kombinierten uPAR- und IGF-1R-RNAi im Vergleich zu der uPAR-RNAi und zu der IGF-1R-RNAi hoch signifikant ($p=0,001$) auf ca. 26% reduziert (Abb. 30A). Das Invasionspotential der BT549-Zellen war

infolge der IGF-1R-RNAi nicht signifikant auf ca. 80% reduziert und infolge der uPA-RNAi stark induziert (Abb. 30B).

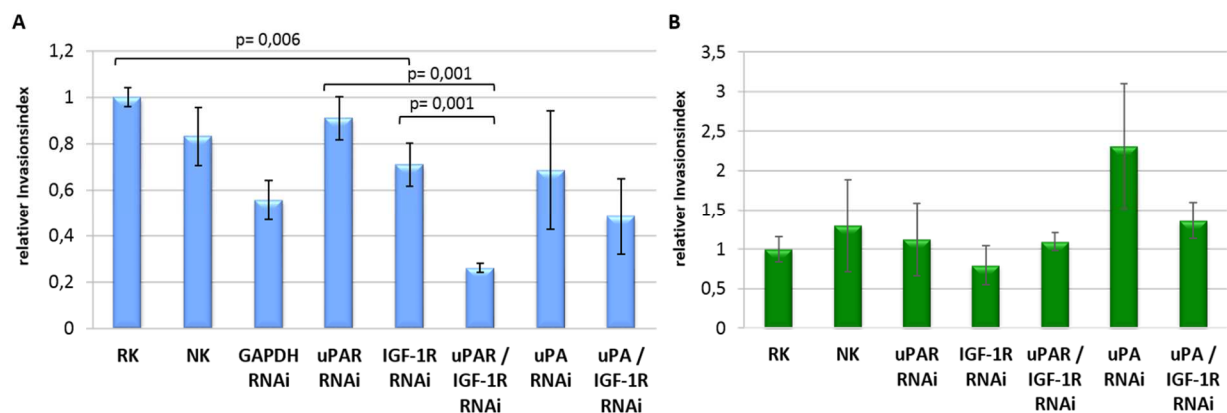


Abbildung 30: Reduzierte *in vitro*-Invasion der MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R-, uPAR-, uPA-, kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi bzw. IGF-1R- und uPA-RNAi

Matrigel-Boyden-Kammer-Invasionstest mit MDA-MB-231-Zellen (**A**) und BT549-Zellen (**B**) nach RNA-Interferenz; Analyse 48 h nach Testbeginn mit Standardabweichung im Verhältnis zur Reaktionskontrolle (RK); NK: *non-targeting vector* RNAi, n=3.

Mit Western Blot-Analysen wurde die Expression bzw. Phosphorylierung von für die Invasion relevanten Signalmarkern wie Paxillin, Vimentin und MMP2 bzw. MMP9 überprüft. Diese zeigten jedoch keine Effekte infolge der RNAi.

3.4.5 Immunhistochemische IGF-1R- und uPAR- Expressionsanalysen in MDA-MB-231- und BT549-Zellen nach IGF-1R- und uPAR-RNAi

Aus den MDA-MB-231-Zellen und BT549-Zellen, in denen die Proteinexpression von uPAR bzw. IGF-1R permanent reduziert war, wurden FFPE-Zellblöcke und anschließend histologische Schnitte hergestellt, um an diesen die uPAR- bzw. IGF-1R-Proteinexpression und -Lokalisation mit immunhistochemischer Analyse darzustellen.

IGF-1R Expression

Der Transmembranrezeptor IGF-1R wird meist an der Zytoplasmamembran exprimiert, was als membranständige Markierung erkennbar ist (Abb. 31) (Shimizu *et al.* 2004). Da IGF-1R darüber hinaus im Zytoplasma vorliegt, zeigte sich auch eine schwache zytoplasmatische IHC-Markierung (Abb. 31) (Shimizu *et al.* 2004). Die immunhistochemische Markierung in

MDA-MB-231-Zellen von IGF-1R in Reaktions-Kontrollzellen (RK) und in Zellen nach uPAR-RNAi zeigten keinen Effekt hinsichtlich der IGF-1R-Proteinexpression, während die Zellen nach IGF-1R-RNAi und nach der simultanen uPAR- und IGF-1R-RNAi eine verminderte IGF-1R-Expression zeigten (Abb. 31). Als Positiv-Kontrolle wurde die Zelllinie MCF7 verwendet, die laut vorherigen Western Blot-Analysen IGF-1R sehr stark exprimiert (Abb. 13) und mit immunhistochemischen Analysen hier bestätigt wurde (Abb. 31). Die als Negativ-Kontrolle eingesetzte SKBR3-Zelllinie, die IGF-1R in Western Blot-Analysen (Abb. 13) nur schwach exprimiert, zeigte dies auch in der immunhistochemischen Analyse (Abb. 31).

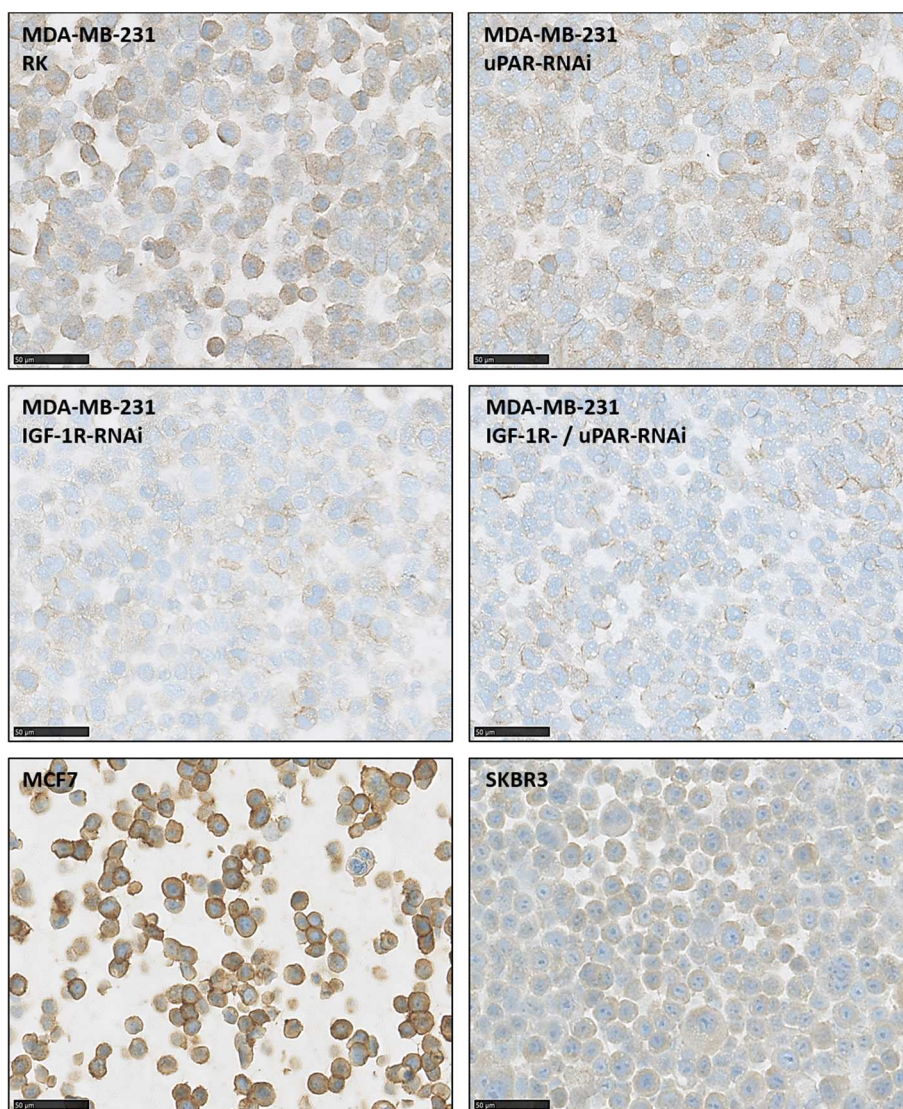


Abbildung 31: Reduzierte Expression von IGF-1R in MDA-MB-231-Zellen nach IGF-1R- und kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi

Immunhistochemische Analyse der IGF-1R-Expression in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 in Reaktions-Kontrolle (RK) und nach uPAR-, IGF-1R-, IGF-1R- und uPAR-RNAi, MCF7 und SKBR3, DAB-basierte Braunmarkierung von IGF-1R, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; Maßstabsleiste mit 50 µm.

Auch in der BT549-Zelllinie zeigte sich eine sowohl membranständige als auch zytoplasmatische IHC-Markierung des IGF-1R (Abb. 32). Infolge der RNAi von IGF-1R im Einzelansatz als auch in der kombinierten RNAi mit uPAR war die Expression und deshalb die IHC-Markierung reduziert (Abb. 32). Die uPAR-RNAi zeigte ebenfalls kein im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) verändertes Proteinexpressionslevel von IGF-1R (Abb. 32).

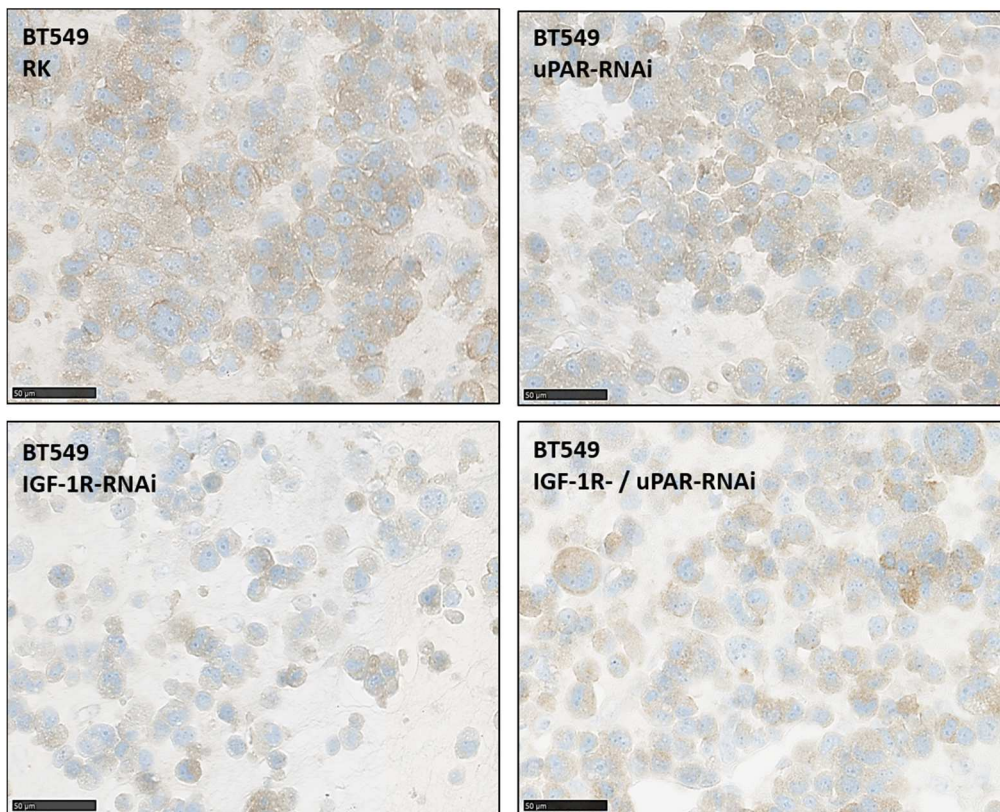


Abbildung 32: Reduzierte Expression von IGF-1R in BT549-Zellen nach IGF-1R- und kombinierter IGF-1R- und uPAR-RNAi

Immunhistochemische Analyse der IGF-1R-Expression in der Brustkrebszelllinie BT549 in Reaktions-Kontrollzellen (RK) und nach uPAR-, IGF-1R-, IGF-1R- und uPAR-RNAi. DAB-basierte Braunmarkierung von IGF-1R, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; Maßstabsleiste mit 50 µm

uPAR-Expression

uPAR ist an der Zytoplasmamembran lokalisiert, was durch IHC-Analysen an der membranständigen Markierung erkennbar wird (Abb. 33) und mit bisherigen Literaturangaben übereinstimmt (Magnussen *et al.* 2014). Darüber hinaus ist uPAR auch im Zytoplasma der Zellen vorhanden, wie die zytoplasmatische Markierung in Abb. 33 zeigt und bereits gezeigt wurde (Magnussen *et al.* 2014). Die immunhistochemische Markierung von

uPAR in Reaktions-Kontrollzellen (RK) zeigt eine unveränderte uPAR-Proteinexpression, während Zellen nach uPAR-RNAi und in den Zellen mit kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi eine verminderte uPAR-Expression detektiert wird (Abb. 33). Die IGF-1R-RNAi schien einen leicht reduzierenden Effekt auf die Expression von uPAR in den MDA-MB-231-Zellen zu haben (Abb. 33). Die als Negativ-Kontrollen eingesetzten MCF7- und SKBR3-Zellen zeigten sowohl in Western Blot Analysen (Abb. 12) als auch in der immunhistochemischen Analyse hier eine schwache bzw. keine uPAR-Expression (Abb. 33).

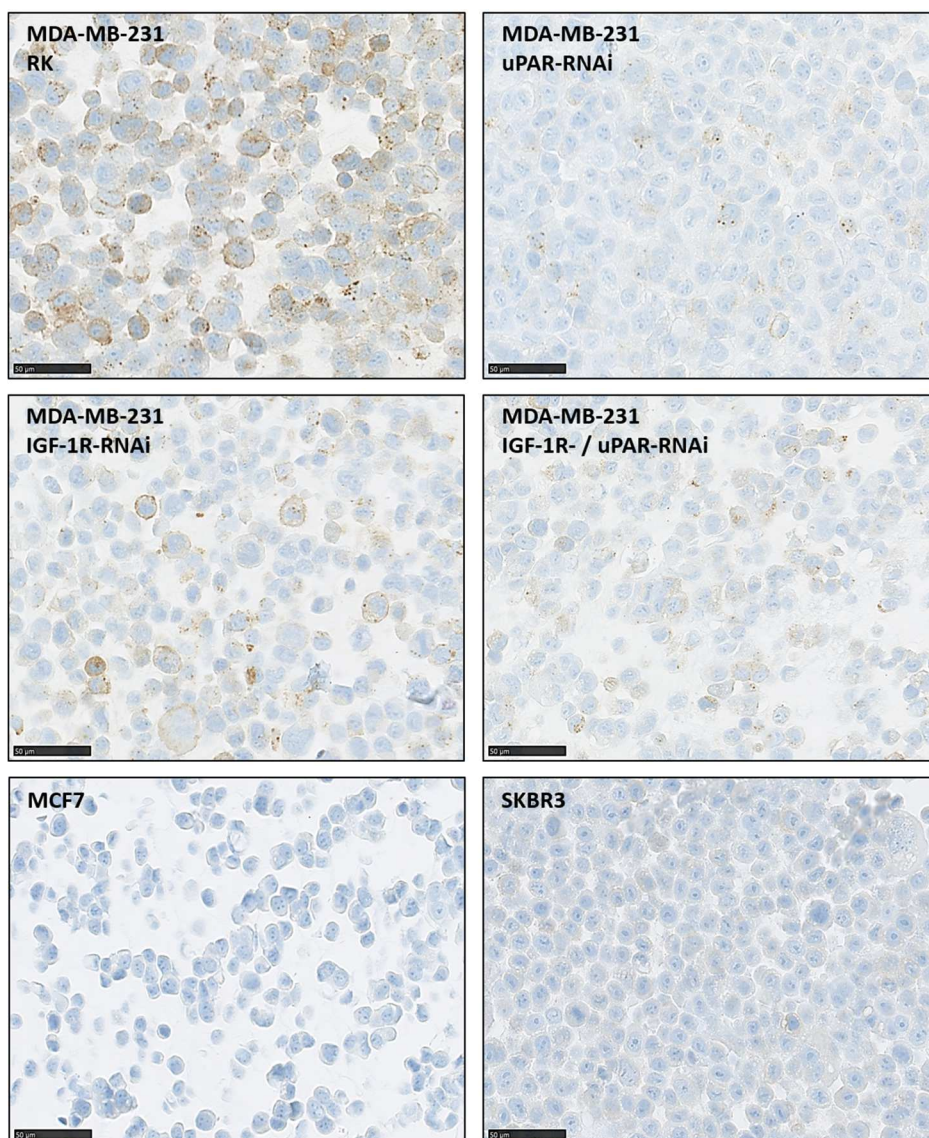


Abbildung 33: Reduzierte Expression von uPAR in MDA-MB-231-Zellen nach uPAR- und kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi

Immunhistochemische Analyse der uPAR-Expression in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 in Reaktions-Kontrolle (RK) und nach uPAR-, IGF-1R-, IGF-1R- und uPAR-RNAi, MCF7 und SKBR3, DAB-basierte Braunmarkierung von uPAR, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; Maßstabsleiste mit 50 µm.

Auch in der BT549-Zelllinie zeigte sich eine sowohl membranständige als auch zytoplasmatische IHC-Markierung des uPAR (Abb. 34). Infolge der RNAi von uPAR im Einzelansatz als auch in der kombinierten RNAi mit IGF-1R war die Expression bzw. die IHC-Markierung reduziert (Abb. 34). Die IGF-1R-RNAi zeigte ein im Vergleich zur Reaktionskontrolle (RK) leicht reduziertes Proteinexpressionslevel von uPAR (Abb. 34).

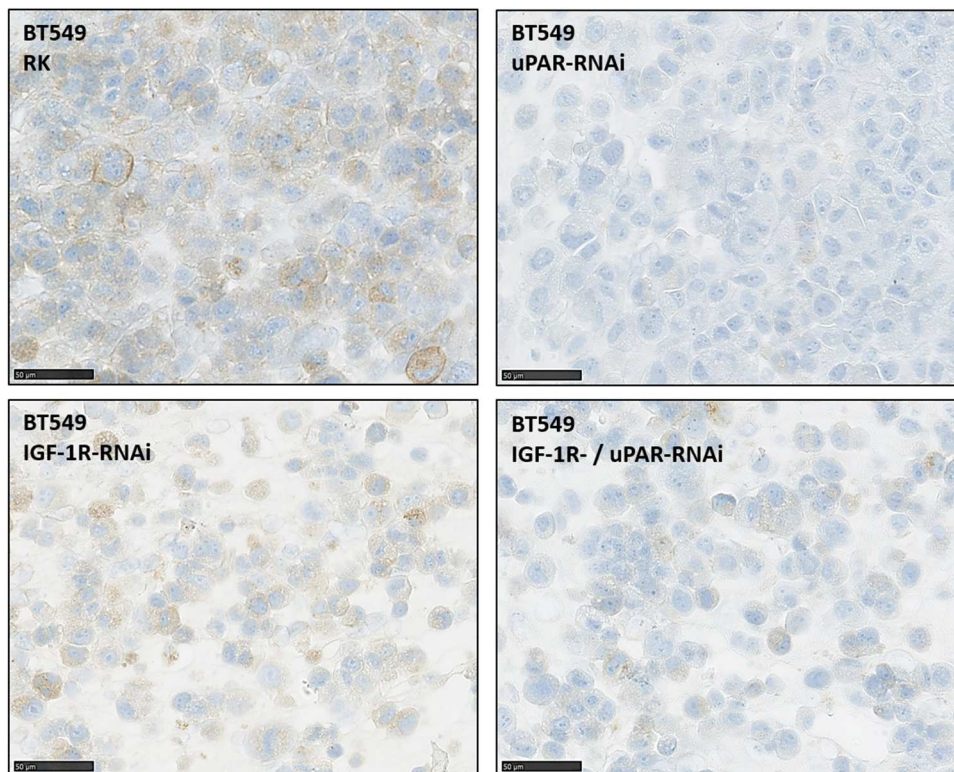


Abbildung 34: Reduzierte Expression von uPAR in BT549-Zellen nach uPAR- und kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi

Immunohistochemische Analyse der uPAR-Expression in der Brustkrebszelllinie BT549 in Reaktionskontrollzellen (RK) und nach uPAR-, IGF-1R-, IGF-1R- und uPAR-RNAi. DAB-basierte Braunmarkierung von uPAR, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; Maßstabsleiste mit 50 µm

3.4.6 Verminderte Anzahl von Protein-Protein-Komplexen aus uPAR und IGF-1R nach RNAi in MDA-MB-231- und BT549-Zellen

Der PLA dient hier zur Untermauerung von Hinweisen auf die direkte Interaktion zweier Proteine. In dieser Arbeit wurde dieser Test für die Proteine uPAR und IGF-1R optimiert. Die PLA-Analyse zeigte, dass nach der Herunterregulierung von uPAR, IGF1R bzw. uPAR und IGF-1R in den MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle (RK) die Anzahl der Protein-Protein-Komplexe aus uPAR und IGF-1R reduziert war (Abb. 35A). Die relative Signalanzahl war im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) infolge der uPAR-RNAi hoch signifikant ($p=0,007$) auf ca. 21% und infolge der IGF-1R-RNAi signifikant ($p=0,013$) auf ca. 35% reduziert (Abb. 35A). In den Ansätzen der kombinierten RNAi aus uPAR und IGF-1R war die Anzahl der Proteinkomplexe ebenfalls auf etwa 35% reduziert (Abb. 35A). Auch die MCF7-Zellen, die in Western Blot-Analysen eine schwache uPAR und sehr starke IGF-1R Expression aufwiesen, zeigten eine im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) der MDA-MB-231-Zellen sehr geringe Anzahl an PLA-Signalen (< 5%). In der als Negativ-Kontrolle eingesetzten SKBR3-Zelllinie, die sowohl IGF-1R als auch uPAR sehr schwach exprimiert, wurde ebenfalls im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) der MDA-MB-231-Zellen eine sehr geringe Anzahl von PLA-Signalen gezählt (Abb. 35A).

Die PLA-Analyse in den BT549-Zellen (Abb. 35B) ergab, dass die PLA-Signalanzahl, im Vergleich zur BT549-Reaktions-Kontrolle (RK), infolge der uPAR-RNAi signifikant ($p=0,02$) auf ca. 52% und aufgrund der IGF-1R-RNAi signifikant ($p=0,013$) auf ca. 49% reduziert (Abb. 35B) war. In den Ansätzen der kombinierten RNAi aus uPAR und IGF-1R war die Anzahl der Proteinkomplexe im Vergleich, zu uPAR-RNAi hoch signifikant ($p=0,002$) und zu IGF-1R-RNAi höchst signifikant ($p\leq 0,001$) sogar additiv auf 17% reduziert (Abb. 35B). Auch im Vergleich zu der BT549-Reaktions-Kontrolle zeigten die Negativ-Kontrollzellen MCF7 und SKBR3 nur eine geringe Anzahl an PLA-Signalen (<5%) (Abb. 35B).

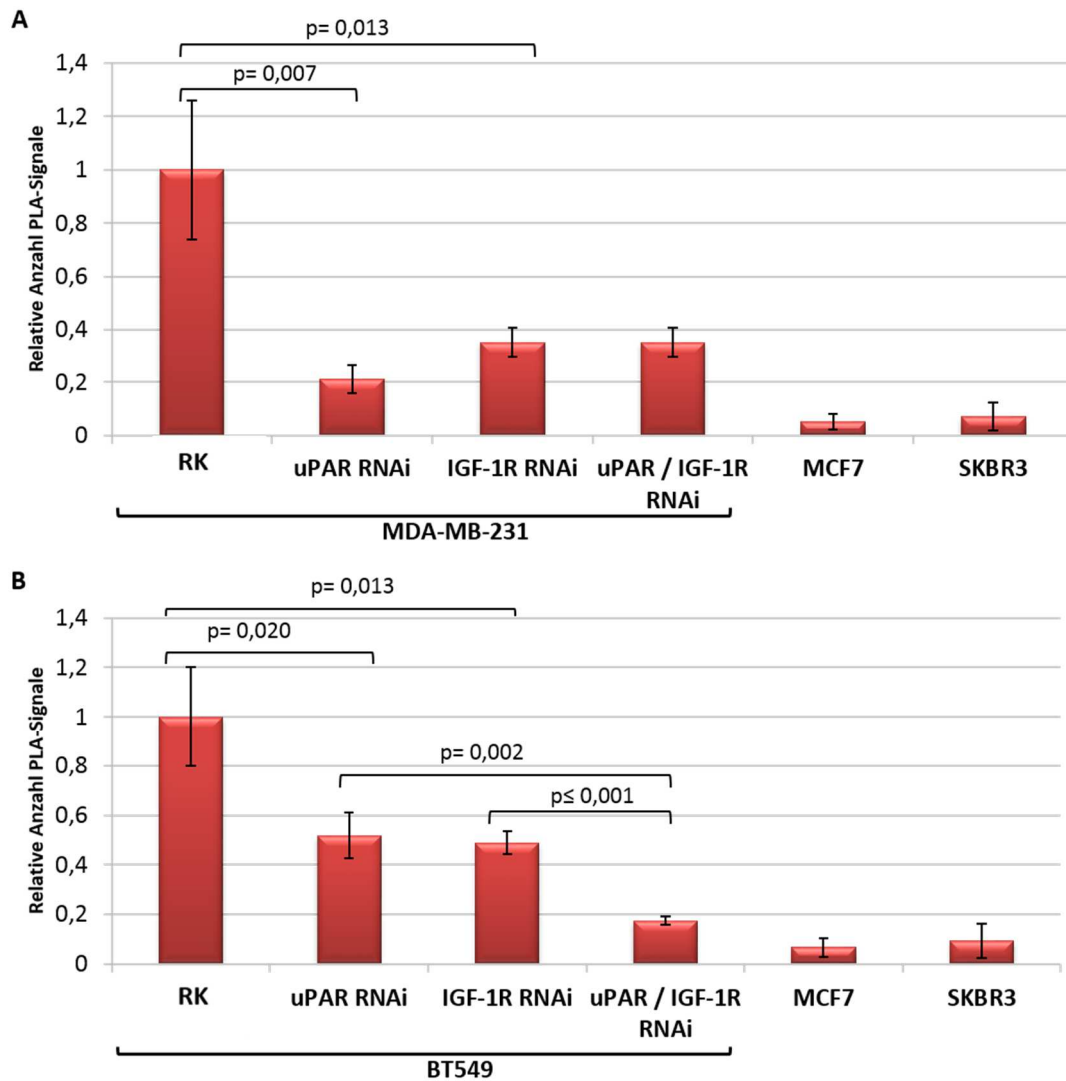


Abbildung 35: Reduzierte uPAR-IGF-1R Komplexanzahl infolge der uPAR-, IGF-1R- und kombinierter uPAR- und IGF1R-RNAi in MDA-MB-231- bzw. BT549-Zellen

PLA-Signale nach uPAR-, IGF-1R-, kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi in MDA-MB-231-Zellen (**A**) und in BT549-Zellen (**B**) sowie in MCF7 und SKBR3-Zellen als Negativ-Kontrollen im Verhältnis zu Reaktions-Kontrollzellen (RK), Analyse aus je 3 Blickfeldern, n=2, Bildanalysesoftware: *Definiens Developer XD*, Statistische Analysesoftware: *SigmaPlot*.

3.5 Effekte der uPAR- und uPA-RNAi auf Komponenten des Gesamtproteoms der MDA-MB-231- und BT549-Zellen

Um die Effekte der RNAi mit uPAR und uPA auf das allgemeine Expressionslevel von Proteinen in MDA-MB-231- bzw. BT549-Zellen zu analysieren und Rückschlüsse auf die veränderten zellulären Mechanismen ziehen zu können, wurden ICPL Markierungen und anschließend massenspektrometrische Analysen (ESI-LC-MS/MS) mit Reaktions-Kontroll-Ansätzen, uPAR-RNAi-Ansätzen und uPA-RNAi-Ansätzen durchgeführt. Für die ICPL-Markierung wurden Reaktions-Kontrollzelllysate und uPAR-RNAi-Zelllysate der MDA-MB-231-Zelllinie in Triplikaten eingesetzt und massenspektrometrisch analysiert. Im Zuge der Rohdatenanalyse mit *Proteome Discoverer 1.3* (Thermo Scientific) in Zusammenarbeit mit Dr. Omid Azimzadeh (HMGU) wurde eine Gesamtanzahl von 1395 Proteinen auf Grundlage von 30086 Peptiden identifiziert. Die Effizienz der Markierung war mit 97% markierter Peptide sehr gut, die sich aus dem Verhältnis von modifizierten Peptiden zu solchen, die Lysine enthalten, errechnet. 2853 Peptide wurden quantifiziert, als signifikant reguliert eingestuft und weiter analysiert (Gesamtliste im Appendix 5). Auch Lysate der Reaktions-Kontroll-, uPAR-RNAi und uPA-RNAi-Ansätze der BT549-Zellen wurden in Triplikaten ICPL-markiert, massenspektrometrisch vermessen und das Ergebnis der ESI-LC-MS/MS mit *Proteome Discoverer 1.3* analysiert. Es wurde eine Gesamtzahl von 3368 Proteinen aus 62818 Peptiden identifiziert. Auch hier zeigte sich eine sehr hohe Effizienz mit 98% markierter Peptide aus der Gesamtzahl der Lysin enthaltenden Peptide. Weiter analysiert bzw. quantifiziert, wurden 5356 Peptide, die eine signifikant regulierte Expressionsveränderung aufwiesen (Gesamtliste im Appendix 5).

3.5.1 Anti-apoptotisches Zellverhalten nach uPAR-RNAi in MDA-MB-231-, nach uPA-RNAi und uPAR-RNAi in BT549-Zellen

Die detaillierte Auswertung der funktionalen Zusammenhänge und biologischen Signalkaskaden der im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle in den RNAi-Ansätzen regulierten Proteine wurde mit der Software *Ingenuity Pathway analysis* (IPA) (Qiagen) durchgeführt. Mit dieser Software können auch Prognosen über die zelluläre Reaktion auf Grundlage der Regulierungsrichtung der Gene abgegeben werden.

Diese Analyse ergab, dass die uPAR-RNAi in der MDA-MB-231-Zelllinie signifikante Auswirkungen auf die zellulären Netzwerke „*cell death and survival*“, „*cellular assembly and organisation*“ sowie „*cellular compromise*“ zu haben schienen (Tab. 28). In den BT549-Zellen waren infolge der uPAR-RNAi die zellulären Netzwerke „*cell morphology*“, „*cellular assembly and organisation*“ und „*cellular growth and proliferation*“ verändert oder dereguliert (Tab. 28). Die uPA-RNAi beeinflusste am stärksten die zellulären Netzwerke „*cellular growth and proliferation*“, „*cellular movement*“ und „*cell death and survival*“ (Tab. 28).

Tabelle 28: Mit IPA-Analyse identifizierte, am stärksten regulierte, zelluläre Netzwerke

Zelllinie, RNAi	Betroffenes zelluläres Netzwerk	p-Wert	Anzahl identifizierter Moleküle im Netzwerk
MDA-MB-231, uPAR-RNAi	<i>Cellular Assembly and Organization</i>	≤ 0,05	7
MDA-MB-231, uPAR-RNAi	<i>Cellular Compromise</i>	≤ 0,05	6
MDA-MB-231, uPAR-RNAi	<i>Cell Death and Survival</i>	≤ 0,05	12
BT549, uPAR-RNAi	<i>Cell Morphology</i>	≤ 0,04	22
BT549, uPAR-RNAi	<i>Cellular Assembly and Organization</i>	≤ 0,04	19
BT549, uPAR-RNAi	<i>Cellular Growth and Proliferation</i>	≤ 0,04	25
BT549, uPA-RNAi	<i>Cellular Growth and Proliferation</i>	≤ 0,03	37
BT549, uPA-RNAi	<i>Cellular Movement</i>	≤ 0,04	22
BT549, uPA-RNAi	<i>Cell Death and Survival</i>	≤ 0,04	32

In der Analyse der MDA-MB-231-Ansätze wurden 10 Gene bzw. Proteine identifiziert, deren Expression nach der uPAR-RNAi im Vergleich zu den Reaktions-Kontrollzellen verändert war und die mit der Regulation von Apoptose in den Zellen assoziiert werden. Aufgrund der Regulationsrichtung der 10 Gene prognostizierte die IPA-Software eine Inhibierung der Apoptose in diesen Ansätzen (Abb. 36). Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Analyse der BT549-uPAR-RNAi-Ansätze, in denen die Expression von 18 Genen im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle verändert war und aufgrund derer die IPA-Software ebenfalls eine Unterdrückung von Apoptose prognostizierte (Abb. 36). Auch die Analyse der BT549-uPA-RNAi ergab eine im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle veränderte Expression von 25 Genen, die eine inhibierende Funktion auf Zellapoptose haben.

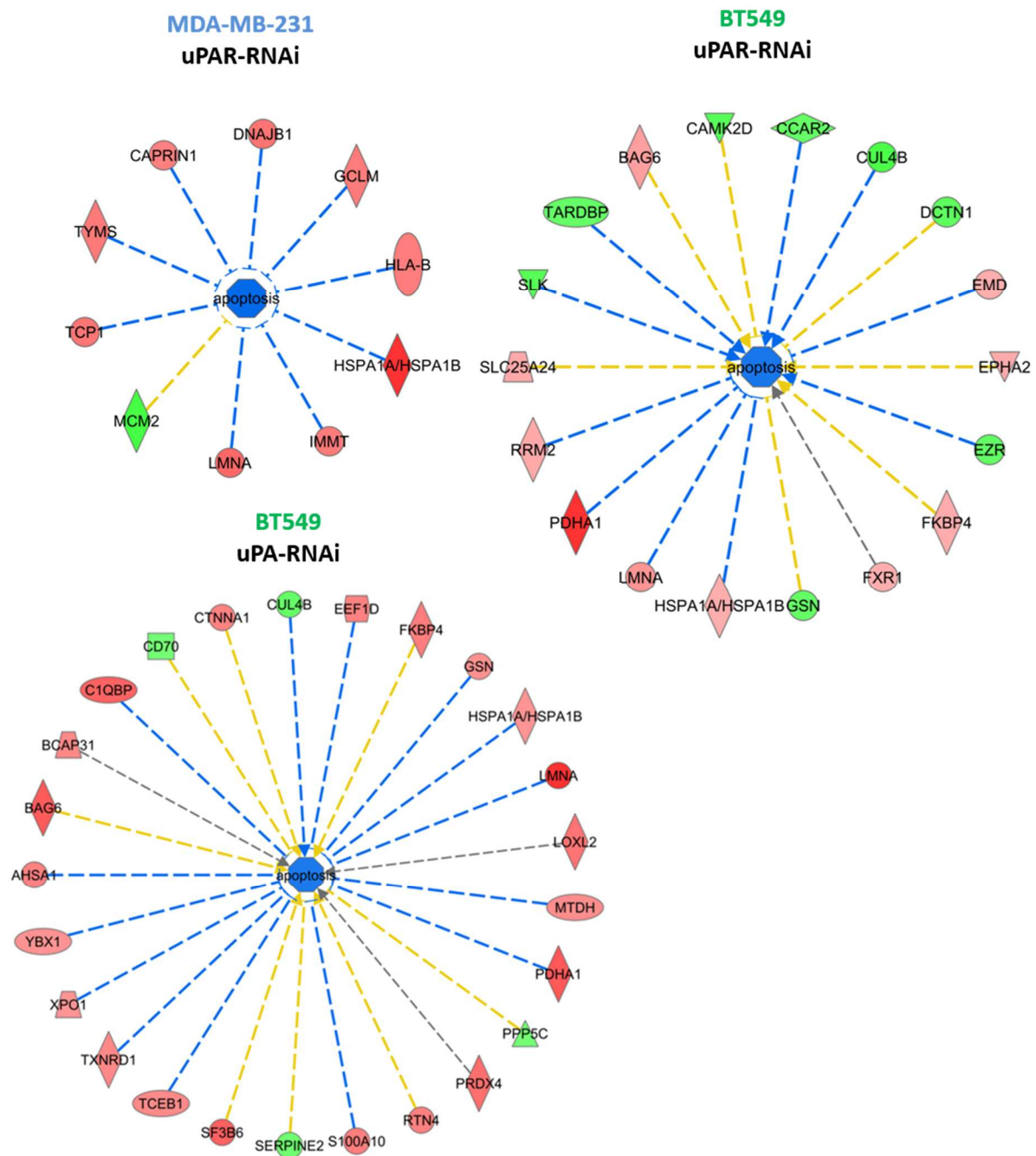


Abbildung 36: Unterdrückung von Apoptoseinduktion in BT549- und MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-RNAi und uPA-RNAi

Signifikant regulierte Proteine, laut *Ingenuity pathway* (IPA)-Analyse der uPAR-RNAi im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle in MDA-MB-231-Zellen und der uPAR-RNAi bzw. uPA-RNAi im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle in BT549-Zellen. Hoch-regulierte Proteine sind rot markiert, die herunterregulierten in grün. Die blauen Linien und Knotenpunkte symbolisieren Inhibition, die gelben und grauen Linien zeigen nicht sicher prognostizierbare Einflüsse. Je stärker die Regulation, desto intensiver der Farbton.

3.5.2 Induzierte Migrations- und Invasionsproteine nach uPAR-RNAi und uPA-RNAi in BT549-Zellen

Die Analyse mit der IPA-Software ergab außerdem, dass in der BT549-Zelllinie die uPAR- und die uPA-RNAi im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle einen Effekt auf die zellulären Netzwerke hatte, die an der Regulierung von Migration und Invasion beteiligt sind. Es wurden infolge der uPAR-RNAi in den Ansätzen 13 Gene identifiziert, deren Expression erhöht oder vermindert wurde. Deren Regulation gibt einen Hinweis auf Veränderungen in der zellulären Migration, erlaubt jedoch keine Aussage über deren Induktion oder Suppression (Abb. 37).

Außerdem wurden 9 Proteine, die mit der Invasionsregulation von Zellen assoziiert werden, nach der uPAR-RNAi im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle unterschiedlich reguliert. Die Richtung dieser Regulation gibt Hinweise auf ein leicht induziertes Invasionspotential der Zellen (Abb. 37). Infolge der uPA-RNAi waren 19 Gene im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle verschieden reguliert und ließen aufgrund ihrer Regulierung in der IPA-Analyse die Prognose zu, dass die Migration der Zellen stark induziert worden war (Abb. 37). 8 Gene wurden in der IPA-Analyse identifiziert, die signifikant reguliert waren und deren Regulation die Vermutung zuließ, dass das Invasionsverhalten der Zellen mäßig induziert worden war (Abb. 37)

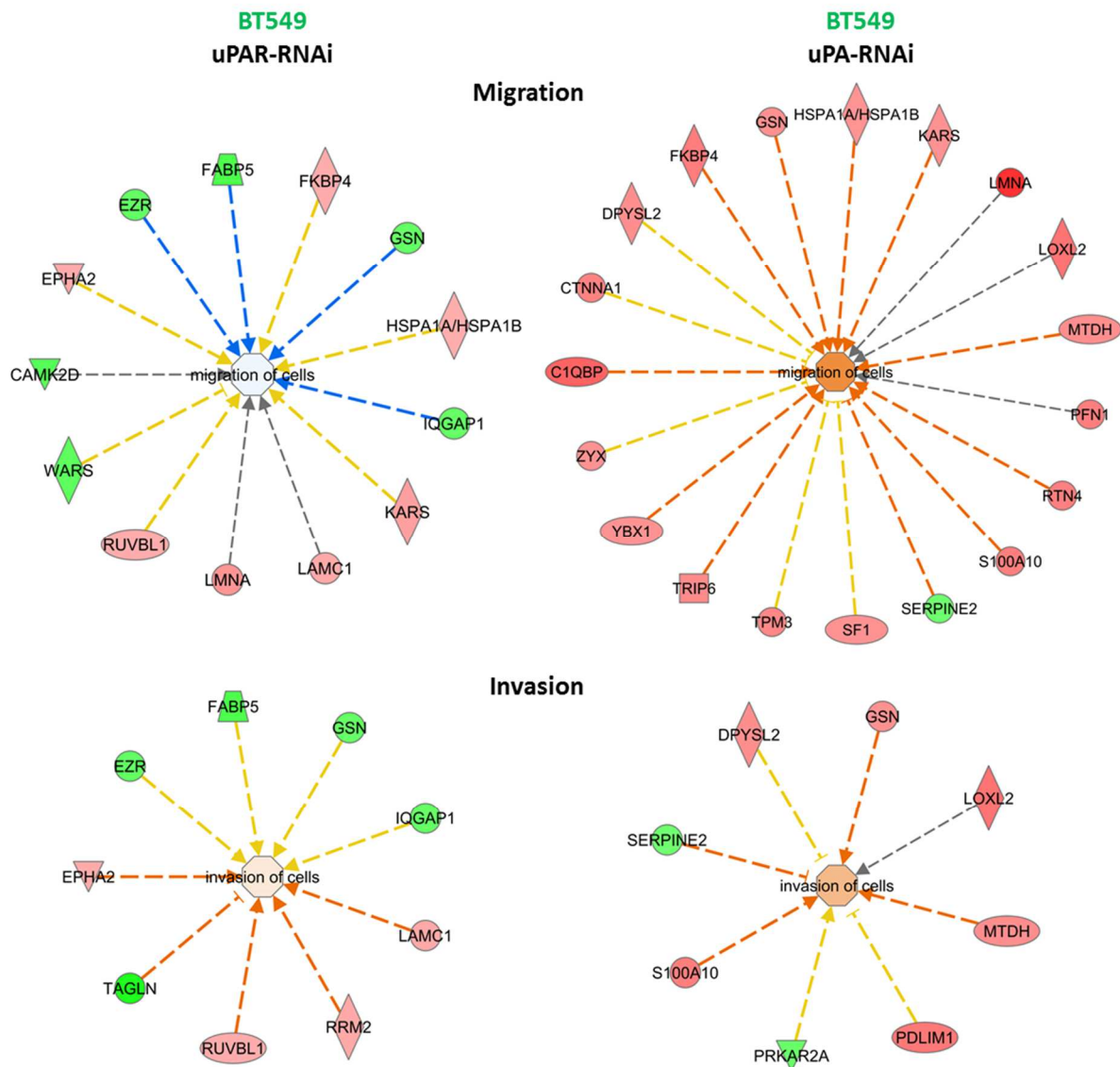


Abbildung 37: Induktion von Migration- und Invasion-involvierten Genen/Proteinen in BT549-Zellen nach uPAR-RNAi und uPA-RNAi

Ingenuity pathway (IPA)-Analyse der uPAR-RNAi und uPA-RNAi im Vergleich zur Reaktionskontrolle in BT549-Zellen. Hochregulierte Gene sind rot markiert, die herunterregulierten grün. Die blauen Linien symbolisieren Inhibition, die orangen Linien und Knotenpunkte symbolisieren Aktivierung. Die gelben und grauen Linien bzw. weißen Knotenpunkte zeigen nicht sicher prognostizierbare Einflüsse bzw. Effekte. Je stärker die Regulation, desto intensiver der Farbton.

Als eine Untermauerung der Hinweise auf induzierte Zellmigration/-invasion kann außerdem die laut IPA-Analyse prognostizierte Veränderung in der Zytoskelett-Zytoplasmastruktur der BT549-Zellen infolge der uPA-RNAi gewertet werden. 14 Gene, die mit der Veränderung des Zytoskeletts in Verbindung gebracht werden, waren im Vergleich zur Reaktionskontrolle verschieden reguliert, ebenso wie 15 Gene, die an der Organisation der Zytoplasmastruktur beteiligt sind.

3.6 Identifizierung neuer Interaktionspartner von uPAR

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer, bisher in der Literatur nicht beschriebener Interaktionspartner von uPAR. Hierzu wurde eine co-Immunpräzipitation für uPAR etabliert und für massenspektrometrische Analysen mit ESI-LC-MS/MS optimiert.

3.6.1 Optimierung der co-Immunpräzipitation mit uPAR und Identifizierung von uPA im co-IP Präzipitat

Die Tabelle 29 zeigt die Protokolle, die die relevanten Schritte hin zur Optimierung der spezifischen co-Immunpräzipitation von uPAR darstellten. Der Unterpunkt `Ergebnis` zeigt die entscheidenden Veränderungen in den einzelnen Protokollen hin zur Etablierung. So wurde die eingesetzte Proteinmenge verändert, unterschiedlich sensitive Antikörper gegen uPAR, auch unterschiedlicher Spezies und die Antikörperkonzentration getestet. Auch die Art der *Beads* (AG PLUS Agarose, G Sepharose) und deren Inkubationszeit mit dem Zelllysat wurde optimiert. Ein entscheidender Faktor war die Veränderung der Zusammensetzung des IP-Puffers und die Anpassung der Waschschrte der *Beads* vor der Proteinelution mit Lämmli-puffer.

Tabelle 29: Relevante Protokolle zur Etablierung der co-IP mit uPAR

Parameter	SOP basierend auf Molatore <i>et al.</i>	co-IP 1	co-IP 2	co-IP 3	co-IP 4
Eingesetzte Proteinmenge/ Gesamtvolumen je IP- Ansatz	250 µg/500 µl	500 µg/250 µl	500 µg/500 µl	1000 µg/750 µl	750 µg/750 µl
Antikörper	10 µl Anti-uPAR, #AF807,	15 µl Anti-uPAR, #AF807 (0,2 µg/µl)	15 µl Anti-uPAR, #AF807 (0,2 µg/µl) oder 15 µl Anti-uPAR, #IID7	20 µl Anti-uPAR, #AF807 (0,2 µg/µl) oder 20 µl Anti-uPAR, #IID7	IP: 20 µl Anti-uPAR, #AF807 (0,2 µg/µl) NK: 20 µl Purified goat IgG (0,2 µg/µl)
Beads	20 µl A/G PLUS Agarose	30 µl A/G PLUS Agarose	30 µl A/G PLUS Agarose oder 30 µl G Sepharose beads	40 µl A/G PLUS Agarose	40 µl G Sepharose beads
IP-Puffer	0,5% Triton X PBS 5 mM EDTA	0,5% Triton X PBS 5 mM EDTA	1,0% NonidetP40 PBS 5 mM EDTA	1,0% NonidetP40 oder 0,5% Nonidet P40 PBS 5 mM EDTA	0,5% NonidetP40 PBS 5 mM EDTA
Inkubationsbedingungen von beads mit Zelllysat	Ü.N., 4°C, Drehrad	Ü.N., 4°C, Drehrad oder 2 h, 4°C, Drehrad	Ü.N., 4°C, Drehrad	Ü.N., 4°C, Drehrad	Ü.N., 4°C, Drehrad
Waschpuffer und Waschhäufigkeit nach der Co-IP	3x 500 µl IP-Puffer	2x 500 µl IP-Puffer 1x 500 µl PBS	2x 500 µl IP-Puffer 1x 500 µl PBS	1x 500 µl IP-Puffer 1x 500 µl PBS oder 2x 500 µl PBS oder 1x 500 µl PBS	2x 500 µl PBS
Elutionspuffer	20 µl Lämmli-Puffer (2x)	30 µl Lämmli-Puffer (2x)	60 µl Lämmli-Puffer (2x)	60 µl Lämmli-Puffer (2x)	60 µl Lämmli-Puffer (2x)
Zusatzschritte		Vorreinigen (<i>pre- clearing</i>) der Lysate vor der Co-IP			
Ergebnis	uPAR als Zielprotein identifiziert mit Western Blot	<i>Pre-clearing</i> führte zu keiner signifikanten Verbesserung	Die co-IP mit #AF807 zeigte deutlich mehr uPAR	Abb. 38 Detektion von uPA in unterschiedlicher Intensität in den Ansätzen	ESI-LC-MS/MS Analyse von Co-IP Triplikaten identifizierte bereits bekannte (uPA, PAI-1, Vitronectin) und neue uPAR-Interaktionspartner (Cyr61, YB1, Caprin1)

Die Optimierung der co-IP für uPAR mit uPA als direktem Interaktionspartner wurde nach dem Protokoll co-IP 3 durchgeführt (Tab. 29). Die zwölf verschiedenen Ansätze wurden mit Western Blot analysiert, ob uPA im Präzipitat vorhanden war. Es zeigte sich, dass uPA je nach IP-Ansatz (1-12) unterschiedlich stark angereichert werden und sowohl das noch nicht gespaltene pro-uPA bei ca. 50 kDa als auch die aktive uPA Form (HMW-uPA) bei 30 kDa im Western Blot nachgewiesen werden konnte (Abb. 38). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde das Protokoll co-IP 3, Ansatz 2, in dem uPA am stärksten angereichert werden konnte, in Triplikaten unter zusätzlicher Verwendung eines Ziege-Isotypantikörpers als Negativkontrolle wiederholt und für massenspektrometrischen Analysen eingesetzt.

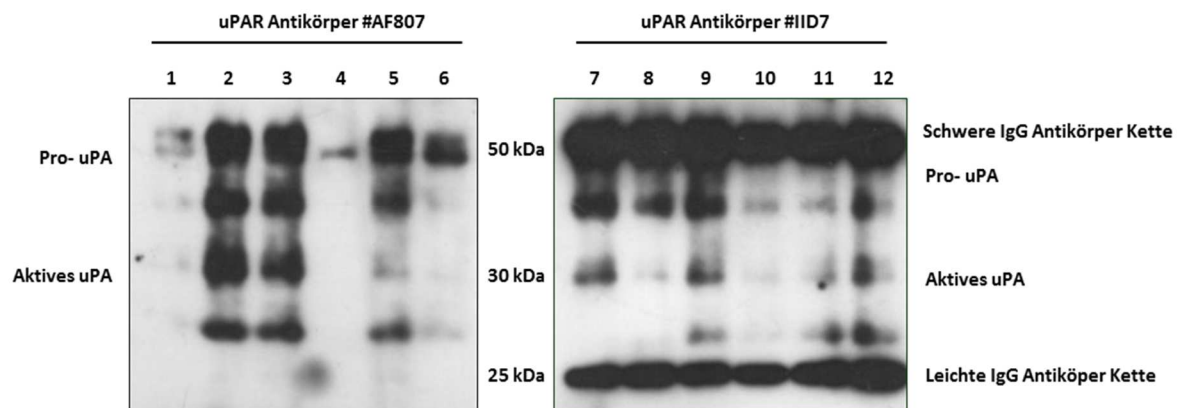


Abbildung 38: Erfolgreiche co-IP von uPAR mit uPA in den Präzipitaten verschiedener IP-Ansätze des Protokolls co-IP 3

Western Blot Analyse von uPA in den Ansätzen 1-12 des co-IP Protokolls 3

3.6.2 Identifizierung von IGF-1R im co-Immünpräzipitat von uPAR

Um eine direkte Interaktion von uPAR und IGF-1R zu überprüfen, wurde eine co-IP für uPAR etabliert und das Präzipitat mit Western Blot auf das Vorkommen von IGF-1R überprüft. Die Analyse zeigte, dass IGF-1R im Präzipitat von uPAR mitausgefällt wurde (Abb. 39) und damit eine direkte Interaktion der Rezeptoren belegt werden konnte.

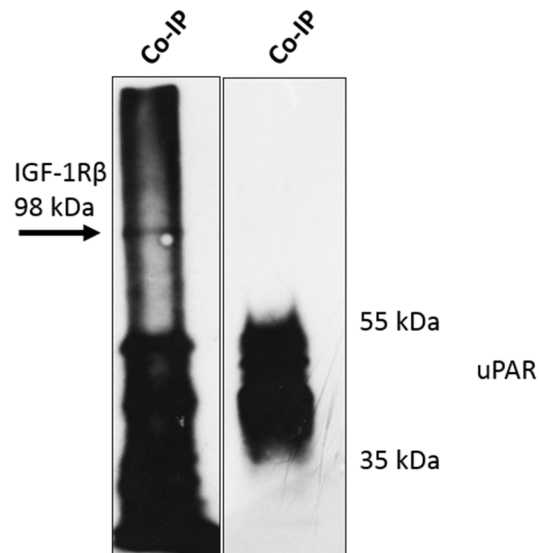


Abbildung 39: IGF-1R interagiert direkt mit uPAR

Western Blot-Analyse von IGF-1R (98 kDa, links) und von uPAR (Isoformen bei 35-55 kDa, rechts) in dem co-IP Präzipitat

3.6.3 Identifizierung neuer Interaktionspartner von uPAR mit Massenspektrometrie

Nachdem die co-IP optimiert worden war, sodass uPA als direkter Interaktionspartner von uPAR bestätigt werden konnte, wurde die co-IP in Triplikaten durchgeführt und zusammen mit einem dreifachen Ansatz der Negativ-Kontrolle (Ziege-Isotypantikörper) mit ESI-LC-MSMS in der *Core Facility* Einheit der PROT (HMGU) an dem *LTQ Orbitrap XL* Massenspektrometer analysiert. Die sich aus der MS/MS-Analyse ergebende Proteinliste wurde anhand der ANOVA-Analyse (p-Wert) der Peptide aufsteigend sortiert. Der Verhältniswert (*fold change*) ergab sich aus der Relation der in den uPAR-co-IP-Ansätzen mitpräzipitierten Proteine zu den in den Negativ-Kontroll-Ansätzen identifizierten Proteinen. uPAR (*PLAUR*), das Zielprotein der IP, wurde 21,1-fach und höchst signifikant ($p \leq 0,001$) sowie der direkte Interaktionspartner uPA (*PLAU*) 18,2-fach hoch signifikant ($p = 0,003$) in der co-IP im Vergleich zur Negativ-Kontrolle angereichert (Tab. 30).

Auch der weitere direkte Interaktionspartner und Inhibitor PAI-1 (*SERPINE1*) wurde 9,1-fach und hoch signifikant ($p=0,003$) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle und Vitronektin (*VTN*), auch ein beschriebener Interaktionspartner von uPAR, in dem co-IP-Präzipitat signifikant ($p=0,05$) 6,5-fach im Vergleich zur Negativ-Kontrolle angereichert (Tab. 30). Diese bereits beschriebenen Schlüsselkomponenten des uPAR-Systems sind in der Tabelle 30 blau markiert.

Weitere sieben potentielle uPAR-Interaktionspartner - deren Gensymbole in der Tabelle 30 grün (mit Primärantikörpern in Western Blot überprüft) bzw. rot (für weitere Analysen ausgewählt) markiert sind, wurden identifiziert:

- das *tight junction protein 2* (*TJP2*) ($p \leq 0,001$, 69,3-fach)
- das *Y box binding protein 1* (*YBX1*) ($p=0,002$, 2,1-fach)
- das *DEAH box polypeptide 16* (*DHX16*) ($p=0,003$, 68,4-fach)
- der *Cysteine-rich angiogenic inducer 61* (*CYR61*) ($p=0,013$, 19,9-fach)
- das *fragile X mental retardation autosomal homolog 1* (*FXR1*) ($p=0,026$, 14,8-fach)
- das *cell cycle associated protein 1* (*CAPRIN1*) ($p=0,029$, 1,4-fach)
- die *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2* (*PHLPP2*) ($p=0,145$, 4879-fach)

Tabelle 30: Mit Massenspektrometrie identifizierte Proteine, die potentiell mit uPAR interagieren (Anova $p \leq 0,151$)

Protein IDs	Einzelne Peptide	Anova (p-Wert)	Verhältniswert Co-IP/NK	Genname	Beschreibung
ENSP00000339328	13	0,000	21,1	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor
ENSP00000345893	3	0,000	69,3	TJP2	tight junction protein 2
ENSP00000248437	1	0,001	4,8	TUBA4A	tubulin, alpha 4a
ENSP00000361626	2	0,002	2,1	YBX1	Y box binding protein 1
ENSP00000365625	4	0,003	68,4	DHX16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16
ENSP00000361848	1	0,003	18,2	PLAU	plasminogen activator, urokinase
ENSP00000223095	3	0,003	9,1	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E
ENSP00000398736	1	0,013	19,9	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
ENSP00000339095	1	0,018	2,3	RPS7	ribosomal protein S7
ENSP00000350170	1	0,026	14,8	FXR1	fragile X mental retardation, autosomal homolog 1
ENSP00000346050	1	0,029	2,4	RPS3A	ribosomal protein S3A
ENSP00000340329	4	0,029	1,4	CAPRIN1	cell cycle associated protein 1
ENSP00000188376	1	0,050	5,0	SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3
ENSP00000226218	1	0,050	6,5	VTN	vitronectin
ENSP00000014112	1	0,059	1,9	PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1
ENSP00000309629	1	0,071	2,6	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)
ENSP00000346694	1	0,077	4,0	HNRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
ENSP00000333504	1	0,086	3,5	HNRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
ENSP00000348578	1	0,118	1,5	G3BP1	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1
ENSP00000346045	1	0,129	2,1	RPS17	ribosomal protein S17
ENSP00000009589	1	0,141	1,5	RPS20	ribosomal protein S20
ENSP00000456572	1	0,145	4879,4	PHLPP2	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2
ENSP00000336725	2	0,151	2,2	DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, Y-linked

3.6.4 Charakterisierung der neu identifizierten und direkten Interaktionspartner in Brustkrebszellen

Die sieben neu identifizierten Proteine wurden zunächst mit Western Blot-Analysen auf ihre Proteinexpression in den projektrelevanten Brustkrebszelllinien hin untersucht. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Zusammenhänge (Menendez *et al.* 2003, Lasham *et al.* 2003, Sabile *et al.* 2013) und einer spezifischen Proteinexpression in den TNBC-Zelllinien wurden aus diesen sieben Proteinen drei für weitere Analysen ausgewählt. Diese sind in der Tabelle 30 rot markiert.

- Protein CYR61 (*cysteine-rich anigogenic inducer 61*)
- YB-1 (*Y-box binding protein 1*)
- Caprin-1 (*Cell cycle-associated protein 1*)

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass Cyr61 ausschließlich in den triple-negativen Brustkrebs-Zelllinien BT549 und stärker in MDA-MB-231 vorhanden ist. YB-1 wird unterschiedlich stark, aber in allen untersuchten Zelllinien exprimiert und Caprin-1 nur in der BT549-Zelllinie (Abb. 40).

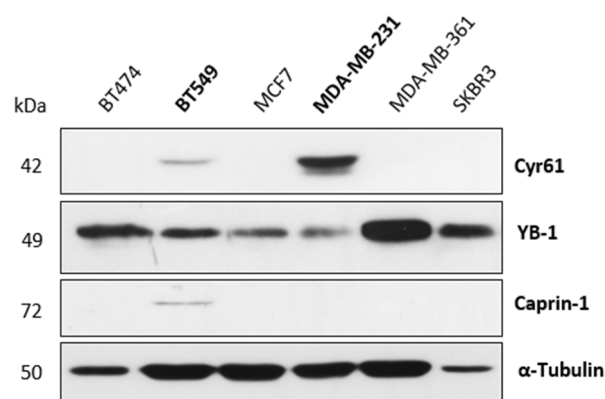


Abbildung 40: Proteinexpression der neu identifizierten und potentiellen Interaktionspartner von uPAR - Cyr61, YB-1 und Caprin - in humanen Brustkrebszelllinien

Western Blot-Analyse der Proteine Cyr61, YB-1 und Caprin-1 in den Brustkrebszelllinien BT474, BT549, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-361 und SKBR3; Ladekontrolle: α-Tubulin.

3.6.4.1 Cyr61 – ein potentieller und neuer Interaktionspartner von uPAR

Das Protein Cyr61 wird mit dem aggressiven Phänotyp und einer Expression in basalen Brustkrebszelllinien assoziiert (Sanchez-Bailon *et al.* 2015). Zur weiteren Expressions- und Lokalisationsanalyse von Cyr61 wurde die immunhistochemische Analyse für dieses Protein optimiert und sowohl an Paraffinschnitten der TNBC-Zelllinien BT549 und MDA-MB-231 als auch der MCF7-Zelllinie als Negativ-Kontrolle durchgeführt. Wie mit Western Blot (Abb. 40) gezeigt, exprimieren die TNBC-Zelllinien BT549 und in erster Linie die MDA-MB-231 Cyr61 stark, die MCF7 nur schwach (Abb. 41). Die IHC-Markierung des Proteins zeigte dessen sowohl membranständige als auch zytoplasmatische Lokalisation in den Zellen (Abb 41).

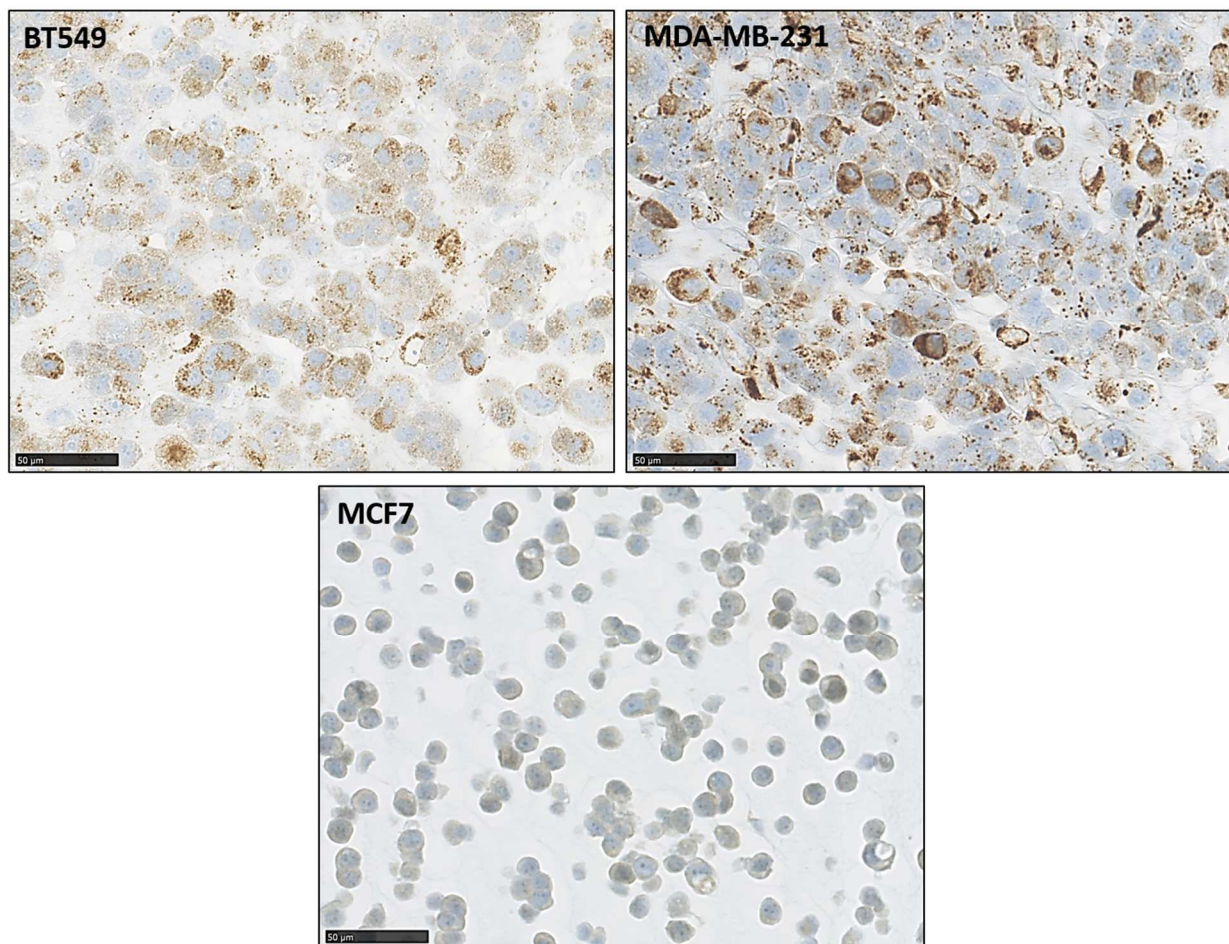


Abbildung 41: Differentielle Expression von Cyr61 in humanen Brustkrebszelllinien

Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression von Cyr61 in den Brustkrebszelllinien BT549, MDA-MB-231 und MCF7; DAB-basierte Braunmarkierung von Cyr61, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; Maßstabsleiste mit 50 µm.

Nachdem die immunhistochemische Detektion für Cyr61 optimiert war, konnte die PLA, die der Darstellung der co-Lokalisation von Proteinen dient, etabliert werden. Hierbei wurde die Protein-Protein-Komplexbildung von uPAR und Cyr61 zum ersten Mal demonstriert (Abb. 42A). Dies zeigt, dass zum einen die zwei Proteine höchstwahrscheinlich direkt miteinander interagieren, weil diese in einer räumlichen Distanz von weniger als 40 nm vorliegen, was die Voraussetzung für die Darstellung einer Interaktion mit PLA ist. Zum anderen führt die Herunterregulierung von uPAR zu einer signifikanten ($p=0,043$) Reduzierung der Protein-Protein-Komplexe um 39% im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) (Abb. 42B und 42C).

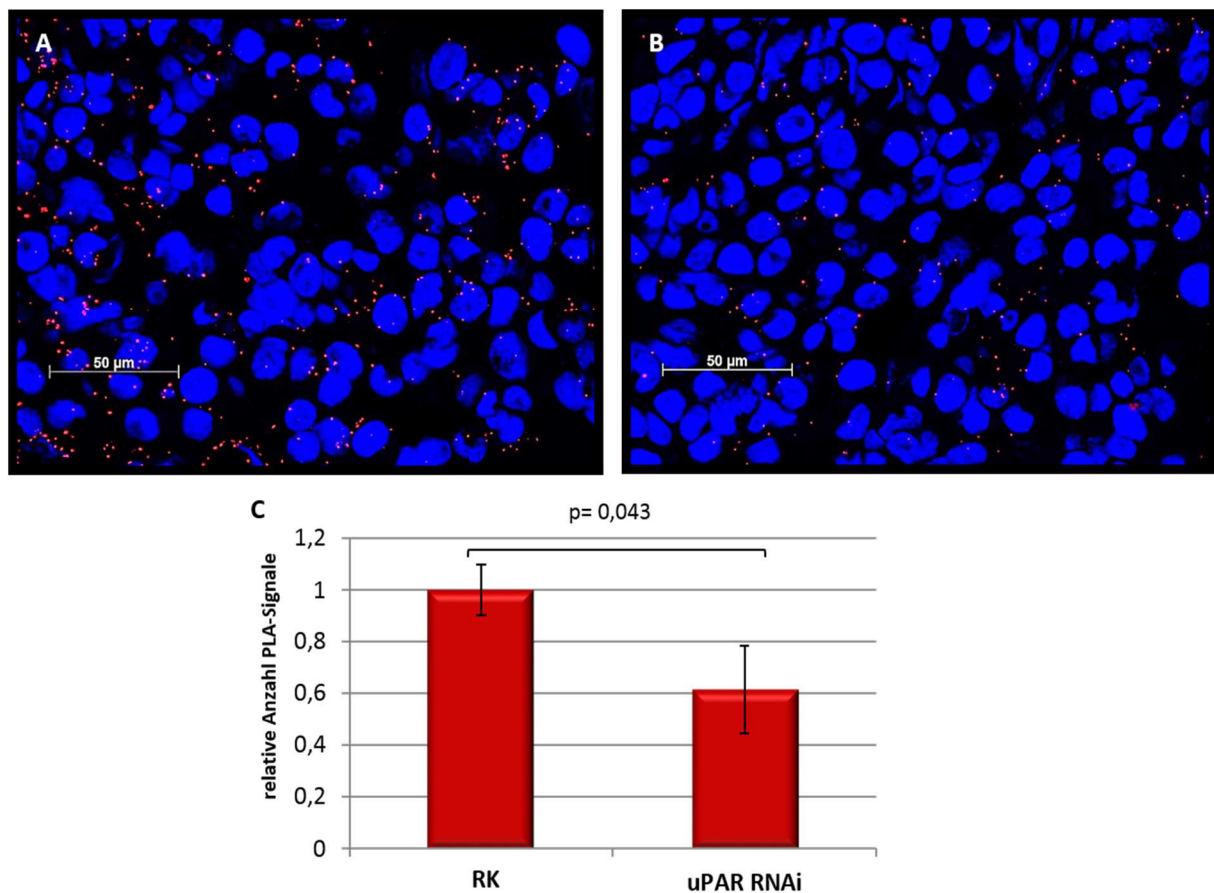


Abbildung 42: Reduzierte uPAR-Cyr61 Komplexanzahl infolge der uPAR-RNAi in MDA-MB-231-Zellen

Fluoreszenzsignale (Exzitationsfilter Cy3, rot) der uPAR-Cyr61-Komplexe in Reaktions-Kontrollzellen (A) und nach uPAR-RNAi (B) (Exzitationsfilter DAPI, blau); Maßstabsleiste mit 50 μm ; C: Relative Anzahl der PLA-Signale nach uPAR-RNAi im Verhältnis zu Reaktions-Kontrollzellen (RK), Analyse aus je drei Blickfeldern, Bildanalysesoftware: *Definiens Developer XD*, Statistische Analysesoftware: *SigmaPlot*.

Um diese Komplexbildung von uPAR und Cyr61 mit einer biochemischen Methode nachzuweisen, wurde eine co-Immunpräzipitation von uPAR mit Cyr61 nach dem optimierten Protokoll co-IP 4 (Tab. 29) durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle (PK) dienten 50 µg des MDA-MB-231-Zelllysats und als Negativ-Kontrolle (NK), der Ansatz, in dem ein Ziege-Isotypantikörper eingesetzt worden war. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass in der co-IP mit uPAR der potentielle Interaktionspartner Cyr61 mitpräzipitiert worden war (Abb. 43). In der Positiv-Kontrolle werden uPAR und Cy61 detektiert, während in der Negativ-Kontrolle keines der Proteine nachweisbar war.

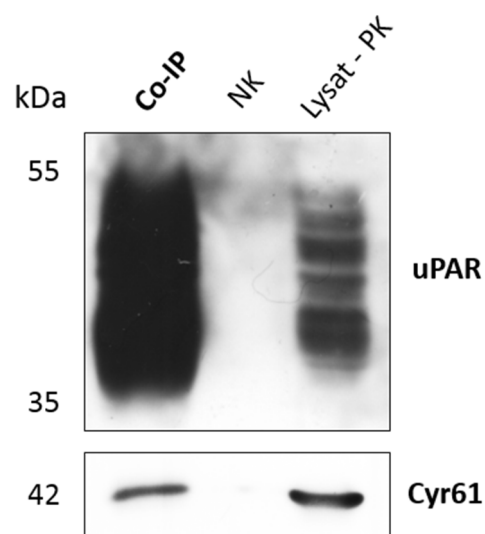


Abbildung 43: Interaktion von Cyr61 in uPAR-co-IP aus MDA-MB-231-Zelllysaten

Western Blot-Analyse von uPAR (Isoformen bei 35-55 kDa, oben) und Cyr61 (42 kDa, unten) in dem co-IP Präzipitat mit uPAR. Negativ-Kontrolle (NK): co-IP mit Ziege-Isotypantikörper und Positiv-Kontrolle (PK): MDA-MB-231-Zelllysate.

3.6.4.2 YB-1 – ein potentieller neuer Interaktionspartner von uPAR

Ein weiterer, in der massenspektrometrischen Analyse identifizierter, möglicher Interaktionspartner von uPAR ist YB-1. Dieses Protein wird in der Literatur im Zusammenhang mit Brustkrebs als möglicher prognostischer Faktor beschrieben (Wang *et al.* 2015). Auch für YB-1 wurde die IHC-Detektion optimiert und an Paraffinschnitten der Zelllinien BT549, MDA-MB-231 und MCF7 durchgeführt. YB-1 wird laut der IHC-Analyse von den BT549-Zellen und MCF7 etwas stärker exprimiert als in den MDA-MB-231-Zellen (Abb. 44). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse überein (Abb. 40) und visualisiert das vor allem zytoplasmatische Vorkommen des Proteins (Abb. 44).

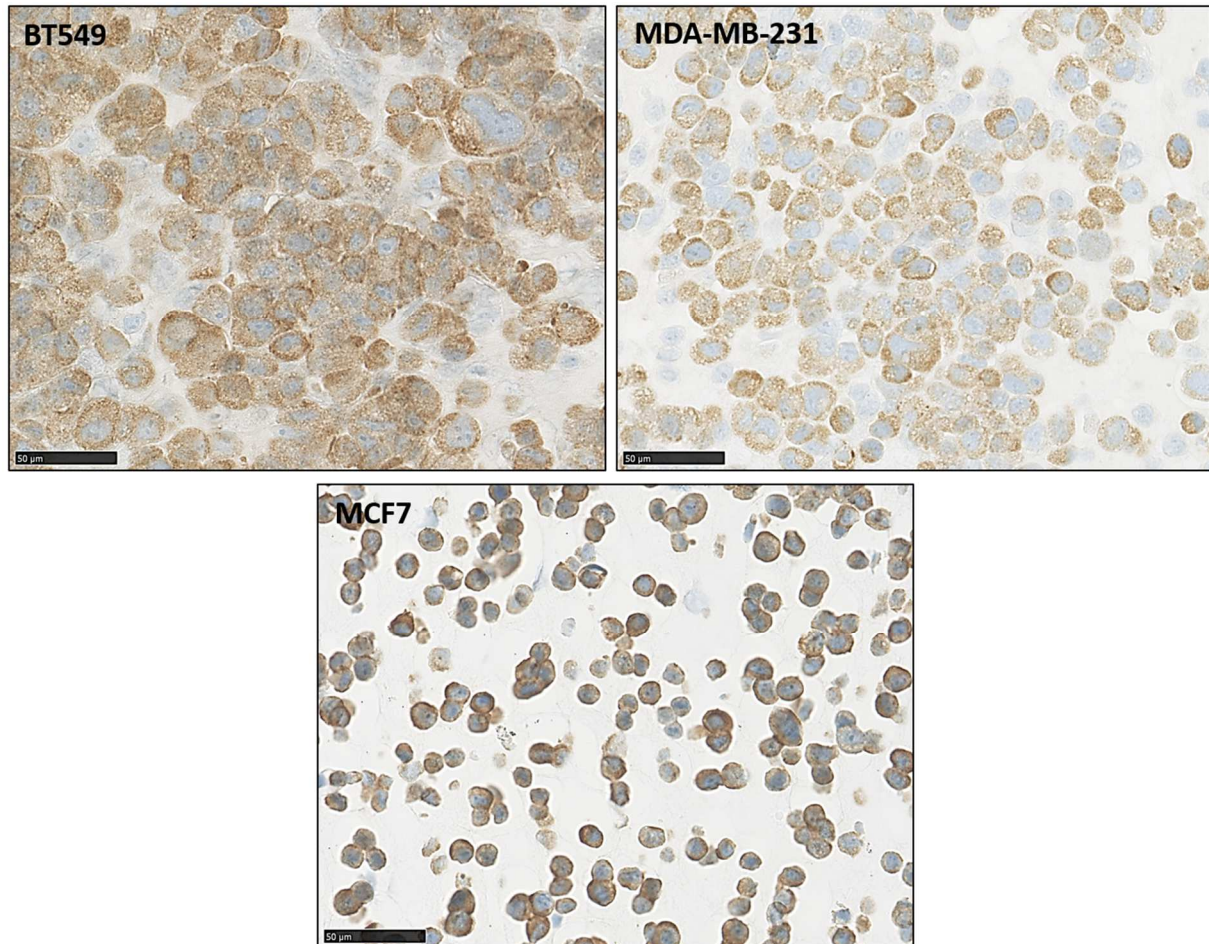


Abbildung 44: Starke Expression von YB-1 in humanen Brustkrebszelllinien

Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression von YB-1 in den Brustkrebszelllinien BT549, MDA-MB-231 und MCF7; DAB-basierte Braunmarkierung von YB-1, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; Maßstabsleiste mit 50 µm.

Auch für die Interaktion von uPAR und YB-1 wurde der PLA auf Grundlage der IHC-Ergebnisse optimiert und an Reaktions-Kontrollzellen (RK) und uPAR-RNAi-Zellen durchgeführt. Mit dieser Methode wurde auch gezeigt, dass uPAR und YB-1 einen Protein-Protein-Komplex bilden. Die Abbildungen 45A und 45B zeigen, dass die zwei Proteine in enger räumlicher Nähe zueinander vorliegen und daher höchstwahrscheinlich direkt interagieren. Zudem führte die uPAR-RNAi zu einer höchst signifikanten Reduzierung ($p=0,001$) der Protein-Protein-Komplexe auf 44% im Verhältnis zu der Reaktions-Kontrolle (RK) (Abb. 45C).

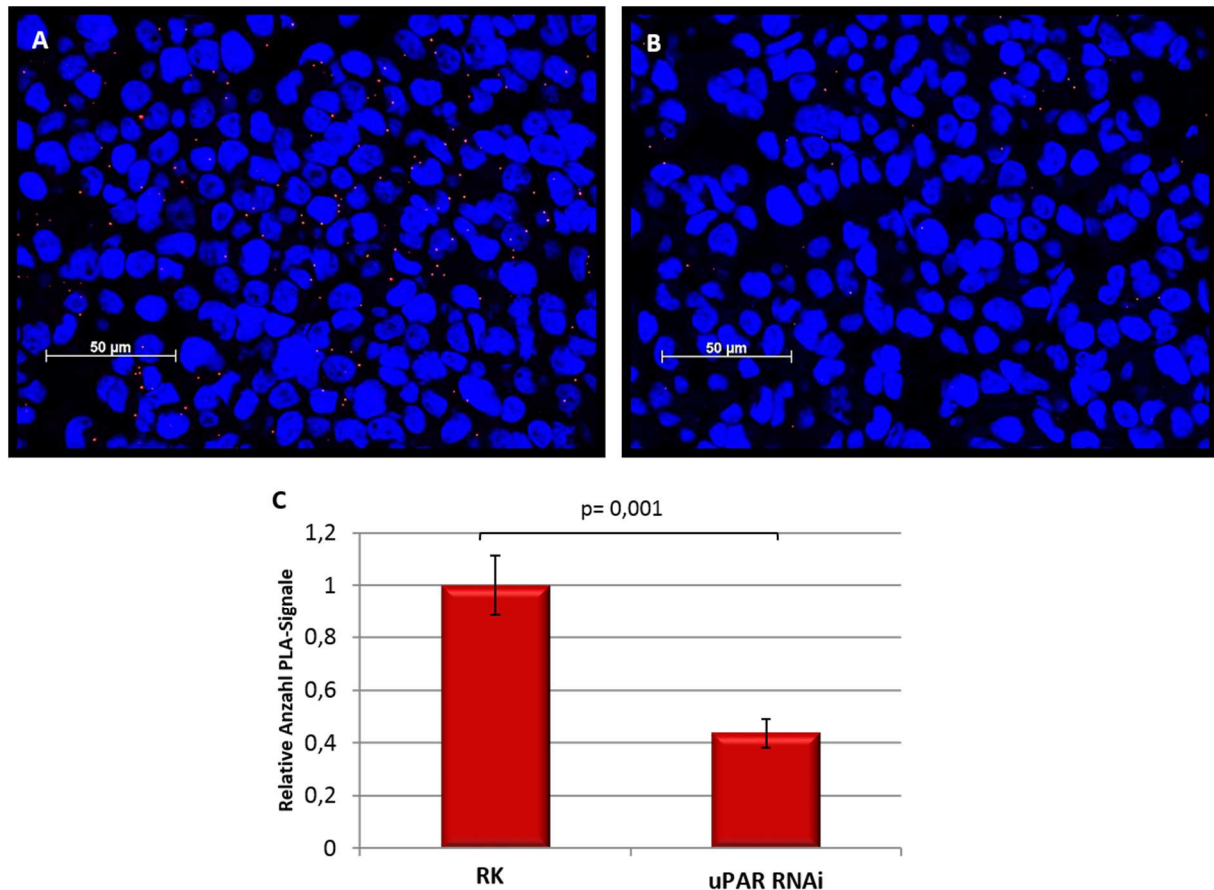


Abbildung 45: Reduzierte uPAR-YB1-Komplexanzahl infolge der uPAR-RNAi in MDA-MB-231-Zellen
 Fluoreszenzsignale (Exzitationsfilter Cy3, rot) der uPAR-YB-1-Komplexe in Reaktions-Kontrollzellen (RK) (A) und nach uPAR-RNAi (B) (Exzitationsfilter DAPI, blau); Maßstabsleiste mit 50 μm ; C: Relative Anzahl der PLA-Signale nach uPAR-RNAi im Verhältnis zu Reaktions-Kontrollzellen, Analyse aus je 3 Blickfeldern, Bildanalysesoftware: *Definiens Developer XD*, Statistische Analysesoftware: *SigmaPlot*.

Um diese Komplexbildung von uPAR und YB-1 mit einer biochemischen Methode nachzuweisen, wurde eine co-Immunpräzipitation von uPAR mit YB-1 nach dem optimierten Protokoll Co-IP 4 (Tab. 29) durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle (PK) dienten 50 μg des MDA-MB-231-Zelllysats und als Negativ-Kontrolle (NK) der Ansatz, in dem anstatt des gegen uPAR gerichteten Antikörpers ein Ziege-Isotypantikörper eingesetzt worden war. Der Western Blot zeigte, dass in der co-IP mit uPAR der potentielle Interaktionspartner YB-1 mitpräzipitiert worden war und in der Positiv-Kontrolle werden uPAR und YB-1 nachgewiesen (Abb. 46).

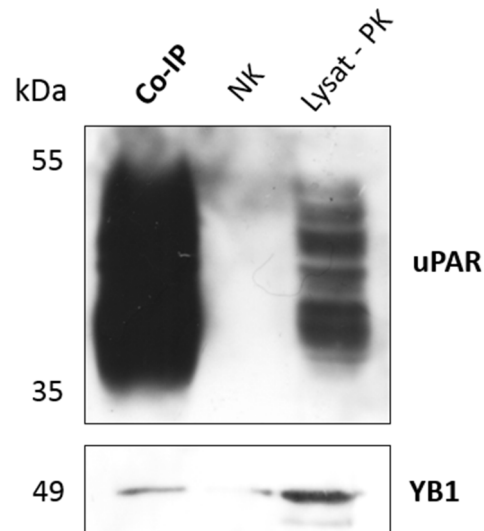


Abbildung 46: Interaktion von YB-1 in uPAR-co-IP aus MDA-MB-231-Zelllysaten

Western Blot Analyse von uPAR (Isoformen bei 35-55 kDa, oben) und Cyr61 (49 kDa, unten) in dem co-IP Präzipitat mit uPAR. Negativ-Kontrolle (NK): co-IP mit Ziege-Isotypantikörper und Positiv-Kontrolle (PK): MDA-MB-231 Zelllysate.

3.6.4.3 Caprin-1 – ein potentieller neuer Interaktionspartner von uPAR

Auch für Caprin-1 wurden immunhistochemische Analysen optimiert und sowohl an den TNBC-Zelllinien BT549 und MDA-MB-231 als auch an der MCF7 durchgeführt. Wie mit Western Blot gezeigt (Abb. 40), exprimiert die BT549-Zelllinie Caprin-1 stärker als die MCF7- bzw. MDA-MB-231-Zellen und es ist sowohl im Zytoplasma als auch an der Zytoplasmamembran detektierbar (Abb. 47).

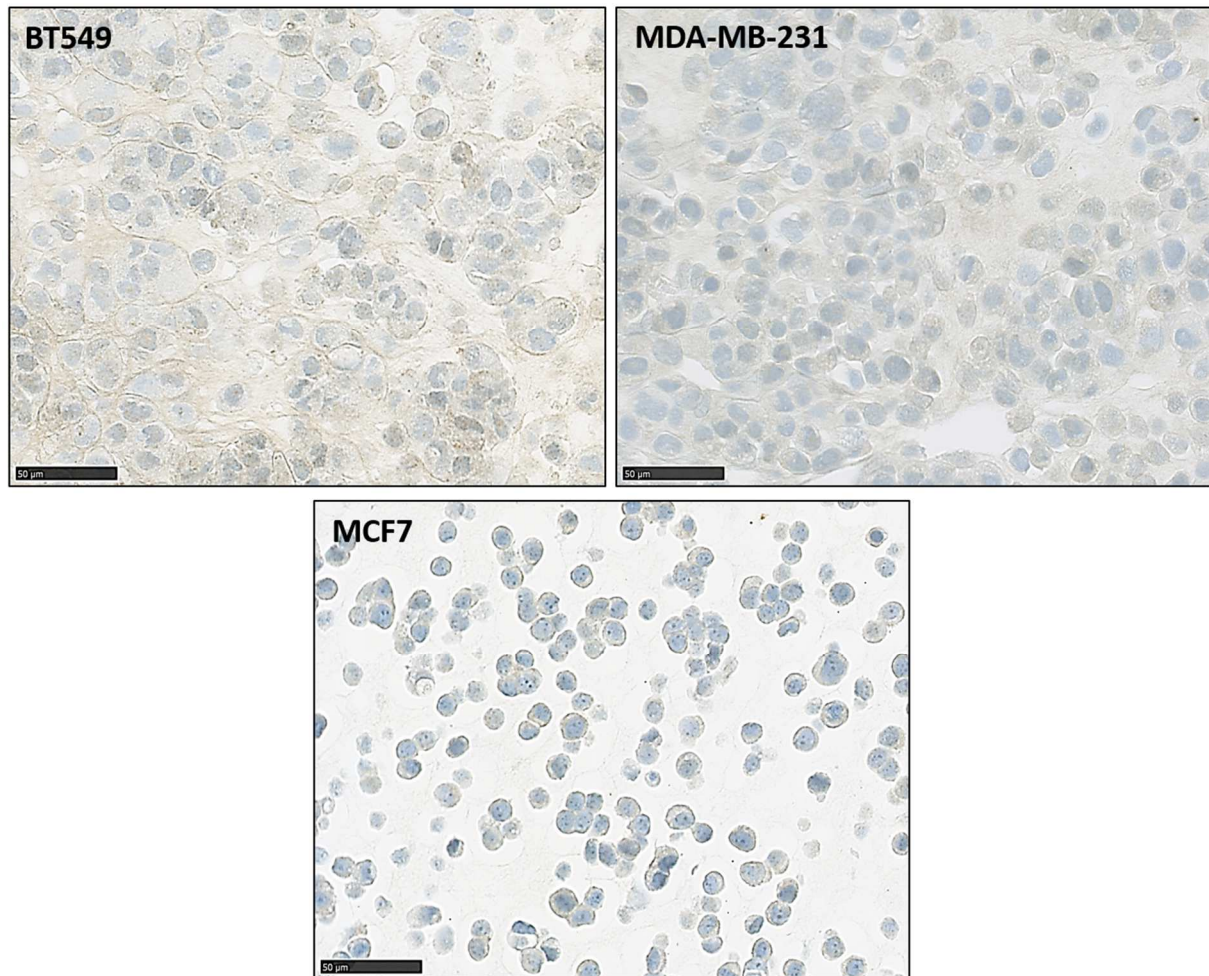


Abbildung 47: Differentielle Expression von Caprin-1 in humanen Brustkrebszelllinien

Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression von Caprin-1 in den Brustkrebszelllinien BT549, MDA-MB-231 und MCF7; DAB-basierte Braunmarkierung von Caprin-1, Hämatoxylin-basierte Blaumarkierung der Zellkerne; Maßstabsleiste mit 50 µm.

Nachdem die immunhistochemische Detektion für Caprin-1 optimiert war, konnte die PLA, die der Darstellung der co-Lokalisation von Proteinen dient, etabliert werden. Hierbei wurde die Protein-Protein-Komplexbildung von uPAR und Caprin-1 zum ersten Mal demonstriert (Abb. 48A). Dies zeigt, dass zum einen die zwei Proteine höchstwahrscheinlich direkt miteinander interagieren, weil diese in einer räumlichen Distanz von weniger als 40 nm vorliegen, was die Voraussetzung für die Darstellung einer Interaktion in PLA ist. Zum anderen führt die Herunterregulierung von uPAR zu einer signifikanten ($p=0,042$) Reduzierung der Protein-Protein-Komplexe um 93% im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle (RK) (Abb. 48B und 48C).

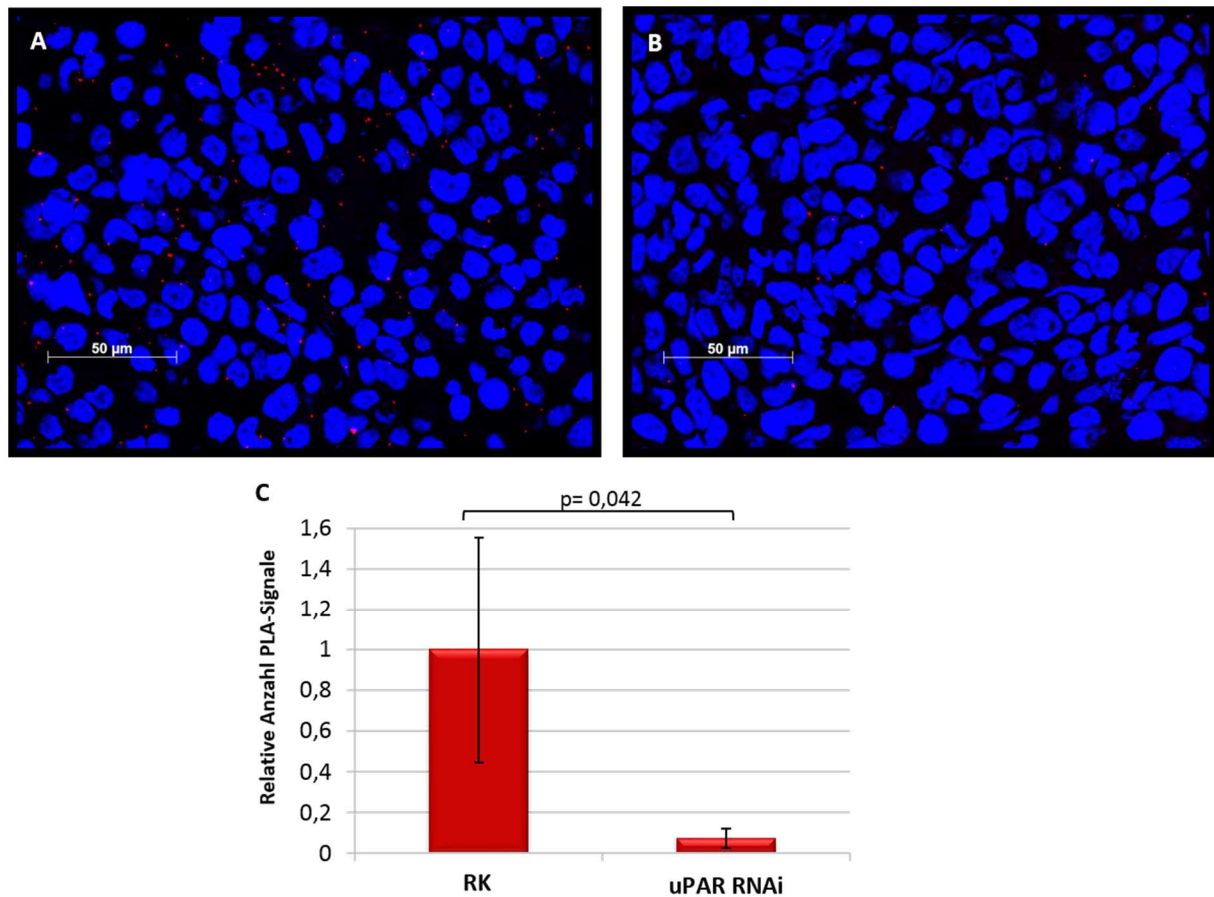


Abbildung 48: Reduzierte uPAR-Caprin-1-Komplexanzahl infolge der uPAR-RNAi in MDA-MB-231-Zellen

Fluoreszenzsignale (Exzitationsfilter Cy3, rot) der uPAR-Caprin-1-Komplexe in Reaktionskontrollzellen (A) und nach uPAR-RNAi (B) (Exzitationsfilter DAPI, blau); Maßstabsleiste mit 50 µm; C: Relative Anzahl der PLA-Signale nach uPAR-RNAi im Verhältnis zu Reaktionskontrollzellen (RK), Analyse aus je 3 Blickfeldern, Bildanalysesoftware: *Definiens Developer XD*, Statistische Analysesoftware: *SigmaPlot*.

Auch die Interaktion von Caprin-1 mit uPAR sollte biochemisch in der co-IP bestätigt werden, jedoch konnte aufgrund der geringen Sensitivität des Caprin-1-Antikörpers im Western Blot dieses Protein in der MDA-MB-231-Zelllinie nicht gezeigt werden.

3.7 Therapeutische Relevanz der neuen uPAR-Interaktionspartner Cyr61 und YB-1 im TNBC

Um die potentielle therapeutische Relevanz von YB-1 und Cyr61 für TNBC-Patienten besser einschätzen zu können, wurden diese Proteine in Gewebeschnitten von TNBC-Tumorgewebe Mikroarrays (*tissue microarrays*, TMA) immunhistochemisch analysiert und klassifiziert. Anschließend wurden die Ergebnisse mit den zugehörigen klinischen Patientendaten und der Expression von weiteren, im Zusammenhang mit dem übergeordneten Forschungsprojekt analysierten Proteinen statistisch ausgewertet.

3.7.1 Korrelation der Proteinexpression von Cyr61 mit den Komponenten des uPAS und mit dem histologischen Grad in TNBC

Von insgesamt 174 Tumorgewebeproben wurden für die immunhistochemische Analyse der Cyr61 Proteinexpression 170 Tumorgewebeproben eingesetzt. Diese ergab, dass 35% (60 Fälle) keine Expression von Cyr61 zeigten, 30% (51 Fälle) waren schwach positiv (1+), 24% (41 Fälle) waren mäßig positiv (2+) und 11% (18 Fälle) stark positiv (3+) (Abb. 49).

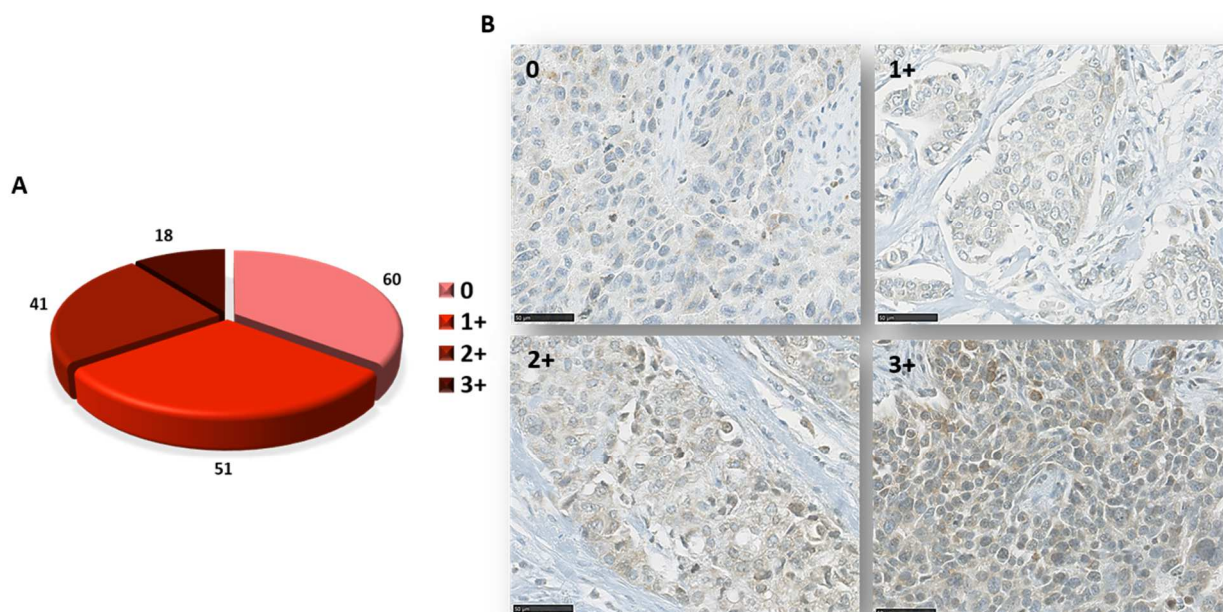


Abbildung 49: Differentielle Expression von Cyr61 in TNBC-Tumoren

A: Kreisdiagramm zur Klassifikation (0-3+) der Tumorgewebeproben aus TNBC-TMAs. **B:** Ausschnitte aus immunhistochemisch markierten Gewebeschnitten der Tumorgewebeproben, mit unterschiedlich starker Expression von Cyr61: 0, 1+, 2+, 3+; Maßstabsleiste mit 50 µm

Die statistische Auswertung (Spearman Rang Korrelation) der mit IHC analysierten Proteinexpression von Cyr61 in den 170 TNBC-Tumorproben zeigte, dass die Expression von uPAR mit der von Cyr61 signifikant korreliert ($p=0,04$) (Tab 31). Außerdem zeigten sich höchst signifikante Korrelationen von Cyr61 mit der Expression der weiteren Komponenten des uPAR-Systems uPA ($p\leq 0,001$, invers), PAI-1 ($p=0,002$, invers) und Plasminogen ($p\leq 0,001$), sowie mit den assoziierten Partnern des Interaktoms, Integrin $\alpha\beta 3$ ($p=0,005$, invers), IGF-1R ($p=0,02$), Insulin Rezeptor ($p\leq 0,001$) und cMet ($p\leq 0,001$) (Tab. 31). Darüber hinaus ergab die statistische Analyse eine höchst signifikante Korrelation ($p\leq 0,001$) der Cyr61-Expression mit der YB-1-Expression (Tab. 31). Die Korrelation der klinischen Patientendaten mit der Expression von Cyr61 in den TNBC-Tumoren zeigte außerdem einen signifikanten Zusammenhang von Cyr61 mit dem histologischen Grad der Tumoren (Tab. 31). Dieser gibt Auskunft über den Grad der Differenzierung der Tumore: je höher der histologische Grad (1-3), desto weniger differenziert sind die Tumorzellen und desto schlechter die Prognose für die Patienten (Elston and Ellis 1991).

Tabelle 31: Mit Cyr61-Expression signifikant korrelierende Parameter

Parameter	p-Wert
uPAR	0,04
uPA	$\leq 0,001$ (invers)
PAI-1	0,002 (invers)
Plasminogen	$\leq 0,001$
Cathepsin B	$\leq 0,001$
Integrin $\alpha\beta 3$	0,005 (invers)
IGF-1R	0,02
Insulin Rezeptor	$\leq 0,001$
YB-1	$\leq 0,001$
cMet	$\leq 0,001$
Histologischer Grad	0,01

3.7.2 Korrelation der Proteinexpression von YB-1 mit dem histologischen Grad in TNBC

Die histologische Klassifikation der Expression von YB-1 in 172 (von 174 verfügbaren) Tumorgewebeproben ergab, dass 19% (32 Fälle) negativ (0) waren, 21% (36 Fälle) schwach positiv (1+), 31% (54 Fälle) mäßig positiv (2+) und 29% (50 Fälle) stark positiv waren (Abb. 50).

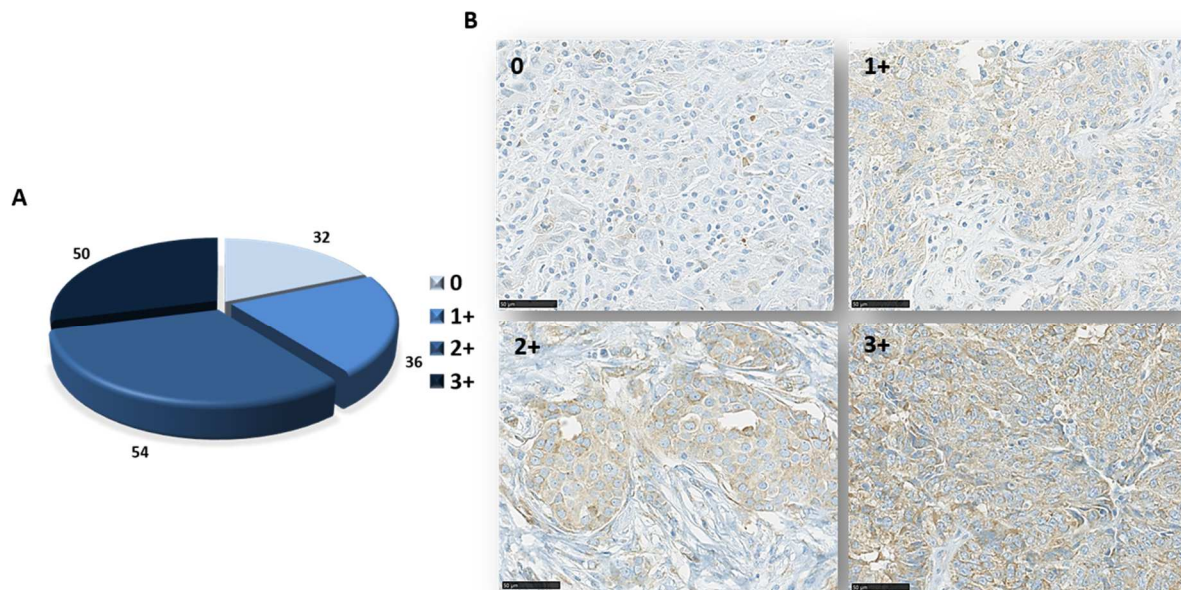


Abbildung 50: Differentielle Expression von YB-1 in TNBC-Tumoren

A: Kreisdiagramm zur Klassifikation (0-3+) der Tumorproben aus TNBC-TMAs. **B:** Ausschnitte aus immunohistochemisch markierten Gewebeschnitten der Tumorproben, mit unterschiedlich starker Expression von YB-1: 0, 1+, 2+, 3+; Maßstabsleiste mit 50 µm

Die statistische Auswertung der Proteinexpression von YB-1 in den Tumorproben in Korrelation mit der Abundanz anderer Komponenten des uPAR-Systems und tumorrelevanter Biomarker zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit den Schlüssel molekülen des uPAR-Interaktoms (uPAR, uPA, PAI-1). Jedoch zeigte sich eine höchst signifikante Korrelation mit den uPAR-System-assoziierten Partnern Cathepsin B ($p \leq 0,001$) und cMet ($p \leq 0,001$) (Tab. 32). Darüber hinaus bestand ein hoch signifikanter ($p = 0,002$) Zusammenhang der YB-1 Expression mit dem histologischen Grad der Tumore (Tab. 32).

Tabelle 32: Mit YB-1 Expression signifikant korrelierende Parameter

Parameter	p-Wert
Cathepsin B	$\leq 0,001$
cMet	$\leq 0,001$
Ki67	$\leq 0,001$
Cyr61	$\leq 0,001$
Histologischer Grad	0,002

4 Diskussion

Etwa 16% aller Brustkrebsfälle gehören zu dem Subtyp der triple-negativen Tumore (Blows *et al.* 2010), bei denen Therapien, die gegen die Hormon-Rezeptoren ER und PR, bzw. gegen HER2 gerichtet sind, nicht eingesetzt werden können. Da deswegen nur systemische Therapieansätze angewendet werden, ist die Suche nach Zielproteinen für eine gerichtete Therapie von großer Bedeutung. Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Schmitt (Frauenklinik, München) zeigten häufig eine deutliche Überexpression von uPA und uPAR in TNBC-Gewebeproben, weshalb dieses System als potentielles Therapieziel im TNBC sehr vielversprechend ist. Das Ziel dieser Arbeit war die Relevanz einer kombinierten Inhibition von uPAR und uPA sowie IGF-1R als potentielle Ziele bzw. Ansätze einer gerichteten Therapie im TNBC detaillierter zu analysieren. Ein weiteres Ziel bestand in der weiteren Charakterisierung des uPAR-Systems, um neue potentielle Interaktionspartner von uPAR zu identifizieren und deren therapeutische Relevanz anhand einer TNBC-Kohorte zu evaluieren.

4.1 uPAR und uPA - potentielle Therapiezielmoleküle im triple-negativen Brustkrebs

Im Unterschied zu vorangegangenen Studien, die die Effekte einer RNAi-basierten Herunterregulierung von uPAR bzw. uPA (Subramanian *et al.* 2006, Li *et al.* 2010, Kunigal *et al.* 2007) oder auch einer Antikörper-basierten Inhibierung von uPAR (Duriseti *et al.* 2010, LeBeau *et al.* 2013) nach einer relativ kurzen Zeitspanne von 24-72 h evaluierten, wurden im Zuge dieser Arbeit die Effekte auf die Tumorprogression infolge einer lentiviral vermittelten, permanenten Reduzierung von uPA und uPAR nach acht Wochen untersucht. Die *in vitro*-Analysen wurden aufgrund der Eigenschaften der TNBC-Modellzelllinien gewählt. Diese wachsen adhärent und bilden keine Kolonien, weshalb sie für die Analyse der Effekte auf die Proliferation für den Koloniebildungstest bzw. die Ausbildung von drei-dimensionalen Sphäroiden nicht geeignet sind. Da das uPAR-System einen entscheidenden Einfluss auf die Metastasierung der Tumorzellen hat (Noh *et al.* 2013), wurden die Effekte der RNAi auf *in vitro*-Invasion und -Migration experimentell analysiert. Die beiden unterschiedlichen Boyden-Kammer-Tests zeigten, dass das Migrations- bzw. Invasionspotential der MDA-MB-231-Zellen v.a. infolge der uPA-RNAi signifikant reduziert war. Diese reduzierte Migration infolge der uPA-RNAi wurde mit dem Wundheilungs-Migrationstest untermauert. Dabei

hatte auch die uPAR-RNAi einen signifikant reduzierenden Effekt auf die Migration der Zellen. Hier zeigte sich außerdem ein additiver Effekt einer simultanen Herunterregulierung von uPAR und uPA im Vergleich zu den Einzelansätzen. Subramanian *et al.* zeigten, dass die transiente Herunterregulierung mit einem bicistronischen Vektor (für eine gleichzeitige uPAR- und uPA-RNAi) einen additiv reduzierenden Effekt auf die Invasivität der Zellen hatte (Subramanian *et al.* 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt nur für die Zellmigration gezeigt werden. Die Invasion der Zellen war nur infolge der uPA-RNAi höchst signifikant reduziert. Auch die Western Blot-Analysen von Invasion-assoziierten Markern wie Paxillin, Vimentin oder MMP9 zeigten keine signifikante Reduzierung der Expression bzw. Aktivierung. Die massenspektrometrische Analyse der ICPL-markierten Zelllysate ergab, dass in den MDA-MB-231-Zellen nach uPAR-RNAi Signalmoleküle dereguliert waren, die zwar hinsichtlich der Migration keine Aussage zuließen, aber eine schwach induzierte Invasion der Zellen anzeigten, was vermutlich eine kompensatorische Reaktion auf die RNAi darstellt.

In der BT549-Zelllinie ergaben die ICPL-Analysen der uPAR-RNAi-Ansätze ähnliche Ergebnisse, jedoch wiesen sie auf eine erhöhte Induktion der Zellmigration hin. Die uPA-RNAi führte in den Zellen zu einer Aktivierung solcher Gene, die Migration und Invasion stark positiv beeinflussen, was ebenfalls ein kompensatorisches Verhalten der Zellen vermuten lässt. Aufgrund der ICPL-Daten zeigt sich, dass die uPA-RNAi einen stärkeren Effekt auf die *in vitro*-Metastasierung hat als die uPAR-RNAi und dies konnte mit den Zellkulturexperimenten auch demonstriert werden. Die Proliferation der MDA-MB-231-Zellen war nach der uPAR-RNAi, sowie der uPA-RNAi und der kombinierten uPAR-/uPA-RNAi im Vergleich zur Reaktions-Kontrolle reduziert, jedoch wurde in diesen Zellen infolge der RNAi keine Apoptose induziert. In Gliomzellen war 48 h nach uPAR- bzw. uPA-RNAi Apoptose induziert (Gondi *et al.* 2007). Im Zuge dieser Arbeit wurden Effekte nach 48 h nicht überprüft, weil in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe mit siRNA-vermittelter uPAR- bzw. uPA-Reduzierung keine Hinweise auf eine induzierte Apoptose beobachtet wurden. Ein Grund für die in der Literatur beschriebene Apoptoseinduktion könnte sicherlich ein anderer Tumortyp und somit eine andere verwendete Zelllinie sein, die die Heterogenität der Tumore bzw. deren Ursprungsgewebe verdeutlicht. Deshalb ist es wichtig potentielle Therapeutika bzw. therapeutische Ansätze in verschiedenen Tumorzellen zu analysieren. In anderen Studien

wurde die uPAR-Proteinexpression allein oder in Kombination mit anderen Zielproteinen in verschiedenen Tumorzelltypen reduziert oder inhibiert. Eine kombinierte siRNA-vermittelte Herunterregulierung (48-72 h) von uPAR und MMP9 in Medulloblastomzellen induzierte Apoptose (Kotipatrani *et al.* 2012), wohingegen in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und ZR75 von einem reduzierten Wachstum, jedoch nicht von induzierter Apoptose nach der Verminderung von uPAR und MMP9 berichtet wird (Kunigal *et al.* 2007).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten ICPL-Proteomanalysedaten der Zellen nach uPAR-RNAi von acht Wochen zeigten, dass sowohl in den MDA-MB-231- als auch den BT549-Zellen die Expression solcher Proteine induziert oder supprimiert war, die auf die Regulierung von Signalwegen hindeuteten, die eine Induktion von Apoptose verhindern sollten. Da bisher keine vergleichbaren ICPL-Studien an uPA- bzw. uPAR-reduzierten Zellen vorliegen, wird vermutet, dass aufgrund der RNAi nach acht Wochen in den Zellen Signalwege induziert wurden, die die Effekte der Herunterregulierung kompensieren könnten. Resistenzbildungen, wie sie z.B. während der Trastuzumab-Therapie (anti-HER2-Antikörper) bei HER2-positiven Tumoren nach ca. einem Jahr auftreten (Valabrega *et al.* 2007), zeigten, dass die zelluläre Reaktion über mehrere Monate einen erheblichen Effekt auf die Wirksamkeit eines Therapeutikums hat. Aus diesem Grund ist eine genaue Evaluierung von Biomarkern auch nach einem längeren Zeitraum und in verschiedenen Modellzelllinien entscheidend.

In dieser Arbeit wurde eine Kohorte von 174 TNBC-Tumorproben eingesetzt, bei denen innerhalb eines größeren Forschungsprojektes bereits zuvor die Expression von uPAR bzw. uPA immunhistochemisch untersucht worden war. Statistische Analysen in diesem übergeordneten Projekt zeigten einen signifikanten Zusammenhang der Expression von uPAR mit Cathepsin B, Cathepsin D und Plasminogen. Da diese auch mit dem uPAR-System assoziiert sind (Mohamed and Sloane 2006), deutet dies auf eine starke Assoziation mit dem hohen Metastasierungspotential und der Malignität im TNBC hin. Auch wurde die Protein-Komplexbildung von uPAR und uPA und dessen Bedeutung in der Tumorkohorte in dem übergeordneten Projekt analysiert und es zeigte sich, dass die Interaktion von uPA und uPAR mit der Tumorgröße invers signifikant korreliert. Eine mögliche Begründung hierfür könnte sein, dass Tumore, die uPAR und uPA im Komplex zeigen, weniger zum Tumorwachstum

als viel mehr zur Invasion bzw. Metastasierung neigen. Dies würde durch das häufig beschriebene, aggressive Potential der TNBC-Tumore untermauert werden, bzw. dieses mit begründen (Bauer *et al.* 2007).

4.2 Therapeutische Relevanz einer simultanen und stabilen Herunterregulierung von uPAR und IGF-1R im TNBC

Ein Zusammenhang des uPAR- und des IGF-1R-Systems wurde in der Literatur bereits beschrieben, z.B. dass die Inhibierung von uPAR und uPA in Kolonkarzinomzellen zu einer reduzierten Wachstumsfaktor-abhängigen Zellinvasion führte (Bauer *et al.* 2005). Weitere Hinweise auf eine mögliche Assoziation dieser Systeme wurde in MDA-MB-231-Zellen (Nielsen *et al.* 2004) und in Rhabdomyosarkomzellen (Gallicchio *et al.* 2001) beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit wurde mit optimierter co-Immünpräzipitation IGF-1R zum ersten Mal als direkter Interaktionspartner und mit PLA die co-Lokalisation von IGF-1R und uPAR in Paraffinschnitten demonstriert. So war die Anzahl der PLA-Signale nach IGF-1R- bzw. uPAR-RNAi und kombinierter uPAR- und IGF-1R-RNAi in den BT549- und MDA-MB-231-Zellen signifikant reduziert.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der bereits beschriebenen Zusammenhänge wurde außerdem die Relevanz einer kombinierten Verminderung von IGF-1R und uPAR bzw. uPA in den TNBC-Zelllinien BT549 und MDA-MB-231 mit entsprechenden *in vitro*-Techniken analysiert. Die *in vitro*-Proliferation der MDA-MB-231-Zellen war infolge der IGF-1R-RNAi höchst signifikant reduziert. Die kombinierte RNAi von IGF-1R mit uPAR führte im Verhältnis zu uPAR-RNAi alleine ebenfalls zu einer höchst signifikant und additiv verringerten Zellviabilität. Jedoch zeigte sich im Vergleich zur IGF-1R-RNAi keine additiv reduzierte Proliferation, sodass der reduzierende Effekt vermutlich überwiegend auf die IGF-1R-RNAi zurückzuführen ist. Andere Studien zur RNAi-basierten Herunterregulierung von IGF-1R alleine - z.B. in Osteosarkomzellen - zeigten ebenfalls eine reduzierte Zellproliferation und sogar induzierte Apoptose (Wang *et al.* 2009). In den BT549-Zellen hatte die IGF-1R-RNAi keinen reduzierenden Effekt auf die Proliferation zur Folge. Ein Grund hierfür könnte die schwächere Expression von IGF-1R in dieser Zelllinie als in den MDA-MB-231-Zellen und

deshalb eine geringere Abhängigkeit der Zellproliferation von diesem Signalweg sein. Hier wurde die BT549-Zelllinie dennoch aufgrund ihrer TNBC-Eigenschaften eingesetzt, um die Heterogenität des TNBC (Lehmann *et al.* 2011) *in vitro* anhand zweier Zelllinien mit unterschiedlichen Proteinexpressionsmustern zu simulieren. Außerdem sind bezüglich der BT549-Zelllinie und vergleichbarer RNAi-Experimente noch keine Studien beschrieben worden.

Neben der Proliferation wurden auch die Effekte der RNAi auf die Invasion bzw. Migration der Zellen analysiert. In der MDA-MB-231-Zelllinie war sowohl die *in vitro*-Invasion als auch die Migration der Zellen infolge der IGF-1R-RNAi reduziert. Hier zeigte sich vor allem ein signifikant additiver Effekt einer simultanen RNAi von uPAR und IGF-1R im Vergleich zu der uPAR-RNAi und zu der IGF-1R-RNAi auf das Invasionsverhalten der Zellen. In Osteosarkomzellen (Wang *et al.* 2009) und in Magenkarzinomzellen (Ge *et al.* 2015) führte die alleinige Herunterregulierung von IGF-1R zu reduzierter Zellinvasion, wie auch in dieser Arbeit in den MDA-MB-231-Brustkrebszellen gezeigt werden konnte. Die Invasivität der BT549-Zellen war infolge der uPA-RNAi erhöht. Die Analyse des Wundheilungs-Migrationstests zeigte jedoch eine signifikant reduzierte Migration der Zellen infolge der simultanen Reduzierung von uPAR und IGF-1R im Vergleich zu der Reaktions-Kontrolle. Ein Grund für die abweichenden Ergebnisse in der BT549-Zelllinie könnte sein, dass für diese der Boyden-Kammer-Migrationstest weniger geeignet scheint, bzw. wie bereits im Zusammenhang mit der Proliferation gezeigt, diese Zelllinie in geringerer Abhängigkeit von diesen Signalmarkern sein könnte, weil die endogene uPAR- und IGF-1R-Proteinexpression in den BT549-Zellen geringer ist als in den MDA-MB-231-Zellen. So gibt es einige Therapieansätze zur kombinierten Herunterregulierung bzw. Inhibierung von IGF-1R in Kombination mit anderen Zielmolekülen, wie HER2 (Chakraborty *et al.* 2015). Eine Herausforderung ist dabei die Resistenzbildung von Tumorzellen gegen Therapeutika, die gegen Tyrosinkinasen bzw. deren Rezeptoren gerichtet sind (Rosenzweig 2012). Aufgrund des Auftretens von Resistenzen und der Heterogenität von Tumoren ist die Entwicklung von individuellen/spezifischen therapeutischen Strategien hin zur personalisierten Medizin von großer Bedeutung. Eine kombinierte Inhibierung von IGF-1R und uPAR könnte eine Möglichkeit für die Therapie ausgewählter TNBC-Patienten darstellen.

In dem übergeordneten Forschungsprojekt wurden auch Expressionsanalysen an Tumorgewebeproben der TNBC-Kohorte mit IHC durchgeführt. 155 Tumore waren positiv für die Expression von IGF-1R und die statistische Analyse zeigte, dass die IGF-1R- mit der uPAR-Expression sowie mit der Expression weiterer Komponenten des uPAR-Systems signifikant korrelierte, was den nahen Zusammenhang von IGF-1R und uPAR bzw. den Komponenten des uPAR-Systems untermauert.

Darüber hinaus wurde im Zuge des übergeordneten Projekts der PLA von IGF-1R mit uPAR an diesen Tumoren durchgeführt und demonstrierte, und dass infolge der uPAR- bzw. IGF-1R-RNAi die Anzahl Proteinkomplexe reduziert war. Die statistische Auswertung des PLA im TNBC-Gewebe ergab, dass die Komplexanzahl hoch signifikant mit dem histologischen Grad der Tumore korrelierte, während die Expression der einzelnen Partner nicht mit dem histologischen Grad assoziiert war, was auf eine entscheidende Rolle der Komplexe von IGF-1R und uPAR bei der Malignität der TNBC-Tumore hinweist. Diese Ergebnisse an Tumorgewebe untermauern auch die Ergebnisse aus den *in vitro*-Analysen, die zeigten, dass eine simultane Herunterregulierung von IGF-1R und uPAR signifikant und additiv das Migrations- bzw. Invasionsverhalten der MDA-MB-231-Zellen auch nach mehreren Wochen reduziert. Außerdem bestand ein signifikanter inverser Zusammenhang der IGF-1R-uPAR-Komplexanzahl mit der Expression von uPA und PAI-1. Dies könnte auf eine Konkurrenzsituation zwischen IGF-1R und den anderen direkten Interaktionspartnern uPA und PAI-1 um die Bindung mit uPAR hinweisen.

4.3 Erstmalige Identifizierung neuer direkter uPAR-Interaktionspartner im uPAS und deren Potential als Therapieziele in TNBC

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war das Identifizieren neuer potentieller direkter Interaktionspartner von uPAR, die zukünftig ebenfalls als mögliche Therapiezielmoleküle denkbar wären. Hierzu wurde eine co-IP mit uPAR etabliert und das Präzipitat anschließend massenspektrometrisch analysiert. Die Expression von sieben signifikant angereicherten Proteinen wurde mit Western Blot in den Brustkrebszelllinien (BT474, BT549, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-361, SKBR3) analysiert und drei von diesen - Cyr61, YB-1, Caprin-1 - wurden dann aufgrund ihrer nachgewiesenen Expression in den TNBC-Zelllinien BT549 und MDA-MB-231 für weitere Analysen ausgewählt. Mit IHC wurde die zelluläre Lokalisation der

Proteine gezeigt und mit PLA die mögliche direkte Interaktion der Proteine mit uPAR untermauert. Um die potentielle therapeutische Relevanz der Proteine zu evaluieren, wurde die Expression von Cyr61 und YB-1 in der TNBC-Kohorte mit IHC analysiert und statistisch mit den klinischen Daten bzw. der Expression anderer relevanter Tumormarker korreliert.

4.3.1 Korrelation der neu identifizierten Cyr61-uPAR-Komplexe mit tumor-assoziierten Biomarkern und mit der Malignität beim TNBC

Cyr61 wurde hier erstmalig in der massenspektrometrischen Analyse als potentieller direkter Interaktionspartner von uPAR identifiziert. Cyr61 ist ein matrizelluläres (Bornstein 1995) Protein, das extrazellulär an Oberflächenrezeptoren und Proteine der ECM bindet (Yang and Lau 1991). Die Western Blot-Analyse in dieser Doktorarbeit zeigte, dass Cyr61 bei den hier verwendeten Brustkrebszelllinien nur in den TNBC-Zelllinien BT549 und v.a. MDA-MB-231, ähnlich wie uPAR, exprimiert wird. Sánchez-Bailón *et al.* zeigten (anhand der Daten von Neve *et al.* 2006), dass Zellen, die dem basalen Subtyp angehören (z.B. die MDA-MB-231) mehr Cyr61 exprimieren als solche, die dem luminalen Subtyp angehören, was die Expression von Cyr61 mit einem aggressiveren Phänotyp assoziiert (Sanchez-Bailon *et al.* 2015).

Einen direkten Zusammenhang von Cyr61 mit dem uPAR-System zeigt die Tatsache, dass Plasmin Cyr61 spaltet und eine verkürzte Form von Cyr61 im Zellüberstand identifizierbar war (Pendurthi *et al.* 2005). Zudem induzierte von Tumorzellen stammendes Cyr61 in benachbarten Fibroblasten die MMP-1 Expression (Nguyen *et al.* 2006). Diese gehört zu den Matrix-Metalloproteasen, die beim Abbau der ECM eine entscheidende Rolle spielen (Shapiro 1998). Die Aktivierung von Plasmin und MMPs ist Grundlage der vom uPAR-System induzierten Invasion (Smith and Marshall 2010). Sowohl die transiente siRNA-basierte Verminderung als auch die Antikörper-basierte Inhibierung von Cyr61 in MDA-MB-231-Zellen führte zu einer reduzierten Invasion bzw. Migration (Sanchez-Bailon *et al.* 2015). Wie bereits beschrieben und auch in dieser Doktorarbeit gezeigt, führte eine Herunterregulierung von Komponenten des uPAR-Systems ebenfalls zu einer reduzierten Migrations- bzw. Invasionsfähigkeit der MDA-MB-231-Zellen. Cyr61 bindet an die Somatomedin B¹⁻⁴⁴-Domäne von Vitronektin (Francischetti *et al.* 2010), einem der bekannten Interaktionspartner von uPAR (Ciambrone and McKeown-Longo 1992). Hierbei konkurriert Cyr61 um diese Bindestelle mit PAI-1 und höchstwahrscheinlich auch mit uPAR. Nach der Inkubation von

immobilisiertem Vitronektin mit Cyr61, banden die zugegebenen uPAR-positiven Zellen weniger an das Vitronektin als in den unbehandelten Kontrollzellen (Francischetti *et al.* 2010). Außerdem bindet Cyr61 an das Integrin $\alpha\beta 3$ (Kireeva *et al.* 1998), einem Integrin, über das auch uPAR intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden induziert (Tarui *et al.* 2006).

In dieser Arbeit konnte Cyr61 im Komplex mit uPAR erstmals präzipitiert werden und mit PLA eine co-Lokalisation gezeigt werden, was eine direkte Interaktion der beiden Proteine nahelegt. Zu klären bleibt, ob Cyr61 in einem Komplex mit uPAR und auch mit z.B. Integrin $\alpha\beta 3$ gebunden ist oder durch die Bindung an Vitronektin einen Komplex mit uPAR formt. Neben den *in vitro*-Analysen wurde im Zuge dieser Doktorarbeit auch die Cyr61-Expression in einer TNBC-Kohorte (n=170) analysiert. 110 Tumorfälle waren positiv für Cyr61 und die Expression von Cyr61 korreliert signifikant mit dem histologischen Grad der Tumore, was den Zusammenhang zwischen Cyr61-Expression und einem aggressiveren Phänotyp untermauert. In einer Tumorkohorte von 61 *ductal carcinoma in situ* (DCIS)-Fällen, die eine Mischung aus ER-, PR-positiven bzw. -negativen Geweben waren, zeigte sich ebenfalls eine Korrelation zwischen der Cyr61-Expression und dem histologischen Grad (Saglam *et al.* 2014). Außerdem ergab die statistische Analyse der TNBC-Tumorkohorte in dieser Arbeit eine signifikante Korrelation der Cyr61-Expression mit der Expression von uPAR und invers mit der Expression von uPA. Dies untermauert erneut die mögliche Interaktion der Komponenten. Die inverse Korrelation zu uPA könnte eventuell auf eine übergeordnete Regulierung z.B. durch Plasmin zurückzuführen sein oder auf eine Konkurrenz der Proteine z.B. um eine gemeinsame Bindestelle. Darüber hinaus korreliert in der vorliegenden Arbeit die Cyr61-Expression signifikant mit weiteren Komponenten des uPAR-Systems wie Plasminogen, Cathepsin B, Integrin $\alpha\beta 3$ und IGF-1R. Einen Zusammenhang zu dem IGF-1R-System zeigte sich darin, dass in der mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 stimulierten Brustkrebszelllinie MCF7 die Expression von Cyr61 höchst signifikant erhöht war (Sarkissyan *et al.* 2014). Die statistische Analyse der Daten der hier verwendeten Tumorkohorte untermauern den Zusammenhang von Cyr61 mit dem uPAR-System und einer direkten Interaktion mit uPAR.

4.3.2 Korrelation der neu identifizierten YB-1-uPAR-Komplexe mit der Malignität beim TNBC

Neben Cyr61 wurde auch YB-1 als potentieller neuer direkter Interaktionspartner von uPAR in der massenspektrometrischen Analyse in dieser Arbeit identifiziert. YB-1 gehört zu der Familie der *cold-shock*-Proteine (Lasham *et al.* 2003). YB-1 scheint an der Regulation verschiedener zellulärer Signaltransduktionskaskaden beteiligt zu sein und hierbei Proliferation, Zellüberleben und Invasion zu beeinflussen (Lasham *et al.* 2003). Angesichts seiner Expression in verschiedenen Tumoren wie im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Gessner *et al.* 2004) und auch in Mammakarzinomzellen, wird YB-1 auch eine prognostische Bedeutung zugeschrieben (Wang *et al.* 2015). In dieser Doktorarbeit wurde die YB-1-Proteinexpression in allen untersuchten Brustkrebszelllinien gezeigt. Aufgrund seiner Relevanz für die Zellinvasion wurde YB-1 auch im Zusammenhang mit dem uPA-System analysiert. Eine Herunterregulierung von YB-1 u.a. in der MDA-MB-231-Zelllinie führte zu einer Inhibierung von uPA, während eine Expression von wt-YB-1 eine Induktion der uPA-Expression *in vitro* zur Folge hatte (Astanehe *et al.* 2009). Letzteres widerspricht den Ergebnissen aus ICPL-Analysen, die im Zuge dieser Doktorarbeit erzielt wurden. So war infolge der uPA-RNAi in den BT549-Zellen die Expression von YB-1 leicht induziert.

Eine direkte Interaktion von YB-1 mit uPAR wurde bisher nicht beschrieben. Die hier erstmalige Darstellung von uPAR-YB-1-Komplexen untermauert den Hinweis auf eine direkte Interaktion von YB-1 mit uPAR und die klar reduzierte Komplexbildung infolge von uPAR-RNAi bestätigt dies. Die statistische Analyse der Expression von YB-1 in der TNBC-Kohorte zeigte außerdem eine hoch signifikante Korrelation mit dem histologischen Grad der Tumore. Eine statistische Analyse auf Grundlage von bereits in der Literatur beschriebenen Studien evaluierte die prognostischen Relevanz von YB-1 beim Brustkrebs (Wang *et al.* 2015). Sie fanden keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit histologischem Grad aber eine Assoziation von starker YB-1 Expression mit einer schlechten 5-Jahres-Überlebensprognose (Wang *et al.* 2015). Diese Assoziation von YB-1-Expression und schlechter Fünf-Jahresprognose war zuvor an einer Kohorte von n=83 Brustkrebsproben gezeigt worden (Janz *et al.* 2002). In derselben Publikation wurde auch kein statistisch

signifikanter Zusammenhang der Expression von uPA bzw. PAI-1 mit der von YB-1 beschrieben. In dieser Doktorarbeit zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang der Expression von YB-1 mit uPA und PAI-1 bzw. uPAR in der TNBC-Kohorte. Dies könnte auch damit zusammenhängen, dass die Ergebnisse mit unterschiedlichen Methoden erzielt wurden und nicht immer direkt von Zelllinien auf Tumore übertragen werden können. Außerdem wurden in den Studien von Janz und Wang nicht explizit TNBC-Tumorproben analysiert. Es wäre also möglich, dass YB-1 eine starke Relevanz für die Malignität der Tumore im TNBC hat, abhängig vom Zelltyp und dessen uPAR-Expressionsintensität.

4.3.3 Caprin-1 – ein potentieller neuer Interaktionspartner im uPAR-System

Der dritte im Rahmen dieser Doktorarbeit mit massenspektrometrischen Analysen identifizierte potentielle direkte Interaktionspartner von uPAR war Caprin-1. Die cDNA dieses Proteins wurde 1995 identifiziert und zunächst fälschlicherweise dem GPI-verankerten p137-Protein zugeordnet (Ellis and Luzio 1995). Grill *et al.* stellten richtig, dass die cDNA für ein zytoplasmatisches Protein kodiert und nannten es *cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1* (Caprin-1) als Beispiel für eine Proteinfamilie, die durch zwei sogenannte homologe Domänen *homology region 1* bzw. *2* (HR-1, HR-2) charakterisiert ist (Grill *et al.* 2004). Die Unterdrückung der Caprin-1-Expression führte - aufgrund einer verlängerten G₁-Phase im Zellzyklus - zu einer reduzierten Zellproliferation (Wang *et al.* 2005). Außerdem wurde eine co-Lokalisation von Caprin-1 mit dem *RasGAP SH3 domain binding protein-1* (G3BP-1) in zytoplasmatischen RNA-Granula gezeigt, die mit Mikrotubuli verbunden und an der Zellfrontseite lokalisiert sind, weshalb ihnen eine Rolle bei der Zellmigration zugesprochen wird (Solomon *et al.* 2007).

Ein Zusammenhang zwischen Caprin-1 und dem uPAR-System war zum Zeitpunkt dieser Doktorarbeit noch nicht beschrieben. Jedoch wurde Caprin-1 als direkter Interaktionspartner von Cyr61 identifiziert (Sabile *et al.* 2013). Cyr61 war wiederum in den hier beschriebenen Ergebnissen als direkter Interaktionspartner von uPAR identifiziert worden. Die ektopische Expression von Caprin-1 führte in einer Osteosarkom-Mausmodell-Linie zu einer Zunahme des Primärtumorwachstums und von Lungenmetastasen (Sabile *et al.* 2013). In dieser Arbeit wurde nur eine schwache Proteinexpression von Caprin-1 in der BT549-Zelllinie nachgewiesen. Die IHC-Analyse zeigte eine leichte zytoplasmatische Expression in den

BT549-Zellen und eine sehr schwache in den MDA-MB-231- bzw. MCF7-Zellen. Caprin-1 wird also in den hier verwendeten Brustkrebszelllinien sehr schwach exprimiert, aber auch im Zusammenhang mit Proliferation und Migration beschrieben, die vom uPAR-System mitreguliert werden, was ein Hinweis auf die Interaktion des Proteins innerhalb dieses Systems sein könnte. Die massenspektrometrische ICPL-Analyse ergab, dass infolge der uPAR-RNAi Caprin-1 in den MDA-MB-231-Zellen leicht induziert war, was ebenfalls als ein Hinweis auf eine Regulierung gewertet werden kann.

4.4 Relevanz der Erkenntnisse dieser Doktorarbeit für eine zielgerichtete Therapie von TNBC

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es die Relevanz von uPAR mit uPA und mit IGF-1R als potentieller therapeutischer Ansatz für den Triple-negativen Brustkrebs zu evaluieren. Die *in vitro*-Analysen zeigten, dass eine Reduzierung von uPAR und uPA auch noch nach acht Wochen einen inhibierenden Effekt auf Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen hatte. Außerdem ergaben die Analysen, dass eine gemeinsame Herunterregulierung von uPAR mit uPA bzw. IGF-1R im Vergleich zu den Einzel-RNAi-Ansätzen in den TNBC-Zelllinien, meist eine additiv reduzierte Migration und Invasion zur Folge hatte. Die Effekte waren in der MDA-MB-231- stärker als in der BT549-Zelllinie. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen zum einen, dass uPAR, uPA und IGF-1R - vor allem in Kombination - relevante Zielmoleküle für eine verbesserte Therapie des TNBC sein könnten, zum anderen aber auch, dass die Heterogenität der Tumore, die auch für TNBC-Tumorgewebe charakteristisch ist, zu einem unterschiedlichen Therapieansprechen der Patientinnen führen könnte.

Das übergeordnete Forschungsprojekt an TNBC-Tumoren, das in Anlehnung an die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ergab, dass explizit die Komplexe von uPAR mit IGF-1R, aber nicht die einzelnen Rezeptorexpressionen, mit dem histologischen Grad der Tumoren und der Expression von uPA und PAI-1 korrelierte. Auch zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Expression von IGF-1R mit der uPAR-, Cathepsin B- und Plasminogen-Expression, die Komponenten des uPAR-Systems sind. Die statistische Korrelation der Komplexe aus uPAR und uPA, aber nicht die jeweilige Expression der zwei Interaktionspartner, ergab einen invers signifikanten Zusammenhang mit

der Tumorgröße. Dies sollte in weiteren Studien eingehender analysiert werden, um die stärkere tumorigene Relevanz der Interaktion als prognostischen Biomarker weiter zu untersuchen. Dies wäre vor allem im Hinblick auf eine kombinierte Therapie, die sowohl die von uPAR als auch die von IGF-1R induzierten Signalwege als Ziel hätte, von immenser Bedeutung. Auch wäre denkbar, dass durch solch eine kombinierte Therapie einer eventuellen Resistenzbildung vorgebeugt würde, wie sie zum Teil bei der Inhibierung von Rezeptortyrosinkinasen beobachtet werden kann. Zum anderen könnte eine kombinierte Therapie den Einsatz von geringeren Dosierungen der Einzelmedikamente erlauben und somit die Nebenwirkungen einschränken. Außerdem wäre eine auf den einzelnen Patienten abgestimmte Therapie denkbar, abhängig von der Expressionsintensität des jeweiligen Zielproteins.

Darüber hinaus wurde im Zuge dieser Doktorarbeit das uPAR-System weiter charakterisiert und neue Interaktionspartner von uPAR nämlich Cyr61, YB-1 und Caprin-1 identifiziert. Proteinexpressionsanalysen an TNBC-Proben ergaben, dass Cyr61 in diesen nachweisbar war und dessen Expression signifikant mit der von Komponenten des uPAR Systems und mit IGF-1R korrelierte. Außerdem zeigte sich ein höchst signifikanter Zusammenhang der Expression von Cyr61 mit dem histologischen Grad der Tumore. Dies untermauert die Relevanz von Cyr61 als möglichem prognostischen Marker und auch als potentiell Zielmolekül für eine gerichtete Therapie.

Literaturverzeichnis

- Alberini, C. M. and D. Y. Chen (2012). Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. Trends Neurosci **35**: 274-283.
- Allred, D. C. (2010). Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. J Natl Cancer Inst Monogr **2010**: 134-138.
- American Cancer Society (2013). Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. American Cancer Society, Atlanta
- American Cancer Society (2015). Global Cancer Facts & Figures. 3rd Edition. American Cancer Society, Atlanta
- Andersson, M., J. Sjostrand, A. Petersen, A. K. Honarvar and J. O. Karlsson (2000). Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci **41**: 2623-2632.
- Anfinsen C.B. and E. Haber (1961). Studies on the Reduction and Re-formation of Protein Disulfide Bonds. J Biol Chem **236**: 1361-1363.
- Astanehe, A., M. R. Finkbeiner, P. Hojabrpour, K. To, A. Fotovati, A. Shadeo, A. L. Stratford, W. L. Lam, I. M. Berquin, V. Duronio and S. E. Dunn (2009). The transcriptional induction of PIK3CA in tumor cells is dependent on the oncoprotein Y-box binding protein-1. Oncogene **28**: 2406-2418.
- Atchley, D. P., C. T. Albarracin, A. Lopez, V. Valero, C. I. Amos, A. M. Gonzalez-Angulo, G. N. Hortobagyi and B. K. Arun (2008). Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. J Clin Oncol **26**: 4282-4288.
- Aubele, M., M. Spears, N. Ludyga, H. Braselmann, A. Feuchtinger, K. J. Taylor, K. Lindner, G. Auer, K. Stering, H. Hofler, M. Schmitt and J. M. Bartlett (2010). In situ quantification of HER2-protein tyrosine kinase 6 (PTK6) protein-protein complexes in paraffin sections from breast cancer tissues. Br J Cancer **103**: 663-667.
- Azimzadeh, O., H. Scherthan, H. Sarioglu, Z. Barjaktarovic, M. Conrad, A. Vogt, J. Calzada-Wack, F. Neff, M. Aubele, C. Buske, M. J. Atkinson and S. Tapio (2011). Rapid proteomic remodeling of cardiac tissue caused by total body ionizing radiation. Proteomics **11**: 3299-3311.
- Azimzadeh, O., W. Sievert, H. Sarioglu, J. Merl-Pham, R. Yentrapalli, M. V. Bakshi, D. Janik, M. Ueffing, M. J. Atkinson, G. Multhoff and S. Tapio (2015). Integrative proteomics and targeted transcriptomics analyses in cardiac endothelial cells unravel mechanisms of long-term radiation-induced vascular dysfunction. J Proteome Res **14**: 1203-1219.
- Azimzadeh, O., W. Sievert, H. Sarioglu, R. Yentrapalli, Z. Barjaktarovic, A. Sriharshan, M. Ueffing, D. Janik, M. Aichler, M. J. Atkinson, G. Multhoff and S. Tapio (2013). PPAR alpha: a novel radiation target in locally exposed Mus musculus heart revealed by quantitative proteomics. J Proteome Res **12**: 2700-2714.
- Bachmann, F. and I. E. Kruithof (1984). Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects. Semin Thromb Hemost **10**: 6-17.

Balzer J., H.-G. Meerpohl, J. Bahnsen (2000). Praxis der gynäkologischen Onkologie - Konzepte für das differenzierte Vorgehen in Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Baselga, J., P. Gomez, R. Greil, S. Braga, M. A. Climent, A. M. Wardley, B. Kaufman, S. M. Stemmer, A. Pego, A. Chan, J. C. Goeminne, M. P. Graas, M. J. Kennedy, E. M. Ciruelos Gil, A. Schneeweiss, A. Zubel, J. Groos, H. Melezinkova and A. Awada (2013). Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. J Clin Oncol **31**: 2586-2592.

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

Bauer, T. W., F. Fan, W. Liu, M. Johnson, N. U. Parikh, G. C. Parry, J. Callahan, A. P. Mazar, G. E. Gallick and L. M. Ellis (2005). Insulinlike growth factor-I-mediated migration and invasion of human colon carcinoma cells requires activation of c-Met and urokinase plasminogen activator receptor. Ann Surg **241**: 748-756.

Behrendt, N., M. Ploug, L. Patthy, G. Houen, F. Blasi and K. Dano (1991). The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. J Biol Chem **266**: 7842-7847.

Behrendt, N., E. Ronne, M. Ploug, T. Petri, D. Lober, L. S. Nielsen, W. D. Schleuning, F. Blasi, E. Appella and K. Dano (1990). The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH2-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. J Biol Chem **265**: 6453-6460.

Berridge, M. V., P. M. Herst and A. S. Tan (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev **11**: 127-152.

Berry, D. A., K. A. Cronin, S. K. Plevritis, D. G. Fryback, L. Clarke, M. Zelen, J. S. Mandelblatt, A. Y. Yakovlev, J. D. Habbema, E. J. Feuer, I. Cancer and C. Surveillance Modeling Network (2005). Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. N Engl J Med **353**: 1784-1792.

Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. Nat Rev Mol Cell Biol **3**: 932-943.

Blows, F. M., K. E. Driver, M. K. Schmidt, A. Broeks, F. E. van Leeuwen, J. Wesseling, M. C. Cheang, K. Gelmon, T. O. Nielsen, C. Blomqvist, P. Heikkila, T. Heikkinen, H. Nevanlinna, L. A. Akslen, L. R. Begin, W. D. Foulkes, F. J. Couch, X. Wang, V. Cafourek, J. E. Olson, L. Baglietto, G. G. Giles, G. Severi, C. A. McLean, M. C. Southey, E. Rakha, A. R. Green, I. O. Ellis, M. E. Sherman, J. Lissowska, W. F. Anderson, A. Cox, S. S. Cross, M. W. Reed, E. Provenzano, S. J. Dawson, A. M. Dunning, M. Humphreys, D. F. Easton, M. Garcia-Closas, C. Caldas, P. D. Pharoah and D. Huntsman (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. PLoS Med **7**: e1000279.

Borglum, A. D., A. Byskov, P. Ragno, A. L. Roldan, P. Tripputi, G. Cassani, K. Dano, F. Blasi, L. Bolund and T. A. Kruse (1992). Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. Am J Hum Genet **50**: 492-497.

- Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. J Cell Biol **130**: 503-506.
- Boulares, A. H., A. G. Yakovlev, V. Ivanova, B. A. Stoica, G. Wang, S. Iyer and M. Smulson (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. J Biol Chem **274**: 22932-22940.
- Boyden, S. (1962). The Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on Polymorphonuclear Leucocytes. The Journal of Experimental Medicine **115**: 453-466.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brahmkhatri, V. P., C. Prasanna and H. S. Atreya (2015). Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. Biomed Res Int **2015**: 538019.
- Brenton, J. D., L. A. Carey, A. A. Ahmed and C. Caldas (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? J Clin Oncol **23**: 7350-7360.
- Brunette, W.N. (1981). Western Blotting: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. Anal Biochem **112**: 195-203
- Buchta M., D. W. Höper and A. Sönnichsen (2004). Das zweite StEx, Basiswissen Klinische Medizin für Examen und Praxis. 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- Buko, A. M., E. J. Kentzer, A. Petros, G. Menon, E. R. Zuiderweg and V. K. Sarin (1991). Characterization of a posttranslational fucosylation in the growth factor domain of urinary plasminogen activator. Proc Natl Acad Sci U S A **88**: 3992-3996.
- Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 463-518.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol **25**: 169-193.
- Cameron, D., J. Brown, R. Dent, C. Jackisch, J. Mackey, X. Pivot, G. G. Steger, T. M. Suter, M. Toi, M. Parmar, R. Laefle, Y. H. Im, G. Romieu, V. Harvey, O. Lipatov, T. Pienkowski, P. Cottu, A. Chan, S. A. Im, P. S. Hall, L. Bubuteishvili-Pacaud, V. Henschel, R. J. Deurloo, C. Pallaud and R. Bell (2013). Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol **14**: 933-942.
- Campos, S. M. (2004). Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women. Oncologist **9**: 126-136.
- Carey, L. A., C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman, H. S. Earp and R. C. Millikan (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. JAMA **295**: 2492-2502.

- Carmeliet, P., L. Moons, R. Lijnen, M. Baes, V. Lemaître, P. Tipping, A. Drew, Y. Eeckhout, S. Shapiro, F. Lupu and D. Collen (1997). Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. Nat Genet **17**: 439-444.
- Chakraborty, A. K., C. Zerillo and M. P. DiGiovanna (2015). In vitro and in vivo studies of the combination of IGF1R inhibitor figitumumab (CP-751,871) with HER2 inhibitors trastuzumab and neratinib. Breast Cancer Res Treat **152**: 533-544.
- Chandra, A., S. Lan, J. Zhu, V. A. Siclari and L. Qin (2013). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling promotes proliferation and survival in osteoprogenitors by increasing early growth response 2 (EGR2) expression. J Biol Chem **288**: 20488-20498.
- Cheang, M. C., S. K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung, J. Snider, M. Watson, S. Davies, P. S. Bernard, J. S. Parker, C. M. Perou, M. J. Ellis and T. O. Nielsen (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst **101**: 736-750.
- Chlebowski, R. T., L. H. Kuller, R. L. Prentice, M. L. Stefanick, J. E. Manson, M. Gass, A. K. Aragaki, J. K. Ockene, D. S. Lane, G. E. Sarto, A. Rajkovic, R. Schenken, S. L. Hendrix, P. M. Ravdin, T. E. Rohan, S. Yasmeen, G. Anderson and W. H. I. Investigators (2009). Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. N Engl J Med **360**: 573-587.
- Chotkowski, H. L., A. T. Ciota, Y. Jia, F. Puig-Basagoiti, L. D. Kramer, P. Y. Shi and R. L. Glaser (2008). West Nile virus infection of *Drosophila melanogaster* induces a protective RNAi response. Virology **377**: 197-206.
- Ciambrone, G. J. and P. J. McKeown-Longo (1992). Vitronectin regulates the synthesis and localization of urokinase-type plasminogen activator in HT-1080 cells. J Biol Chem **267**: 13617-13622.
- Clark, O., T. E. Botrel, L. Paladini and M. B. Ferreira (2014). Targeted therapy in triple-negative metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Core Evid **9**: 1-11.
- Coelen, R. J., D. G. Jose and J. T. May (1983). The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of the primate retroviruses SSV 1/SSAV 1 and BaEV. Arch Virol **75**: 307-311.
- D'Alessio, S., L. Gerasi and F. Blasi (2008). uPAR-deficient mouse keratinocytes fail to produce EGFR-dependent laminin-5, affecting migration in vivo and in vitro. J Cell Sci **121**: 3922-3932.
- Darken, M. A. (1964). Puromycin Inhibition of Protein Synthesis. Pharmacol Rev **16**: 223-243.
- Dass, K., A. Ahmad, A. S. Azmi, S. H. Sarkar and F. H. Sarkar (2008). Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. Cancer Treat Rev **34**(2): 122-136.
- Davis, H. E., J. R. Morgan and M. L. Yarmush (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. Biophys Chem **97**: 159-172.
- DeGregorio M.W., V.J. Wiebe (1999). Tamoxifen and Breast Cancer. 2. Auflage, Yale University Press, New Haven

Du, F. L., B. L. Eckhardt, B. Lim, J. K. Litton, S. Moulder, F. Meric-Bernstam, A. M. Gonzalez-Angulo and N. T. Ueno (2015). Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget*, **6**: 12890-12908

Duffy, M. J., P. O'Grady, D. Devaney, L. O'Siorain, J. J. Fennelly and H. J. Lijnen (1988). Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* **62**: 531-533.

Dupont, J. and D. LeRoith (2001). Insulin and Insulin-Like Growth Factor I Receptors: Similarities and Differences in Signal Transduction. *Hormone Research in Paediatrics* **55**: 22-26.

Duriseti, S., D. H. Goetz, D. R. Hostetter, A. M. LeBeau, Y. Wei and C. S. Craik (2010). Antagonistic anti-urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) antibodies significantly inhibit uPAR-mediated cellular signaling and migration. *J Biol Chem* **285**: 26878-26888.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* **351**: 1451-1467.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., S. Darby, P. McGale, C. Correa, C. Taylor, R. Arriagada, M. Clarke, D. Cutter, C. Davies, M. Ewertz, J. Godwin, R. Gray, L. Pierce, T. Whelan, Y. Wang and R. Peto (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**: 1707-1716.

Eden, G., M. Archinti, F. Furlan, R. Murphy and B. Degryse (2011). The urokinase receptor interactome. *Curr Pharm Des* **17**: 1874-1889.

Edge S.B., D.R. Byrd, C.C. Compton, A.G. Fritz, F.G. Greene, A. Trotti, eds (2010). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed., Springer, New York City

Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.

Ellis, J. A. and J. P. Luzio (1995). Identification and characterization of a novel protein (p137) which transcytoses bidirectionally in Caco-2 cells. *J Biol Chem* **270**: 20717-20723.

Ellis, V., N. Behrendt and K. Dano (1991). Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* **266**: 12752-12758.

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

Falkenberg, N., N. Anastasov, I. Hofig, K. Bashkueva, K. Lindner, H. Hofler, M. Rosemann and M. Aubele (2015). Additive impact of HER2-/PTK6-RNAi on interactions with HER3 or IGF-1R leads to reduced breast cancer progression in vivo. *Mol Oncol* **9**: 282-294.

Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.

- Ferlay J., I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 25/July/2015.
- Fire, A., D. Albertson, S. W. Harrison and D. G. Moerman (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. Development **113**: 503-514.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature **391**: 806-811.
- Foekens, J. A., H. A. Peters, M. P. Look, H. Portengen, M. Schmitt, M. D. Kramer, N. Brunner, F. Janicke, M. E. Meijer-van Gelder, S. C. Henzen-Logmans, W. L. van Putten and J. G. Klijn (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. Cancer Res **60**: 636-643.
- Foulkes, W. D., I. E. Smith and J. S. Reis-Filho (2010). Triple-negative breast cancer. N Engl J Med **363**: 1938-1948.
- Francischetti, I. M., M. Kotsyfakis, J. F. Andersen and J. Lukszo (2010). Cyr61/CCN1 displays high-affinity binding to the somatomedin B(1-44) domain of vitronectin. PLoS One **5**: e9356.
- Fredriksson, S., M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gustafsdottir, A. Ostman and U. Landegren (2002). Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. Nat Biotechnol **20**: 473-477.
- Galicchio, M. A., M. Kneen, C. Hall, A. M. Scott and L. A. Bach (2001). Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-6 inhibits rhabdomyosarcoma growth in vivo. Int J Cancer **94**: 645-651.
- Ge, J., Z. Chen, J. Huang, W. Yuan, Z. Den and Z. Chen (2015). Silencing insulin-like growth factor-1 receptor expression inhibits gastric cancer cell proliferation and invasion. Mol Med Rep **11**: 633-638.
- Geback, T., M. M. Schulz, P. Koumoutsakos and M. Detmar (2009). TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. Biotechniques **46**: 265-274.
- Gessner, C., C. Woischwill, A. Schumacher, U. Liebers, H. Kuhn, P. Stiehl, K. Jurchott, H. D. Royer, C. Witt and G. Wolff (2004). Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer. Eur Respir J **23**: 14-19.
- Geyer, C. E., J. Forster, D. Lindquist, S. Chan, C. G. Romieu, T. Pienkowski, A. Jagiello-Gruszfeld, J. Crown, A. Chan, B. Kaufman, D. Skarlos, M. Campone, N. Davidson, M. Berger, C. Oliva, S. D. Rubin, S. Stein and D. Cameron (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med **355**: 2733-2743.
- Ginsburg, D., R. Zeheb, A. Y. Yang, U. M. Rafferty, P. A. Andreasen, L. Nielsen, K. Dano, R. V. Lebo and T. D. Gelehrter (1986). cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. J Clin Invest **78**: 1673-1680.

- Gondi, C. S., N. Kandhukuri, D. H. Dinh, M. Gujrati and J. S. Rao (2007). Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase-mediated apoptosis and inhibits the PI3K/AKT pathway. Int J Oncol **31**: 19-27.
- Gonzalez-Angulo, A. M., K. M. Timms, S. Liu, H. Chen, J. K. Litton, J. Potter, J. S. Lanchbury, K. Stemke-Hale, B. T. Hennessy, B. K. Arun, G. N. Hortobagyi, K. A. Do, G. B. Mills and F. Meric-Bernstam (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. Clin Cancer Res **17**: 1082-1089.
- Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem **177**: 751-766.
- Greenup, R., A. Buchanan, W. Lorizio, K. Rhoads, S. Chan, T. Leedom, R. King, J. McLennan, B. Crawford, P. Kelly Marcom and E. Shelley Hwang (2013). Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. Ann Surg Oncol **20**: 3254-3258.
- Grill, B., G. M. Wilson, K. X. Zhang, B. Wang, R. Doyonnas, M. Quadroni and J. W. Schrader (2004). Activation/division of lymphocytes results in increased levels of cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1: prototype of a new family of proteins. J Immunol **172**: 2389-2400.
- Gstraunthaler G., T. Lindl (2013). Zell- und Gewebekultur. 7. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- Gurtu V., G. Yan and G. Zhang (1996). IRES Bicistronic Expression Vectors for Efficient Creation of Stable Mammalian Cell Lines. Biochem Biophys Res Commun **229**: 295-298
- LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview group, J. Cuzick, L. Ambroisine, N. Davidson, R. Jakesz, M. Kaufmann, M. Regan and R. Sainsbury (2007). Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. Lancet **369**: 1711-1723.
- Hall, J. M., M. K. Lee, B. Newman, J. E. Morrow, L. A. Anderson, B. Huey and M. C. King (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science **250**: 1684-1689.
- Hammond, M. E., D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerty, S. Badve, P. L. Fitzgibbons, G. Francis, N. S. Goldstein, M. Hayes, D. G. Hicks, S. Lester, R. Love, P. B. Mangu, L. McShane, K. Miller, C. K. Osborne, S. Paik, J. Perlmutter, A. Rhodes, H. Sasano, J. N. Schwartz, F. C. Sweep, S. Taube, E. E. Torlakovic, P. Valenstein, G. Viale, D. Visscher, T. Wheeler, R. B. Williams, J. L. Wittliff and A. C. Wolff (2010). American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Clin Oncol **28**: 2784-2795.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. Cell **100**: 57-70.
- Hannon, G. J. and J. J. Rossi (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. Nature **431**: 371-378.

- Harris, L., H. Fritsche, R. Mennel, L. Norton, P. Ravdin, S. Taube, M. R. Somerfield, D. F. Hayes, R. C. Bast, Jr. and O. American Society of Clinical (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol **25**: 5287-5312.
- Harvey, S. R., T. C. Hurd, G. Markus, M. I. Martinick, R. M. Penetrante, D. Tan, P. Venkataraman, N. DeSouza, S. N. Sait, D. L. Driscoll and J. F. Gibbs (2003). Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer. Clin Cancer Res **9**: 4935-4943.
- Hauck, S. M., J. Dietter, R. L. Kramer, F. Hofmaier, J. K. Zipplies, B. Amann, A. Feuchtinger, C. A. Deeg and M. Ueffing (2010). Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. Mol Cell Proteomics **9**: 2292-2305.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet **5**: 522-531.
- Heberling, R. L., S. T. Barker, S. S. Kalter, G. C. Smith and R. J. Helmke (1977). Oncornavirus: isolation from a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) lung culture. Science **195**: 289-292.
- Heinrich P.C., M. Müller, L. Graeve (2014). Löffler/Petrides Biochemie and Pathobiochemie 9. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- Herschkowitz, J. I., K. Simin, V. J. Weigman, I. Mikaelian, J. Usary, Z. Hu, K. E. Rasmussen, L. P. Jones, S. Assefnia, S. Chandrasekharan, M. G. Backlund, Y. Yin, A. I. Khramtsov, R. Bastein, J. Quackenbush, R. I. Glazer, P. H. Brown, J. E. Green, L. Kopelovich, P. A. Furth, J. P. Palazzo, O. I. Olopade, P. S. Bernard, G. A. Churchill, T. Van Dyke and C. M. Perou (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. Genome Biol **8**: R76.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A **88**: 7276-7280.
- Houck, K. A., D. W. Leung, A. M. Rowland, J. Winer and N. Ferrara (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. J Biol Chem **267**(36): 26031-26037.
- Huai, Q., A. P. Mazar, A. Kuo, G. C. Parry, D. E. Shaw, J. Callahan, Y. Li, C. Yuan, C. Bian, L. Chen, B. Furie, B. C. Furie, D. B. Cines and M. Huang (2006). Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. Science **311**: 656-659.
- Huai, Q., A. Zhou, L. Lin, A. P. Mazar, G. C. Parry, J. Callahan, D. E. Shaw, B. Furie, B. C. Furie and M. Huang (2008). Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes. Nat Struct Mol Biol **15**: 422-423.
- Hudziak, R. M., G. D. Lewis, M. Winget, B. M. Fendly, H. M. Shepard and A. Ullrich (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. Mol Cell Biol **9**: 1165-1172.

- Jagadeeswaran, R., H. Surawska, S. Krishnaswamy, V. Janamanchi, A. C. Mackinnon, T. Y. Seiwert, S. Loganathan, R. Kanteti, T. Reichman, V. Nallasura, S. Schwartz, L. Faoro, Y. C. Wang, L. Girard, M. S. Tretiakova, S. Ahmed, O. Zumba, L. Soulii, V. P. Bindokas, L. L. Szeto, G. J. Gordon, R. Bueno, D. Sugarbaker, M. W. Lingen, M. Sattler, T. Krausz, W. Vigneswaran, V. Natarajan, J. Minna, E. E. Vokes, M. K. Ferguson, A. N. Husain and R. Salgia (2008). Paxillin is a target for somatic mutations in lung cancer: implications for cell growth and invasion. Cancer Res **68**: 132-142.
- Janz, M., N. Harbeck, P. Dettmar, U. Berger, A. Schmidt, K. Jurchott, M. Schmitt and H. D. Royer (2002). Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. Int J Cancer **97**: 278-282.
- Jordan, V. C. and S. Koerner (1975). Tamoxifen (ICI 46,474) and the human carcinoma 8S oestrogen receptor. Eur J Cancer **11**: 205-206.
- Khan, P., D. Idrees, M. A. Moxley, J. A. Corbett, F. Ahmad, G. von Figura, W. S. Sly, A. Waheed and M. I. Hassan (2014). Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. Appl Biochem Biotechnol **173**: 333-355.
- Kireeva, M. L., S. C. Lam and L. F. Lau (1998). Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin alphavbeta3. J Biol Chem **273**: 3090-3096.
- Kiyan, J., R. Kiyan, H. Haller and I. Dumler (2005). Urokinase-induced signaling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR-beta. EMBO J **24**: 1787-1797.
- Kolben, T., D. Augustin, R. Armbrust, T.M. Kolben, T. Degenhardt, M. Burgmann, C. Goess, N. Ditsch, R. Kates, N. Harbeck and R. Wuerstlein (2016). Impact of guideline-based use of uPA/PAI-1 on patient outcome in intermediate-risk early breast cancer. Breast Cancer Res Treat **155**: 109-115
- Koley, D. and A. J. Bard (2010). Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). Proc Natl Acad Sci U S A **107**: 16783-16787.
- Kotipatruni, R. R., A. K. Nalla, S. Asuthkar, C. S. Gondi, D. H. Dinh and J. S. Rao (2012). Apoptosis induced by knockdown of uPAR and MMP-9 is mediated by inactivation of EGFR/STAT3 signaling in medulloblastoma. PLoS One **7**: e44798.
- Kreike, B., M. van Kouwenhove, H. Horlings, B. Weigelt, H. Peterse, H. Bartelink and M. J. van de Vijver (2007). Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. Breast Cancer Res **9**: R65.
- Kunigal, S., S. S. Lakka, C. S. Gondi, N. Estes and J. S. Rao (2007). RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloprotease-9 in human breast cancer cells results in decreased tumor invasion, angiogenesis and growth. Int J Cancer **121**: 2307-2316.
- Kuzembayeva M., K. Dilley, L. Sardo, W.-S. Hu (2014). Life of psi: How full-length HIV1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. Virology **454-455**: 362-370
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

- LaRusch, G. A., F. Mahdi, Z. Shariat-Madar, G. Adams, R. G. Sitrin, W. M. Zhang, K. R. McCrae and A. H. Schmaier (2010). Factor XII stimulates ERK1/2 and Akt through uPAR, integrins, and the EGFR to initiate angiogenesis. Blood **115**: 5111-5120.
- Lasham, A., S. Moloney, T. Hale, C. Homer, Y. F. Zhang, J. G. Murison, A. W. Braithwaite and J. Watson (2003). The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. J Biol Chem **278**: 35516-35523.
- LeBeau, A. M., S. Duriseti, S. T. Murphy, F. Pepin, B. Hann, J. W. Gray, H. F. VanBrocklin and C. S. Craik (2013). Targeting uPAR with antagonistic recombinant human antibodies in aggressive breast cancer. Cancer Res **73**: 2070-2081.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell **75**: 843-854.
- Lehmann, B. D., J. A. Bauer, X. Chen, M. E. Sanders, A. B. Chakravarthy, Y. Shyr and J. A. Pietersen (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest **121**: 2750-2767.
- Lewis, P., M. Hensel and M. Emerman (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. EMBO J **11**: 3053-3058.
- Li, C., S. Cao, Z. Liu, X. Ye, L. Chen and S. Meng (2010). RNAi-mediated downregulation of uPAR synergizes with targeting of HER2 through the ERK pathway in breast cancer cells. Int J Cancer **127**: 1507-1516.
- Liang, C. C., A. Y. Park and J. L. Guan (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc **2**: 329-333.
- Lindbo, J. A. and W. G. Dougherty (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. Virology **189**: 725-733.
- Liu, D., J. Aguirre Ghiso, Y. Estrada and L. Ossowski (2002). EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. Cancer Cell **1**: 445-457.
- Liu, Y., D. J. Cao, I. M. Sainz, Y. L. Guo and R. W. Colman (2008). The inhibitory effect of HKa in endothelial cell tube formation is mediated by disrupting the uPA-uPAR complex and inhibiting its signaling and internalization. Am J Physiol Cell Physiol **295**: C257-267.
- Liu, Y. P., S. V. Dambaeva, O. V. Dovzhenko, M. A. Garthwaite and T. G. Golos (2005). Stable plasmid-based siRNA silencing of gene expression in human embryonic stem cells. Stem Cells Dev **14**: 487-492.
- Livak K.J. and T.D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods **25**: 402-408

- Ludyga, N., B. Grunwald, O. Azimzadeh, S. Englert, H. Hofler, S. Tapio and M. Aubele (2012). Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. Virchows Arch **460**: 131-140.
- Luther, T., V. Magdolen, S. Albrecht, M. Kasper, C. Riemer, H. Kessler, H. Graeff, M. Muller and M. Schmitt (1997). Epitope-mapped monoclonal antibodies as tools for functional and morphological analyses of the human urokinase receptor in tumor tissue. Am J Pathol **150**: 1231-1244.
- Magnussen, S., O. G. Rikardsen, E. Hadler-Olsen, L. Uhlin-Hansen, S. E. Steigen and G. Svineng (2014). Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are potential predictive biomarkers in early stage oral squamous cell carcinomas (OSCC). PLoS One **9**: e101895.
- Manjunath, N., H. Wu, S. Subramanya and P. Shankar (2009). Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. Adv Drug Deliv Rev **61**: 732-745
- Mauri, D., N. Pavlidis and J. P. Ioannidis (2005). Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. J Natl Cancer Inst **97**: 188-194.
- McAnuff, M. A., G. R. Rettig and K. G. Rice (2007). Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo. J Pharm Sci **96**: 2922-2930.
- Menendez, J. A., I. Mehmi, D. W. Griggs and R. Lupu (2003). The angiogenic factor CYR61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives. Endocr Relat Cancer **10**: 141-152.
- Mengele, K., R. Napieralski, V. Magdolen, U. Reuning, A. Gkazepis, F. Sweep, N. Brunner, J. Foekens, N. Harbeck and M. Schmitt (2010). Characteristics of the level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. Expert Rev Mol Diagn **10**: 947-962.
- Merl, J., M. Ueffing, S. M. Hauck and C. von Toerne (2012). Direct comparison of MS-based label-free and SILAC quantitative proteome profiling strategies in primary retinal Muller cells. Proteomics **12**: 1902-1911.
- Mohamed, M. M. and B. F. Sloane (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. Nat Rev Cancer **6**: 764-775.
- Molatore, S., E. Kiermaier, C. B. Jung, M. Lee, E. Pulz, H. Hofler, M. J. Atkinson and N. S. Pellegata (2010). Characterization of a naturally-occurring p27 mutation predisposing to multiple endocrine tumors. Mol Cancer **9**: 116.
- Moller, L. B., J. Pollanen, E. Ronne, N. Pedersen and F. Blasi (1993). N-linked glycosylation of the ligand-binding domain of the human urokinase receptor contributes to the affinity for its ligand. J Biol Chem **268**: 11152-11159.
- Morgan, D. O., J. C. Edman, D. N. Standring, V. A. Fried, M. C. Smith, R. A. Roth and W. J. Rutter (1987). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. Nature **329**: 301-307.

Morris, G. J., S. Naidu, A. K. Topham, F. Guiles, Y. Xu, P. McCue, G. F. Schwartz, P. K. Park, A. L. Rosenberg, K. Brill and E. P. Mitchell (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. Cancer **110**: 876-884.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods **65**: 55-63.

Mulisch M. (2014). Verfahren der Immunlokalisation. Springer Spektrum, Wiesbaden

Neve, R. M., K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J. P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W. L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar and J. W. Gray (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell **10**: 515-527.

Nguyen, N., A. Kuliopulos, R. A. Graham and L. Covic (2006). Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. Cancer Res **66**: 2658-2665.

Nielsen, T. O., H. N. Andrews, M. Cheang, J. E. Kucab, F. D. Hsu, J. Ragaz, C. B. Gilks, N. Makretsov, C. D. Bajdik, C. Brookes, L. M. Neckers, V. Evdokimova, D. G. Huntsman and S. E. Dunn (2004). Expression of the insulin-like growth factor I receptor and urokinase plasminogen activator in breast cancer is associated with poor survival: potential for intervention with 17-allylamino geldanamycin. Cancer Res **64**: 286-291.

Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature **308**: 693-698.

Noh, H., S. Hong and S. Huang (2013). Role of urokinase receptor in tumor progression and development. Theranostics **3**: 487-495.

Nykjaer, A., C. M. Petersen, B. Moller, P. H. Jensen, S. K. Moestrup, T. L. Holtet, M. Etzerodt, H. C. Thogersen, M. Munch, P. A. Andreasen and et al. (1992). Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. J Biol Chem **267**: 14543-14546.

Ohashi, K., T. Yokoyama, Y. Nakajima, and M. Kosovsky,(2013). Methods for Implantation of Corning® Matrigel® Matrix into Mice and Tissue Fixation. Technical Bulletin, Corning Incorporated

OLink Biosciences (2012). Duolink in situ. User Manual Fluorescence.

O'Shaughnessy, J., C. Osborne, J. E. Pippen, M. Yoffe, D. Patt, C. Rocha, I. C. Koo, B. M. Sherman and C. Bradley (2011). Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. N Engl J Med **364**: 205-214.

Organ, S. L. and M. S. Tsao (2011). An overview of the c-MET signaling pathway. Ther Adv Med Oncol **3**: S7-S19.

- Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon and D. S. Conklin (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev **16**: 948-958.
- Papaioannou, M. D., M. Lagarrigue, C. E. Vejnar, A. D. Rolland, F. Kuhne, F. Aubry, O. Schaad, A. Fort, P. Descombes, M. Neerman-Arbez, F. Guillou, E. M. Zdobnov, C. Pineau and S. Nef (2011). Loss of Dicer in Sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice. Mol Cell Proteomics **10**: M900587MCP900200.
- Parkin, D. M. (2009). Is the recent fall in incidence of post-menopausal breast cancer in UK related to changes in use of hormone replacement therapy? Eur J Cancer **45**: 1649-1653.
- Pendurthi, U. R., T. T. Tran, M. Post and L. V. Rao (2005). Proteolysis of CCN1 by plasmin: functional implications. Cancer Res **65**: 9705-9711.
- Perou, C. M. (2010). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. Oncologist **15**: 39-48.
- Perou, C. M. and A. L. Borresen-Dale (2011). Systems biology and genomics of breast cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol **3**.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature **406**: 747-752.
- Ploug, M., N. Behrendt, D. Lober and K. Dano (1991). Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator. Semin Thromb Hemost **17**: 183-193.
- Ploug, M. and V. Ellis (1994). Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. FEBS Lett **349**: 163-168.
- Ploug, M., H. Rahbek-Nielsen, P. F. Nielsen, P. Roepstorff and K. Dano (1998). Glycosylation profile of a recombinant urokinase-type plasminogen activator receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem **273**: 13933-13943.
- Ploug, M., E. Ronne, N. Behrendt, A. L. Jensen, F. Blasi and K. Dano (1991). Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. J Biol Chem **266**: 1926-1933.
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. Nat Rev Cancer **12**: 159-169.
- Pukac, L.A., J.E. Carter, K.S. Morrison and M.J. Karnovsky (1997). Enhancement of diaminobenzidine colorimetric signal in immunoblotting. Biotechniques **23**: 385-388.
- Rabbani, S. A., B. Ateeq, A. Arakelian, M. L. Valentino, D. E. Shaw, L. M. Dauffenbach, C. A. Kerfoot and A. P. Mazar (2010). An anti-urokinase plasminogen activator receptor antibody (ATN-658) blocks prostate cancer invasion, migration, growth, and experimental skeletal metastasis in vitro and in vivo. Neoplasia **12**: 778-788.

- Rao, D. D., N. Senzer, M. A. Cleary and J. Nemunaitis (2009). Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development. Cancer Gene Ther **16**: 807-809.
- Ravdin, P. M., K. A. Cronin, N. Howlander, C. D. Berg, R. T. Chlebowski, E. J. Feuer, B. K. Edwards and D. A. Berry (2007). The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med **356**: 1670-1674.
- Rehm H., T. Letzel (2010). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Riccio, A., G. Grimaldi, P. Verde, G. Sebastio, S. Boast and F. Blasi (1985). The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter. Nucleic Acids Res **13**: 2759-2771.
- Roldan, A. L., M. V. Cubellis, M. T. Masucci, N. Behrendt, L. R. Lund, K. Dano, E. Appella and F. Blasi (1990). Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. EMBO J **9**: 467-474.
- Romero-Calvo, I., B. Ocon, P. Martinez-Moya, M. D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin and F. S. de Medina (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. Anal Biochem **401**: 318-320.
- Rosenzweig, S. A. (2012). Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. Biochem Pharmacol **83**: 1041-1048.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, R. L. Prentice, A. Z. LaCroix, C. Kooperberg, M. L. Stefanick, R. D. Jackson, S. A. Beresford, B. V. Howard, K. C. Johnson, J. M. Kotchen, J. Ockene and I. Writing Group for the Women's Health Initiative (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA **288**: 321-333.
- Rottem, S. and M. F. Barile (1993). Beware of mycoplasmas. Trends Biotechnol **11**: 143-151.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev **68**: 320-344.
- Rubinson, D. A., C. P. Dillon, A. V. Kwiatkowski, C. Sievers, L. Yang, J. Kopinja, D. L. Rooney, M. Zhang, M. M. Ihrig, M. T. McManus, F. B. Gertler, M. L. Scott and L. Van Parijs (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. Nat Genet **33**: 401-406.
- Rusnak, D. W., K. Lackey, K. Affleck, E. R. Wood, K. J. Alligood, N. Rhodes, B. R. Keith, D. M. Murray, W. B. Knight, R. J. Mullin and T. M. Gilmer (2001). The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther **1**: 85-94.
- Sabatier, R., P. Finetti, A. Guille, J. Adelaide, M. Chaffanet, P. Viens, D. Birnbaum and F. Bertucci (2014). Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. Mol Cancer **13**: 228.

- Sabile, A. A., M. J. Arlt, R. Muff, K. Husmann, D. Hess, J. Bertz, B. Langsam, C. Aemisegger, U. Ziegler, W. Born and B. Fuchs (2013). Caprin-1, a novel Cyr61-interacting protein, promotes osteosarcoma tumor growth and lung metastasis in mice. Biochim Biophys Acta **1832**: 1173-1182.
- Saglam, O., F. Dai, S. Husain, Y. Zhan, G. Toruner and G. K. Haines, 3rd (2014). Matricellular protein CCN1 (CYR61) expression is associated with high-grade ductal carcinoma in situ. Hum Pathol **45**: 1269-1275.
- Sanchez-Bailon, M. P., A. Calcabrini, V. Mayoral-Varo, A. Molinari, K. U. Wagner, J. P. Losada, S. Ciordia, J. P. Albar and J. Martin-Perez (2015). Cyr61 as mediator of Src signaling in triple negative breast cancer cells. Oncotarget **6**: 13520-13538.
- Sarkissyan, S., M. Sarkissyan, Y. Wu, J. Cardenas, H. P. Koeffler and J. V. Vadgama (2014). IGF-1 regulates Cyr61 induced breast cancer cell proliferation and invasion. PLoS One **9**: e103534.
- Satagopan, J. M., K. Offit, W. Foulkes, M. E. Robson, S. Wacholder, C. M. Eng, S. E. Karp and C. B. Begg (2001). The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**: 467-473.
- Schmitt, M., F. Janicke, N. Moniwa, N. Chucholowski, L. Pache and H. Graeff (1992). Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. Biol Chem Hoppe Seyler **373**: 611-622.
- Schmitz S. (2011). Der Experimentator: Zellkultur. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Schwartz, I., D. Seger and S. Shaltiel (1999). Vitronectin. Int J Biochem Cell Biol **31**: 539-544.
- Seradour, B., H. Allemand, A. Weill and P. Ricordeau (2009). Changes by age in breast cancer incidence, mammography screening and hormone therapy use in France from 2000 to 2006. Bull Cancer **96**: E1-6.
- Shapiro, S., E. A. Coleman, M. Broeders, M. Codd, H. de Koning, J. Fracheboud, S. Moss, E. Paci, S. Stachenko and R. Ballard-Barbash (1998). Breast cancer screening programmes in 22 countries: current policies, administration and guidelines. International Breast Cancer Screening Network (IBSN) and the European Network of Pilot Projects for Breast Cancer Screening. Int J Epidemiol **27**: 735-742.
- Shapiro, S. D. (1998). Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Opin Cell Biol **10**: 602-608.
- Shimizu, C., T. Hasegawa, Y. Tani, F. Takahashi, M. Takeuchi, T. Watanabe, M. Ando, N. Katsumata and Y. Fujiwara (2004). Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. Hum Pathol **35**: 1537-1542.
- Shiomi, H., Y. Eguchi, T. Tani, M. Kodama and T. Hattori (2000). Cellular distribution and clinical value of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-2 in esophageal squamous cell carcinoma. Am J Pathol **156**: 567-575.
- Sijen, T. and R. H. Plasterk (2003). Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. Nature **426**: 310-314.

- Simon, D. I., Y. Wei, L. Zhang, N. K. Rao, H. Xu, Z. Chen, Q. Liu, S. Rosenberg and H. A. Chapman (2000). Identification of a urokinase receptor-integrin interaction site. Promiscuous regulator of integrin function. J Biol Chem **275**: 10228-10234.
- Singh, P., J. M. Alex and F. Bast (2014). Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. Med Oncol **31**: 805.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga and L. Norton (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med **344**: 783-792.
- Smith, H. W. and C. J. Marshall (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. Nat Rev Mol Cell Biol **11**: 23-36.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem **150**: 76-85.
- Soderberg, O., K. J. Leuchowius, M. Gullberg, M. Jarvius, I. Weibrecht, L. G. Larsson and U. Landegren (2008). Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. Methods **45**: 227-232.
- Solomon, S., Y. Xu, B. Wang, M. D. David, P. Schubert, D. Kennedy and J. W. Schrader (2007). Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. Mol Cell Biol **27**: 2324-2342.
- Song, M. S., L. Salmena and P. P. Pandolfi (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. Nat Rev Mol Cell Biol **13**: 283-296.
- Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. E. Lonning and A. L. Borresen-Dale (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 10869-10874.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lonning, P. O. Brown, A. L. Borresen-Dale and D. Botstein (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 8418-8423.
- Sotiriou, C. and L. Pusztai (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. N Engl J Med **360**: 790-800.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Stewart, C. E. and I. Sayers (2009). Characterisation of urokinase plasminogen activator receptor variants in human airway and peripheral cells. BMC Mol Biol **10**: 75.

- Subramanian, R., C. S. Gondi, S. S. Lakka, A. Jutla and J. S. Rao (2006). siRNA-mediated simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells. Int J Oncol **28**: 831-839.
- Sui, G., C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester and Y. Shi (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 5515-5520.
- Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomita (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun **135**: 397-402.
- Tarui, T., N. Akakura, M. Majumdar, N. Andronicos, J. Takagi, A. P. Mazar, K. Bdeir, A. Kuo, S. V. Yarovoi, D. B. Cines and Y. Takada (2006). Direct interaction of the kringle domain of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and integrin alpha v beta 3 induces signal transduction and enhances plasminogen activation. Thromb Haemost **95**: 524-534.
- Thermo Scientific (2012). Thermo Scientific SMARTchoice Lentiviral shRNA, Technical Manual
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A **76**: 4350-4354.
- Turner, N., A. Tutt and A. Ashworth (2004). Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. Nat Rev Cancer **4**: 814-819.
- Ulisse, S., E. Baldini, S. Sorrenti and M. D'Armiento (2009). The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. Curr Cancer Drug Targets **9**: 32-71.
- Valabrega, G., F. Montemurro and M. Aglietta (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. Ann Oncol **18**: 977-984.
- van Mourik, J. A., D. A. Lawrence and D. J. Loskutoff (1984). Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. J Biol Chem **259**: 14914-14921.
- Vara, J. A., A. Portela, J. Ortin and A. Jimenez (1986). Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance. Nucleic Acids Res **14**: 4617-4624.
- Vassalli, J. D., D. Baccino and D. Belin (1985). A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. J Cell Biol **100**: 86-92.
- Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell **108**: 171-182.
- Wagener C., O. Müller (2010). Molekulare Onkologie – Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Wang, B., M. D. David and J. W. Schrader (2005). Absence of caprin-1 results in defects in cellular proliferation. J Immunol **175**: 4274-4282.

- Wang, X., X. B. Guo, X. C. Shen, H. Zhou, D. W. Wan, X. F. Xue, Y. Han, B. Yuan, J. Zhou, H. Zhao, Q. M. Zhi and Y. T. Kuang (2015). Prognostic role of YB-1 expression in breast cancer: a meta-analysis. Int J Clin Exp Med **8**: 1780-1791.
- Wang, Y., J. Dang, L. K. Johnson, J. J. Selhamer and W. F. Doe (1995). Structure of the human urokinase receptor gene and its similarity to CD59 and the Ly-6 family. Eur J Biochem **227**: 116-122.
- Wang, Y. H., Z. X. Wang, Y. Qiu, J. Xiong, Y. X. Chen, D. S. Miao and W. De (2009). Lentivirus-mediated RNAi knockdown of insulin-like growth factor-1 receptor inhibits growth, reduces invasion, and enhances radiosensitivity in human osteosarcoma cells. Mol Cell Biochem **327**: 257-266.
- Weber K., M. Osborn (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem **244**: 4406-4412.
- Whitcomb, J. M. and S. H. Hughes (1992). Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. Annu Rev Cell Biol **8**: 275-306.
- Wilson, R. C. and J. A. Doudna (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. Annu Rev Biophys **42**: 217-239.
- Wisniewski, J. R., A. Zougman, N. Nagaraj and M. Mann (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods **6**: 359-362.
- Wolff, A. C., M. E. Hammond, J. N. Schwartz, K. L. Hagerty, D. C. Allred, R. J. Cote, M. Dowsett, P. L. Fitzgibbons, W. M. Hanna, A. Langer, L. M. McShane, S. Paik, M. D. Pegram, E. A. Perez, M. F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S. E. Taube, R. Tubbs, G. H. Vance, M. van de Vijver, T. M. Wheeler, D. F. Hayes and P. American Society of Clinical Oncology/College of American (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Arch Pathol Lab Med **131**: 18-43.
- Wu, J., W. Liu, A. Bemis, E. Wang, Y. Qiu, E. A. Morris, C. R. Flannery and Z. Yang (2007). Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum **56**: 3675-3684.
- Wu, X., J. K. Wakefield, H. Liu, H. Xiao, R. Kralovics, J. T. Prchal and J. C. Kappes (2000). Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. Mol Ther **2**: 47-55.
- Yang, G. P. and L. F. Lau (1991). Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. Cell Growth Differ **2**: 351-357.
- Yu, H., H. Lee, A. Herrmann, R. Buettner and R. Jove (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. Nat Rev Cancer **14**: 736-746.
- Zufferey, R., T. Dull, R. J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldini and D. Trono (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. J Virol **72**: 9873-9880.
- Zufferey, R. J.E. Donello, D. Trono and T.J. Hope (1999). Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors. J Virol **73**: 2886-2892.

Internetquellen:

NCBI NIH: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0015630/>, 01.04.2016

NCBI uPAR: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5329>, 01.04.2016

Firma Wilex Homepage: <http://www.wilex.de/portfolio/mesupron/phase-i-ii-mit-mesupron/>, 01.04.2016

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt

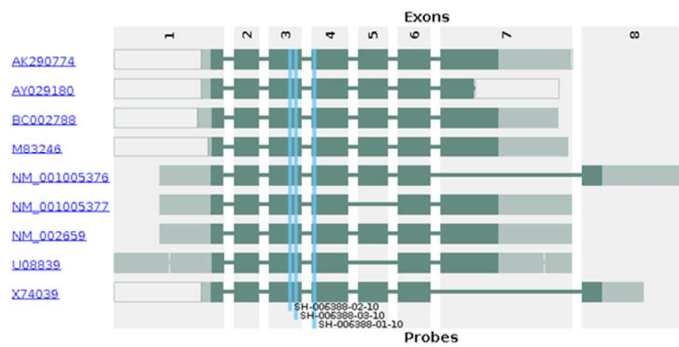
- Prof. Dr. Michaela Aubele, die mir die Möglichkeit gab, in ihrer Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit durchzuführen und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die sehr vielfältige Unterstützung dieser Arbeit und die Vitaminzufuhr!
- Dr. Natalie Falkenberg, die mir immer eine zuverlässige Unterstützung und eine beständig geduldige Ratgeberin war. Vielen Dank für die vielen konstruktiven Gespräche, Tipps, Rezepte, Kekse... einfach alles!
- Prof. Dr. Schnieke, die sich gerne bereit erklärte, die Betreuung dieser Doktorarbeit an der TU München zu übernehmen und in den HELENA Thesis Komitee Treffen eine wertvolle wissenschaftliche Ratgeberin war.
- Prof. Dr. Jochen Graw, der sowohl als zweiter Begutachter dieser Arbeit als auch als Vorsitzender im HELENA Thesis Komitee immer ein engagiert konstruktiver und sehr bereichernder Unterstützer dieser Arbeit war.
- Prof. Dr. Manfred Schmitt, der mit seiner herausragenden Fachkenntnis über das uPAR-System und als externer Betreuer im HELENA Thesis Komitee ein wertvoller Ratgeber und Begleiter war.
- Dr. Omid Azimzadeh, for his support in performing and analysing the ICPL-experiments and for being so patient in answering all of my questions.
- Dr. Stefanie Hauck und Dr. Markus Priller, für die zielführende Kooperation bzgl. der massenspektrometrischen Analysen in dieser Arbeit und für die Unterstützung bei der Auswertung der Daten.
- Prof. Dr. Axel Walch für die histologische Auswertung des TNBC-Kohorts und Dr. Annette Feuchtinger für die Unterstützung bzgl. der Definiens-Analyse der PLA.
- Herbert Braselmann, für die statistischen Analysen des TNBC-Kohorts.
- Katrin Lindner, für die Anfertigung der histologischen Schnitte und vor allem für ihr offenes Ohr wie auch für Rat und Aufmunterung in allen Lebenslagen. Es war eine Freude, mit Dir zu arbeiten!
- David Mörzl, für die Unterstützung im Labor und bei der Lösung sämtlicher IT-Probleme.
- Nina, Ines, Eva, Andrea, Anna und Sara, die in unzähligen Gesprächen und Mittagspausen eine unverzichtbare Stütze auf dem Weg zu dieser Thesis waren; Achim und Dirk, die die Dauer der Bus- und U-Bahn-Fahrten deutlich verkürzten.
- Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, deren Hilfe in allen Lebenslagen, Liebe und unerschütterlicher Glaube an mich diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Danke, dass ihr da seid!

Appendix

1) Bindestellen der siRNAs

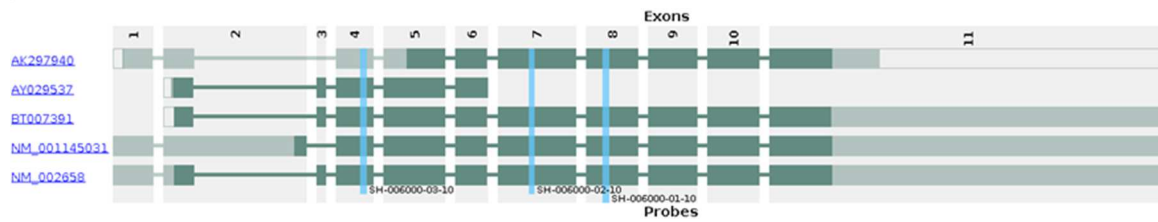
a) uPAR

Gene Symbol	Alternate Symbols	Chromosome	Strand	Start	Stop	Total Exons
PLAUR	CD87, U-PAR, UPAR, URKR, ENSG0000011422	19	-	44174699	44150247	8



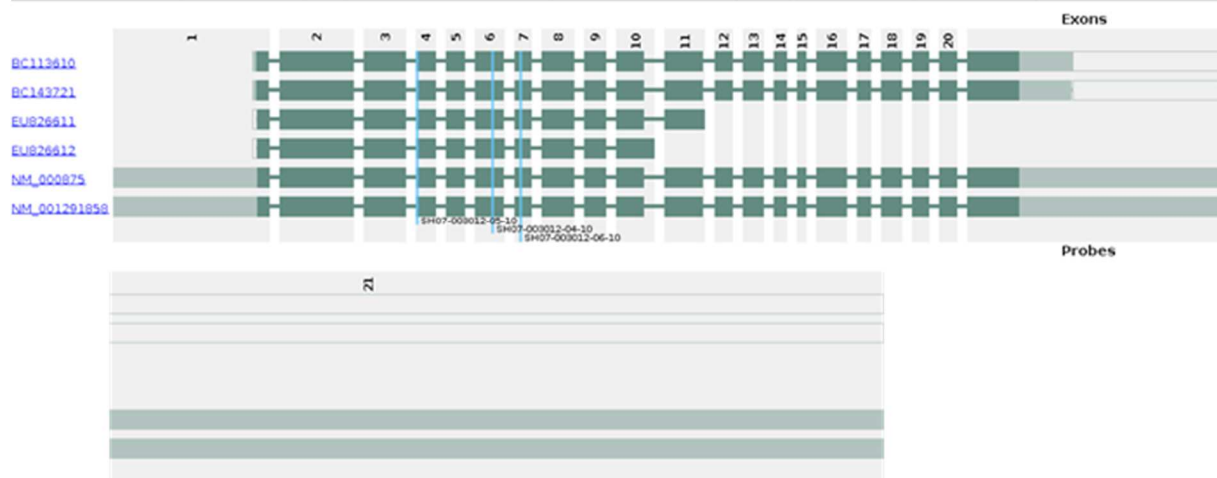
b) uPA

Gene Symbol	Alternate Symbols	Chromosome	Strand	Start	Stop	Total Exons
PLAU	ATF, BDPLT5, QPD, UPA, URK, u-PA, ENSG00000122861	10	+	75670862	75677259	11



c) IGF-1R

Gene Symbol	Alternate Symbols	Chromosome	Strand	Start	Stop	Total Exons
IGF1R	CD221, IGFR, IGFR, JTK13, ENSG00000140443	15	+	99191768	99507759	21



2) IHC Protokolle der Ventana-Färbemaschine

a) #58

Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT (Zusammenfassung)**Discovery XT Färbemodul****GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg**

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
58	2h RT 1.AK CC1	26.05.2015

- 1 Patienten-Material [Ausgewählt]
- 2 Paraffin [Ausgewählt]
- 3 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 4 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 5 Cell Conditioner 1 [Ausgewählt]
- 6 Mildes CC1 [Ausgewählt]
- 7 Standard CC1 [Ausgewählt]
- 8 Antikörper [Ausgewählt]
- 9 Antikörper-Titration [Ausgewählt]
- 10 Erweiterte Ak-Inkubation (Titration) [Ausgewählt]
- 11 Inkubieren für [2 Stunden] (Primär Antikörper)
- 12 Sekundäntikörper [Ausgewählt]
- 13 automatischer Auftrag Sekundäntikörper [Ausgewählt]
- 14 1 Tropfen [DETECTION 1] (Nachweis Nr.2), und für [32 Minuten] inkubieren.
- 15 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 16 Standard [Ausgewählt]
- 17 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 18 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 19 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 20 Objektträger Reinigung [Ausgewählt]

b) #70

Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT (Zusammenfassung)**Discovery XT Färbemodul****GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg**

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
70	12h CC1 ST	01.07.2015

- 1 Patienten-Material [Ausgewählt]
- 2 Paraffin [Ausgewählt]
- 3 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 4 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 5 Cell Conditioner 1 [Ausgewählt]
- 6 Mildes CC1 [Ausgewählt]
- 7 Standard CC1 [Ausgewählt]
- 8 Antikörper [Ausgewählt]
- 9 Antikörper-Titration [Ausgewählt]
- 10 Erweiterte Ak-Inkubation (Titration) [Ausgewählt]
- 11 Inkubieren für [12 Stunden] (Primär Antikörper)
- 12 Sekundäntikörper [Ausgewählt]
- 13 Sekundäntikörper Titration [Ausgewählt]
- 14 ***** Handauftrag (Sekundäntikörper), und für [32 Minuten] inkubieren *****
- 15 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 16 Standard [Ausgewählt]
- 17 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 18 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 19 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 20 Objektträger Reinigung [Ausgewählt]

c) #301

Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT (Zusammenfassung)

Discovery XT Färbemodul

GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
301	8 Min 37 Grad CC1 STD	11.06.2015

- 1 Patienten-Material [Ausgewählt]
- 2 Paraffin [Ausgewählt]
- 3 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 4 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 5 Cell Conditioner 1 [Ausgewählt]
- 6 Mildes CC1 [Ausgewählt]
- 7 Standard CC1 [Ausgewählt]
- 8 Antikörper [Ausgewählt]
- 9 Antikörper-Titration [Ausgewählt]
- 10 Standard Ak-Inkubation (Titration) [Ausgewählt]
- 11 Inkubieren für [8 Minuten] (Primär Antikörper)
- 12 Sekundärantikörper [Ausgewählt]
- 13 automatischer Auftrag Sekundärantikörper [Ausgewählt]
- 14 1 Tropfen [DETECTION 1] (Nachweis Nr.2), und für [32 Minuten] inkubieren.
- 15 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 16 Standard [Ausgewählt]
- 17 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 18 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 19 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 20 Objektträger Reinigung [Ausgewählt]

d) #993

Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT (Zusammenfassung)

Discovery XT Färbemodul

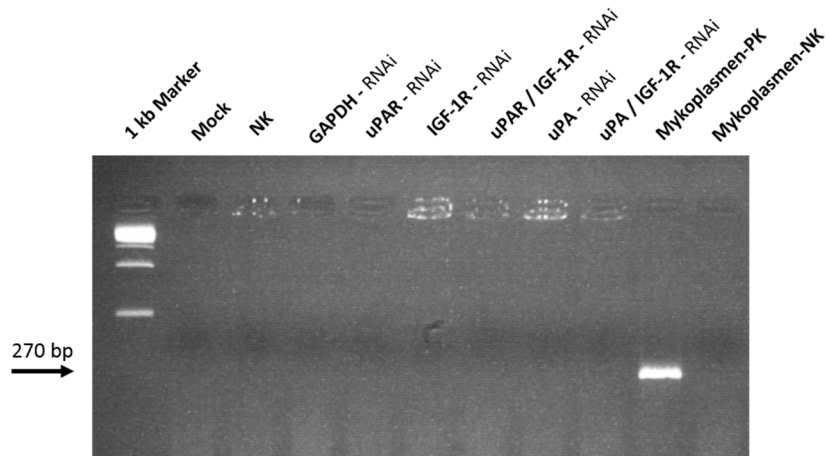
GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
993	SecTit + Haem.37	27.05.2015

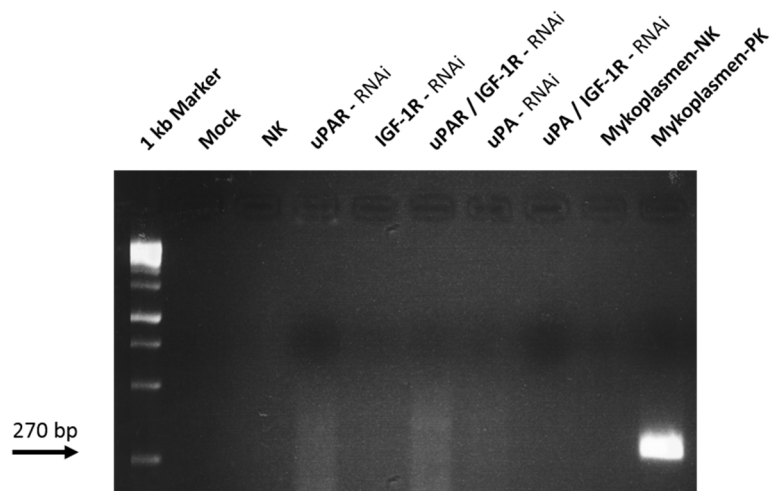
- 1 Patienten-Material [Ausgewählt]
- 2 Nicht-Paraffin [Ausgewählt]
- 3 Objektträger nass laden [Ausgewählt]
- 4 Sekundärantikörper [Ausgewählt]
- 5 automatischer Auftrag Sekundärantikörper [Ausgewählt]
- 6 1 Tropfen [DETECTION 1] (Nachweis Nr.2), und für [32 Minuten] inkubieren.
- 7 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 8 Standard [Ausgewählt]
- 9 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 10 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 11 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 12 Objektträger Reinigung [Ausgewählt]

3) Beispielhafte Bilder der Mycoplasmentests der Infektionsansätze

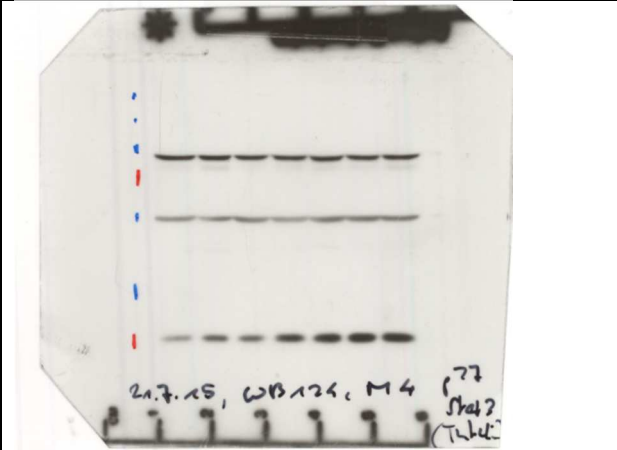
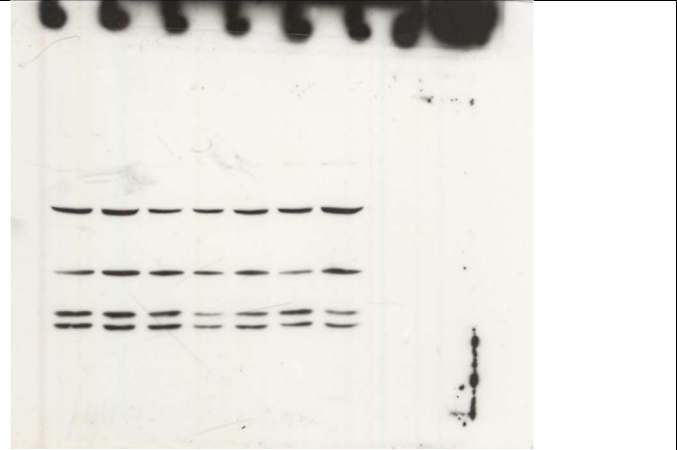
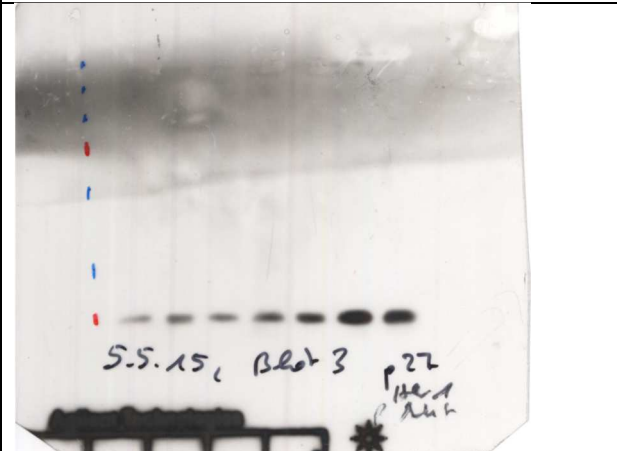
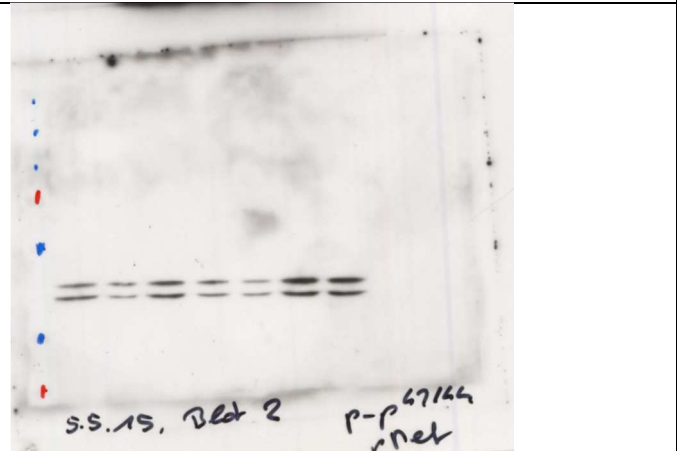
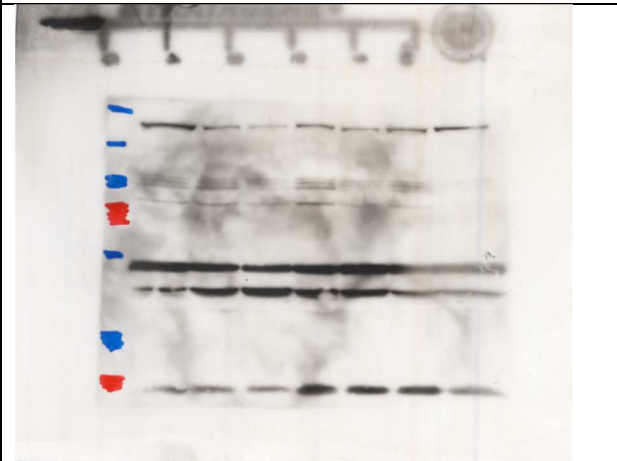
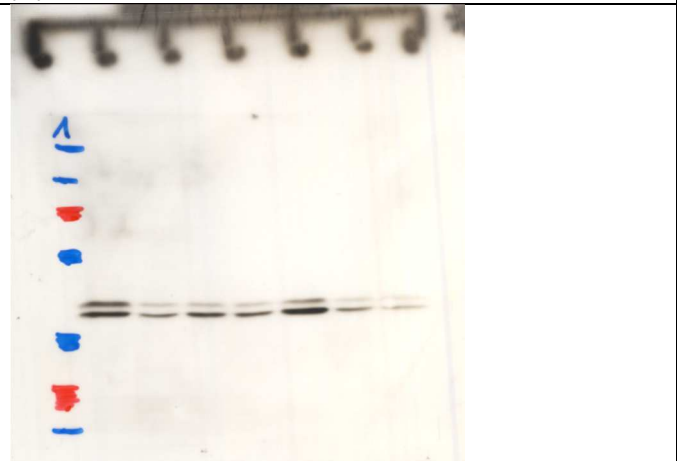
MDA-MB-231



BT549



4) original Western Blot Filme zu den densidometrischen Vermessungen

Auftragsreihenfolge: Reaktions-Kontrolle, NK, uPAR-RNAi, IGF-1R-RNAi, uPAR- / IGF-1R-RNAi, uPA-RNAi, uPA-/IGF-1R RNAi	
p27, STAT3, α -Tubulin in BT549-Zellen nach RNAi Nr.1	p-p44/42 MAPK, pSTAT3, pAkt in BT549-Zellen nach RNAi Nr. 1
	
p27 in BT549-Zellen nach RNAi Nr.2	p-p44/42 MAPK in BT549-Zellen nach RNAi Nr. 2 (spiegelverkehrter Auftrag der Proben)
	
p27, Her1, Akt in BT549-Zellen nach RNAi Nr.3	p-p44/42 MAPK in BT549-Zellen nach RNAi Nr. 3
	

5) ICPL-Ergebnisse: Proteinlisten

Tabelle a) Signifikant regulierte Proteine bzw. Gene infolge der uPAR-RNAi in MDA-MB-231-Zellen

Gen ID	Beschreibung	Verhältniswert (p-Wert)
SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	-1,639
RBM39	RNA binding motif protein 39	-1,405
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	-1,403
DDAH1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	-1,389
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	-1,354
EIF4A3	eukaryotic translation initiation factor 4A3	-1,294
CAPRN1	cell cycle associated protein 1	1,266
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	1,294
IMMT	inner membrane protein, mitochondrial	1,302
GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	1,307
TYMS	thymidylate synthetase	1,330
TCP1	t-complex 1	1,365
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	1,381
LMNA	lamin A/C	1,495
PLIN3	perilipin 3	1,636
HSPA1A/HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A	2,043

Tabelle b) Signifikant regulierte Proteine bzw. Gene infolge der uPAR-RNAi in BT549-Zellen

Gen ID	Beschreibung	Verhältniswert (p-Wert)
TAGLN	transgelin	-1,895
ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	-1,564
PSMC3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3	-1,560
TBRG4	transforming growth factor beta regulator 4	-1,531
CUL4B	cullin 4B	-1,523
FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	-1,502
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	-1,489
PSMA3	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	-1,436
SLK	STE20-like kinase	-1,406
CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	-1,405
PEG10	paternally expressed 10	-1,404
MBNL1	muscleReaktions-like splicing regulator 1	-1,379

NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	-1,373
UAP1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	-1,372
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	-1,359
DCTN1	dynactin 1	-1,346
TRMT112	tRNA methyltransferase 11-2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,337
EZR	ezrin	-1,311
DPM1	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit	-1,309
NDUFS3	--	-1,306
PSME1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	-1,304
RRS1	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,301
MYBBP1A	MYB binding protein (P160) 1a	-1,300
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	-1,297
GSN	gelsolin	-1,295
NOP10	NOP10 ribonucleoprotein	-1,293
H1FO	H1 histone family, member 0	-1,293
CCAR2	cell cycle and apoptosis regulator 2	-1,291
TARDBP	TAR DNA binding protein	-1,291
ADSL	adenylosuccinate lyase	-1,289
RPN2	ribophorin II	1,258
FXR1	fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	1,262
EMD	emerin	1,263
HSPA1A/HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A	1,268
ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	1,274
TKT	transketolase	1,285
FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa	1,301
RUVBL1	RuvB-like AAA ATPase 1	1,306
CYB5B	cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	1,314
NUDT16	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16	1,322
EPHA2	EPH receptor A2	1,325
SLC25A24	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24	1,342
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	1,350
RRM2	ribonucleotide reductase M2	1,352
STOM	stomatin	1,367

EHD2	EH-domain containing 2	1,422
ATP6V1F	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F	1,491
KARS	lysyl-tRNA synthetase	1,492
BAG6	BCL2-associated athanogene 6	1,507
LMNA	lamin A/C	1,662
NPM3	nucleophosmin/nucleoplasmin 3	1,710
PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	3,219

Tabelle c) Signifikant regulierte Proteine bzw. Gene infolge der uPA-RNAi in BT549-Zellen

Gen ID	Beschreibung	Verhältniswert (p-Wert)
DIMT1	DIM1 dimethyladenosine transferase 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,164
PSMA3	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	-1,649
ACO1	aconitase 1, soluble	-1,627
GPS1	G protein pathway suppressor 1	-1,613
CKB	creatine kinase, brain	-1,585
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	-1,499
STT3B	STT3B, subunit of the oligosaccharyltransferase complex (catalytic)	-1,483
CUL4B	cullin 4B	-1,473
PRKAR2A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	-1,44
SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	-1,382
RBM3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	-1,381
PPP5C	protein phosphatase 5, catalytic subunit	-1,338
CD70	CD70 molecule	-1,337
ARPC3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa	-1,334
MAP7D3	MAP7 domain containing 3	-1,33
PURA	purine-rich element binding protein A	-1,324
TRAPPC5	trafficking protein particle complex 5	-1,307
MRPS23	mitochondrial ribosomal protein S23	-1,299
NSUN2	NOP2/Sun RNA methyltransferase family, member 2	-1,289
RPLP0	--	1,255
HSPA1A/HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A	1,256
SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	1,256
XPO1	exportin 1	1,257
YBX1	Y box binding protein 1	1,26

S100A13	S100 calcium binding protein A13	1,261
SF1	splicing factor 1	1,267
KARS	lysyl-tRNA synthetase	1,272
ZYX	zyxin	1,277
RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family	1,289
GSN	gelsolin	1,291
PLIN3	perilipin 3	1,299
FKBP3	FK506 binding protein 3, 25kDa	1,301
RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family	1,307
TRMT112	tRNA methyltransferase 11-2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,309
DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	1,312
CLIC1	chloride intracellular channel 1	1,317
TUBA4A	tubulin, alpha 4a	1,318
PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	1,319
ZC3H18	zinc finger CCCH-type containing 18	1,325
MTDH	metadherin	1,326
COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	1,337
TUBB2A	tubulin, beta 2A class IIa	1,342
TRIP6	thyroid hormone receptor interactor 6	1,354
TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	1,363
RAB7A	RAB7A, member RAS oncogene family	1,363
LYPLA1	lysophospholipase I	1,367
OGFR	opioid growth factor receptor	1,372
HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	1,377
TXNRD1	thioredoxin reductase 1	1,378
TPM3	tropomyosin 3	1,387
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	1,393
GNB2	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	1,397
CORO1C	coronin, actin binding protein, 1C	1,397
POP1	processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (<i>S. cerevisiae</i>)	1,399
SNRPB	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	1,41
RPN2	ribophorin II	1,41
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	1,448

EEF1D	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	1,46
G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	1,468
AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	1,475
RTN4	reticulon 4	1,486
SNRPD3	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide 18kDa	1,486
PFN1	profilin 1	1,495
S100A10	S100 calcium binding protein A10	1,501
KLC1	kinesin light chain 1	1,515
FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa	1,521
SLC1A5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	1,542
H1F0	H1 histone family, member 0	1,546
MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6	1,551
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	1,567
LOXL2	lysyl oxidase-like 2	1,624
OAT	ornithine aminotransferase	1,65
ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	1,658
ATP6V1F	ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F	1,676
PRDX4	peroxiredoxin 4	1,688
SEPHS1	selenophosphate synthetase 1	1,715
P4HA1	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	1,753
C1QBP	complement component 1, q subcomponent binding protein	1,811
SF3B6	splicing factor 3b, subunit 6, 14kDa	1,84
TMPO	thymopoietin	1,861
MT-CO2	cytochrome c oxidase subunit II	1,895
BAG6	BCL2-associated athanogene 6	1,907
PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	1,932
LMNA	lamin A/C	2,396

Lebenslauf

Michaela Christina Huber

Geburtsdatum/-ort 28. August 1986, München
 Adresse Lazarettstrasse 35
 80636 München
 Deutschland
 E-mail michaela.huber.hk@arcor.de

Berufserfahrung

09/2012 – 10/2015 Doktorandin, Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München
 - Planung, Durchführung und Auswertung von Versuchen
 - Labortätigkeiten, Terminplanung, Materialbeschaffung, etc.
 - Betreuung von Studenten bei Praktikum / Masterarbeit
 - Präsentation von Ergebnissen auf internationalen Kongressen (EACR Munich 2014, IMPAKT Brussels 2015) und im Institutsseminar

01/2012 – 04/2012 Praktikum, BC Cancer Agency, Terry Fox Laboratory, Vancouver BC, Kanada,

05/2009 – 08/2012 Kundenservice, Bäckerei / Konditorei Kuhn, Höhenkirchen

03/2007 – 06/2007 studentische Aushilfe, Abteilung für Kommunikation, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München

09/2006 Praktikum, Abteilung für Kommunikation, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München, Mitarbeit bei den Dialogforen 2006 der GSF / Munich Re Stiftung

Ausbildung

09/2012 – 10/2015 Promotion Biologie (Dr. rer. nat.), Technische Universität München
 Anstellung am Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München
 - Dissertation: Das uPAR-Interaktom, potentielle neue Therapieziele beim Triple-negativen Brustkrebs
 - Etablierung / Optimierung von Methoden
 - Forschungsaufenthalt, Advanced Center for Detection of Cancer, Mount Sinai Hospital, Toronto ON, Kanada
 - Teilnahme am HELENA Graduiertenprogramm
 - Publikation in peer-reviewed Journal

03/2011 – 09/2011 Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München
 Masterarbeit: Expression einer transmembranen Version des Hepatitis B Virus E Antigens auf der Zelloberfläche

10/2009 – 09/2011 Masterstudium Biologie, Technische Universität München

09/2009 – 11/2009	Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum München Bachelorarbeit: Optimierung der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen aus Mäusen
10/2006 – 11/2009	Bachelorstudium Biologie, Technische Universität München
09/1997 – 05/2006	Edith – Stein – Gymnasium, München

Weiterbildung

07/2014	How to publish in peer-reviewed journals, Tress&Tress GbR
10/2013	Project Management fundamental methods, Dr. Braune + Partner
07/2013	How to win academic discussions, Dr. Fröhlich-Steffen
04/2013	Einführung in die Biostatistik, LMU München
02/2013	Rhetoric extreme, M. Richter-Meyer
10/2011	Spanischkurs, Instituto Cervantes, Spanisches Kulturinstitut München

Posterpräsentationen

05/2015	„The impact of the uPAR system and its interaction partners as potential therapeutic targets in TNBC“ IMPAKT 2015 Breast Cancer Conference, Brussels, Belgium
07/2014	„uPAR and its Interaction Partners: Potential New Therapy Targets in Triple Negative Breast Cancer“ 23rd Biennial Congress of the European Association of Cancer Research (EACR-23), Munich, Germany

Veröffentlichungen

	Huber M.C. , N. Falkenberg, S.M. Hauck, M. Priller, H. Braselmann, A. Feuchtinger, A. Walch, M. Schmitt and M. Aubele (2016). „Cyr61 and YB-1 are novel interacting partners of uPAR and elevate the malignancy of triple-negative breast cancer“. <u>In Revision</u>
	Huber M.C. , R. Mall, H. Braselmann, A. Feuchtinger, S. Molatore, K. Lindner, A. Walch, E. Gross, M. Schmitt, N. Falkenberg and M. Aubele (2016). „uPAR enhances malignant potential of triple-negative breast cancer by directly interacting with uPA and IGF1R“. <u>In Revision</u>
10/2013	Falkenberg N., N. Anastasov, K. Rappl, H. Braselmann, G. Auer, A. Walch, M. Huber , I. Höfig, M. Schmitt, H. Höfler, J.M. Atkinson and M. Aubele (2013). „MiR-221/-222 differentiate prognostic groups in advanced breast cancers and influence cell invasion“. British Journal of Cancer, 109, 2714–2723 doi: 10.1038/bjc.2013.625

Wissenswertes

Fremdsprachen	Englisch (verhandlungssicher), Französisch (gut), Spanisch (Grundkenntnisse)
IT	MS Office, Adobe Photoshop, Image J, SigmaPlot