

# **Funktionsgewinn von mutiertem p53 im murinen WAP-T Tumorzellsystem**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Dipl. Biologin Eva Lenfert**

geboren am 27.03.1980

in Wismar

Hamburg, 2012

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2007 bis Mai 2012 am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. W. Deppert angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der Disputation: 20.07.2012

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
<b>Zusammenfassung</b> .....	V
<b>Summary</b> .....	VII
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Brustkrebs.....	1
1.2. Der Prozess der Metastasierung.....	2
1.2.1. Epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	4
1.2.2. EMT während der Entwicklung der Brustdrüse und der Tumorprogression.....	7
1.3. Das Tumorsuppressorprotein p53 .....	9
1.3.1. Regulation von p53.....	11
1.3.2. Funktionen des p53-Proteins.....	13
1.3.3. Mutationen im <i>p53</i> -Gen .....	15
1.3.4. P53 in Mammakarzinomen.....	19
1.4. WAP-T Mausmodell zur Analyse des Einflusses von mutiertem p53 .....	20
<b>2. Problemstellung</b> .....	23
<b>3. Material</b> .....	24
3.1. Mausstämme und Zelllinien .....	24
3.1.1. Mausstämme .....	24
3.1.2. Eukaryotische Zellen.....	24
3.1.3. Prokaryotische Zellen .....	25
3.2. Plasmide .....	25
3.3. Größenstandards .....	26
3.4. Antikörper.....	26
3.4.1. Primärantikörper .....	26
3.4.2. Konjugierte Primärantikörper.....	27
3.4.3. Sekundärantikörper – Fluoreszenz-gekoppelt.....	27
3.4.4. Sekundärantikörper – Enzym-gekoppelt .....	27
3.5. Enzyme .....	28
3.6. Oligonukleotide .....	28
3.6.1. Sequenzierprimer .....	28
3.6.2. Oligonukleotide für Standard-PCR.....	28
3.6.3. Oligonukleotide für qPCR .....	29
3.7. Kits .....	31
3.8. Allgemeine Puffer und Lösungen.....	31
3.9. Chemikalien und Reagenzien .....	32
3.10. Verbrauchsmaterial.....	33
3.11. Geräte.....	34
3.12. Software .....	35
<b>4. Methoden</b> .....	36
4.1. Arbeiten mit prokaryotischen Zellen.....	36

4.1.1.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Gold® (Stratagene) Bakterien nach der Mehrionen-Technik .....	36
4.1.2.	Klonierung .....	36
4.1.2.1.	Restriktionsverdau .....	36
4.1.2.2.	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	37
4.1.2.3.	Ligation .....	37
4.1.2.4.	Zielgerichtete Mutagenese .....	37
4.1.2.5.	Vektorkonstruktionen .....	39
4.1.2.6.	Transformation (Kaiser und Hogness, 1960) .....	40
4.1.3.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	40
4.1.3.1.	Mini-Plasmidpräparation .....	40
4.1.3.2.	Maxi-Plasmidpräparation .....	41
4.2.	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	41
4.2.1.	Kultivierung adhärent wachsender Zellen .....	41
4.2.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	42
4.2.3.	Bestimmung der Zellzahl .....	42
4.2.4.	Vereinzeln von Primärtumorzellen aus WAP-T Tumoren .....	43
4.2.5.	Vorbereitung der Zellen für Tumorzelltransplantation in Mäusen .....	43
4.2.6.	Durchflusszytometrische Verfahren (FACS).....	44
4.2.6.1.	Analyse von lebenden Zellen mittels FACS .....	44
4.2.6.2.	Zellsortierung .....	44
4.2.7.	Substrat-unabhängiges Wachstum.....	44
4.2.8.	Herstellung von Lentiviren.....	45
4.2.9.	Transduktion von Zelllinien mit Lentiviren .....	46
4.3.	Experimentelle Methoden mit transgenen Mäusen .....	46
4.3.1.	Induktion von Mammakarzinomen durch Transgenexpression .....	46
4.3.2.	Präparation der Mäuse und Organentnahme .....	47
4.3.3.	Makroskopische Beurteilung des Tumorwachstums ( <i>Staging</i> ) .....	47
4.3.4.	Tumorzelltransplantation .....	48
4.4.	Immunhistologische und immunzytologische Methoden.....	49
4.4.1.	Immunhistochemie & histologische Beurteilung der Mammakarzinome ( <i>Grading</i> ).....	49
4.4.2.	Tumor-Kryokonservierung.....	49
4.4.3.	Anfertigen von Kryoschnitten.....	49
4.4.4.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	50
4.5.	Nukleinsäureanalytische Methoden .....	51
4.5.1.	RNA-Isolierung.....	51
4.5.1.1.	RNA-Extraktion von eukaryotischen Zellen .....	51
4.5.1.2.	Aufreinigung von RNA aus murinen Tumorgewebe .....	52
4.5.2.	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	52
4.5.3.	Analyse der RNA-Qualität .....	53
4.5.4.	cDNA-Synthese .....	53
4.5.5.	Quantitative <i>real-time</i> -PCR.....	54
4.5.6.	Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse .....	56

4.5.7.	DNA-Extraktion aus Gewebe .....	56
4.5.8.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	57
4.5.9.	Agarose-Gelelektrophorese.....	58
4.5.10.	Gelaufreinigung .....	58
4.5.11.	Design von Oligonukleotiden für PCR und qPCR .....	58
4.5.12.	Sequenzierung .....	59
4.6.	Proteinanalytische Methoden .....	59
4.6.1.	Protein-Isolation .....	59
4.6.1.1.	Proteinextraktion aus Gewebe .....	59
4.6.1.2.	Proteinextraktion aus Zellen .....	60
4.6.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	60
4.6.2.1.	Bradford-Test .....	60
4.6.2.2.	BCA-Proteinassay .....	61
4.6.3.	SDS-PAGE .....	61
4.6.4.	Western Blot.....	62
4.6.4.1.	Proteintransfer .....	63
4.6.4.2.	Ponceau-Färbung.....	63
4.6.4.3.	Detektion mit Pierce ECL .....	64
4.6.4.4.	Membran-Stripping.....	64
4.6.5.	ELISA – Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest.....	65
4.6.6.	Immunopräzipitation .....	65
4.7.	Computer-assistierte Analysen.....	66
4.7.1.	Analyse der Gefäßdichte mit Hilfe von ImageJ.....	66
4.7.2.	GraphPad Prism für die statistische Auswertung .....	67
5.	<b>Ergebnisse</b> .....	68
5.1.	Einfluss von mutiertem p53 (mutp53) im WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell .....	68
5.1.1.	Phänotypischer Vergleich mono- und bitransgener Mäuse .....	69
5.1.1.1.	Überlebensrate.....	69
5.1.1.2.	Tumorlast.....	71
5.1.1.3.	Klassifizierung der Mammakarzinome ( <i>Grading</i> ).....	72
5.1.1.4.	Metastasierung.....	73
5.1.1.5.	Mutp53-abhängige Vaskularisierung der WAP-T Mammakarzinome .....	74
5.1.2.	Phospho-Tyrosin-Profile zur Identifikation modulierter Signalwege in W10-NP8 Mäusen .....	78
5.1.3.	Globale Genexpression in WAP-T-NP8 vs. WAP-T-NP8 x WAP-mutp53 <sup>R245W</sup> Tumoren... 80	
5.1.4.	Validierung der EMT-Signatur .....	86
5.2.	Etablierung von experimentellen Zellsystemen zur Untersuchung des Funktionszugewinns von mutp53 <i>in vitro</i> .....	88
5.2.1.	Entwicklung stabiler, homöostatischer Zellsysteme aus transgenen Tumoren .....	88
5.2.2.	Überlebensvorteil in Zellkultur für WAP-T Zellen mit mutp53 <sup>R270H</sup> .....	89
5.2.3.	Charakterisierung der generierten WAP-T Zelllinien.....	91
5.2.4.	Analyse der Tumorigenität und Disseminierungseigenschaften der WAP-T Zelllinie H8N8 .....	97

5.2.4.1.	Tumor-initiierende Fähigkeiten der H8N8 Zellen .....	97
5.2.4.2.	Disseminierung und Metastasierung von H8N8 Zellen in entfernte Organe .....	99
5.2.5.	Übertragung der EMT-Ergebnisse auf das <i>in vitro</i> Zellsystem .....	102
5.3.	Manipulation des WAP-T Tumorzellsystems .....	103
5.3.1.	Tgf $\beta$ 1-/PDGF-Stimulation zur Induktion von EMT .....	103
5.3.2.	Einfluss von mutp53 (R270H und R245W) in G-2 Zellen auf den EMT-Prozess .....	107
5.3.3.	Überexpression von EMT-relevanten Genen ( <i>Zeb1/Mmp3</i> ) in H8N8 Zellen .....	110
5.4.	Relevanz <i>in vivo</i> .....	112
5.4.1.	Transplantation von <i>Zeb1-/Mmp3</i> -überexprimierenden H8N8 Zellen in NP8 Mäuse ..	113
5.4.2.	Disseminierung der Zellen in entfernte Organe .....	113
5.5.	Potentielle Mechanismen der EMT-Regulation durch mutp53 im WAP-T Mausmodell .....	117
5.5.1.	Überprüfung der Wechselwirkung von mutp53 (R245W und R270H) und dem Tumorsuppressor p63 .....	117
5.5.2.	Effekt der mutp53-Expression auf die Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors .....	121
6.	<b>Diskussion</b> .....	124
6.1.	Effekt der mutp53-Expression auf die Malignität der Mammakarzinome im WAP-T Mausmodell .....	125
6.2.	Einfluss von mutp53 auf eine EMT-vermittelte Metastasierung .....	127
6.3.	Modulation der WAP-T Tumorzellsysteme .....	130
6.4.	Potentielle mutp53-vermittelte Mechanismen der Metastasierung .....	132
6.4.1.	Mutp53-GoF – im WAP-T Mausmodell unabhängig von p63 .....	132
6.4.2.	Potentiell neuer mutp53-vermittelter Mechanismus: Beeinflussung der Aktivität des Glucocorticoidrezeptors .....	134
6.5.	Fazit und Ausblick .....	137
7.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	138
8.	<b>Anhang</b> .....	156
8.1.	Listen der differenziell regulierten Gene .....	156
8.2.	Vektorkarten der verwendeten Plasmide .....	161
8.3.	Abbildungsverzeichnis .....	161
8.4.	Tabellenverzeichnis .....	163
8.5.	Abkürzungen .....	163
8.6.	Sicherheitstechnische Daten .....	166
8.6.1.	Gefahrstoffe .....	166
8.6.2.	Liste der GHS-Kodierungen und der zugehörigen Piktogramme .....	168
8.6.3.	Auflistung der H- und P-Sätze .....	169
8.6.3.1.	H-Sätze .....	169
8.6.3.2.	P-Sätze .....	170
	<b>Danksagung</b> .....	172

## Zusammenfassung

Mit dem Anstieg der Lebenserwartung und dem Rückgang von Infektionskrankheiten belegen Krebserkrankungen weltweit Rang zwei der Todesursachen. Die Hälfte aller Fälle geht dabei mit der Mutation des Tumorsuppressors p53 einher. Neben dem Verlust der protektiven wtp53-Funktion werden dem mutierten Protein onkogene Funktionen (*Gain of function* – GoF) in der Tumorgenese zugesprochen, die aber noch nicht im Detail verstanden sind. Deshalb ist die Erforschung der molekularen Mechanismen des Funktionsgewinns von mutiertem p53 (mutp53) für ein besseres Verständnis der Prozesse der Tumorgenese und der Metastasierung von großer Bedeutung. Neue Erkenntnisse über die Wirkung von Schlüsselproteinen der Tumorgenese bergen stets das Potential zur Entwicklung dringend benötigter, innovativer und angepasster Therapien für Krebspatienten.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Analyse des GoF zweier p53-*Hotspot*-Mutationen (R248W, R273H), die häufig in humanen Krebserkrankungen auftreten. Untersucht werden sollte deren maligne Wirkung und mögliche zugrundeliegende Mechanismen im WAP-T Mausmodell der Mammakarzinogenese, welches dafür besonders geeignet ist, da das endogene wtp53 durch Komplexbildung mit dem SV40 T-Antigen funktionell inaktiviert ist. Phänotypische Vergleiche zwischen Tumoren monotransgener WAP-T-NP8 und bitransgener WAP-T-NP8xWAP-mutp53 Mäuse (R245W, R270H) zeigten einen aggressiveren Phänotyp der Tumore in den bitransgenen Mäusen. Insbesondere in WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> Tieren war die Malignität deutlich erhöht: Entwicklung von mehr undifferenzierten Tumoren, eine verstärkte Tumolvaskularisierung und eine 3-4-fach höhere Metastasierungsrate in den Lungen. Unter Verwendung von Mikroarray-basierten Genexpressionsanalysen konnte eine mutp53-vermittelte Gensignatur in den Tumoren identifiziert werden, charakterisiert durch Anreicherung EMT- (epithelial-mesenchymale Transition) assoziierter Gene. Der Prozess der EMT wird mit einer vermehrten Metastasierung und einer schlechteren Prognose bei Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht. In den Tumoren der WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> Mäuse wurde sowohl eine erhöhte Expression der Gene von Transkriptionsfaktoren wie *Snai1* und *Zeb1*, als auch verschiedener Zelloberflächenrezeptoren (*Pdgfra*, *Pdgfrb*, *Fgfr1*, *Itga5* und *Notch4*), Wachstumsfaktoren (*Tgfb1* und *Pdgfb*), Matrix-Metalloproteasen (*Mmp3*, *Mmp10*, *Mmp11* und *Mmp12*) und Kollagenen (*Col1*, *Col5*, *Col6* und *Col15*) gefunden. Diese sogenannte EMT-Signatur wurde *in vitro* anhand der aus einem bitransgenen WAP-TxWAP-mutp53 Tumor entwickelten Zelllinie G-2, und der im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls aus einem bitransgenen Tumor generierten H8N8-Linie bestätigt. Beide Zelllinien bilden jeweils ein heterogenes, homöostatisches Tumorzellsystem bestehend aus

mesenchymal und epithelial differenzierten Zellen. Weiterhin wurde mit Hilfe dieser *in vitro* Modelle gezeigt, dass sowohl die ektope *mutp53*-Expression als auch eine Überexpression einzelner Gene der EMT-Signatur (*Zeb1* und *Mmp3* exemplarisch in dieser Arbeit) eine verstärkte EMT und somit eine mesenchymale Ausprägung des Zellphänotyps verursachen. Auf der Suche nach Mechanismen, die für den *mutp53*-vermittelten GoF verantwortlich sein könnten, wurde basierend auf neueren Literaturdaten zunächst die Interaktion von *mutp53* mit p63 untersucht. In den WAP-T Tumoren konnte weder eine *mutp53*-p63-Interaktion noch eine Regulation von p63-kontrollierten Zielgenen (hier miR-200 Familie) nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde eine vermehrt zytoplasmatische Lokalisation des *mutp53*<sup>R245W</sup>-Proteins in den Tumorzellen festgestellt. Funktionen von zytoplasmatischem *mutp53* sind bisher nahezu unbekannt. Erste Anhaltspunkte könnte die Beobachtung liefern, dass WAP-T Zellen, die *mutp53* überexprimieren, eine ebenso ausgeprägte Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors (GR) im Zytoplasma aufweisen. Zusammen mit Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe weisen diese Ergebnisse auf eine Interaktion von *mutp53* mit dem GR hin. Da der GR in eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen (wie z.B. PI3K/Akt-, MAPK- oder Tgf $\beta$ -Signalwege) involviert ist, stellt die Wechselwirkung mit *mut53* möglicherweise einen neuen regulatorischen Mechanismus für den GoF von *mutp53* dar.

Zusammenfassend bestätigen die hier gewonnenen Daten einen *mutp53*-vermittelten GoF hinsichtlich der Malignität in der Mammakarzinogenese im WAP-T Mausmodell. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit des WAP-T Mausmodells mit humanen Mammakarzinomen können die hier erzielten Erkenntnisse auf die humane Situation übertragen werden. So kann die epithelial-mesenchymale Transition ebenso bei Brustkrebspatientinnen die Metastasierung begünstigen. Die Erforschung der Rolle einzelner EMT-assoziiierter Proteine und deren Modulation könnte in Zukunft Grundlage neuer therapeutischer Strategien sein.

## Summary

Due to rising life expectancy and a decline in infectious diseases, cancer is the second leading cause of death in the world. In about 50% of all cases, cancers contain mutations in the *Tp53* gene, a tumor suppressor gene. In addition to the loss of wtp53 protective functions, mutant p53 (mutp53) acquires novel oncogenic functions (gain of function – GoF) during tumorigenesis, which are so far not yet completely understood. In order to understand the role of mutp53 in mammary carcinogenesis and in the process of metastasis, its molecular mechanisms of action need to be determined in detail. New findings on the role of key proteins in these processes have the potential to promote the development of urgently needed innovative and customized therapies for cancer patients.

The goal of this thesis was to examine the GoF of two p53 hot spot mutations (R248W, R273H), that frequently occur in human cancer. To study their role in the malignancy of the disease and the possible underlying mechanisms, the SV40 transgenic WAP-T mouse model for mammary carcinogenesis was used. This model is especially suitable for this task, because the endogenous wtp53 is functionally inactivated by complex formation with SV40 T-Ag. The tumor phenotypes of monotransgenic WAP-T-NP8 and bitransgenic WAP-T-NP8xWAP-mutp53 (R245W, R270H) mouse lines were compared and indicated a more aggressive phenotype in bitransgenic mice. In particular, tumors in WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> mice showed a significantly increased malignancy, characterized by the development of more undifferentiated tumors, increased tumor vascularization and a 3-4-fold higher rate of metastasis in lungs. Using microarray-based gene expression analysis a mutp53-mediated gene signature, enriched in EMT (epithelial-mesenchymal transition) associated genes, could be identified in tumors of bitransgenic mice. The process of EMT is associated with an increased metastasis rate and a poor prognosis for patients. Multiple genes were identified to be differently regulated in tumors of WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> mice e.g. increased expression encoding transcription factors such as *Snai1* and *Zeb1*, various cell surface receptors (*Pdgfra*, *Pdgfrβ*, *Fgfr1*, *Itga5* and *Notch4*), growth factors (*Tgfβ1* and *Pdgfb*), matrix metalloproteases (*Mmp3*, *Mmp10*, *Mmp11* and *Mmp12*) and several collagens (*Col1*, *Col5*, *Col6* and *Col15*). The EMT signature was confirmed *in vitro* using G-2 cells derived from a bitransgenic WAP-TxWAP-mutp53 tumor and H8N8 cells, a newly established cell line that originated from another bitransgenic tumor. Both cell lines form a heterogeneous homeostatic tumor cell system consisting of an epithelial and a mesenchymal cell population. Experiments in the *in vitro* models showed that ectopic *mutp53* expression as well as an overexpression of individual EMT signature genes (focus was on *Zeb1* and *Mmp3*) increased EMT and led to the development of

a mesenchymal cell phenotype. In order to determine possible mechanisms for mutp53-mediated GoF, the already described interaction of mutp53 with p63 was examined. Neither an interaction of mutp53 with p63, nor the regulation of p63-controlled target genes (e.g. the miR-200 family) could be detected. Interestingly, an accumulation of mutp53<sup>R245W</sup> protein in the cytoplasm of tumor cells could be observed. However, possible cytoplasmic functions of mutp53 remain still unclear. A first hint toward such a function, a mutp53-dependent accumulation of the glucocorticoid receptor (GR) in the cytoplasm was detected. These observations support earlier findings from our group that suggest an interaction of mutp53 with the GR. Since the GR is involved in a variety of signaling pathways (such as PI3K/Akt-, MAPK or Tgf $\beta$ -signaling pathways), an interaction with mutp53 might present a new potential regulatory mechanism for mutp53-mediated GoF.

In conclusion, the obtained data confirm a mutp53-mediated GoF regarding the malignancy of mammary carcinogenesis in the WAP-T mouse model. Due to the high resemblance of WAP-T mouse tumors to certain human breast cancers, the results from this thesis can be transferred into a human context, indicating that the process of epithelial-mesenchymal transition may also promote metastasis in breast cancer patients. The analysis of individual EMT associated proteins and their regulation promises to be important for new therapeutic strategies.

# 1. Einleitung

## 1.1. Brustkrebs

Krebserkrankungen gehören neben Herz-Kreislaufkrankungen zu den häufigsten Todesursachen beim Menschen. In Deutschland starb 2010 jeder Vierte an den Folgen bösartiger Tumore (Pressemitteilung Nr. 41 des Statistischen Bundesamtes vom 03.02.2012).

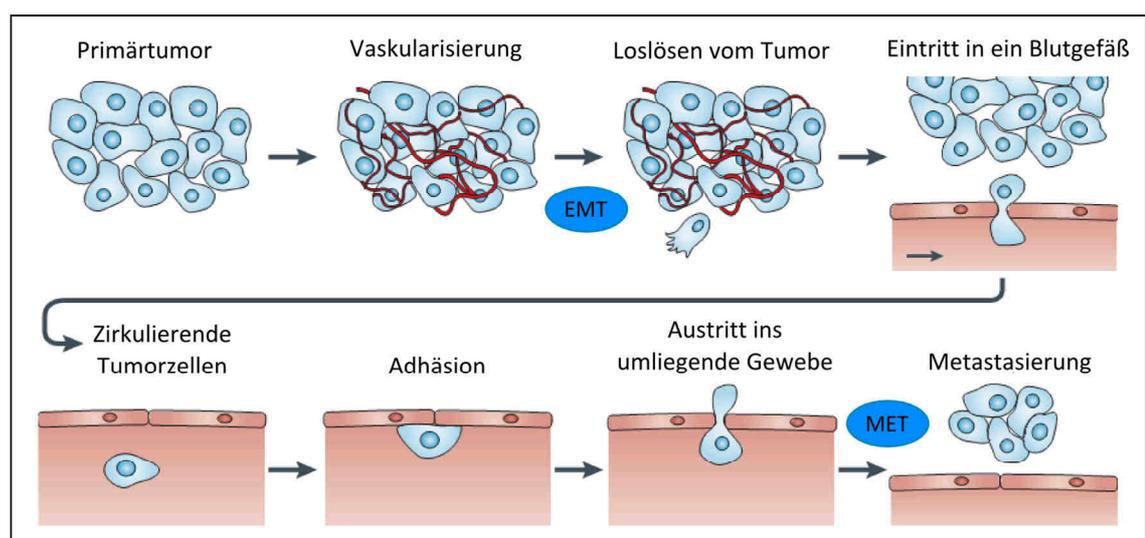
Das Mammakarzinom (Brustkrebs) ist die am weitesten verbreitete Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Die Zahl der Neuerkrankungen steigt jährlich; im Gegensatz zu den 640.000 Ersterkrankungen im Jahr 1980 wurden 2010 1,6 Mio. Mammakarzinome neu diagnostiziert, (Forouzanfar et al., 2011). Die Brustkrebsbedingte Sterberate beträgt global ca. 14%. Somit belegt Brustkrebs den ersten Platz krebsbedingter Mortalität bei Frauen (<http://globocan.iarc.fr>). In Deutschland lag die Mortalitätsrate durch Brustkrebs und Folgeerkrankungen 2008 bei 18%. Durch verbesserte Diagnostik und Verwendung von individuell angepassten Therapien stieg die Zahl der Todesfälle langsamer als die der Neuerkrankungen, so dass im Vergleich zu 1980 die Erkrankung an Mammakarzinomen seltener letal sind (Forouzanfar et al., 2011). Todesursache bei Brustkrebspatientinnen ist normalerweise nicht der Primärtumor selbst, sondern die Entstehung von Rezidiven bzw. Metastasen in entfernten Organen. Besonders häufig betroffen sind Gehirn, Skelett, Leber und Lunge. So ist für eine erfolgreiche Therapie neben Früherkennung und Tumorresektion auch die Behandlung von Metastasen erforderlich. Hierfür sind neue Erkenntnisse über den metastatischen Prozess unumgänglich.

Für die Entstehung von Mammakarzinomen sind genaue Ursachen nicht bekannt. Zum einen mehrten sich Hinweise auf bestimmte Faktoren, die die Entstehung von Brustkrebs fördern oder auch reduzieren. Zu den Risikofaktoren gehören neben dem Alter und Lebensstil (Ernährung, Bewegung, Alkohol- und Nikotinkonsum) auch hormonelle Faktoren bedingt durch Kinderlosigkeit, höheres Alter bei der ersten Geburt und spät einsetzende Menopause. Wohingegen Schwangerschaften in jungen Jahren und längere Stillzeiten einen eher protektiven Einfluss haben (Robert-Koch-Institut, 2010). Zum anderen konnten aber auch bereits genetische Aspekte identifiziert werden, die die Brustkrebsentstehung begünstigen: so haben Frauen ein höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken, in deren naher Verwandtschaft die Erkrankung bereits auftrat oder die Mutationen im *BRCA (breast cancer)-1/-2*-Gen aufweisen, was ca. 5% aller Mammakarzinome betrifft (Antoniou et al., 2003).

## 1.2. Der Prozess der Metastasierung

Die Letalität bei Brustkrebspatientinnen ist hauptsächlich durch Folgeerkrankungen wie die Ausbildung von Metastasen bedingt. Metastasierung ist für die beteiligten Zellen ein mehrstufiger Prozess, welcher mit einem mobilen Phänotyp (via EMT, siehe 1.2.1), Degradation der Basalmembran und Invasion in die extrazelluläre Matrix (ECM) beginnt. Anschließend erfolgt das Eindringen in Blut- bzw. Lymphgefäße. Während sich die Tumorzellen in der Zirkulation aufhalten, sind sie hohen Druck- und Scherkräften ausgesetzt, deren Überleben eine Anpassung des Phänotyps erfordert. Für die Besiedlung entfernter Organe müssen disseminierte Tumorzellen zunächst adhäsiv an eine Gefäßwand binden, um anschließend ins umliegende Gewebe zu migrieren und zum sekundären Tumor auszuwachsen (Thiery, 2002; Wirtz et al., 2011). Eine erfolgreiche Metastasierung von sekundären Organen erfordert dabei die Plastizität, in der fremden Umgebung zu proliferieren.

In der Literatur werden zwei Theorien über den Beginn der Metastasierung und die dafür notwendigen Voraussetzungen diskutiert. Zum einen wird vermutet, dass eine kleine Population von Tumorzellen von Beginn an zur Metastasierung befähigt sind (Minn et al., 2005; Balic et al., 2006; Li et al., 2007; Weng et al., 2012). Zum anderen geht die zweite Theorie von einem späten Ereignis in der Tumorentwicklung aus, bei dem die Tumorzellen durch Akkumulation von genetischen Veränderungen die Eigenschaften für die Metastasierung im Laufe der Progression erwerben (Fidler, 2003; Nguyen and Massagué, 2007).



**Abbildung 1: Multistritt-Prozess der Metastasierung**

Der Prozess der Metastasierung umfasst das Ablösen einzelner Tumorzellen vom Primärtumor, die dann in Blutgefäße invadieren und an entfernten Positionen das Blutgefäß verlassen, um einen Sekundärtumor zu formen. Um den Tumor verlassen zu können, müssen Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen, was durch EMT erfolgen kann und für die Ausbildung epithelialer Metastasen muss der Prozess mittels MET revertiert werden. EMT – epitheliale Transition, MET – mesenchymale-epitheliale Transition (modifiziert nach Wirtz et al., 2011).

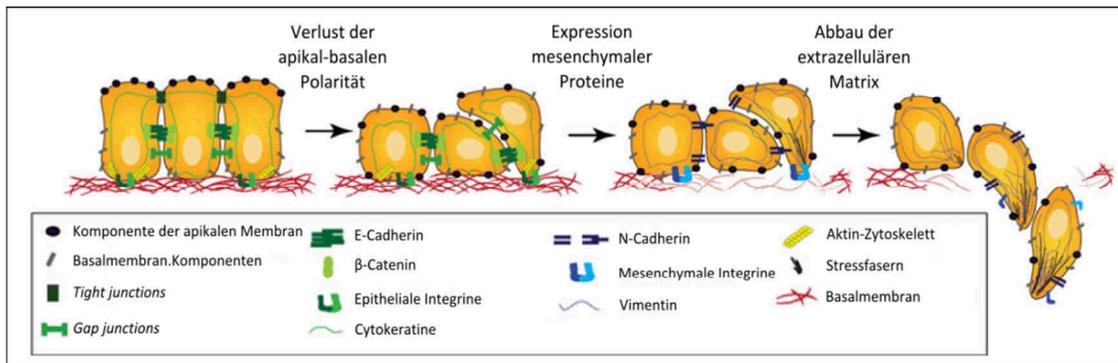
Während der Tumorprogression leitet eine Kombination aus Tumorproliferation, Angiogenese, weiteren genetischen und epigenetischen Veränderungen durch die Aktivierung von komplexen Signalwegen den metastatischen Prozess ein. Eine Phänotyp-Änderung (EMT) führt zu Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp, die reduzierte Zell-Zellinteraktionen besitzen und mobil sind (Thiery and Sleeman, 2006). Diese Zellen exprimieren Matrix-Metalloproteasen, die den Abbau der Basalmembran (Laminin- und Kollagen I-reich) fördern, so dass diese Zellen den Tumor verlassen können (Hotary et al., 2006). Die nächste Hürde stellt die extrazelluläre Matrix (ECM), reich an Kollagen I und Fibronectin, dar. Während der Migration durch die ECM spielen fokale Adhäsionen und Multi-Proteinkomplexe eine große Rolle, da sie für die physikalische und dynamische Verknüpfung von zellulären Aktin-Filamenten mit den ECM-Fasern verantwortlich sind (Smith et al., 2007; Fraley et al., 2010). Die Migration selbst erfolgt offenbar durch Ausbildung von pseudopodialen Protrusionen (Fraley et al., 2010). Während des Ein- und Austritts aus Blut- bzw. Lymphgefäßen müssen Tumorzellen drastische Formveränderungen durch Umbau des Zytoskeletts durchführen, um endotheliale Zell-Zellkontakte aufzubrechen (Wirtz, 2009). Im Blutgefäß müssen Tumorzellen viele Stresssituationen überstehen, dazu gehören immunologischer Stress, Scherkräfte im Blutsystem, Kollisionen mit Blutzellen und endothelialen Zellen der Gefäßwand. Die Stressoren können die Überlebenschance der disseminierten Tumorzellen und auch die Fähigkeit, zur Metastase auszuwachsen, stark beeinflussen. Nur eine sehr kleine Anzahl zirkulierender Tumorzellen überlebt diese Prozedur (Fidler et al., 2002). Für das Verlassen des Blutsystems sind zwei Mechanismen bekannt: zum einen führt die Verstopfung von Blutgefäßen mit geringerem Durchmesser als die Zelle selbst zum Arrest der Zelle im Blutgefäß mit nachfolgender Invasion in das umliegende Gewebe (Kienast et al., 2010; Wirtz et al., 2011), zum anderen werden durch Interaktion membranständiger Liganden (CD44, CEA, PODXL) der Tumorzelle mit Selektin-Rezeptoren (E- und P-Selektin) der Endothelzellen die zirkulierenden Tumorzellen eingefangen (Napier et al., 2007; Thomas et al., 2008, 2009). Für die Arretierung mit anschließendem Gefäßaustritt wird eine stabilere Bindung von Integrinen der Tumorzellen an interzellulären und vaskulären Adhäsionsmolekülen (ICAM1, VCAM1) benötigt (Zhu et al., 2008). Ebenso scheinen Blutplättchen eine wichtige Rolle in der Disseminierung zu übernehmen: mittels Bindung an Tumorzellen werden diese „maskiert“ und dadurch vor dem Immunsystem geschützt (Nieswandt et al., 1999; Palumbo et al., 2005); weiterhin unterstützen sie die Adhäsion an die Gefäßwand (Felding-Habermann et al., 1996; Burdick and Konstantopoulos, 2004; Gay and Felding-Habermann, 2011). Darüber hinaus können von der Tumorzelle ins umliegende Gewebe mitgeschleppte aktivierte Blutplättchen durch Sekretion von Faktoren Angiogenese induzieren und damit das Metastasenwachstum unterstützen

(Pinedo et al., 1998). Analysen von Autopsieergebnissen ergaben, dass Tumore nicht wahllos Organe besiedelten (Weiss, 1992, 2000), sondern dass für bestimmte Tumorentitäten Prävalenzen für bestimmte Organe beobachtet werden konnten. Bei Prostatakrebs sind Metastasen vornehmlich im Knochenmark und in der Leber zu finden, während Mammakarzinome eher in Knochenmark und Lunge metastasieren. Das Muster der Metastasierung wird durch zwei Hypothesen versucht zu erklären: die „Seed and Soil“-Hypothese, wonach die lokale Mikroumgebung eine wichtige Rolle spielt, und die „mechanische“ Hypothese, bei der die Metastasierung mit dem Verlauf des Blutkreislaufs korreliert (Weiss, 2000).

### 1.2.1. Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Während der Embryogenese multizellulärer Organismen ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von entscheidender Bedeutung. Über diesen Prozess werden Entwicklung und Spezialisierung von Zellen gesteuert, was die Entstehung komplexerer Organismen ermöglicht. Im frühen Organismus (während der Gastrulation) wird zwischen epithelialem und mesenchymalem Zellphänotyp, die für die Bildung neuer Gewebe verantwortlich sind, unterschieden. Epitheliale Zellen zeichnen sich durch Immobilität, enge Zell-Zellkontakte und eine apikal-basalen Polarität aus, während mesenchymale Zellen eher mobil und spindelförmig sind (Hay, 2005). Der EMT-Prozess kann in drei funktionelle Gruppen eingeteilt werden: Typ I entspricht der EMT während der Embryogenese und Entwicklung, Typ II spielt bei Fibrosenentstehung und Wundheilung eine Rolle, und Typ III beschreibt EMT-Prozesse, die bei Krebserkrankungen vorkommen und mit erhöhter Zellmigration und Invasion assoziiert sind (Kalluri and Weinberg, 2009).

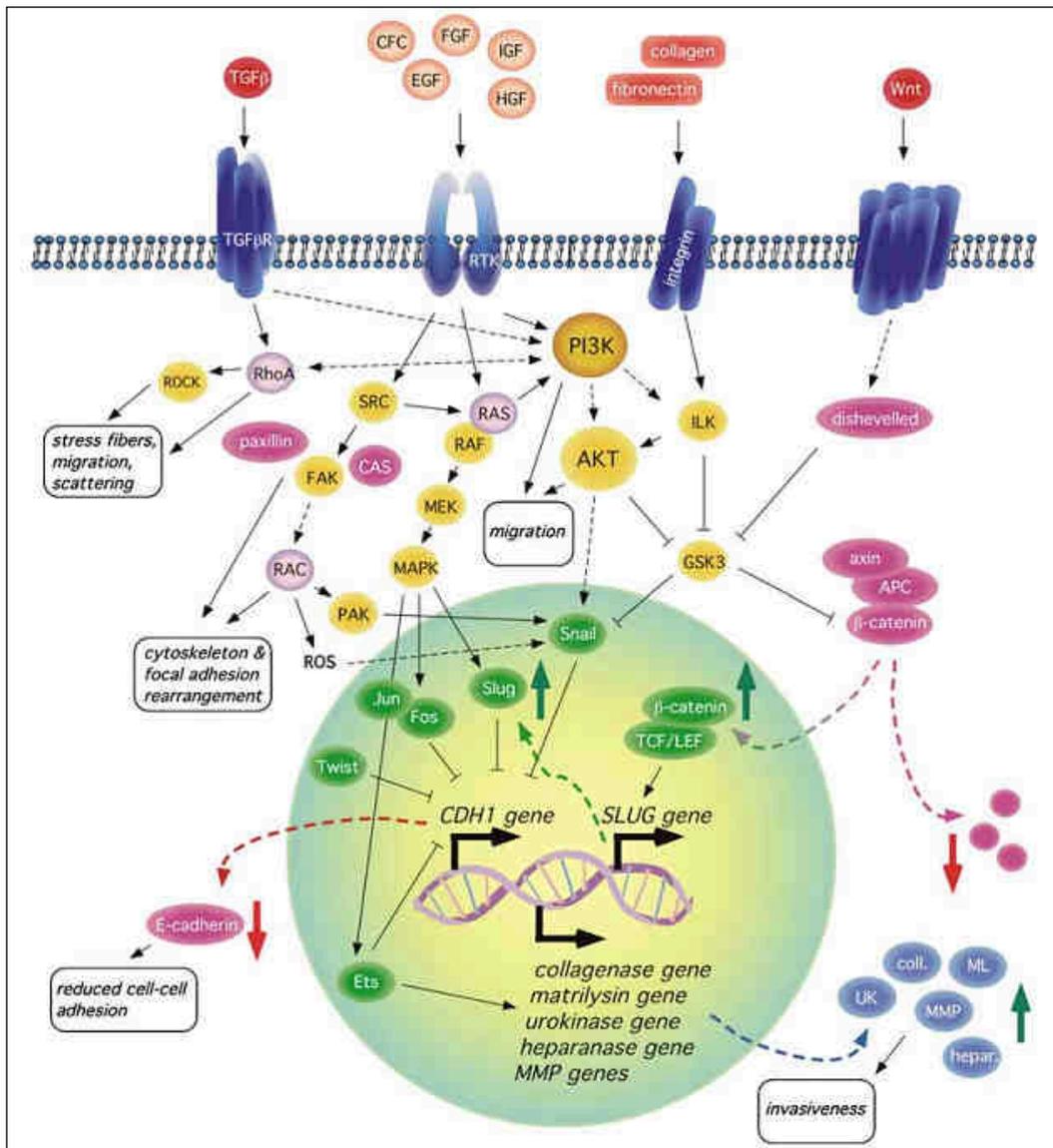
Im Allgemeinen kommt es nach Induktion der EMT zum Verlust der apikal-basalen Polarität, einhergehend mit dem Abbau von Desmosomen, *Gap-* und *Tight-Junctions* sowie beginnender Degradation der Basallamina durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) (Peinado et al., 2004; Townsend et al., 2008). Zelloberflächenproteine wie E-Cadherin (E-Cdh) und Integrine (z.B.  $\beta$ 1-Integrine) werden durch N-Cadherin (N-Cdh) und mesenchymale Integrine ersetzt, die nur transiente Zell-Zellkontakte vermitteln. Es folgt eine Umorganisation des Zytoskeletts, wobei Aktin durch Stressfasern und Keratine durch Vimentin ausgetauscht werden. Nach diesen Schritten ist die nun spindelförmige Zelle befähigt, in das umliegende Stroma bzw. in die extrazelluläre Matrix (ECM) einzuwandern (Abbildung 2) (Micalizzi et al., 2010).



**Abbildung 2: Frühe Ereignisse während der EMT**

Zu Beginn verlieren die Zellen ihre apikal-basale Polarität, damit geht der Verlust epithelialer Markerproteine einher, während die Expression mesenchymaler Proteine zunimmt. Für die Migration von Zellen ist außerdem die Degradation der Basalmembran Voraussetzung (nach Micalizzi et al., 2010).

Die Induktion von EMT scheint zelltypspezifisch und kontextabhängig zu sein und kann über verschiedene Signalwege erfolgen, denn EMT-induzierende Faktoren können unterschiedliche Effekte hervorrufen (Janda et al., 2002; Thiery, 2003). Tgf $\beta$ , ein potenter EMT-Auslöser, hat in Karzinomen eine duale Rolle inne: es agiert in frühen Läsionen als Tumorsuppressor und inhibiert das Zellwachstum (Reynisdóttir et al., 1995), entgegengesetzt dazu fördert Tgf $\beta$  die Metastasierung in späteren Stadien der Krebserkrankung (Muraoka et al., 2002; Muraoka-Cook et al., 2006). Bei der EMT-Induktion aktiviert Tgf $\beta$  nach Rezeptorbindung typischerweise den Smad- oder alternativ p38-MAPK- bzw. RhoA-Signalweg (Derynck and Zhang, 2003), während Wachstumsfaktoren wie *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) und *Epidermal Growth Factor* (EGF) durch Bindung an die entsprechenden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen den MAPK- oder Akt-Signalweg aktivieren (Strutz et al., 2002; Hung et al., 2011; Kim et al., 2011; Al Moustafa et al., 2012). ECM-Komponenten wie Kollagene können über Integrin-vermittelte Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase 2 (PTK2, auch *focal adhesion kinase*, FAK) eine epithelial-mesenchymale Transition veranlassen (Nakamura et al., 2001; Shintani et al., 2008). Auch die Spaltung des E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes durch MMPs oder ein aktivierter Wnt-Signalweg führen zur Internalisation und Relokalisation von freiem, transkriptionell aktivem  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, wodurch EMT induziert wird (Lochter et al., 1997; Blavier et al., 2010; Iwai et al., 2010).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von EMT-assoziierten Signalwegen**

EMT kann über eine Vielzahl von Signalen und Aktivierung nachgeschalteter Signalwege eingeleitet werden. Zellen, die EMT durchführen, verlieren ihren epithelialen Charakter und erhalten einen mesenchymalen Phänotyp, assoziiert mit erhöhter Migration und Invasion. RTK – Rezeptor-Tyrosin-Kinase, ROS – Reaktive Sauerstoffradikale (Larue and Bellacosa, 2005).

Die Induktion der EMT durch oben genannte Prozesse führt zur Aktivierung des sogenannten EMT-Transkriptom (Kim et al., 2002). Es kommt zur Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren wie Snai1/2, Twist1/2 und Zeb1/2 (Kalluri and Neilson, 2003; Cowin et al., 2005; Lindley and Briegel, 2010), die die Expression weiterer Gene regulieren: zum einen die Repression von epithelialen Proteinen wie E-Cadherin, Zytokeratinen, Claudinen, Desmoplakin und ZO-1, zum anderen die vermehrte Expression von mesenchymalen Proteinen, wie Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin, *Smooth-muscle actin* und Matrix-Metalloproteasen (Behrens et al., 1993; Novak et al., 1998; Li et al., 2003; Sipos and Galamb, 2012).

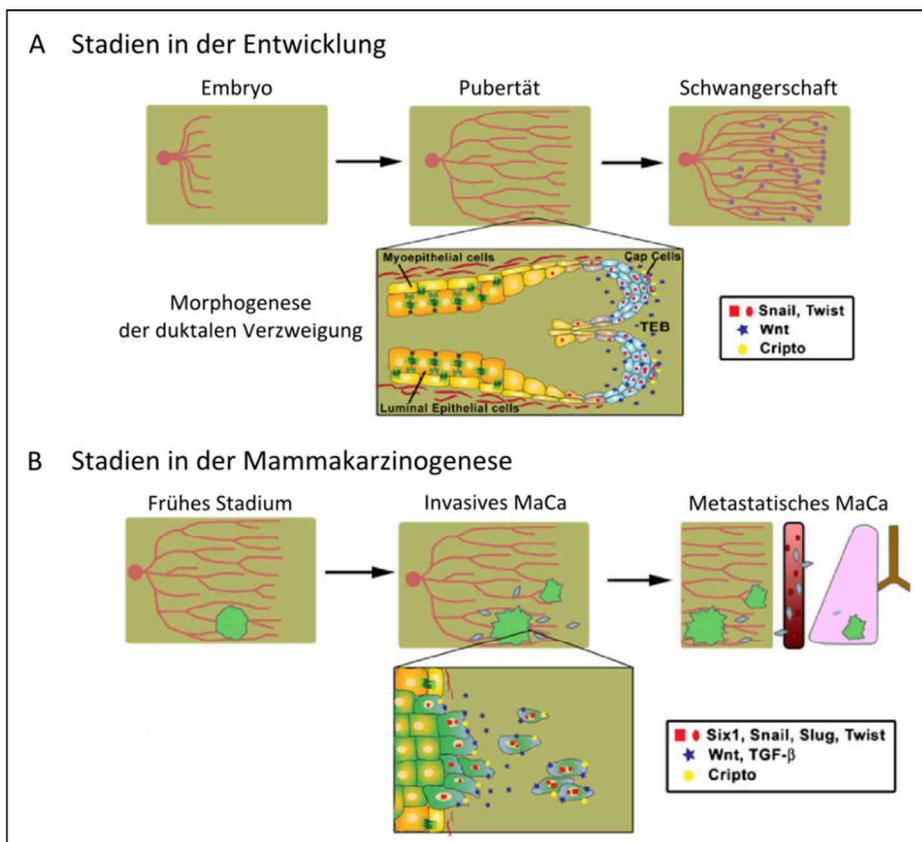
Die Repression von E-Cdh (oder funktionelle Inaktivierung durch Mutationen wie in Krebserkrankungen) scheint eines der Hauptereignisse der EMT zu sein, da das Protein für die Aufrechterhaltung des epithelialen Phänotyps wichtig ist (Behrens et al., 1993; Cowin et al., 2005). Der Verlust von E-Cdh resultiert in der Reduktion von interzellulären Kontakten und der E-Cdh-vermittelten Sequestrierung von  $\beta$ -Catenin mit dem Ergebnis, dass  $\beta$ -Catenin in den Nukleus transportiert wird und dort, komplexiert mit LEF (*Lymphoid enhance factor*), z.B. die Expression von Snai2 (auch als Slug bekannt) initiiert. (Thiery and Sleeman, 2006). Eine Zusammenfassung einiger der für die EMT-Induktion verantwortlichen Signaltransduktionswege ist in Abbildung 3 gezeigt.

Eine Konsequenz von EMT während der Tumorgenese ist die vermehrte Migration und Invasivität der malignen Zellen, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit für die Metastasierung steigt (Thiery and Sleeman, 2006). Die Hinweise auf eine Rolle der EMT während der Tumorgenese mehren sich: so wurde gezeigt, dass der Wechsel von epithelialem zu mesenchyalem Phänotyp mit der Tumorprogression und einer schlechteren Prognose korreliert (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Moody et al., 2005), dass sich bei Drüsengewebstumoren (wozu auch Brustkrebs gehört) Einzelzellen durch EMT aus dem Tumorzellverband lösen und dadurch die Invasivität erhöhen (Thiery, 2002) und dass die Manipulation der E-Cadherin-Expression *in vitro* sowohl den Phänotyp als auch das invasive Verhalten von Zellen verändert (Perl et al., 1998; Thiery, 2002; Peinado et al., 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Expression von Twist in invasiven lobulären Mammakarzinomen zur Reduktion des metastatischen Potentials *in vivo* führt. Die Überexpression von Twist hingegen führt durch Reduktion von E-Cdh und Expression mesenchymaler Marker zu gesteigerter Mobilität der Zellen (Yang et al., 2004).

### **1.2.2. EMT während der Entwicklung der Brustdrüse und der Tumorprogression**

Die Entwicklung der Brustdrüse beginnt bereits im embryonalen Stadium, in dem ein rudimentäres duktales System (Milchgänge) angelegt wird. Während Pubertät und Schwangerschaft kommt es zur Verlängerung und Verzweigung der Dukte (Abbildung 4A). Die Verlängerung der Dukte in der Pubertät beginnt mit Bildung der *Terminal end buds* (TEB) (Watson and Khaled, 2008). Ein TEB ist eine mehrschichtige epitheliale Struktur, aus der in der Entwicklung die zweilagigen Dukte aus luminalen und basalen Epithelzellen entstehen (Sternlicht et al., 2006). Auf äußere Signale hin, zu denen Wachstumsfaktoren (EGF, HGF) und aktivierte Matrix-Metalloproteasen gehören, teilen TEB sich gabelförmig (Fata et al., 2004). In der Spitze der TEB befinden sich *Cap Cells*, die Merkmale epithelialer Plastizität aufweisen:

trotz enger Zell-Zellkontakte verlieren sie die apikal-basale Polarität und es findet keine Lokalisation von  $\beta$ -Catenin zur basolateralen Domäne statt. Weiterhin sekretieren die Zellen MMPs, was zum Abbau der Basalmembran führt (Fata et al., 2004). Mit Hilfe von Genomweiten Genexpressionsanalysen wurde in TEB Zellen die verstärkte Expression bekannter EMT-Regulatoren wie Snai1 und Twist im Vergleich zu ausgereiften Dukten festgestellt (Kouros-Mehr and Werb, 2006). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass EMT-Prozesse während der Entwicklung einer Brustdrüse entscheidend sind.



**Abbildung 4: Parallele EMT-Funktionen während der normalen Entwicklung einer Brustdrüse und in der Mammakarzinogenese**

A) Während der embryonalen Entwicklung wird im Brustgewebe ein rudimentäres, duktales System angelegt, das in der Pubertät und besonders während der Schwangerschaft ausgeweitet wird und in dem weitere Verzweigungen angelegt werden. Die Expansion der Ducte durch EMT-Prozesse findet im TEB (*Terminal end bud*) statt. B) Während der Karzinogenese können Tumorzellen neue mobile und invasive Eigenschaften (EMT) erwerben, die die Ausbreitung der Zellen erlauben (Micalizzi et al., 2010).

Die Mechanismen, die es Tumorzellen erlauben, den Verbund des Primärtumors zu verlassen und an entfernten Stellen Metastasen zu bilden, sind noch nicht in Gänze verstanden (Guarino et al., 2007). Es wurde aber postuliert, dass die epithelial-mesenchymale Transition durchaus eine Möglichkeit darstellt, den Prozess der Metastasierung zu erklären. Bei verschiedenen Krebserkrankungen wurde mit Hilfe von Genexpressionsprofilen ein Verlust von E-Cdh und die erhöhte Expression von Fibronectin und Kollagen I und III gefunden (Turashvili et al., 2007).

Epitheliale Tumorzellen, die eine EMT durchführen, sind phänotypisch von Fibroblasten nicht zu unterscheiden. Sie können sich als Einzelzellen oder aber als Gruppe vom Tumor lösen und migrieren (Friedl et al., 1995; Nabeshima et al., 1999; Friedl and Gilmour, 2009). Um eine Fernmetastase zu bilden, müssen Tumorzellen zusätzlich zur Phänotypänderung die Fähigkeit erwerben, lymphatische oder hämatopoetische Gefäße zu durchwandern und anschließend wieder einen epithelialen Phänotyp annehmen zu können, um im Zielgewebe zu proliferieren (Thiery, 2002; Fidler, 2003). Deshalb wird vermutet, dass EMT auch bei der Karzinogenese ein transienter, reversibler Prozess ist (Trimboli et al., 2008).

### **1.3. Das Tumorsuppressorprotein p53**

Die Tumoringenese und -progression ist ein mehrstufiger Prozess, dessen Ursachen in genetischen und epigenetischen Veränderungen zu finden sind. Oft werden dabei Regulationsmechanismen der Wachstumskontrolle oder der Zellteilung verändert. Dadurch gewinnen Tumorzellen einen Selektionsvorteil gegenüber gesunden Zellen und können so zu Tumoren auswachsen und benachbartes Gewebe infiltrieren. Hanahan und Weinberg postulierten im Jahr 2000, dass für die Tumoringenese sechs Fähigkeiten entscheidend sind, die auch in den meisten humanen Tumorerkrankungen zu finden sind: eine von Wachstumsfaktoren unabhängige Zellproliferation, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren und Apoptose, die damit einhergehende unbegrenzte Replikationsfähigkeit, Stimulation der Angiogenese zur eigenen Nährstoffversorgung und die Fähigkeit ins umliegende Gewebe zu invadieren und in entfernte Organe zu metastasieren (Hanahan and Weinberg, 2000).

All diese Eigenschaften beruhen auf anormaler Aktivierung von Proto-Onkogenen bzw. der Inhibierung von Tumorsuppressorgenen (Hernandez-Boussard et al., 1999). Proto-Onkogene kodieren für Proteine, die in einer gesunden Zelle Wachstum, Proliferation und Differenzierung regulieren. Dazu gehören Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, G-Proteine, Transkriptionsfaktoren und Gene, die für die Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich sind. Durch Mutationen, Genamplifikationen oder auch chromosomale Rearrangements in den Proto-Onkogenen kommt es zur Expression von Proteinen, die ihre regulierende Funktion nicht mehr ausüben können und die Zellen zu unkontrolliertem Wachstum und Proliferation anregen (Bishop, 1991; Croce, 2008). Tumorsuppressoren hingegen zeigen eine inhibierende Wirkung auf Wachstum und Proliferation von Zellen. Tumorsuppressorgene wirken im Gegensatz zu Proto-Onkogenen rezessiv, und es müssen daher beide Allele inaktiviert bzw. deletiert sein, um einen Funktionsverlust und damit einhergehende Tumoringenese zu erhalten (Levine, 1993).

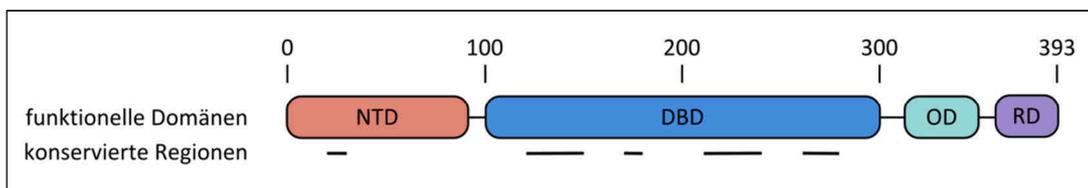
Ein Tumorsuppressorprotein, welches in humanen Krebserkrankungen häufig von Mutationen und Alterationen betroffen ist (in 50 bis 60%), ist p53 (UMD TP53 Mutation Database, 2010\_R1, Juli 2010 (UMD TP53 Mutation Database, 2010\_R1, Juli 2010, Caron de Fromentel and Soussi, 1992). Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erfolgt zumeist durch Deletionen, Trunkierungen oder auch Promotor-*silencing*, während im *p53*-Gen hauptsächlich Punktmutationen auftreten, die zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen (Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991).

Die Funktionen von p53 und mutiertem p53 sind trotz über 30 Jahren Forschung noch nicht vollständig verstanden. Aufgrund der hohen Mutationsfrequenz von p53 in Krebserkrankungen und die Partizipation von wtp53 in vielen essentiellen Prozessen ist das Interesse der Forschung an p53 ungebrochen. Dies bestätigt auch die jährlich steigende Anzahl an neuen Publikationen über das Protein.

Das p53-Protein wurde 1979 von vier unabhängigen Gruppen (DeLeo et al., 1979; Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979) entdeckt: auf der Suche nach Antwort, wie virale Tumorantigene Tumore initiieren können, wurde ein zelluläres Protein in Tumorzellen bzw. in mit Simian Virus 40 (SV40) transformierten Zellen gefunden, das mit dem großen T-Antigen (LT) des Virus Komplexe bildet. Den Namen erhielt das Protein aufgrund seines scheinbaren Molekulargewichts von 53 kDa. Da das p53 in vielen Tumorzellen überexprimiert war und sowohl mit viralen als auch mit zu diesem Zeitpunkt bekannten onkogenen Proteinen (z.B. myc und ras) interagierte, wurde eine onkogene Rolle des Proteins in der Tumorentwicklung vermutet (Eliyahu et al., 1984; Jenkins et al., 1984; Parada et al., 1984). Dies wurde erst Jahre später widerlegt, als durch Sequenzierung von cDNA-Klonen festgestellt wurde, dass für die Experimente mutiertes p53 verwendet wurde, welches im Gegensatz zum Wildtyp-p53 (wtp53) in der Lage war, in Kooperation mit anderen Onkogenen wie ras Zellen zu transformieren (Hinds et al., 1989; Harvey and Levine, 1991). Erst nach einigen Jahren wurde die besondere Bedeutung von p53 als Tumorsuppressorprotein offensichtlich: es zeigt im Gegensatz zu mutp53 antiproliferative Eigenschaften und kooperiert nicht mit ras (Eliyahu et al., 1989; Finlay et al., 1989).

Das humane *TP53*-Gen ist auf Chromosom 17 (murin: Chromosom 11) lokalisiert und weist innerhalb der Vertebraten starke Homologien auf, was für die Bedeutung des Proteins in komplexen Organismen spricht. Das Gen besteht aus 11 Exons, wobei das erste Exon nicht-kodierend ist. Das p53-Protein besteht beim Menschen aus 393 Aminosäuren (390 bei der Maus) und kann anhand seiner Funktion in vier wesentliche Domänen unterteilt werden:

N-terminal befinden sich zwei unabhängige Transaktivierungsdomänen (Aminosäuren 1-42 und 43-92), wobei die erste maßgeblich für die Aktivierung der Transkription von Zielgenen verantwortlich ist (Walker and Levine, 1996; Zhu et al., 2000; Harms and Chen, 2006). Der mittleren Bereich (Aminosäuren 101-306) umfasst die DNA-Bindedomäne, welche für die Sequenz-spezifische Bindung des p53-Proteins an die Promotor-Sequenz seiner Zielgene verantwortlich ist. Dieser Bereich ist in humanen Krebserkrankungen häufig von Mutationen betroffen (IARC-Datenbank, R15 Nov. 2010 Petitjean et al., 2007). Außerdem ist in dieser Region auch eine intrinsische 3'-5'-Exonukleasefunktion lokalisiert (Mummenbrauer et al., 1996). Am C-terminalen Ende sind mehrere funktionelle Domänen vorhanden. So ist im Bereich der Aminosäuren 307-355 die Oligomerisierungsdomäne lokalisiert, die die Komplexierung mehrerer p53-Moleküle (Dimerisierung von p53-Dimeren) und damit deren funktionelle Aktivität ermöglicht (Stürzbecher et al., 1992). In dieser Region ist ebenfalls ein Signal für den nukleären Export enthalten. Eine weitere regulatorische Domäne ist im äußeren C-terminalen Bereich (Aminosäuren 356-393) des Proteins zu finden: diese enthält sowohl ein Signal für den Transport in den Nukleus als auch einen Bereich, der für eine nicht-spezifische DNA-Bindung, z.B. im Falle beschädigter DNA, verantwortlich ist. Zusätzlich kann hierüber die DNA-Bindedomäne reguliert werden (Harms et al., 2004; Weinberg et al., 2004; Laptenko and Prives, 2006).



**Abbildung 5: Struktur von p53**

Aufbau des p53 Proteins: NTD – N-terminale Domäne mit zwei unabhängigen Transaktivierungsdomänen, DBD – DNA-Bindedomäne, OD – Oligomerisierungsdomäne und RD – regulatorische Domäne.

### 1.3.1. Regulation von p53

Unter stressfreien Bedingungen beträgt die Halbwertszeit des nukleären p53-Proteins weniger als 20 Minuten (Kubbutat et al., 1997), d.h. die Menge an p53 wird überwiegend über seine Degradationsrate reguliert. Ein erhöhter Spiegel von p53 aktiviert die Expression von *Mdm2* (*mouse double minute 2*, in Human *Hdm2*), dem Hauptregulator von p53 (Levine, 1997; Vogelstein et al., 2000). *Mdm2* kann die p53-Aktivität durch direkte Interaktion in der N-terminalen Region behindern (Momand et al., 1992; Chen et al., 1993; Picksley et al., 1994), und p53 durch Ubiquitylierung für den proteasomalen Abbau mit Hilfe seiner E3-Ligasenfunktion markieren (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Dadurch wird der p53-

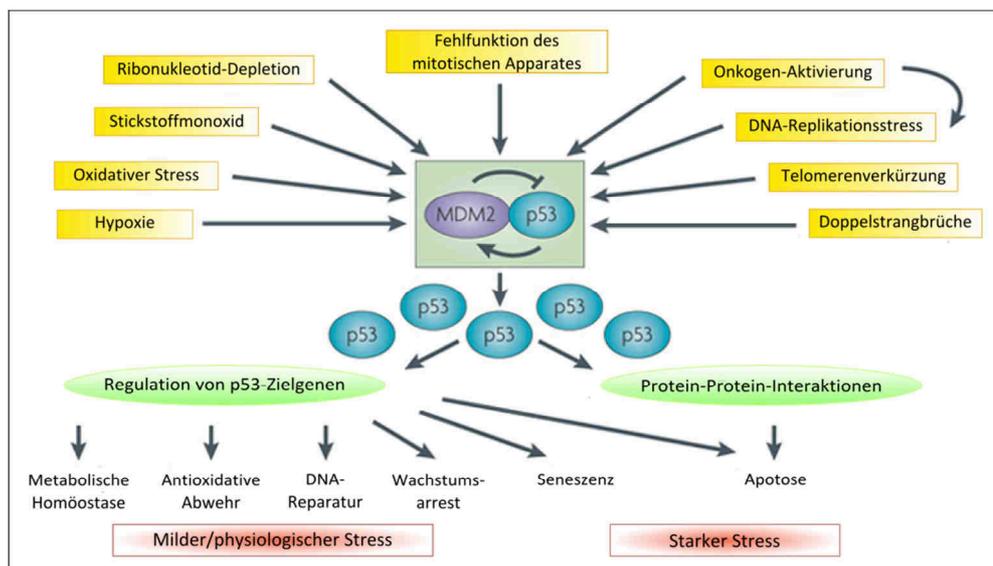
Proteinlevel auf konstant niedrigem Niveau gehalten. Da beide Proteine sich gegenseitig regulieren, sind sie über einen negativen Rückkopplungsmechanismus miteinander verknüpft (Freedman and Levine, 1999). Einige p53-Mutanten sind in der Lage, dem Regulierungsmechanismus zu entgehen: Mdm2 kann nicht mehr mit diesen Mutanten interagieren, was zu einer Akkumulation von mutp53 führt (Haupt et al., 1997; Midgley and Lane, 1997; Buschmann et al., 2000).

Als Hauptregulator für viele verschiedene Signalwege bedarf die Aktivität des p53-Proteins einer Feinregulierung. Diese erfolgt über posttranslationale Mechanismen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung. Die Modifikationen betreffen hauptsächlich den N-Terminus und das C-terminale Ende des p53-Proteins (Appella and Anderson, 2001; Brooks and Gu, 2003; Bode and Dong, 2004). Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in p53 erfolgt meist als Folge von zellulärem Stress und führt zur Stabilisierung und Aktivierung von p53. Vermittelt werden die wichtigsten Signaltransduktionswege durch ATM- und ATR-Kinasen, die durch DNA-Schäden und ionisierende Strahlung induziert werden: die ATM-Kinase (*Ataxia telangiectasia mutated*) phosphoryliert p53 an Serin 15 und aktiviert außerdem die Chk2-Kinase, die Serin 20 modifiziert. Die ATR-Kinase (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) und die nachgeschaltete Chk1-Kinase phosphorylieren p53 an verschiedenen Stellen u.a. an Serin 313 und 314 (Steegenga et al., 1996; Shieh et al., 1997; Caspari, 2000; Thompson et al., 2004; Meek and Anderson, 2009). Einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus stellt die Acetylierung von p53 dar; bevorzugt werden verschiedene Lysinreste in der C-terminalen Region modifiziert. Die Acetylierung wird von Histon-Acetyltransferasen durchgeführt, was zur Regulation der transkriptionellen Aktivität von p53 führt (Gu and Roeder, 1997; Barlev et al., 2001; Prives and Manley, 2001). Durch Ubiquitylierung von Lysinresten im C-terminalen Bereich des p53-Proteins wird die Stabilität des Proteins beeinflusst. Ursächlich hierfür ist Mdm2, welches über seine E3-Ligasenfunktion die Modifizierung vermittelt und durch mehrfache Ubiquitylierung das Protein für die Degradation markiert (Fang et al., 2000; Rodriguez et al., 2000). Neben der Polyubiquitylierung für den p53-Abbau vermittelt Mdm2 ebenso den nukleären Export von p53 und verhindert somit dessen transkriptionelle Aktivität. Dafür ist die Ubiquitylierung von einem Lysin im C-Terminus von p53 ausreichend (Freedman et al., 1999; Geyer et al., 2000; Lohrum et al., 2001; Nie et al., 2007). Sumoylierung spielt bei der Regulation der Aktivität, Lokalisation und Degradation von Zielproteinen eine ebenso wichtige Rolle. Dabei wird ein kleines, ubiquitin-ähnliches Protein (SUMO-1) an Lysinreste der Zielproteine gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass eine kovalente Bindung von SUMO-1 an Lysin 386 von p53 zur

Steigerung der Transkriptionsaktivität führt (Gostissa et al., 1999; Rodriguez et al., 1999; Muller et al., 2000; Hochstrasser, 2001).

### 1.3.2. Funktionen des p53-Proteins

Die Hauptfunktion von p53 liegt in der Erhaltung der genomischen Integrität einer Zelle. Die Aktivierung von p53 durch verschiedenste Arten von Stress (z.B. UV- und Röntgenstrahlung, DNA-Schädigungen, Aktivierung von Onkogenen, Virusinfektionen, Chemikalien, Hypoxie) führt zur Stabilisierung und Akkumulation des Proteins im Zellkern und dort zur Regulation von Zielgenen und den damit verbundenen Signalwegen (Chipuk and Green, 2006; Giono and Manfredi, 2006; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Maddocks and Vousden, 2011; Solozobova and Blattner, 2011). Seine Funktion übt p53 hauptsächlich als Transkriptionsfaktor aus, indem das Protein sequenzspezifisch an die DNA bindet und die Transkription der Zielgene aktiviert bzw. inhibiert.



**Abbildung 6: Schema der p53-Funktionen**

p53 kann durch verschiedene Stresssignale aktiviert werden und seine Tumorsuppressorfunktion durch Transkriptionskontrolle von Zielgenen bzw. Interaktionen mit Proteinen ausüben (modifiziert nach Levine and Oren, 2009).

So bewirkt p53 als Reaktion auf DNA-Schäden einen transienten Wachstumsarrest (entweder am G<sub>1</sub>- oder am G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt des Zellzyklus), indem es die Expression des Zyklin-abhängigen Kinase (CDKs)-Inhibitors p21 (G<sub>1</sub>-Arrest) oder von 14-3-3σ (G<sub>2</sub>/M-Arrest) aktiviert (el-Deiry et al., 1993; Agarwal et al., 1995; Deng et al., 1995; Waldman et al., 1995; Hermeking et al., 1997). In einer gesunden Zelle phosphorylieren die Zykline D-CDK4/6 und E-CDK2 das Retinoblastom-Protein (pRB), wodurch der pRB-Komplex mit E2F, einem weiteren

Transkriptionsfaktor, aufgelöst wird und E2F den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase vermitteln kann.

Bei einem G<sub>1</sub>-Arrest wird die Aktivität der Zyklinkomplexe D-CDK4/6 und E-CDK2 durch die Expression von p21 gehemmt (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993), E2F bleibt weiterhin an pRB gebunden, ist somit inaktiv, wodurch der Übergang in die S-Phase verzögert wird (Hinds et al., 1992; Ewen et al., 1993). In der so gewonnenen Zeit kann die Zelle DNA-Schäden vor Vollendung der Zellteilung reparieren.

Ein G<sub>2</sub>-Arrest kann durch mehrere Proteine und Mechanismen ausgelöst werden. Dazu gehört 14-3-3 $\sigma$ , welches eine dominante Rolle im Erhalt des G<sub>2</sub>-Arrests spielt und durch p53 reguliert wird. 14-3-3 $\sigma$  sequestriert Zyklin B-CDK1, und der Komplex wird in das Zytoplasma verlagert, wodurch das Zyklin inaktiv bleibt und der Eintritt in die Mitose verhindert wird (Chan et al., 1999; Laronga et al., 2000; Hermeking and Benzinger, 2006). Eine weitere Möglichkeit, einen p53-vermittelten G<sub>2</sub>-Arrest auszulösen, ist die Komplexbildung der Zykline A und B mit p21 und die damit einhergehende Inaktivierung der Zykline (Bunz et al., 1998; Dulić et al., 1998; Niculescu et al., 1998).

Bei irreparablen Schäden kann p53 den programmierten Zelltod (Apoptose) direkt (transkriptionsunabhängig) bzw. indirekt einleiten (Yonish-Rouach et al., 1991; Clarke et al., 1993). Zu einer transkriptionsunabhängigen Aktivierung der Apoptose führt die Wechselwirkung von p53 mit Proteinen der pro-apoptotischen Bcl-Familie (z.B. Bax, Bak), dies setzt aber eine Akkumulation von p53 im Zytoplasma bzw. an den Mitochondrien voraus (Kuwana and Newmeyer, 2003; Moll et al., 2005). P53 kann Bax direkt oder indirekt aktivieren, indem es mit Bcl-x<sub>L</sub> interagiert, was zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteinen wie Bid führt, die dann wiederum Bax aktivieren (Chipuk and Green, 2004; Chipuk et al., 2004). Aktiviertes Bax führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, was zur Initiierung der Apoptose führt (Kluck et al., 1997; Jürgensmeier et al., 1998).

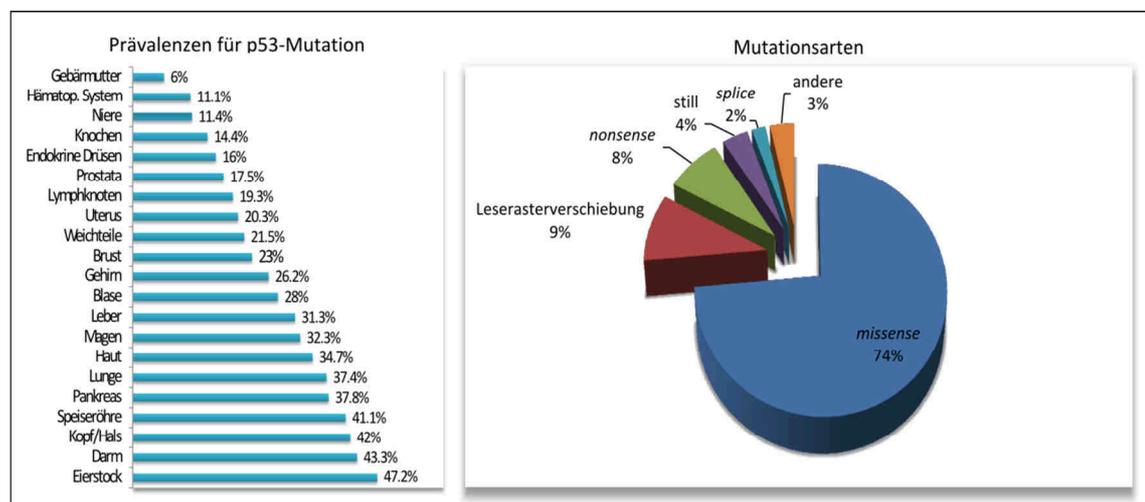
Darüber hinaus kann p53 Apoptose durch Regulation der Expression von pro-apoptotischen Genen indirekt einleiten (Vousden and Lu, 2002). Zu diesen Genen gehören die Oberflächenrezeptoren CD95/Apo-1/Fas und Killer/DR5, deren Transkription bei DNA-Schädigung aktiviert wird (Owen-Schaub et al., 1995; Wu et al., 1997; Müller et al., 1998). Durch Ligandenbindung werden die Rezeptoren aktiviert, die wiederum nachfolgende Caspasen aktivieren, die den apoptotischen Phänotyp auslösen (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996).

Neben den Tumorsuppressorfunktionen wurden in den letzten Jahren weitere Funktionen von p53 entdeckt: so spielt es eine Rolle bei der Zelldifferenzierung, Erhaltung von Stammzeleigenschaften, Regulation des Zellmetabolismus, Adhäsion und Zell-Zell-

kommunikation sowie in der Immunantwort (Menendez et al., 2009; Feng et al., 2011; Madan et al., 2011; Maddocks and Vousden, 2011; Solozobova and Blattner, 2011)

### 1.3.3. Mutationen im *p53*-Gen

Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* sind oft ein Merkmal verschiedener Krebserkrankungen. Die Prävalenz für somatische *p53*-Mutationen variiert je nach Krebsart zwischen 6% (Gebärmutterkrebs) und 47% (Eierstockkrebs). Humane Mammakarzinome zeigen in 23% der Fälle Mutationen im *p53*-Gen. Am häufigsten (74%) treten Punktmutationen auf, die zum Austausch einer Aminosäure führen und damit die Funktion des Tumorsuppressors beeinträchtigen. In knapp 10% der Fälle kommt es zur Verschiebung des Leserasters oder zu *nonsense*-Mutationen (8%) (IARC Datenbank R15, Nov. 2010, Petitjean et al., 2007).



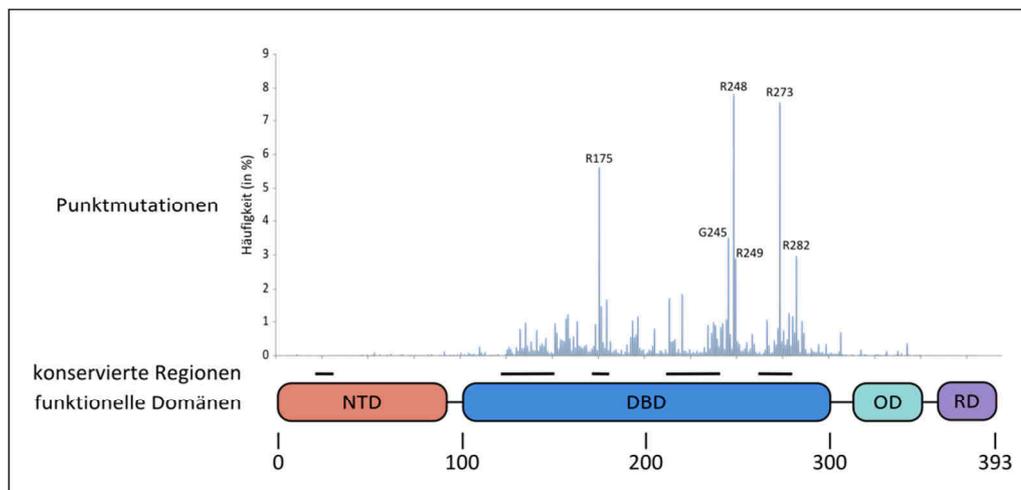
**Abbildung 7: Prävalenzen für somatische *p53*-Mutationen in verschiedenen Krebserkrankungen und Mutationsarten im *p53*-Gen**

Die Prävalenzen für somatische *p53*-Mutationen schwanken je nach Krebserkrankungen zwischen 10% und 50% (linke Abb.), dabei treten besonders häufig *missense*-Mutationen im *p53*-Gen auf (rechte Abb.) (IARC Datenbank R15, Nov. 2010, Petitjean et al., 2007).

Der Austausch nur einer Aminosäure in der ansonsten intakten Proteinsequenz kann bereits zum Verlust der *p53*-Tumorsuppressorfunktion in Zellen führen. Über 90% der Mutationen betreffen die DNA-Bindedomäne, wodurch das Protein in seiner sequenzspezifischen DNA-Bindung eingeschränkt wird. 30% der *p53*-Mutationen in Krebserkrankungen beschränken sich sogar auf wenige Aminosäuren, die sogenannte *Hotspot*-Mutationen (Abbildung 8) (Levine et al., 1995; Szymańska and Hainaut, 2003). Dazu gehören R175 (5,6%), G245 (3,5%), R248 (7,8%), R249 (2,9%), R273 (7,6%) und R282 (3%). Die offensichtliche Hypermutabilität der *Hotspots* ist zum einen bedingt durch umgebene CpG-Inseln, in denen Cytosin oft methyliert ist und durch Desaminierung eine C-zu-T-Transition stattfindet (Rideout et al., 1990) und zum anderen

handelt es sich bei den betroffenen Aminosäuren hauptsächlich um Arginine, die eine Rolle beim direkten Kontakt des Proteins mit der Ziel-DNA spielen (z.B. R248 und R273), so dass eine Substitution dieser eine geringere Bindeaffinität verursacht (Cho et al., 1994; Szymańska and Hainaut, 2003).

Basierend auf ihrem Einfluss auf Struktur und Funktion von p53 können die Mutationen in zwei Gruppen unterschieden werden: bei DNA-Kontaktmutationen (wie z.B. R248W und R273H) führt der Aminosäureaustausch zum Verlust der Fähigkeit, an die DNA zu binden und dementsprechend transkriptionell zu wirken. Der Effekt auf die Konformation ist gering. Währenddessen bewirkt der Austausch einer Aminosäure bei Strukturmutationen (z.B. R175H) eine deutliche Konformationsänderung, wodurch eine Bindung von mutiertem p53 (mutp53) an die DNA verhindert wird (Sigal and Rotter, 2000). Alle *Hotspot*-Mutationen führen zum Verlust der Tumorsuppressorfunktion des Wildtyp-Proteins, z.B. verliert p53 mit dem Verlust der DNA-Bindefähigkeit auch seine transkriptionelle Aktivität für seine Zielgene, die u.a. bei der Schadensantwort eine wichtige Rolle spielen (Hollstein et al., 1991; Kim and Deppert, 2006).



**Abbildung 8: Verteilung der Mutationshäufigkeit in den Codons von p53**

Es ist die Verteilung und Häufigkeit der Punktmutationen (n=22356) im p53-Gen gezeigt. Die DNA-Bindedomäne (DBD) ist auffallend häufig betroffen (IARC-Datenbank R15, Nov. 2010, Petitjean et al., 2007).

Im Gegensatz zu wtp53 weist mutiertes p53-Protein eine höhere Stabilität auf und ist in Tumoren oftmals stark akkumuliert (Rotter, 1983; Iggo et al., 1990; Bártek et al., 1991).

Für die Stabilisierung von mutp53 scheinen neben den Mutationen weitere Veränderungen in den Tumorzellen notwendig zu sein, wobei genaue Mechanismen noch unklar sind (Terzian et al., 2008; Brosh and Rotter, 2009; Goh et al., 2011). Häufig führt die Mutation im p53-Gen eines Allels zunächst zu einem partiellen oder auch kompletten Funktionsverlust (sog. *Loss of function* – LoF) des mutierten Proteins. Darüber hinaus kann wtp53 durch Tetramerisierung

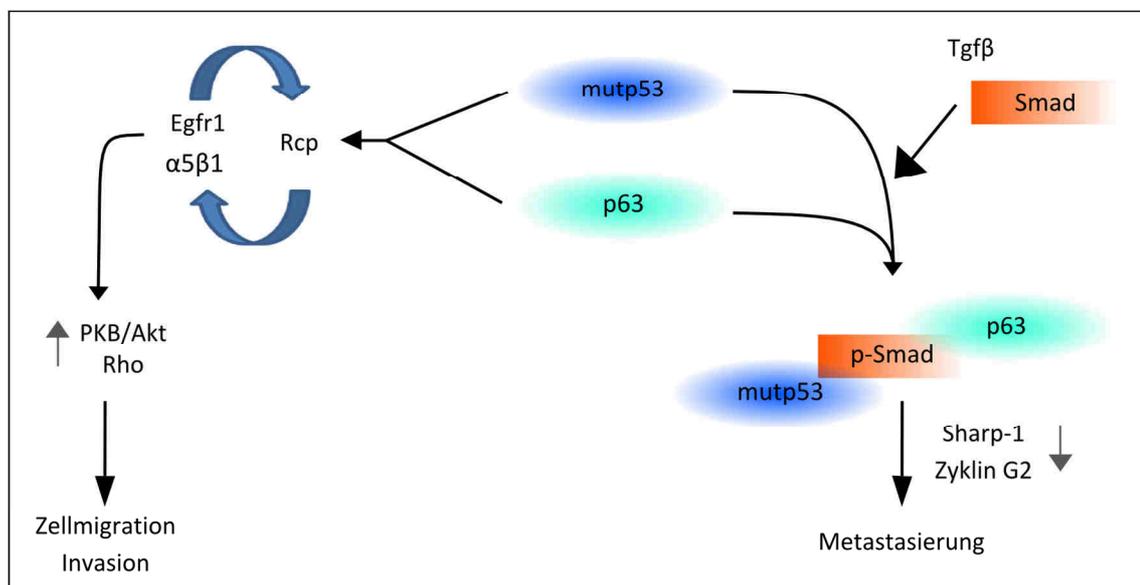
mit mutp53 funktionell inaktiviert werden (dominant-negativer Effekt – DN), was jedoch von einem Überschuss der p53-Mutante abhängig ist (Kern et al., 1991; Milner and Medcalf, 1991; Sigal and Rotter, 2000; Nicholls et al., 2002; Chan et al., 2004). Während der Tumorentwicklung kommt es dann oftmals zum Verlust des verbliebenen p53-Allels durch Deletion (LOH – *Loss of heterozygosity*) oder Mutation, was mit dem kompletten Verlust der Schutzfunktionen von p53 einhergeht.

Neben dem Funktionsverlust wurde für mutiertes p53 bereits 1993 ein Zugewinn an onkogenen Funktionen (sog. *Gain of function* – GoF) postuliert (Dittmer et al., 1993). Zahlreiche Studien beschrieben neue mutp53-abhängige Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*. So wurde mittels Zellkulturexperimenten beobachtet, dass mutp53 unempfindlich gegenüber Apoptosesignale ist: der Effekt der c-myc induzierten Apoptose ist durch die Expression von mutp53 in Blutzellen reduziert (Lotem and Sachs, 1995) und auch gegenüber Apoptose, vermittelt durch DNA-Schäden, weist mutp53 ein weniger sensitives Verhalten auf (Li et al., 1998). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von verschiedenen p53-Mutanten (R175H, R273H) und erhöhte Resistenzen gegen Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Cisplatin oder Etoposid beobachtet (Aas et al., 1996; Blandino et al., 1999; Matas et al., 2001). In weiteren Experimenten wurde zusätzlich eine Korrelation der mutp53-Expression mit einem verbesserten Zellwachstum und Überleben nachgewiesen (Cadwell and Zambetti, 2001; Lim et al., 2009). Aber von essentieller Bedeutung sind *in vivo* Studien, mit deren Hilfe die biologischen Eigenschaften des mutp53-abhängigen GoF im komplexen System aufgeklärt werden können. Überexpression von p53-*Hotspot*-Mutationen in p53-null Zellen (murine Fibroblasten, humane T-Zellen oder Osteosarkomzellen) führte nach Transplantation in Nacktmäuse zu gesteigerter Tumorbildung (Taylor et al., 1992; Dittmer et al., 1993; Hsiao et al., 1994; Lányi et al., 1998). Transgene Mäuse mit gewebspezifischer mutp53-Expression in den Brustdrüsen oder in der Lunge offenbarten einen aggressiveren Phänotyp, der mit erhöhter Malignität, Invasivität und Metastasierung einherging (Duan et al., 2002, 2009; Heinlein et al., 2008).

Mechanismen, die für einen mutp53-vermittelten GoF-Phänotyp verantwortlich sind, sind Bestandteil intensiver Forschung. Für die Ausübung der mutp53-Funktion werden zwei wesentliche Möglichkeiten diskutiert: zu einem die Interaktion mit DNA und zum anderen über Protein-Protein-Wechselwirkungen. Zahlreiche Publikationen wiesen eine transkriptionelle Aktivität für mutiertes p53 nach. Es wurde gezeigt, dass es die Expression verschiedener Gene, die u.a. in Apoptose oder Proliferation involviert sind, reguliert. Dazu gehört z.B. die Aktivierung von *Nfkb2* (Deb et al., 2002; Weisz et al., 2007), *Egr1* (Weisz et al., 2004), *Zyklin A* und *B1*, *Cdk*, *Cdc25c* (Di Agostino et al., 2006). Darüber hinaus ist mutp53 ebenso in der Lage,

die Expression von pro-apoptotischen Genen zu supprimieren, wie z.B. *CD95/Fas/Apo1* (Gurova et al., 2003), *Tgfr2* (Kalo et al., 2007) und *Caspase-3* (Wong et al., 2007) sowie klassische wtp53-Zielgene wie *p21*, *gadd45* und *PTEN* (Vikhanskaya et al., 2007).

Ein Mechanismus, der auf die Wechselwirkung von mutp53 mit anderen zellulären Proteinen beruht, ist die Interaktion mit den p53-Familienmitgliedern p63 und p73. Beide Proteine agieren ebenfalls als Transkriptionsfaktoren, die zum Teil den Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion ausgleichen können (Flores et al., 2005; Deyoung and Ellisen, 2007). Durch direkte Bindung von mutp53 an einige p63- bzw. p73-Isoformen werden diese in ihrer Funktion inaktiviert (Marin et al., 2000; Gaiddon et al., 2001; Strano et al., 2002; Muller et al., 2009). So wurde gezeigt, dass mutantes p53 die Aktivität von p63 inhibiert, so dass p63 nicht mehr *Rab-coupling protein* (Rcp)-Expression inhibieren konnte, was zu einem verstärkten Recycling von Itga5 und Egfr führt. Dies wiederum aktiviert Rho und PKB/Akt und führt somit zu verstärkter Zellmigration und Invasion (siehe Abbildung 9, linke Seite). Darüber hinaus können weitere Proteine in die Komplexe miteinbezogen werden, wie z.B. Smad-Proteine oder NF- $\kappa$ B, die eine indirekte Interaktion von mutp53 mit p63/p73 gewährleisten, was mit einer erhöhten Invasivität und Metastasierung korreliert (Adorno et al., 2009; Liu et al., 2011; Muller et al., 2011).



**Abbildung 9: Interaktion von mutp53 mit p63**

Linke Seite: p63 inhibiert die Rcp-Aktivierung, wodurch Integrine und Egfr nicht recycelt werden. Durch mutp53 ist p63 inaktiviert, was zur Erhöhung des Rezeptorrecyclings führt. Dadurch werden Rho und PKB/Akt aktiviert, was die Migration und Invasion fördert. Rechte Seite: Nach Tgf $\beta$ -Induktion erfolgt die Smad-Phosphorylierung. P-Smad vermittelt die Bindung zwischen mutp53 und p63, was zu erhöhter Expression von Sharp-1 und Zyklin G2 führt. Dies bewirkt eine vermehrte Metastasierung (modifiziert nach Melino, 2011). Rcp – Rab-coupling protein, PKB – Proteinkinase B.

Am Beispiel der Smad-Beteiligung wurde nachgewiesen, dass Tgf $\beta$ -Stimulation zur Phosphorylierung von Smad2 führt, dieses unterstützt die Bindung von p63 und mutp53<sup>R175H</sup> in einem ternären Komplex. Dadurch wird die Suppressorfunktion von p63 gehemmt. Dies geht mit einer Reduktion der Expression weiterer Metastasierungssuppressoren (Sharp-1 und Zyklin G2) einher, wodurch das Metastasierungspotential erhöht wird (Adorno et al., 2009).

#### 1.3.4. P53 in Mammakarzinomen

In humanen Mammakarzinomen werden in ca. 23% aller Fälle Mutationen im *p53*-Gen gefunden, die hauptsächlich in der DNA-Bindedomäne lokalisiert sind (Abbildung 8). In verschiedenen Studien wurden Korrelationen von somatischen p53-Mutationen mit schlechter Prognose nachgewiesen (Pharoah et al., 1999; Olivier et al., 2006). Olivier und Kollegen untersuchten den Funktionsgewinn (GoF) von mutp53-Expressionen und deren Relevanz als prognostischer Marker bei knapp 1.800 Brustkrebspatientinnen. Sie konnten zeigen, dass Mutationen der DNA-Bindedomäne generell mit einer schlechteren Prognose korrelieren als Mutationen, die andere Bereiche des Gens betreffen. Am deutlichsten war der negative Effekt von mutp53 bei der spezifischen *Hotspot*-Mutation R248W und Mutationen der Aminosäure an Position 179 zu sehen. Die Überlebensrate ist bei Patientinnen mit dieser Mutation drastisch verringert (Olivier et al., 2006). Zusätzliche Studien konnten eine Korrelation zwischen mutp53-Expression und hohem Tumor-Malignitätsgrad, Verlust von Hormonrezeptoren und bereits von Tumorzellen befallene Lymphknoten zeigen (Ferrero et al., 2000; Overgaard et al., 2000; Turner et al., 2000). Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen p53-Mutationen und erhöhter genetischer Instabilität (Eyfjörd et al., 1995; Jong et al., 2004) sowie gesteigertem Proliferationsverhalten anhand erhöhter Ki-67- oder Zyklin-E-Expression in den Tumorzellen gefunden (Chappuis et al., 1999; Lindahl et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde eine Korrelation zwischen p53-Mutationen und *ERBB2*-Amplifikationen im Tumor mit einem erhöhten Risiko für Rezidive bzw. einer geringen Überlebensdauer festgestellt (Bull et al., 2004). Die Entwicklung von Mikroarrays zur Analyse der globalen Genexpression führte zu einer molekularen Charakterisierung von Brusttumoren, die zur Prognostik herangezogen werden kann. In einer der ersten Studien wurden anhand ihrer Genexpression verschiedene Tumorsubgruppen definiert, deren Genprofile mit dem klinischen Ausgang korrelierten. Dabei waren p53-Mutationen mit den Profilen assoziiert, die mit einem schlechtem Ausgang korrelierten (Sørli et al., 2001). Darüber hinaus wurde anhand der Genexpressionsanalysen gezeigt, dass Mutationen im *TP53*-Gen vornehmlich mit der Subgruppe der basal-ähnlichen Mammakarzinome assoziiert sind. Miller und Kollegen entdeckten mittels Genexpressionsanalyse ein Set von 22 Genen, anhand deren Expression zwischen Tumoren mit

Wildtyp- und mutiertem p53 unterschieden werden konnte. Sie zeigten außerdem, dass die Expression von wtp53 mit einer besseren Überlebensrate korrelierte (Miller et al., 2005). Die Identifikation von p53-Mutationen und deren Genexpressionssignatur beinhaltet demnach eine zusätzliche prognostische Aussagekraft.

#### 1.4. WAP-T Mausmodell zur Analyse des Einflusses von mutiertem p53

Um Tumorgenese, -progression und Metastasierung in ihrer vollen Komplexität verstehen zu können, sind Versuche in einem *in vivo* Modell unumgänglich. Ein murines Modell (*Mus musculus*) bietet den Vorteil, dass sein Genom dem des Menschen ähnelt, es eine hohe Reproduktionsrate hat und schnell geschlechtsreif wird, so dass der Effekt genetischer Modifikationen über mehrere Generationen beobachtet werden kann. Aufgrund ihres Inzucht-Charakters kann bei Studien mit Mäusen der Effekt der intrinsischen genetischen Heterogenität umgangen werden, was die Erforschung humaner Erkrankungen erleichtert. Der für diese Arbeit verwendete BALB/c-Stamm neigt zur Entwicklung von spontanen Mammakarzinomen aufgrund einer Mutation im *Cdkn2a*-Gen (Kuperwasser et al., 2000; Sherr, 2001). Aufgrund zweier sich überlagernder Leseraster kodiert das Gen zwei verschiedene Tumorsuppressoren: p16<sup>INK4a</sup> und p19<sup>ARF</sup> (human: p14<sup>ARF</sup>). Diese unterscheiden sie sich im ersten Exon, während das zweite identisch ist. P16<sup>INK4a</sup> interagiert mit den Zyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6), wodurch deren Fähigkeit zur Interaktion mit D-Zyklinen gestört wird. Das bewirkt, dass das pRB-Protein nicht phosphoryliert und somit ein G<sub>1</sub>-Arrest eingeleitet wird. P19<sup>ARF</sup> inhibiert Mdm2 durch Bindung, wodurch p53 stabilisiert und transaktiviert wird, was zur p53-abhängigen Apoptose führt (Quelle et al., 1995; Sherr, 2001).

Um den Effekt von p53-Mutanten auf die Tumorprogression und Metastasierung zu untersuchen, wurden die in der Abteilung Tumorstudiologie des Heinrich-Pette-Instituts etablierten WAP-TxWAP-mutp53 Mausmodelle verwendet (Schulze-Garg et al., 2000; Krepulat et al., 2005).

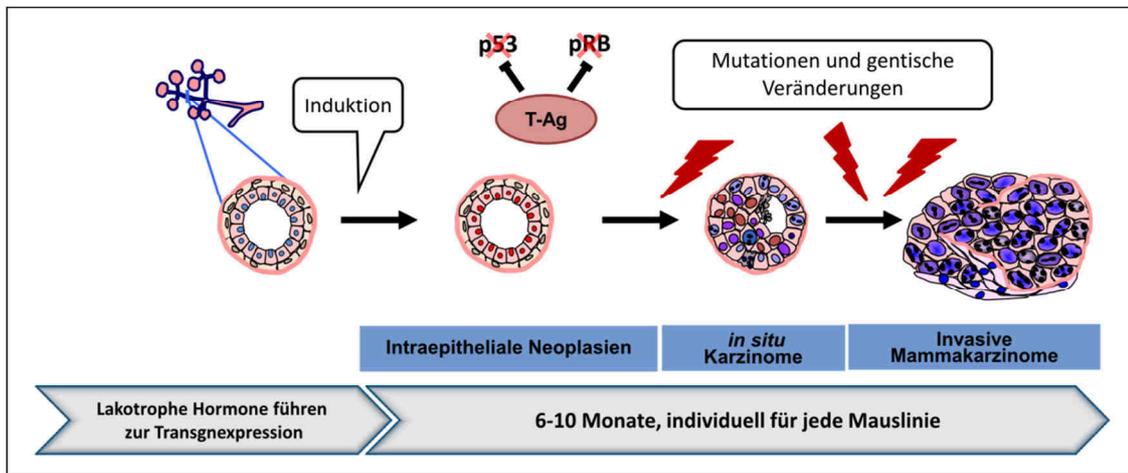
WAP-mutp53-transgene Mäuse exprimieren eine von zwei der p53-Mutationen, die häufig in Mammakarzinomen vorkommen: entweder R245W (human 248) oder R270H (human 273). Bei den Mutationen wurde Arginin (R) durch Tryptophan (W) bzw. Histidin (H) ersetzt. Um mutantes p53 von wtp53 zu unterscheiden, wurde ein HA-Tag verwendet, der nach dem p53-Stoppocodon über einen flexiblen Linker an die DNA-Sequenz kloniert wurde (Krepulat et al., 2005). Dadurch kann das mutierte p53 sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene von dem endogenen wtp53 unterschieden werden. In früheren Experimenten in der Abteilung konnte gezeigt werden, dass die Expression von mutanten p53 nicht ausreicht, um Tumorwachstum zu

initiieren (Krepulat et al., 2005; Heinlein, 2006). Aus diesem Grund wurden durch Verpaarungen von monotransgenen WAP-mutp53 und WAP-T Mäusen bitransgene Linien (WAP-T x WAP-mutp53) generiert, die neben dem mutp53 zusätzlich die „frühe“ Region des Simian Virus 40 (SV40) tragen.

Diese Region kodiert für drei Proteine, die durch alternatives Spleißen entstehen: großes T-Antigen (T-Ag), kleines T-Antigen (st) und 17kT-Protein. Aufgrund ihrer transformierenden Fähigkeiten, die überwiegend auf Protein-Protein-Interaktionen basieren, wurden sie als Onkogene klassifiziert. Das große T-Antigen komplexiert die zellulären Proteine p53, pRB p107, p130, CBP/p300 und RASSF1A (Zerrahn and Deppert, 1993; Stubdal et al., 1996; Ahuja et al., 2005), was für wtp53 und pRB eine funktionelle Inaktivierung zur Folge hat und somit eine Null-Situation generiert (Sheng et al., 2000; Chen and Hahn, 2003; Voorhoeve and Agami, 2003). Dadurch werden Apoptose und Zellzyklus-Arretierung verhindert mit Folge der erhöhten Proliferation. Das kleine T-Ag (st) unterstützt die Transformation von Zellen durch Bindung an die Protein-Phosphatase pp2A und die damit einhergehende Modifizierung der Aktivität, wodurch Komponenten der Notch-, Wnt- und Hedgehog-Signalwege aktiviert werden (Chen and Hahn, 2003; Chen et al., 2004; Skoczylas et al., 2005; Ali-Seyed et al., 2006). 17kT-Protein interagiert, dem großen T-Ag ähnlich, mit pRB und p130 und nimmt dadurch Einfluss auf die Zellzyklus-Regulation (Boyapati et al., 2003). Die genauen Mechanismen sind aber noch ungeklärt.

Im oben erwähnten Mausmodell befinden sich beide Transgene unter Kontrolle des murinen *whey acidic protein* (WAP)-Promotors. Dieser erlaubt die gezielte Induktion einer lokal-spezifischen Transgenexpression in Epithelzellen im murinen Brustgewebe (Schulze-Garg et al., 2000; Krepulat et al., 2005). Dadurch ist eine normale Entwicklung der Mäuse, vergleichbar zu Wildtyp-BALB/c Mäusen, gewährleistet. Erst während der späten Schwangerschaft und der Laktation wird der Promotor durch laktotrophe Hormone wie Prolaktin und Östrogen aktiviert und initiiert die Expression der Transgene ausschließlich in Mammaepithelzellen. Für die T-Ag-Expression variiert die Anzahl der T-Ag-positiven Zellen zwischen 5-100% (Schulze-Garg et al., 2000). Nach der Rückbildung des Mammagewebes nach Abschluss der Laktation (Involution) verbleibt eine kleine Population epithelialer Zellen im Mammagewebe, die das T-Ag Hormon-unabhängig weiter exprimiert. Durch Inaktivierung von p53 und pRB mittels T-Ag und Akkumulation von weiteren genetischen Veränderungen entwickeln sich aus diesen Zellen Dysplasien, Hyperplasien und intraepitheliale Neoplasien (z.B. duktales *in situ* Karzinom), die aufgrund ähnlicher Morphologie mit humanen Läsionen vergleichbar sind (Schulze-Garg et al., 2000). Zusätzliche Mutationen führen in einigen wenigen dieser Läsionen innerhalb von 6-10

Monaten zu invasiven, aber nur gering metastasierenden Mammakarzinomen (Jannasch et al., 2009).



**Abbildung 10: Schema der Tumorentstehung in dem WAP-T Mausmodell**

Laktotrophe Hormone führen zur Expression des großen T-Ag, dieses komplexiert wtp53 und pRB, so dass eine Null-Situation entsteht. Es kommt zu Mutationen und genetischen Veränderungen in den Zellen, die zur Entstehung von Mammakarzinomen führen.

Für die Studien eines mutp53-vermittelten Funktionszugewinns während der Mammakarzinogenese wurde das induzierbare WAP-T-NP8 Mausmodell verwendet, das durch SV40 T-Ag-Expression die Entstehung von Mammakarzinomen induziert. Gleichzeitig führt die T-Ag-Expression zur funktionellen Inaktivierung von wtp53 durch Komplexbildung, wodurch eine Null-Situation für p53 generiert wird (Schulze-Garg et al., 2000). Durch zusätzliche Expression von mutiertem p53 (mutp53<sup>R245W</sup>, mutp53<sup>R270H</sup>) im bitransgenen WAP-T-NP8xWAP-mutp53 Modell kann somit der onkogene Funktionszugewinn zweier p53-Mutanten auf die Malignität der Tumore spezifisch untersucht werden. Da beide Transgene unter Kontrolle des WAP-Promotors stehen, kann die Transgenexpression gezielt induziert werden und beschränkt sich auf adulte Epithelzellen der murinen Brustdrüsen. Dadurch ist eine normale Entwicklung des Brustgewebes ohne Einfluss der Transgene gewährleistet und simuliert damit eher die Situation im Menschen.

## 2. Problemstellung

Mammakarzinome stellen die häufigsten Krebserkrankungen in der weiblichen Bevölkerung dar. Im Jahr 2010 wurden weltweit 1,6 Mio. Neuerkrankungen diagnostiziert, die Letalität beträgt 14% innerhalb der ersten fünf Jahre. Da die Brust kein lebenswichtiges Organ ist, wird die Sterberate hauptsächlich durch Folgeerkrankungen wie z.B. Metastasierung verursacht. Anhand dieser Zahlen wird deutlich, dass das Verstehen der molekularen Grundlagen der Tumorentwicklung und der damit einhergehenden Metastasierung essentiell ist, um verbesserte Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

In knapp 25% aller Mammakarzinomfälle weist das Tumorsuppressorgen *TP53* eine Mutation auf. Bestimmte Mutationen korrelieren dabei mit einer schlechteren Prognose (Olivier et al., 2006). Hierbei werden Zusammenhänge einerseits mit Verlusten der tumorsuppressiven Funktionen aber andererseits hauptsächlich mit einem onkogenen Funktionszugewinn (*Gain of function*) von mutiertem p53 (mutp53) vermutet.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von zwei häufig bei Brustkrebs auftretenden p53-*Hotspot*-Mutationen (R248W und R273H) auf die Progression, Malignität und Metastasierung der Tumore in dem gut charakterisierten WAP-T-Mausmodell zu bestimmen. Dabei sollten molekularbiologische Untersuchungen mögliche Mechanismen, die für einen GoF von mutp53 verantwortlich sein könnten, aufklären. Für die Beantwortung dieser Fragestellung sollte zunächst ein phänotypischer Vergleich der monotransgenen WAP-T-NP8 Linie mit den bitransgenen WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> und WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R270H</sup> Linien hinsichtlich des Überlebens, der Tumorklassifikation, der Vaskularisierung und der Metastasierung durchgeführt werden. Mögliche Mechanismen sollten durch Mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen ermittelt werden und es so erlauben, eine mutp53-vermittelte Gensignatur zu finden.

Anhand dieser Signatur sollte in weiteren Untersuchungen die Rolle einzelner Zielgene aufgeklärt werden. Hierfür sollten in dieser Arbeit tumorigene Zelllinien aus WAP-T Tumoren generiert werden, die (i) die phänotypische Heterogenität der Primärtumore *in vitro* und *in vivo* widerspiegeln und (ii) durch genetische Manipulation bestimmte Aspekte eines mutp53-GoF simulieren können. Durch Transduktion dieser Zelllinien mit ausgewählten Zielgenen aus der Genexpressionsanalyse sollte Einfluss auf Mechanismen der Metastasierungsprozesse genommen werden und somit eine Modulation der Disseminierungs- und Metastasierungs-eigenschaften der Zellen *in vivo* erreicht werden. Anhand dieser Untersuchungen sollte gezeigt werden, ob mutp53 einen GoF in der Metastasierung ausübt, und ob die Modulation von mutp53-abhängigen Genen den Prozess beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag für ein besseres Verständnis der Funktion von mutp53 im Metastasierungsprozess und für die Entwicklung neuer Therapeutika leisten.

### 3. Material

#### 3.1. Mausstämme und Zelllinien

##### 3.1.1. Mausstämme

WAP-T-NP8 Mäuse wurden in einem BALB/c Hintergrund generiert (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000). Diese transgene Mauslinie trägt die frühe Gen-Region des SV40-Virus, welche mit einem 33 bp großen Epitop aus dem Nukleokapsid-Protein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV NP-Epitop) C-terminal fusioniert ist. Die WAP-T-NP8 Mäuse weisen eine intermediäre T-Ag-Expression auf: ca. 50% bis 60% der laktierenden Zellen sind T-Ag positiv. Die T-Ag-Expression wird für die Induktion von Mammakarzinomen im murinen Brustgewebe genutzt. Für die Generierung von bitransgenen Mäusen wurde die WAP-T-NP8 Linie mit verschiedenen monotransgenen WAP-mutp53<sup>R245W</sup> oder WAP-mutp53<sup>R270H</sup> Linien (beschrieben in Krepulat et al., 2005) gekreuzt. Die bitransgenen Mauslinien unterscheiden sich nur anhand der mutp53-Expressionsstärke während der Laktation. Beide Transgene befinden sich unter der Kontrolle des murinen WAP-Promotors.

**Tabelle 1: Mauslinien und deren spezifische mutp53-Expression**

Mauslinien	mutp53- Expressionslevel	Abkürzung
WAP-T-NP8	∅	NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R245W</sup> -W10	hoch	W10-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R245W</sup> -W1	mittel	W1-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R245W</sup> -W4	gering	W4-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R270H</sup> -H8	hoch	H8-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R270H</sup> -H22	sehr gering	H22-NP8

##### 3.1.2. Eukaryotische Zellen

G-2	murine Mammakarzinom-Zelllinie aus einem undifferenzierten bitransgenen Tumor (WAP-T x WAP-mutp53 <sup>R270H</sup> ) (Wegwitz et al., 2010)
H8N8	murine Mammakarzinom-Zelllinie aus einem undifferenzierten bitransgenen Tumor (WAP-T-NP8 x WAP-mutp53 <sup>R270H</sup> )
H22N8	murine Mammakarzinom-Zelllinie aus einem undifferenzierten bitransgenen Tumor (WAP-T-NP8 x WAP-mutp53 <sup>R270H</sup> )
293T	humane embryonale Nierenzellen, konstitutive Expression von SV40 großes T-Ag

### 3.1.3. Prokaryotische Zellen

*E. coli* XL10-Gold      Ultrakompetenter Bakterienstamm (Stratagene), geeignet für Transformation von großen DNA-Fragmenten  
 Genotyp: Tet<sup>r</sup> Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI qZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]

### 3.2. Plasmide

Plasmide	Resistenz	Erläuterung
LeGo-iG2	Ampicillin	Lentiviraler Vektor der 3. Generation, Selektion über GFP, zur Verfügung gestellt von C. Stocking (Heinrich-Pette-Institut, Abt. Molekulare Pathologie) (Weber et al., 2008)
pCIneo-cTrp53	Ampicillin	Expressionsvektor für Säugerzellen mit G418-Resistenz als Selektionsmarker, enthält die cDNA des murinen wtp53, kloniert von Andrea Hermannstädter
pCIneo-Trp53 Minigen + HA	Ampicillin	Expressionsvektor für Säugerzellen mit G418-Resistenz als Selektionsmarker, enthält das Minigen (-Exon 1) des murinen wtp53, mit HA-Tag, kloniert von Frauke Krepulat
pCR-BluntII-TOPO-Zeb1	Kanamycin	Bakterieller Vektor, enthält verifizierte cDNA von Zeb1, erhältlich bei Open Biosystems (Clone-ID 40111227)
pCMV-Sport6-Mmp3	Ampicillin	Expressionsvektor, enthält verifizierte cDNA von Mmp3, erhältlich bei Open Biosystems (Clone ID 3962288)
pMDLg/pRRE	Ampicillin	Gag/Pol-Plasmid (3. Generation), zur Verfügung gestellt von C. Stocking (HPI)
RSV-Rev	Ampicillin	Rev-Plasmid (3. Generation), zur Verfügung gestellt von C. Stocking (HPI)
phCMV-VSV-G	Ampicillin	VSV-g Plasmid (3. Generation), zur Verfügung gestellt von C. Stocking (HPI)

### 3.3. Größenstandards

DNA-Standards	Gene Ruler 100bp DNA Ladder, #SM0311; Gene Ruler 1kb DNA Ladder, #SM0241; MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Standards	Precision Plus Protein Dual Color Standards; Bio-Rad, München

### 3.4. Antikörper

#### 3.4.1. Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Klon	Spezies	Hersteller
CD31 (PECAM1)	1:100 (IF)	monoklonal	Ratte	BioLegend/Biozol, Eching
CEACAM1 (P1)	1:500 (WB/ELISA)	polyklonal	Kaninchen	Produziert von C. Wagener, A. Horst BioLegend/Biozol, Eching
CEACAM1a	1:100 (ELISA)	monoklonal	Maus	BioLegend/Biozol, Eching
Zytokeratin 14	1:100 (IF)	polyklonal	Kaninchen	Covance, München
Zytokeratin 8/18	1:200 (IF)	polyklonal	Meerschweinchen	Acris, Herford
Epcam	1:100 (IF)	Klon G8.8	Ratte	BioLegend/Biozol, Eching
HA-Tag	1:100 (IF) 1:500 (WB)	monoklonal	Ratte	Roche, Basel, Schweiz
HA-Tag (Y-11)	1:100 (IP)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Hsc70	1:500 (WB)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Kollagen I	1:50 (IHC)	polyklonal	Kaninchen	GenTex/Biozol, Eching
Kollagen IV	1: 200 (IHC)	polyklonal	Kaninchen	Millipore, Schwalbach
p63 (4A4)	1:500 (WB)	monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
R15 ( $\alpha$ -SDS-T)	1:500 (IF) 1:20.000 (IHC)	polyklonal	Kaninchen	(Deppert and Pates, 1979)
Vimentin	1:5000 (IF)	polyklonal	Huhn	Acris, Herford
Vimentin (C20)	1:100 (IF)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

### 3.4.2. Konjugierte Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Klon	Konjugat	Spezies	Hersteller
Epcam	1:100 auf 10 <sup>6</sup> Zellen	monoklonal	Allophycocyanin (APC)	Ratte	BioLegend/ Biozol, Eching

### 3.4.3. Sekundärantikörper – Fluoreszenz-gekoppelt

Spezies	Reaktivität	Verdünnung	Konjugat	Hersteller
Esel IgG (H+L)	anti-Kaninchen	1:500	Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe
Esel IgG (H+L)	anti-Kaninchen	1:500	Alexa 555	Invitrogen, Karlsruhe
Esel IgG (H+L)	anti-Ziege	1:500	Alexa 555	Invitrogen, Karlsruhe
Esel IgG (H+L)	anti-Ratte	1:500	DyLight 488	Dianova, Hamburg
Esel IgG (H+L)	anti-Ratte	1:500	DyLight 549	Dianova, Hamburg
Esel IgG (H+L)	anti-Huhn	1:500	DyLight 488	Dianova, Hamburg
Esel IgG (H+L)	anti-Huhn	1:500	DyLight 549	Dianova, Hamburg
Esel IgG (H+L)	anti-Meerschweinchen	1:500	DyLight 488	Dianova, Hamburg
Esel IgG (H+L)	anti-Meerschweinchen	1:500	DyLight 549	Dianova, Hamburg

### 3.4.4. Sekundärantikörper – Enzym-gekoppelt

Spezies	Reaktivität	Verdünnung	Konjugat	Hersteller
Esel IgG (H+L) (WB)	anti-Maus	1:10.000	Meerrettich- Peroxidase	Biomol, Hamburg
Esel IgG (H+L) (WB)	anti-Ziege	1:5.000	Meerrettich- Peroxidase	Biomol, Hamburg
Esel IgG (H+L) (WB)	anti-Kaninchen	1:10.000	Meerrettich- Peroxidase	Biomol, Hamburg
Esel IgG (H+L) (IHC)	anti-Kaninchen	1:200	Biotin-SP	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
Ziege IgG (Histofine Simple Stain) (IHC)	anti-Kaninchen	unverdünnt	Alkalische Phosphatase	Nichirei, Amsterdam, NL

### 3.5. Enzyme

Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>FastDigest</i> ® Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagenase III (Worthington)	CellSystems, Katharinen
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Pefabloc®SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA-Polymerase	5-Prime, Hamburg
Trypsin (1:250)	Biochrom, Berlin

### 3.6. Oligonukleotide

#### 3.6.1. Sequenzierprimer

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' - 3')
T3-pCIneo	Sense	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7-EEV-pCIneo	Antisense	AAGGCTAGAGTACTTAATACGA
p07	Sense	GAGCTCACAACCCCTCACTC
cs413	antisense	GGCCTTATTCCAAGCGGCTT

#### 3.6.2. Oligonukleotide für Standard-PCR

Bezeichnung	Spezies	Orientierung	Sequenz (5' - 3')
Aktin-H	Maus	sense	CGAGCAGGAGATGGCCACTGC
Aktin-N	Maus	antisense	GTGAGCTCTCTGGGTGCTGGG
mutp53_HA-1a	Maus	sense	GACCGCCGTACAGAAGAAGAA
mutp53_HA-Q2	Maus	antisense	TCAGATCTTCAGGCGTAGTCG
Notch4-Ex27-28_Q1	Maus	sense	CTGCACCTAGCTGCCAGATTC
Notch4-Ex27-28_Q2	Maus	antisense	CTGTCTGCTGGCCAATAGGAG

### 3.6.3. Oligonukleotide für qPCR

Bezeichnung	Spezies	Orientierung	Sequenz (5' - 3')
Mm18sRNA-Q1	Maus	sense	CGGACAGGATTGACAGATTG
Mm18sRNA-Q2	Maus	antisense	CAAATCGCTCCACCAACTAA
mActb_Q1	Maus	sense	GAAATCGTGCGTGACATCAAAG
mActb_Q2	Maus	antisense	TGTAGTTTCATGGATGCCACAG
mCC1_Ex5-Q1a	Maus	sense	GAATCCAGTCAGCGTCAGGAG
mCC1_Ex6-Q2a	Maus	antisense	CCGCCAGACTTCCTGGAATAG
Ceacam1-3UTR_QA1	Maus	sense	ATGACGTCGCATACACTGTCC
Ceacam1-3UTR_QA2	Maus	antisense	TGTTTCTGTGGCTCTTGGAGA
Epcam-Q1	Maus	sense	GAGTCCGAAGAACCGACAAGG
Epcam-Q2	Maus	antisense	CTGATGGTCGTAGGGGCTTTC
Etv1-Ex12-13_Q1	Maus	sense	CCGGCGATGAACTATGACAA
Etv1-Ex12-13_Q2	Maus	antisense	GTGACGTTCCATGTCCGTCTT
Etv1-3UTR_QB1	Maus	sense	CTCGACTGTGCTGCATGTGT
Etv1-3UTR_QB2	Maus	antisense	GTCATGGTGGCTGTCCTGAT
Fgfr1-Ex18-19_Q1	Maus	sense	GAAGACCTGGACCGCATTGT
Fgfr1-Ex18-19_Q2	Maus	antisense	GCTCCTCAGGTAACGGCTCAT
Fgfr1-3UTR_QA1	Maus	sense	CAGAGCGGAAGCAAGTGGA
Fgfr1-3UTR_QA2	Maus	antisense	GCAGAGGTTGCCTTCGGTTA
GAPDH-1	Maus	sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH-2	Maus	antisense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
mHPRT1-Q1	Maus	sense	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA
mHPRT1-Q2	Maus	antisense	AGGGCATATCCAACAACAACTT
qRT-Hspa8-3	Maus	sense	CCGATGAAGCTGTTGCCTAT
qRT-Hspa8-4	Maus	antisense	GTGACATCCAAGAGCAGCAA
Itga5-Ex24-25_Q1	Maus	sense	CCACCATGTCTACGAGCTCATC
Itga5-Ex24-25_Q2	Maus	antisense	GGTGTAGTTGGAGGTGCAGTTG
Itga5-3UTR_QA1	Maus	sense	GCAGCTAAGAGCCTGAGACTTG
Itga5-3UTR_QA2	Maus	antisense	GCACCATCCACGGTTAGTGT
Krt14-Q1	Maus	sense	CAGAGCGGCAAGAGTGAGAT
Krt14-Q2	Maus	antisense	TGCCGATCATCTCTGGATCT
Krt18-Q1	Maus	sense	AGTCTGTGGAGAGCGACATC
Krt18-Q2	Maus	antisense	TCAATCCAGAGCTGGCAATC
Mmp3-Q1	Maus	sense	TGTCCCGTTTCCATCTCTCTC
Mmp3-Q2	Maus	antisense	TGGTGATGTCTCAGGTTCCAG
Mmp3_Ex8/9_Q1	Maus	sense	AAGATCGATGCTGCCATTTCT
Mmp3_Ex8/9_Q2	Maus	antisense	AGACAGCATCCACCCTTGAGT
mutp53_HA-Q1a	Maus	sense	CCAGCTACCTGAAGACCAAGA
mutp53_HA-Q2	Maus	antisense	TCAGATCTTCAGGCGTAGTCG
Notch4-Ex27-28_Q1	Maus	sense	CTGCACCTAGCTGCCAGATTC
Notch4-Ex27-28_Q2	Maus	antisense	CTGTCTGCTGGCCAATAGGAG
Notch4-3UTR_Q1	Maus	sense	AAGCGACACGTACGAGTCTG
Notch4-3UTR_Q2	Maus	antisense	GTCTATCTCAACCGGACATCCT
pri-miR-200a_Q1	Maus	sense	ACCTGTGTCTTCTGCCAGAG
pri-miR-200a_Q2	Maus	antisense	AACTGGAGTCCAGGAGGACAA

pri-miR-200c_Q1	Maus	sense	AGGAGATCTGCCGCTTCTCTT
pri-miR-200c_Q2	Maus	antisense	AATGGACGCCGATGACACT
Pdgfb-Ex4-5_Q1	Maus	sense	GCTGCAATAACCGCAATGTG
Pdgfb-Ex4-5_Q2	Maus	antisense	CACTGTGGCCTTCTTGAAGATG
Pdgfb-3UTR_QA1	Maus	sense	ATCTGCCACGCACTCATCTCT
Pdgfb-3UTR_QA2	Maus	antisense	ACACGCACACTGCACCTCTAA
Pdgfra-Ex23-24_Q1	Maus	sense	CGCTGACAGTGGCTACATCAT
Pdgfra-Ex23-24_Q2	Maus	antisense	AACCTGTCTCGATGGCACTCT
Pdgfra-3UTR_QA1	Maus	sense	GAGTGCCATCGAGACAGGTTCC
Pdgfra-3UTR_QA2	Maus	antisense	CCGGAGCGTGTGAGTTACAG
Pdgfrb-Ex22-23_Q1	Maus	sense	AAGCCTGACGTTGCTGATGA
Pdgfrb-Ex22-23_Q2	Maus	antisense	TCTGCTTGTCTGTGGCTCTTC
Pdgfrb-3UTR_QA1	Maus	sense	CCAGCAAGAGTGGCAGAGAA
Pdgfrb-3UTR_QA2	Maus	antisense	GCTGGCAGTTGAGGTGGTAAT
Rplp1-Q1	Maus	sense	CTCGCTTGCATCTACTCCGC
Rplp1-Q2	Maus	antisense	AGAAAGGTTTCGACGCTGACAC
Snai1-Q1	Maus	sense	CTGGTGAGAAGCCATTCTCCT
Snai1-Q2	Maus	antisense	CCTGGCACTGGTATCTCTTCA
Snai1-3UTR_QB1	Maus	sense	GCTGCTTCGAGCCATAGAAC
Snai1-3UTR_QB2	Maus	antisense	CTCAAAGAAGGTGGCCTGAA
SV40LTag-Q1	Maus	sense	TCCTGGCTGTCTTCATCATC
SV40LTag-Q2	Maus	antisense	TACAGACCTGTGGCTGAGTT
Tgfb1-Ex4-5_Q1	Maus	sense	TTCAGCGCTCACTGCTCTTG
Tgfb1-Ex4-5_Q2	Maus	antisense	CCGGTTCATGTCATGGATGG
Tgfb1i1-Ex6-7_Q1	Maus	sense	CCTCTGTGGCTCCTGCAATA
Tgfb1i1-Ex6-7_Q2	Maus	antisense	AGCGCTCAAAGTAGCACTCG
Tgfb1i1-3UTR_QA1	Maus	sense	AGGCATCCTTGCTCCTTCTC
Tgfb1i1-3UTR_QA2	Maus	antisense	ATCCTGGCCTCTACTTGGTCA
Thy1-Q1	Maus	sense	CAAGGTCCTTACCCTAGCCAA
Thy1-Q2	Maus	antisense	CCAGCTTGTCTCTATACACACTG
Thy1-3UTR_QA1	Maus	sense	ACCCAGCTTACCAAGGGAGA
Thy1-3UTR_QA2	Maus	antisense	TGCCCCTGAGATTAGGAGGT
Trp63 Ex4-5_Q1	Maus	sense	AAGTCAGCCACCTGGACGTAT
Trp63 Ex4-5_Q2	Maus	antisense	CTCGGTGACATGCTCAGCTT
Vim-Q1	Maus	sense	CGGCTGCGAGAGAAATTGC
Vim-Q2	Maus	antisense	CCACTTTCCGTTCAAGGTCAAG
Wap-Q3for	Maus	sense	CCAGAATGCCATGTGCTGTC
Wap-Q3rev	Maus	antisense	CGGTGCTGGAGCATTCTAT
Wisp1-Q1	Maus	sense	ACAGAGGCTGCCATCTGTGAC
Wisp1-Q2	Maus	antisense	CTCGCCATTGGTGTAGCGTA
Wisp1-3UTR_QB1	Maus	sense	GGTCCAGGACTTCACAATTGAG
Wisp1-3UTR_QB2	Maus	antisense	CTGAGCCTGAGCAGCACTCT
Zeb1-Ex3_for	Maus	sense	CACCAGAAGCCAGCAGTCAT
Zeb1-Ex4_rev	Maus	antisense	CGTTCTTCTCATGGCGGTACT
Zeb1-3UTR_QC1	Maus	sense	ACTGGGGCATCTCACACTTTT
Zeb1-3UTR_QC2	Maus	antisense	CAATAGCGTATCCATGCCTGA

### 3.7. Kits

BCA Protein Assay Reagenzien	Thermo Scientific, Waltham, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
innuPREP RNA Mini Kit	Jena Analytik, Jena
NucleoBond Extract II Kit	Macherey&Nagel, Düren
NucleoBond PC500 Kit	Macherey&Nagel, Düren
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Micro Kit	QIAGEN, Hilden
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystem, Darmstadt
RNA 6000 Nano Chip Kit	Agilent, Waldbronn
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.8. Allgemeine Puffer und Lösungen

4% Formalin/0,1 M Phosphatpuffer  
 10% (v/v) Formaldehydlösung (37%)  
 10% (v/v) 1 M Phosphatpuffer (pH 7,3)  
 in ddH<sub>2</sub>O

TAE 50x  
 2 M Tris-HCl pH 8,0  
 1 M Essigsäure  
 50 mM EDTA

Lysispuffer  
 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)  
 5 mM EDTA  
 0,2% SDS (w/v)  
 200 mM NaCl

Lens cleaning fluid (Objektivputzlösung)  
 50% (v/v) 2-Propanol  
 50% (v/v) ddH<sub>2</sub>O  
 0,04% (v/v) Tween 20

Phosphatpuffer (0,2 M, für 1l Puffer)  
 28,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
 7,76 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
 in ddH<sub>2</sub>O, pH 7,3

Ladepuffer (10x DNA-Ladepuffer)  
 0,1% Xylencyanol (v/v)  
 50% Glycerol (w/v)  
 0,1 M EDTA  
 0,1% SDS  
 in 10x TAE

10x PBS  
 137 M NaCl,  
 27 mM KCl,  
 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
 pH 7,4 (HCl)

### 3.9. Chemikalien und Reagenzien

Alle handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Des Weiteren wurden folgende Chemikalien verwendet:

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Propanol	Merck, Darmstadt
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose SeaKem® LE (DNA-Gele)	Lonza, Köln
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Baytril	Bayer, Leverkusen
Bepanthen Augensalbe	Bayer, Leverkusen
Betaisodona-Lösung	Munidpharma, Limburg
Betaisodona-Salbe	Munidpharma, Limburg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA , Fraktion V	Roche, Mannheim
Carprofen	Pfizer, Karlsruhe
Chlorophorm	Merck, Darmstadt
Citrat Plus Puffer	DCS, Hamburg
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM-Medium	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix (jeweils 100 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
DRAQ5™	Biostatus, Shepshed, UK
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin Y Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	PAA Laboratories, Pasching, A
Formaldehyd, mind. 37 %	Merck, Darmstadt
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Serva, Heidelberg

Ketamin	Albrecht, Bern, CH
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
Mayers Hämalanlösung	Merck, Darmstadt
Mowiol 4-88	Calbiochem, Schwalbach
Novaminsulfon	Pfizer, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefablock SC	Biomol, Hamburg
PEI (Polyethylimin)	jetPRIME/Peqlab, Erlangen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
peqGOLD Trifast™	Peqlab, Erlangen
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg
Quantum-Medium	Invitrogen, Frankfurt
Salzsäure 37% (HCl)	Serva, Heidelberg
SDS	Thermo Scientific, Langenselbold
Shandon Cryomatrix™	Thermo Scientific, Langenselbold
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trasylol	Bayer HealthCare, Montville, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma Base (Tris Base)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Xylazin	Bayer, Leverkusen

### 3.10. Verbrauchsmaterial

Bakterienkulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen Ø12mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Dynabeads Protein A	Invitrogen, Darmstadt
F96 Maxisorb Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
FACS-Röhrchen (4 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Fettstift	Immunotech, Marseille, FR
Filterpapier Whatman 3 mm	Schleicher und Schüll, Dassel
Handschuhe Safeskin (Nitril und Latex)	Kimberly Clark, Zaventem, Belgien
Histologiekassetten (TurbOflow™)	Microm, Walldorf
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Fast Prep Röhrchen (Lysing Matrix D)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA

Membranfilter (0,2 µm und 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Platte	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Nähzeug	Ethicon, Dülmen
Nitrozellulosemembran Hybond-C Super	GE Healthcare Europe, Freiburg
Nylonsieb Thomapor (80 µm Marschen)	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
SuperForst/Plus Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm "M"	American National Can, Greenwich, USA
Phase Lock Gefäß	5-Prime, Hamburg
Pipettenspitzen	VWR, Hannover
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Oldendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Röntgenfilme RP New, blau	CEA, Hamburg
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden

### 3.11. Geräte

Agarosegelapparaturen	Horizon 58; 11-14; 20-25; Gibco/BRL, Invitrogen, Darmstadt
Agarosegeldokumentation	BioDoc Analyze UV-Transilluminator; Biometra, Göttingen Bioanalyzer 2100; Agilent, Waldbronn
Analysenwaagen	PM 460; PB 3001; XP 205DR; Mettler-Toledo, Gießen
Brutschrank (Bakterien)	T5042 E; Heraeus, Hanau
Chirurgisches Besteck	Dumont; Roth, Karlsruhe
Cryostat	Leica CM3050; Leica, Wetzlar
Digitalkamera	PowerShot G3; Canon, Krefeld
ELISA Reader	Tecan Sunrise Multiplate Reader; Männedorf, CH
FACS-Geräte	BD FACS-Aria, BD FACS-Canto; BD Biosciences, Heidelberg
Filmentwickler	Classic E.O.S.; AGFA, Köln
Filmkassette	X-OMAT; Kodak, USA
Fluoreszenzmikroskope	DMI 6000B mit DFC350 FX Kamera; Leica, Wetzlar Axiovert 200 mit LSM 510 META Konfokalscanner; Zeiss, Jena
Gewebehomogenisator	Fast Prep FP120; Qbiogene, Heidelberg, DE
Heizblock	Techne Dri-Block DB 2; Bibby Scientific, Burlington, USA
Inkubationsschüttler	Multitron 2; Infors AG, Bottmingen-Basel, CH
Inkubator (Zellen)	HeraCell 150; Heraeus, Hanau
Konfokalmikroskop	LSM 510 META; Zeiss, Oberkochen
Laborwasseranlage	Milli-Q Reagent Water System; Millipore, Billerica, USA
Magnetrührer	MR3001; Heidolph, Schwabach

PCR-Maschine	PTC-200 Peltier Thermal Cycler; MJ Research, Massachusetts, USA
Phasenkontrastmikroskope	IMT-2 (ULWCD 0,30); Olympus, Hamburg Axiovert 25; Zeiss, Jena
pH-Meter	SevenEasy; Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	DU 800; Beckmann Coulter, Krefeld NanoDrop ND1000; Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy acu; Integra Biosciences, Fernwald
Proteingel-Elektrophoreseapparatur	Mighty Small II; Hoefer, San Francisco, USA
Proteingel-Gießapparatur	Mighty Small Multiple Gel Caster SE 200 Series; Hoefer, San Francisco, USA
Real-Time PCR System	7500 Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Darmstadt
Rollenschüttler	RollerMixer SRT1; Stuart Scientific, Watford, UK
Schüttelheizblock	Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator (Bakterien)	Multitron; Infors HAT, Basel, CH
Schwenktisch	Mini Rocker MR1; Peqlab, Erlangen Polymax 2040; Heidolph, Schwabach
Spannungsquellen	PowerPAC 300, PowerPAC 3000; Biorad, München
Sterilwerkbank	Hera safe; Heraeus, Hanau
Tankblotapparatur	Mini Trans-Blot Cell; Biorad, München
Tierohrknipser	Fisher Scientific; Schwerte
Vortexmixer	Reax 2000; Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Technicon Instruments; Tarrytown NY, USA
Zentrifugen	Biofuge pico; Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C; Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg GS-6R; Beckmann Coulter, Krefeld Rotana 96R; Hettich, Tuttlingen Sorvall RC 5C Plus; Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.12. Software

dChip v1.0.0.1	Cheng Li Lab of Computational Genomics (Dana-Faber Cancer Institut/ Havard School of Public Health); Open Source Software
GraphPadPrism 4	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageJ v1.43	National Instituts of Health; Open Source Software
Imaris v5.0.1	Bitplane Scientific Software, Zürich, CH
Sci Ed Central 95	Scientific & Educational Software, Cary, USA

## 4. Methoden

### 4.1. Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

#### 4.1.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* XL1-Gold® (Stratagene)

##### Bakterien nach der Mehrionen-Technik

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli* XL10-Gold®-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C kultiviert bis zu einer optischen Dichte zwischen 0,4 und 0,6 bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Bakterien wurden in einem 50 ml Röhrchen überführt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 12 ml eiskaltem Tfb-I Puffer aufgenommen und erneut für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet in 4 ml eiskaltem Tfb-II Puffer resuspendiert und für 25 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien aliquotiert (à 100 µl), in Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

**LB-Medium:** 10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, pH 7,5

**Tfb-I:** 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM KaAc (pH 7,2), 15% Glycerol (v/v), pH 5,8 mit 0.2 M Essigsäure

**Tfb-II:** 10 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol (v/v), pH 7,0 mit NaOH

#### 4.1.2. Klonierung

##### 4.1.2.1. Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau dient dem Linearisieren eines Plasmids bzw. dem Ausschneiden und/oder Einfügen bestimmter DNA-Fragmente. Restriktionsenzyme erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden dann in dieser Sequenz oder in einem definierten Abstand. Für den Restriktionsverdau wurden *FastDigest*® Enzyme der Firma Fermentas verwendet. Ein Restriktionsansatz wurde wie in Tabelle 2 pipettiert, der Verdau erfolgte für 30 min bei 37°C.

**Tabelle 2: Pipettierschema eines Restriktionsverdau**

Komponenten	Volumen
10x <i>FastDigest</i> <sup>®</sup> Puffer	2 µl
Plasmid-DNA	1-2 µg
Enzym I	1 µl
Enzym II (bei Doppelverdau)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

#### 4.1.2.2. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Ein Plasmidverdau mit einem einzelnen Restriktionsenzym führt zu einem linearisierten Plasmid, dessen kompatiblen Schnittstellen dazu neigen, selbst zu ligieren. Um dies zu verhindern, wurden Plasmide dephosphoryliert. Dabei entfernt die Antarktische Phosphatase (NEB) die 5'-Phosphatgruppe am DNA-Ende, die für die Ligation benötigt wird. Nach einem Restriktionsverdau wurde 1/10 Volumen des 10x Phosphatase-Reaktionspuffers und 1 µl der Antarktischen Phosphatase zu dem Ansatz gegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C, wenn es sich um 5'-Überhänge oder glatte Enden handelte; bei 3'-Überhängen wurde für 60 min inkubiert. Das Enzym wurde bei 65°C für 5 min durch Hitze inaktiviert.

#### 4.1.2.3. Ligation

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente erfolgte mittels T4-DNA-Ligase (Fermentas). Das Enzym katalysiert eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat und der benachbarten 3'-Hydroxylgruppe. Für die Ligation wurden 10-50 ng linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt und die Menge für das Insert wurde nach dem molaren Verhältnis über den Vektor mit Hilfe eines web-basierten Programms (<http://django.gibthon.org/tools/ligcalc/>) berechnet: für Überhänge betrug die Ratio (Vektor zu Insert) 1:3 und bei glatten Enden 1:1 oder 1:2. Zu dem Ansatz wurden 2 µl T4-DNA-Ligasepuffer sowie 1 µl Enzym beigegeben und auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte entweder 15-30 min bei RT oder bei 16°C über Nacht.

#### 4.1.2.4. Zielgerichtete Mutagenese

Die Generierung von Punktmutationen in DNA wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> Lightning Site-directed* Mutagenese Kits von Stratagene vorgenommen. Hierbei wurde das ausgewählte Gen im Plasmid mit Hilfe von Primern, welche die Mutation enthalten, zielgerichtet mutiert. Die Primer wurden so entworfen, dass sie 25-45 Basen lang sind, eine hohe Schmelztemperatur besitzen (> 78°C), einen GC-Gehalt von ca. 40% aufweisen und mit einem

oder mehreren Cytosinen oder Guaninen enden. Wichtig für eine erfolgreiche Mutagenese ist die Lokalisation der gewünschten Mutation. Die veränderten Basen sollten in der Mitte des Primers liegen mit mind. 10-15 Basen der korrekten Sequenz auf beiden Seiten. Stratagene (jetzt Agilent) bietet ein Web-basiertes Programm für das Entwerfen von Mutagenese-Primer an ([www.agilent.com/genomics/qcpd](http://www.agilent.com/genomics/qcpd)).

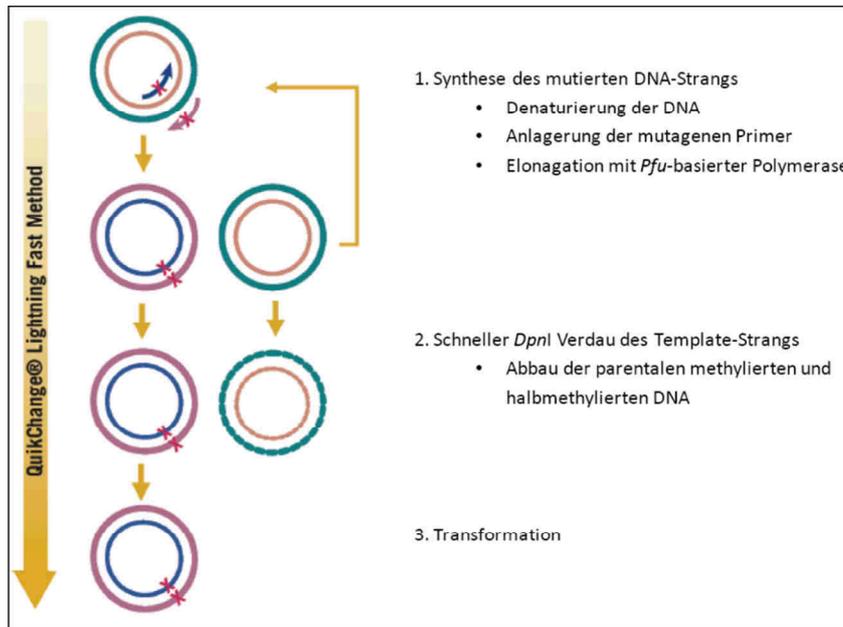


Abbildung 11: Überblick der Drei-Schritt-Mutagenese (Handbuch *QuikChange® Lightning Site-directed Mutagenese Kit*, Stratagene)

Das Protokoll schreibt den Einsatz von 125 ng der mutagenen Primer vor. Dafür war es erforderlich, die Oligonukleotide in Molekülmenge (hier picomol) zu berechnen.

$$X \text{ pmol des Oligos} = \frac{\text{ng des Oligos}}{330 \times \text{Basenzahl des Oligos}} \times 1000$$

Für die Synthese des mutierten DNA-Strangs wurde folgender Ansatz pipettiert: 5 µl des 10x Reaktionspuffers, 100 ng dsDNA-Matrize, jeweils 125 ng der mutagenen Primer, 1 µl dNTP-Mix und 1,5 µl *QuikSolution* Reagenz. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und abschließend 1 µl *QuikChange® Lightning* Enzym dazugegeben.

Die Reaktion wurde nach folgenden Parametern durchgeführt:

**Tabelle 3: Temperaturprogramm der Mutagenesereaktion**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	2 min
18 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	20 sec
Annealing	60°C	10 sec
Elongation	68°C	30 sec/kb Plasmidlänge
Finale Elongation	68°C	5 min
Abschluss	4°C	∞

Nach der DNA-Synthese wurde dem Ansatz 2 µl DpnI Enzym zugegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die DpnI-Endonuklease spaltet spezifisch methylierte DNA und kann so zwischen methylierter Ausgangs-DNA und neu synthetisiertem PCR-Produkt unterscheiden. Zum Schluss wurden *E.coli* XL-10 Gold, denen 2 µl β-Mercaptoethanol zur Steigerung der Transformations-effizienz hinzugegeben wurde, mit 2 µl der DpnI-behandelten DNA transformiert (siehe 4.1.2.6)

#### 4.1.2.5. Vektorkonstruktionen

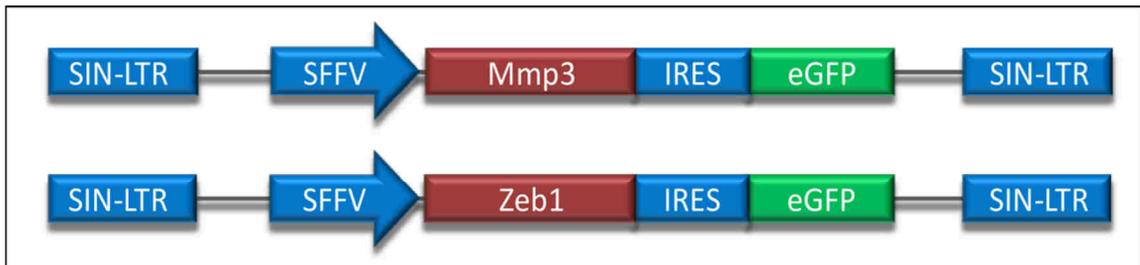
Für die Generierung eines lentiviralen Vektors mit *mutp53* (R270H und R245W) wurde zu Beginn eine zielgerichtete Mutagenese in *wtp53*-cDNA (pCIneo-Vektor) durchgeführt. Anschließend wurde der HA-Tag (ggc ggc tac ccc tac gac gtg ccc gac tac gcc) mit SacII und NheI aus dem WAP-*mutp53* Minigen-Konstrukt (Krepulat et al., 2005) ausgeschnitten und die *mutp53*-cDNA im pCIneo-Vektor ligiert. Mit EcoRI wurde das *mutp53*-HA-Konstrukt aus dem pCIneo-Vektor ausgeschnitten und in den lentiviralen Vektor LeGO-iG2 (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von C. Stocking, HPI) eingefügt. Vorteil des LeGO-Vektors ist die starke Expression des Transgens aufgrund der Verwendung des SFFV-Promotors (*Spleen focus-forming virus*) und die Selektionierbarkeit anhand des Fluoreszenzfarbstoffs GFP (grün fluoreszierendes Protein). Über den HA-Tag war es möglich, *mutp53* spezifisch zu detektieren.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des lentiviralen LeGO-*mutp53* Konstrukts**

Das Konstrukt basiert auf den LeGO-iG2 Vektor, *mutp53*-cDNA mit HA-Tag wurde über eine *EcoRI*-Schnittstelle in der *Multi Cloning Site* in den Vektor kloniert. SIN-LTR: *self-inactivating-long-terminal repeat*, SFFV: Promotor des Spleen Focus-Forming-Virus, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, eGFP: *enhanced green fluorescent protein* (Weber et al., 2008)

Für die Herstellung lentiviraler Vektoren mit Zeb1 und Mmp3 wurde die cDNA der Gene (Plasmide von Open Biosystems) in den LeGO-iG2-Vektor kloniert. Die *Zeb1*-cDNA wurde aus dem pcR-BluntII-TOPO-Vektor mit EcoRI, *Mmp3*-cDNA wurde mit Hilfe von Stul und PspOMI aus dem pCMV-Sport6-Vektor herausgeschnitten und mit LeGO-iG2 (für *Zeb1*-Integration: EcoRI, für *Mmp3*-Integration: Stul und NotI) ligiert (Abbildung 13). Die Plasmidkarten sind im Anhang 8.2 zu finden.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der lentiviralen LeGO-Mmp3 und LeGO-Zeb1 Konstrukte**

Das Konstrukt basiert auf den LeGO-iG2 Vektor, cDNA von *Zeb1* wurde über eine EcoRI-Schnittstelle in der *Multi Cloning Site* in den Vektor kloniert, *Mmp3*-cDNA wurde über Stul und PspOMI ausgeschnitten und in LeGO-iG2 (geschnitten mit Stul und NotI) hineinkloniert. SIN-LTR: *self-inactivating-long-terminal repeat*, SFFV: Promotor des Spleen Focus-Forming-Virus, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, eGFP: *enhanced green fluorescent protein*

#### 4.1.2.6. Transformation (Kaiser und Hogness, 1960)

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien (auch Transformation genannt) wird mit Hilfe eines Hitzeschocks die bakterielle Zellwand durchlässig gemacht. Für eine Transformation wurden pro Ansatz 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl vom Ligationsansatz vermengt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock (60 sec, 42°C), der zur Porenbildung in der Membran und zur Aufnahme freier DNA in die Bakterien führt. Für eine optimale DNA-Aufnahme ist ein rapider Temperaturwechsel entscheidend, so dass der Ansatz nach dem Hitzeschock für 5 min auf Eis heruntergekühlt wurde. Der Ansatz wurde dann zu 400 µl vorgewärmtem LB-Medium ohne Antibiotikum pipettiert und bei 37°C für 30-60 min im Schüttler inkubiert, um die Plasmidexpression und die damit einhergehende Resistenz-Ausbildung zu gewährleisten. Abschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten, mit Antibiotika versetzt, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

#### 4.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

##### 4.1.3.1. Mini-Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, werden sogenannte Plasmidpräparationen durchgeführt. Die Mini-Plasmidpräparation wurde meist zur Überprüfung der inserierten DNA

im Plasmid verwendet. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im kleinen Maßstab wurden 2-3 ml antibiotikahaltigem LB-Medium mit jeweils einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (2 min, RT, 12.000 rpm). Zur Lyse der Bakterien wurde das Pellet zuerst in 200 µl S1-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl S2-Puffer für 2-3 min bei Raumtemperatur lysiert. Durch Hinzufügen von 200 µl des S3-Puffers zur Suspension wurde die Reaktion neutralisiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Mittels Zentrifugation (5 min, RT, 14.000 rpm) wurden unlösliche, pelletierte Bakterienbestandteile verworfen. Um die Plasmid-DNA zu fällen, wurde der Überstand mit 600 µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert (10 min, RT, 10.000 rpm). Die Plasmid-DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert. Es wurden die Puffer aus dem NucleoBond® PC 500-Kit von Macherey-Nagel verwendet.

#### **4.1.3.2. Maxi-Plasmidpräparation**

Um Plasmide im reinen und größeren Maßstab zu erhalten, wurde für die Präparation das NucleoBond® PC 500 Kit von Macherey-Nagel eingesetzt und die Plasmid-DNA nach Firmenprotokoll isoliert. Eine Übernachtskultur (150 -200 ml) wurde abzentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 x g) und das Pellet mit 12 ml S1-Puffer resuspendiert, anschließend wurden 12 ml S2-Puffer zur Lyse dazugegeben und die Suspension mit 12 ml S3-Puffer neutralisiert. Das Lysat wurde durch einen Papierfilter gegeben und anschließend zur DNA-Bindung durch eine Säule laufen gelassen. Die Säule wurde mit 36 ml N3-Puffer gewaschen und die DNA mit 15 ml N5-Puffer eluiert. Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren, wurde das Eluat mit 15 ml Isopropanol vermischt und zentrifugiert (mind. 30 min, 4°C, 9000 x g). Mit 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet gewaschen und für 10-20 min bei RT getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

## **4.2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen**

### **4.2.1. Kultivierung adhärent wachsender Zellen**

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte unter standardisierten Bedingungen: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank und mit sterilen Materialien durchgeführt.

Die Zelllinien wurden als Monolayer-Kulturen in beschichteten Zellkulturschalen in DMEM-Medium mit Zugabe von 10% FCS gehalten. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% passagiert und dabei in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit 2-3mal pro Woche

1:3 bis 1:10 umgesetzt. Für das Umsetzen der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung nach kurzer Inkubationszeit im Brutschrank von der Zellkulturschale gelöst, in frischem Medium aufgenommen und in entsprechender Verdünnung neu ausgesät.

**PBS:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, autoklaviert, bei RT lagern

#### 4.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine längerfristige Aufbewahrung von Zellen wurden diese von einer ~80% konfluenten Zellkulturschale mit Trypsin abgelöst und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen transferiert und sofort auf Eis gestellt. Die Kryoröhrchen wurden in eine Styroporbox überführt und für mindestens 48 Stunden bei -80°C langsam herabgekühlt, bevor die Zellen für die langfristige Aufbewahrung in Stickstofftanks (-196°C) gebracht wurden.

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad (37°C) schnell aufgetaut und in 9 ml Medium gegeben, 5 min bei RT und 300 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale ausgesät.

**Einfriermedium:** 90% FCS, 10% DMSO, bei -20°C lagern

#### 4.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Bei der Zählkammer befindet sich zwischen Glasplättchen und Objektträger ein definiertes Volumen, aufgrund dessen die Konzentrationsbestimmung einer Zellsuspension ermöglicht wird. Dazu wurden die Zellen zuvor trypsiniert und in Medium aufgenommen. Zum Zählen der Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blau (Stammlösung 1:5 mit PBS verdünnt) vermischt und in den Spalt der Zählkammer gegeben. Da Trypan-Blau nur von toten Zellen aufgenommen wird, war es möglich, ausschließlich ungefärbte, vitale Zellen für die Zählung zu berücksichtigen. Standardmäßig wurden zwei Großquadrate ausgezählt und aufgrund der Verdünnung mit Trypan-Blau entsprach die ermittelte Zahl (n) der beiden Großquadrate  $n \times 10^4$  Zellen/ml.

#### 4.2.4. Vereinzeln von Primärtumorzellen aus WAP-T Tumoren

Ein Ziel dieser Arbeit war es, aus verschiedenen WAP-T Tumoren stabile Zelllinien für *in vitro* Arbeiten zu generieren. Dazu wurden alle Medien und Lösungen zu Beginn auf 37°C erwärmt. Als Ausgangsmaterial wurden primäre Tumore unter sterilen Bedingungen präpariert, wobei ein Stück so schnell wie möglich entnommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit vorgewärmtem DMEM/10% FCS überführt wurde. Das Tumorstück wurde in eine Glaspetrischale überführt, unter Medium mit zwei sterilen Skalpellenspitzen fein zerkleinert und anschließend zentrifugiert (5 min, 300 x g, RT). Das Medium wurde verworfen und durch 5 ml Kollagenase-Lösung ersetzt. Anschließend wurde das Gewebe für ca. 2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Hierbei wurde ein Großteil der extrazellulären Matrix der Tumorgewebestücke verdaut, um eine Zellvereinzelnung zu ermöglichen. Frei gewordene DNA, entstanden durch das Zerkleinern und Absterben von Zellen, führt zum Verklumpen von Tumorzellen. Aufgrund dessen wurde nach dem Kollagenase-Verdau ein DNase-Verdau (10-15 min, 37°C, schüttelnd) durchgeführt. Daran anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und in 5 ml DMEM-Medium + 10% FCS aufgenommen. Zum Entfernen bzw. Vereinzeln verbliebener, größerer Zellaggregate wurde die Suspension durch zwei Zellsiebe (Edelstahlsieb, 150 µm; 80 µm Membran (Thomapor, Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland) filtriert. Abschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und in eine 10 cm Zellkulturschale mit DMEM und Zugabe von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät.

**Kollagenase-Lösung:** 200 U/ml Kollagenase III, 100 U/ml Hyaluronidase, in Quantum-Medium, steril filtriert, bei -20°C lagern

**DNase-Lösung:** 5000 U/ml, in PBS, steril filtriert, bei -20°C lagern

#### 4.2.5. Vorbereitung der Zellen für Tumorzelltransplantation in Mäusen

Für Tumorzelltransplantationsexperimente wurden zuerst Zellen trypsinisiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Den Mäusen wurden unterschiedliche Zellanzahlen transplantiert. Das entsprechende Volumen wurde abgenommen, bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das verbleibende Zellpellet wurde in einem Gemisch aus Matrigel und Quantum-Medium (1:2, 20 µl) aufgenommen und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Matrigel dient dem Zusammenhalten der Zellen nach Transplantation am Transplantationsort, da es oberhalb von 16°C polymerisiert. Aufgrund dessen war darauf zu achten, dass Matrigel, Pipettenspitzen und Zellsuspension ständig

gekühlt waren. Die so vorbereitete Zellsuspension wurde in ebenfalls vorgekühlte Insulinspritzen aufgezogen und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

#### **4.2.6. Durchflusszytometrische Verfahren (FACS)**

Die Durchflusszytometrie (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ist ein Messverfahren, welches die Analyse von Zellen u.a. mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen erlaubt. Dafür werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper, die an bestimmte Zellstrukturen binden, oder auch Fluoreszenzfarbstoffe, die von Reporter genen exprimiert werden, eingesetzt. Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von sowohl lebenden als auch fixierten Zellen.

##### **4.2.6.1. Analyse von lebenden Zellen mittels FACS**

Es wurden standardmäßig  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen ausgezählt, abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT), mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen. Diesem Ansatz wurde dann der entsprechende Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gemäß den Herstellerangaben dazugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Zellsuspension zentrifugiert, das Zellpellet dreimal mit PBS gewaschen und zum Schluss in 300-400 µl PBS aufgenommen und zur Zellvereinzlung durch ein Sieb in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Für die Analyse wurde ein FACSCanto™ Durchflusszytometer verwendet und es wurden mindestens 20.000 Zellen analysiert.

##### **4.2.6.2. Zellsortierung**

Die Anreicherung von lentiviral transduzierten Zellen erfolgte mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Die Sortierung erfolgte am BD FACSAria™ Durchflusszytometer (Becton Dickson) durch Arne Düsedau oder Cordula Grüttner.

Für die Sortierung wurden Zellen von 70-80% konfluenten Kulturschalen trypsiniert, mit PBS gewaschen, in 700-800 µl PBS aufgenommen und durch ein Sieb in ein FACS-Röhrchen überführt. Die GFP-exprimierenden Zellen wurden in ein Röhrchen mit vorgelegtem Medium (DMEM, 10% FCS, 1% P/S) sortiert und nachfolgend entsprechend ihrer Zellzahl in geeignete Zellkulturschalen ausgesät und kultiviert.

#### **4.2.7. Substrat-unabhängiges Wachstum**

Substrat-unabhängiges Wachstum und Verlust der Kontaktinhibition sind Eigenschaften transformierter Zellen, die eng mit der Karzinogenese *in vivo* verknüpft sind. Für die Identifikation transformierter Zellen und für die *in vitro* Analysen wurde deshalb ein Assay

entwickelt, der die Situation imitiert – das Wachstum im Softagar. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen in einer Agarschicht über einen längeren Zeitraum bei 37°C kultiviert und auf ihre Fähigkeit, Kolonien zu bilden, untersucht.

Um ein Adhärenzen der Zellen am Boden zu verhindern, wurde Grundagar (450 µl 1,2% Agarose gekühlt auf 50°C mit auf 37°C erwärmten 100 µl FCS und 450 µl 2x DMEM versetzt ; 1 ml pro 6-well) in die Zellkulturplatte gegeben und für eine Stunde bei RT ausgehärtet. Für den Überschichtungsagar wurde 0,7% Agarose aufgeköcht und im 50°C-Wasserbad abgekühlt und ebenfalls mit 2x DMEM und FCS vermischt (150 µl FCS, 675 µl 2x DMEM, 675 µl 0,7% Agarose, 15 µl P/S; 1,5 ml pro 6-well). Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen/6-well im Überschichtungsagar aufgenommen und anschließend ausplattiert. Der Überschichtungsagar härtete erneut für eine Stunde bei RT aus. Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen für 2-3 Wochen inkubiert. Das Wachstum der Kolonien wurde am Zeiss-Mikroskop Axiovert 25 regelmäßig überprüft und mikroskopische Bilder wurden nach den 2-3 Wochen mit dem Leica DMI 6000B aufgenommen und ggf. auch die GFP-Expression der Zellen überprüft. Für die quantitative Auswertung der Kolonien wurden die Platten mit Kristallviolett überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden sie eingescannt und mit Image J hinsichtlich Anzahl und Größe der Kolonien analysiert.

**2x DMEM:** 26,76 g/L DMEM, 7,4 g/L NaHCO<sub>3</sub>, mit ddH<sub>2</sub>O (pH 7), steril filtriert

**Agarose:** 0,7% und 1,2% Agarose (Agarose Typ VII, low melting, for cell culture, Sigma), autoklaviert

**Kristallviolett-Lösung:** 0,005% Kristallviolett in ddH<sub>2</sub>O, steril filtriert (0,45 µm)

#### 4.2.8. Herstellung von Lentiviren

Die Herstellung von lentiviralen Partikeln erfolgte durch transiente Transfektion. Dazu wurden am Vortag  $5 \times 10^6$  293T Zellen pro Kulturschale (Ø 10 cm) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die zu transfizierenden Plasmide (pro Kulturschale: 10-20 µg des Vektor-Plasmids, 10 µg des Gag/Pol-Plasmids, 5 µg des Rev-Plasmids und 2 µg des Envelope-Plasmids) mit der 6-fachen Menge des Transfektionsreagenz PEI vermischt und in 900 µl DMEM aufgenommen und gut durchmischt. Anschließend folgte ein Inkubationsschritt von 10 min bei RT, um die Komplexbildung der Plasmide und PEI zu fördern. Danach wurde dem Ansatz 3 ml DMEM (+10% FCS) zugefügt und auf die Zellen gegeben. Nach 6 – 8 h erfolgte ein Mediumwechsel mit 10 ml frischem DMEM (+10% FCS). Der virale Überstand wurde nach 48 – 72 h abgenommen und durch einen Zellulose-Acetat-Filter (0,22 µm) filtriert, um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

#### 4.2.9. Transduktion von Zelllinien mit Lentiviren

Zur Transduktion von Zelllinien wurden diese in einer geringen Dichte in einer 6-well-Platte ausgesät (max. 50% Konfluenz) und nach Absetzen der Zellen wurde das Medium durch 1 ml des Virusüberstand mit 1 ml DMEM (+ 10% FCS) ersetzt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach mit jeweils neuem Virusüberstand wiederholt. Die Kontrolle der transduzierten Zellen erfolgte frühestens nach 72 h mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops und eine spätere Anreicherung der GFP-positiven Zellen wurde mittels FACS ermöglicht.

### 4.3. Experimentelle Methoden mit transgenen Mäusen

Gemäß den offiziellen Richtlinien für Labortiere wurden die Mäuse unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen in den Tierställen des Heinrich-Pette-Instituts gehalten. Dabei waren die Tiere einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus ausgesetzt. Futter und Wasser stand den Tieren jederzeit unbegrenzt zur Verfügung. Zur Aufrechterhaltung der Zucht wurden heterozygote transgene Mäuse mit Wildtyp-BALB/c-Tieren in der 8. Lebenswoche verpaart. Dies diente der Vermeidung von Mutationsakkumulationen in den transgenen Tieren.

Sämtliche Tierexperimentelle Arbeiten wurden mit Hilfe von Annette Preuss und Julia Abe durchgeführt. Anzeigepflichtige Experimente und Präparationen wurden durch das Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Hamburg genehmigt.

#### 4.3.1. Induktion von Mammakarzinomen durch Transgenexpression

Während der Trächtigkeit und des Säugens wird der Level laktotropher Hormone (z.B. Prolaktin) in Epithelzellen der murinen Mammæ deutlich erhöht. Dieses führt durch Aktivierung des WAP-Promotors zur Expression der Transgene: die frühe Region des SV40 (große T-Antigen (T-Ag), kleines T-Antigen (st) und 17kD Protein) und mutp53. Aber für die Induktion von Mammakarzinomen ist das große T-Ag des SV40 verantwortlich (Schulze-Garg et al., 2000). Die Expression des Transgens führt zur Entstehung von intraepithelialen Neoplasien, duktaalen Karzinomen *in situ* sowie invasiven Karzinomen, je nach Mauslinie dauert dies 6 - 10 Monate. Induzierte Tiere wurden wöchentlich auf palpierbare Tumore untersucht. Betroffene Mäuse wurden zweimal wöchentlich nach Auffälligkeiten und Krankheitssymptomen untersucht und das Tumorwachstum vermessen.

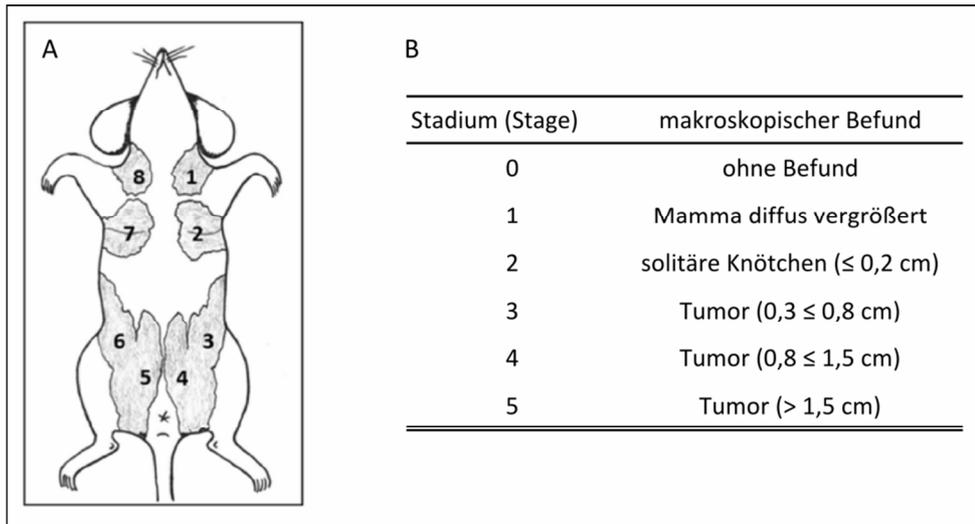
### 4.3.2. Präparation der Mäuse und Organentnahme

Als Kriterien für die Präparation einer Maus dienten der Tumordurchmesser ( $\varnothing \leq 1,5$  cm) bzw. ein schlechter Allgemeinzustand. Für die Betäubung und Tötung wurde Diethylether verwendet. Sofern Tumore für die Gewinnung von Primärtumorzellen verwendet werden sollten, wurden nachfolgende Schritte unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Für die Tumor- und Organentnahme wurde die getötete Maus mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und anschließend auf eine Unterlage in Rückenlage fixiert. Nach Öffnen der Bauchdecke wurden Tumore und Mammae makroskopisch begutachtet (*Staging*) und Tumore, Mammagewebe, Milz, Leber und Lunge entnommen und diese sowohl in Stickstoff (für RNA-, DNA-, Proteingewinnung) als auch in Formalin (für histologische Analysen) fixiert. Für die Analysen der Disseminierungseigenschaften von Tumorzellen wurden zusätzlich Gehirn, Blut und Knochenmark entnommen. Ein Stück des Tumors wurde generell in Shandon Kryomatrix™ eingebettet.

### 4.3.3. Makroskopische Beurteilung des Tumorwachstums (*Staging*)

Während der Präparation wurden sämtliche Mammagewebe der Maus untersucht und verschiedenen Stadien zugeordnet, die sich vorrangig auf die gemessene Größe der Tumore beziehen. Die Mammae wurden wie in Abbildung 14A beziffert: dabei handelt es bei Mammae 1 und 8 um zervikale Brustdrüsen, bei Mammae 2 und 7 um thorakale Gewebe, die im engeren Sinne aus jeweils zwei Mammae bestehen, aber als eine zusammengefasst wurden, bei Mammae 3 und 6 um abdominale Gewebe und bei Mammae 4 und 5 um inguinale Brustdrüsen. Für die Erstellung der makroskopischen Befunde wurde ein Lineal verwendet und die Mammae im Uhrzeigersinn beginnend bei Mamma 1 vermessen. Die Unterteilung der Stadien ist in Abbildung 14B zu sehen.



**Abbildung 14: Lokalisation und Benennung der murinen Mammagewebe und Unterteilung des Stagings**

A) Lage der murinen Mammagewebe einer zu präparierenden Maus. Es wurde acht verschiedene Mammae unterschieden. B) Bedeutung der verschiedenen Stadien eines Tumors.

#### 4.3.4. Tumorzelltransplantation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich orthotope Transplantationen von Tumorzellen durchgeführt. Dazu wurde dem Tier eine Kombinationsnarkose intraperitoneal sowie ein Schmerzmittel subkutan appliziert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt. Die Empfängertiere wurden an der Brustdrüse #3 sorgfältig rasiert, mit 70%-igem Ethanol und Betaisodona-Lösung desinfiziert. Die Zelltransplantation wurde in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Um die Maus vor Unterkühlung zu schützen, wurde sie während der Dauer der Transplantation auf ein vorgewärmtes Gelkissen gelegt. Zunächst wurde ein kleiner Hautschnitt in Höhe des Brustgewebes durchgeführt und das darunterliegende Mammagewebe vorsichtig vom Bindegewebe getrennt und freigelegt. Anschließend wurde die Zellsuspension (20-30  $\mu$ l) direkt in das Mammagewebe injiziert. Der Schnitt wurde mit zwei Stichen genäht und die Wunde mit Betaisodona-Salbe versorgt. Zur Stabilisierung des Kreislaufs wurde der Maus nach der Transplantation 300  $\mu$ l erwärmte Kochsalzlösung (0,9% NaCl) subkutan verabreicht. Die Tiere wurden bis zum Aufwachen aus der Narkose unter eine Wärmelampe gestellt und mit eingeweichtem Futter zur Erleichterung der Wasser- und Nahrungsaufnahme versorgt. Die Tiere bekamen für die folgenden 14 Tage mit Antibiotika (Baytril) und Schmerzmittel (Novaminsulfon) versetztes Trinkwasser. Des Weiteren wurden transplantierte Tiere 2-mal pro Woche nach ihrem Allgemeinzustand und Tumorwachstum über einen Zeitraum von maximal 6 Monaten begutachtet.

**Kombinationsnarkose:** Ketamin 12 mg/ml, Xylazin 1,6 mg/ml,

Applikation: 7-8  $\mu$ g Körpergewicht

<b>Schmerzmittel:</b>	Carpofen 5 mg/ml, Applikation: 1,2 µl/g Körpergewicht
<b>Trinkwasser:</b>	Baytril 2,5%: 1 ml/250 ml, Novaminsulfon 500 mg/ml: 533 µl/200 ml

## 4.4. Immunhistologische und immunzytologische Methoden

### 4.4.1. Immunhistochemie & histologische Beurteilung der Mammakarzinome (*Grading*)

Für die Untersuchungen der Organe wurden sie wie unter 4.3.2 beschrieben entnommen und in 4% gepuffertem Formalin fixiert. Die daran anschließenden immunhistologischen Arbeiten wie Einbetten, Schneiden und Färben wurden von Frau Pilnitz-Stolze nach bewährten Protokollen durchgeführt bzw. auch neu etabliert.

Die histologische Begutachtung der Tumore wurde von Herrn Prof. Dr. med. Schumacher (Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, UKE, Hamburg) durchgeführt. Hierbei wurden die Richtlinien der Klassifizierung für murine Mammakarzinome der Annapolis Konsensus Konferenz (Cardiff et al., 2000) angewandt. Diese unterteilt Tumore anhand ihrer morphologischen Struktur: G0 für epitheliale, neoplastische Veränderungen oder auch Karzinome *in situ*, G1 und G2 für differenzierte und G3 und G4 für undifferenzierte Mammakarzinome.

### 4.4.2. Tumor-Kryokonservierung

Die Verwendung von Shandon Kryomatrix™ unterstützt das schnelle Einfrieren von Geweben, wodurch die Gewebestrukturen erhalten bleiben. Dazu wurde ein Tumorstück direkt nach der Präparation in eine kleine, mit Kryomatrix gefüllte Form gegeben und mit weiterer Kryomatrix bedeckt. Die Probe wurde unter Zuhilfenahme einer Pinzette in einem Gemisch aus Isopentan und Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 4.4.3. Anfertigen von Kryoschnitten

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurde ein Cryostat (CM3050) der Firma Leica verwendet. Das Schneiden von Tumorgewebe erfolgte bei -20°C Kammertemperatur als auch Objektkopf Temperatur. Je nach Bedarf wurden 8 bis 15 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost/Plus Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden bei RT für ca. 30 min getrocknet und konnten sofort für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet oder bei -20°C in luftdicht versiegelten Objektträgerkästen gelagert werden.

#### 4.4.4. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Um die Expression und Lokalisation spezifischer Proteine zu analysieren, wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewandt. Sämtliche Schritte erfolgten in einer feuchten Umgebung, d.h. eine Kammer wurde mit feuchtem Papier ausgelegt.

Um Zellen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung zu fixieren, wurden sie zuvor auf sterilen Deckgläschen ( $\emptyset$  12 mm) in 24-well-Kulturschalen ausgesät und drei bis fünf Tage kultiviert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Kryoschnitte von Gewebe wurden zu Beginn mit einem Fettstift umrandet. Die Fixierung erfolgte jeweils mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei RT. Der Vorteil der PFA-Fixierung liegt im Erhalt der Zellstrukturen für die anschließende Mikroskopie. Bei Verwendung der PFA-Fixierung war es teilweise notwendig, die Zellen zu permeabilisieren, damit Moleküle und Strukturen innerhalb der Zelle und des Zellkerns visualisiert werden konnten. Dieser Schritt erfolgte im Anschluss an die Fixierung mit einer 1%-igen TritonX-100-Lösung, die Zellen wurden ebenfalls für 10 min bei RT mit der Lösung inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Primär- sowie des Sekundärantikörpers zu minimieren, erfolgte zunächst eine Inkubation mit einer Blockierlösung, versetzt mit Normalserum der Spezies, aus der auch der sekundäre Antikörper stammt, für mind. 30 min bei RT. Die Markierung der zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels Antikörper, die ebenfalls in der Blockierlösung verdünnt wurden. Die Präparate wurden mit der Antikörperlösung überschichtet und für 30-60 min bei RT inkubiert (alternativ über Nacht bei 4°C, Gewebeschnitte generell über Nacht). Anschließend wurden die Objektträger 3x 5 min in PBS-T gewaschen und es folgte die Detektion der gebundenen Primärantikörper mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, dafür wurden die Zellen mit der spezies-spezifischen sekundären Antikörper-Lösung überschichtet und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Daran anschließend wurden die Proben erneut 3x 5 min mit PBS-T gewaschen. Bei der Färbung von Gewebeschnitten war eine Nachfixierung mit PFA erforderlich, diese wurde nach der Sekundärantikörperinkubation für 10 min durchgeführt und anschließend wurden die Schnitte erneut 3x 5 min mit PBS-T gewaschen. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe (DAPI und DRAQ5<sup>TM</sup>) verwendet. DAPI wurde bereits zu der Sekundär-Antikörperlösung gegeben, während DRAQ5<sup>TM</sup> standardmäßig dem letzten Waschschrift beigefügt wurde. Zuletzt wurden die Präparate mit Mowiol eingebettet. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Begutachtung und mikroskopische Aufnahmen der Präparate erfolgten entweder am Fluoreszenzmikroskop DMI6000B (Leica) oder am Laser-Konfokalmikroskop LSM 510 META (Zeiss). Verwendete Antikörper und deren verwendete Verdünnung in Kapitel 3.4 zu finden.

**PFA:** 4% PFA in ddH<sub>2</sub>O; 450 ml ddH<sub>2</sub>O wurden auf 60°C erwärmt und 20 g PFA-Pulver sowie ca. 5 Tropfen 2 N NaOH eingerührt. Die Lösung wurde abgekühlt und mit 10x PBS auf 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert von 7,2 wurde mit 37% HCl eingestellt. Abschließend wurde die Lösung filtriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

**TritonX-100-Lösung:** 1% TritonX-100 (v/v) in PBS, pH 7,4

**Blockierlösung:** 0,5% BSA (w/v) in PBS (pH 7,4)

**PBS-T:** 0,1% Tween20 (v/v) in PBS (pH 7,4)

**DAPI:** 0,1% (v/v) DAPI (0,1 mg/ml) in PBS (pH 7,4)

**DRAQ5™:** 0,1% DRAQ5 in PBS oder PBS-T (pH 7,4)

**Mowiol:** 2,4 g Mowiol 4-88® Reagenz wurden in 4,8 ml 99% Glycerin und 1,2 ml ddH<sub>2</sub>O unter Rühren für mindestens vier Stunden oder über Nacht gelöst. Anschließend wurden weitere 12 ml ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben, die Lösung vorsichtig auf 50°C erhitzt und für 10 min unter ständigem Rühren inkubiert. Luftblasen wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 x g, RT) entfernt.

## 4.5. Nukleinsäureanalytische Methoden

### 4.5.1. RNA-Isolierung

#### 4.5.1.1. RNA-Extraktion von eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von RNA aus Zellkulturzellen wurden in Abhängigkeit von der Zellzahl verschiedene Kits verwendet: für weniger als  $5 \times 10^5$  Zellen wurde das RNeasy Micro Kit von Qiagen, für Zellzahlen bis  $5 \times 10^6$  Zellen das innuPrep RNA Mini Kit von Analytik Jena verwendet. Das Prinzip beruht auf spezifischer RNA-Bindung an Silica-Säulchen, verschiedenen Waschschritten und abschließender Elution der gebundenen, gereinigten RNA. Beide Kits unterscheiden sich nur geringfügig im Protokoll, so dass hier nur auf das Protokoll des innuPREP RNA Mini Kits eingegangen wird.

Ein Zellpellet wurde in 400 µl Lysispuffer aufgenommen, für 2 min bei RT inkubiert, erneut resuspendiert, um eine vollständige Lyse zu ermöglichen, und weitere 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf den Filter D zur DNA-Entfernung pipettiert und für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit dem gleichem Volumen 70% Ethanol (angesetzt mit DEPC-H<sub>2</sub>O) vermengt und auf den Filter R gegeben. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt (2 min, 10.000 x g) an und der Durchfluss wurde verworfen. Als nächstes folgten mehrere Waschschriffe mit verschiedenen Pufferlösungen (500 µl HS-Puffer, 700 µl LS-Puffer), jeweils gefolgt von einer Zentrifugation (1 min, 10.000 x g). Zum Entfernen sämtlicher Ethanolreste wurde der Filter 3 min bei 10.000 x g zentrifugiert und die RNA nach einer

1-minütigen Inkubationszeit mit RNase-freiem Wasser in ein neues Reaktionsgefäß eluiert (1 min, 6.000 x g).

#### 4.5.1.2. Aufreinigung von RNA aus murinen Tumorgewebe

Die Extraktion von RNA aus Tumormaterial erfolgte mit TriFast™. Dazu wurde ein ~50 mg großes Gewebestück in ein Röhrchen (Lysing Matrix D) mit 1 ml TriFast™ Reagenz gegeben und in einem Homogenisator zerkleinert. Dies erfolgte in mehreren Schritten (15 sec Stufe 5,5; 3x 10 sec Stufe 4), bis das Gewebe komplett zerkleinert war und zwischendurch wurde die Probe auf Eis gelegt, um einer RNA-Degradation entgegenzuwirken. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde das lysierte Gewebe in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 200 µl Chloroform dazugegeben. Nach Vermischen der Lösung und kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4°C) und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Anschließend wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für weitere 10 min inkubiert und erneut zentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (mit DEPC-H<sub>2</sub>O, eiskalt) gewaschen. Abschließend wurde das Pellet für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Das Pellet konnte für 10 min bei 50°C im Schüttler gelöst werden.

**DEPC-H<sub>2</sub>O:** 0,01% DEPC (Diethylpyrocarbonat) in ddH<sub>2</sub>O, Rühren über Nacht bei RT, autoklaviert

#### 4.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren (sowohl RNA als auch DNA) wurden mit Hilfe des Nano-Drop 1000 Spektrometers photometrisch ermittelt. Dabei wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und zur Konzentrationsbestimmung berücksichtigt. Die Kontrolle der Reinheit erfolgt über die Ratio der Absorption bei 260 nm zur Adsorption bei 280 nm. Für DNA sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte darunter weisen auf eine Proteinverunreinigung hin, Werte darüber auf eine Kontamination mit RNA. Die Werte der Ration für RNA sollten > 2,0 sein. Für die Messung am Nano Drop wurde zuerst der Nullwert eingestellt, indem 1 µl der Lösung, in die die RNA bzw. DNA aufgenommen war, auf die Messfläche des Gerätes pipettiert wurde, und anschließend wurde jeweils 1 µl der Proben für die Messungen eingesetzt.

### 4.5.3. Analyse der RNA-Qualität

Um degradierte RNA-Proben auszuschließen zu können, wurde die Qualität der RNA mit dem Agilent 2100 *Bioanalyzer* untersucht. Zu Beginn wurde die Gelmatrix vorbereitet, indem sie durch ein im Kit enthaltenen Filter filtriert wurde (10 min, 1500 x g). Anschließend wurden 65 µl des gefilterten Gels mit 1 µl Farbstoff durch Vortexen kräftig gemischt und erneut zentrifugiert (10 min, 13.000 x g). Nun wurde das Gel in eine gekennzeichnete Vertiefung (9 µl pro Vertiefung) pipettiert und durch Druck in die Kapillaren des Chips gepresst. Als nächstes wurden in den Vertiefungen für die Proben und den Größenstandard 5 µl eines Markers pipettiert. Nachfolgend wurde 1 µl des Größenstandards in die entsprechende Vertiefung gegeben sowie 1 µl der zu untersuchenden Proben. Zum Schluss wurde der Chip noch auf einem Horizontalmischer (1 min, 2400 rpm) gemischt, in den *Bioanalyzer* eingelegt und der Lauf gestartet. Das Ergebnis wurde als ein Gel-ähnliches Bild und als Elektropherogramm dargestellt und die Qualität bzw. Integrität der RNA ermittelt. Die Integrität wurde als Zahlenwert angegeben, wobei 0 für degradierte RNA und 10 für sehr gute RNA-Qualität steht. Anhand des Elektropherogramms konnten degradierte RNA oder auch DNA-Verunreinigungen visualisiert werden.

### 4.5.4. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese, also das Umschreiben von RNA in cDNA, wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription* Kit von Applied Biosystems verwendet. Routinemäßig wurde dafür 1 µg RNA eingesetzt. Im Fall, dass nur begrenzte Mengen RNA vorhanden waren, wurde in einem Versuch die gleiche RNA-Menge für alle Proben eingesetzt. Zuvor wurde die entsprechende Menge RNA auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

**Tabelle 4: Pipettierschema einer cDNA-Synthese-Reaktion**

Komponente	Volume/Reaktion
10x RT-Puffer	2,0 µl
25x dNTP-Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl
MutiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	14,2 µl
RNA + H <sub>2</sub> O	10,0 µl
Gesamt	20,0 µl

**Tabelle 5: Temperaturzyklus einer cDNA-Synthese-Reaktion**

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Dauer	10 min	120 min	5 min	∞

Die cDNA-Proben wurden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

#### 4.5.5. Quantitative *real-time*-PCR

Zur Expressionsanalyse von bestimmten Genen wird die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) verwendet. Die Methode basiert auf der konventionellen PCR und dient der Quantifizierung spezifischer DNA-Sequenzen durch gleichzeitige Vervielfältigung und Konzentrationserfassung der amplifizierten DNA-Moleküle in Echtzeit. Die Messung der Molekülkonzentrationen erfolgt über Fluoreszenzfarbstoffe, die an der DNA binden. Die Fluoreszenz steigt im gleichen Verhältnis wie die PCR-Produkte pro Zyklus an, worüber die DNA-Menge während eines PCR-Laufs quantifiziert werden kann.

Für die quantitative *real-time*-PCR wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, P/N: 4367659) mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I, der an doppelsträngige DNA bindet, und die Methode der relativen Quantifizierung verwendet. Hierbei wird das untersuchte Gen auf ein Haushaltsgen, dessen Expression nicht reguliert ist, normiert und anschließend wird die Expression unterschiedlicher Proben untereinander verglichen. Für die Berechnung wurde die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001) angewandt. Dabei wird zunächst das Zielgen der Proben auf das Haushaltsgen normiert:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Haushaltsgen}$ . Anschließend erfolgt die Kalibrierung auf eine Kontrollprobe, so dass die Expression der Zielgene weiterer Proben relativ zur Kontrollprobe quantifiziert werden kann:  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Probe} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$ . Der Expressionsunterschied wird wie folgt berechnet:  $n = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Zweifache und höhere Unterschiede der Expression werden als signifikant gewertet, geringe Unterschiede gelten als natürliche Schwankungen.

Für die qPCR wurde ein 10 µl Ansatz pipettiert, bestehend aus 5 µl 2x Power SYBR® Green Mastermix, jeweils 0,5 µmol des Vorwärts- und Rückwärts-Primers, 1 µl cDNA, aufgefüllt auf 10 µl mit ddH<sub>2</sub>O.

Standardmäßig wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt:

**Tabelle 6: Temperatur-Programm einer qPCR**

	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	10 min	95°C
40 Zyklen:		
Denaturierung	15 sec	95°C
Annealing/Elongation	40 sec	60°C

Für die Berechnung der relativen Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet (Pfaffl, 2001), wobei auf ein Haushaltsgen (vornehmlich *Gapdh*) normiert wurden. Im Allgemeinen ist die Verwendung eines Haushaltsgens (*House keeping gene* – HKG) für die relative Quantifizierung ausreichend.

Bei den Analysen von Tumorproben, wie es für die Validierung der EMT-Signatur erforderlich war, wurden in einige Proben Schwankungen in der Expression verschiedener Haushaltsgene beobachtet. In diesem Fall war also die Methode der Normierung auf ein einzelnes Haushaltsgen nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Proben manuell auf fünf verschiedene Haushaltsgene ( *$\beta$ -Aktin*, *Gapdh*, *Hprt1*, *Rplp1* und *18sRNA*) zu normieren. Dadurch wird eine viel präzisere Normierung erreicht, da Schwankungen einzelner Gene minimiert werden. Dafür wurde der Mittelwert aus den Ct-Werten der einzelnen HKGs einer Probe ermittelt und diese vom Ct-Wert des Zielgens abgezogen ( $\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{MW der HKGs})$ ).

Für die manuelle Berechnung der RQ-Werte von Gruppen statt von einzelnen Proben war die Generierung eines gemeinsamen Koeffizienten für die Normierung einzelner Expressionswerte innerhalb einer Gruppe erforderlich. Dabei war Voraussetzung, dass der Mittelwert aller Expressionswerte der Gruppe ( $2^{-\Delta Ct}$ ), auf dem die Normierung erfolgen sollte, eine relative Quantifizierung ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) von 1 ergibt. Dieser Koeffizient wurde mit Hilfe der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Koeffizient} = \log_2 \frac{\sum_{k=1}^n \Delta Ct_n}{n}$$

Anschließend wurde dieser Normierungskoeffizient für die Berechnung der einzelnen  $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus den zu vergleichenden Gruppen zugrunde gelegt. Schließlich konnten einzelne RQ-Werte ( $x=2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), RQ-Mittelwert und RQ-Abweichung für die verschiedenen Gruppen berechnet werden. Durch dieses Verfahren konnte das Verhältnis der Genexpression zwischen zwei Gruppen berechnet werden.

#### 4.5.6. Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse

Zum Erstellen von globalen Genexpressionsprofilen wurden GeneChip® Mouse Genome 430 Version 2.0 Mikroarrays der Firma Affymetrix verwendet. Laut Herstellerangaben können mit einem Array über 39.000 Gentranskripte analysiert werden. Die RNA wurde mit Hilfe von TriFast™ Reagenz isoliert (beschrieben in Kapitel 4.5.1.2), zusätzlich wurde die RNA über Säulchen (RNeasy MinElute™ Cleanup, Qiagen) aufgereinigt. Die Isolation, Aufreinigung und Qualitätskontrolle der RNA-Proben wurde von Christina Heinlein im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte durch die Firma Signature Diagnostics AG in Potsdam und für die Auswertung wurde das Programm dChip verwendet.

#### 4.5.7. DNA-Extraktion aus Gewebe

Für die Extraktion von DNA aus Gewebe wurden ca. 50 mg Gewebe in ein Röhrchen mit Keramikkügelchen (Lysing Matrix D) überführt, in 250 µl Lysispuffer aufgenommen und im Homogenisator zerkleinert (Stufe 6, 40 sec). Anschließend wurden die Proben für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 x g) zentrifugiert. Es wurden weitere 250 µl Lysispuffer in das Reaktionsgefäß gegeben und erneut im Homogenisator zerkleinert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde 1 µl RNase A zur Suspension gegeben und bei 37°C für 15 min schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurden zusätzlich 240 µl Lysispuffer und 10 µl Proteinase K zur Lösung gegeben und nun drei Stunden bei 56°C im Thermo-Schüttler inkubiert. Zwischendurch wurde die Lösung immer wieder gemischt. Nach Verdau wurde die Suspension abermals zentrifugiert (10 min, max. Geschwindigkeit, 4°C). Die DNA wurde mittels Phenol-Chloroform präzipitiert, dazu wurde die Lösung (ca. 700 µl) in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 700 µl kalten Phenol-Chloroform-Gemisch gut vermischt, in ein Phase Lock Gefäß transferiert und weitere 10 min bei 14.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand oberhalb der Gelschicht, der die RNA enthält, wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 650 µl Chloroform vermennt und in ein neues Phase Lock Gefäß überführt. Nach Zentrifugation (14.000 x g, 10 min, RT) der Proben wurde der Überstand (ca. 600 µl) in ein neues 2 ml Gefäß transferiert, 0,1 Vol. Natriumacetat und 2,5 Vol. 100% eiskalter Ethanol dazugegeben und kräftig vermischt. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht oder alternativ mind. 1 Stunde bei -80°C. Darauffolgend wurden die Proben zentrifugiert (14.000 x g, 20-30 min, 4°C), der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und die DNA-Pellets im Anschluss zweimal mit 70%-igem Ethanol (eiskalt) gewaschen. Das Trocknen der Pellets fand bei 40°C für 10-20 min statt und schließlich wurden die Pellets je nach Größe in Tris/HCl pH 7,5

resuspendiert. Die DNA-Konzentrationen wurden am Nano Drop gemessen und die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

**Lysispuffer:** 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS

**RNase A:** Stocklösung 10 mg/ml, in ddH<sub>2</sub>O

**Proteinase K:** Stocklösung 20 mg/ml, in ddH<sub>2</sub>O

**Natriumacetat:** Stocklösung 0,3 M, in ddH<sub>2</sub>O

#### 4.5.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*) dient der Amplifikation von DNA-Molekülen, die mit Hilfe von thermostabiler Polymerasen durchgeführt wird. Als Startpunkt fungiert ein ca. 20-25 bp langes Oligonukleotid, welches an denaturierter, einzelsträngiger DNA bindet. Die Polymerase nutzt den DNA-Strang als Vorlage und synthetisiert den dazu komplementären Strang. Die entstandenen Produkte dienen im folgenden Zyklus ebenfalls als Matrize und ermöglichen so eine exponentielle Vervielfältigung. Die PCR wurde nach dem Schema in Tabelle 7 pipettiert und das Temperaturprogramm ist in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 7: Pipettieransatz einer Standard-PCR**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x Puffer	2,5 $\mu\text{l}$	1x
10 mM dNTPs	0,5 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ Primermix	1,25 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$	0,5 U
DNA	x $\mu\text{l}$	100-500 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu\text{l}$	

**Tabelle 8: Temperatur-Programm einer Standard-PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5 min
30-40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 sec
Annealing	55-65°C	30 sec
Elongation	72°	1 min
Finale Elongation	72°C	5 min
Abschluss	4°C	$\infty$

#### 4.5.9. Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Dazu wurden abhängig der zu erwartenden Fragmentgröße unterschiedlich konzentrierte Agaroselösungen verwendet. Im Allgemeinen wird mit 1%-igen Agarosegel eine Vielzahl von Fragmentgrößen abgedeckt. Für die Herstellung eines Gels wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50-60°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid, ein DNA-interkalierender Farbstoff, der durch UV-Licht sichtbar gemacht werden kann, versetzt (Endkonzentration: 0,1 µg/ml) und anschließend in eine horizontale Gelkammer zur Polymerisation gegossen. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer durchgeführt bei einer Spannung von 100-120 V. Zur Analyse der Größe wurde auf jedem Gel 5-10 µl eines geeigneten Größenmarkers aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte an einem BioDoc Analyze UV-Transilluminator (Biometra).

**TAE-Puffer (50x):** 2 M Tris, 0,5 M Essigsäure (100%), 0,05 M EDTA

#### 4.5.10. Gelaufreinigung

Um linearisierte DNA-Fragmente aufzutrennen und aufzureinigen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden von entsprechender Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Für die Isolierung der DNA aus der Agarose wurde das NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel verwendet. Dafür wurde das ausgeschnittene Agarosestück mit der DNA gewogen, in der entsprechenden Menge NT-Puffer aufgenommen (200 µl NT-Puffer/100 mg Agarose) und für 10 min bei 50°C erwärmt, um die Agarose zu lösen. Die Lösung wurde auf die Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 11.000 x g). Mit 600 µl NT3-Puffer wurde die Säule gewaschen und zum Trocknen der Säule erneut zentrifugiert (2 min, 11.000 x g). Abschließend wurde die DNA in 15-50 µl NE-Puffer eluiert.

#### 4.5.11. Design von Oligonukleotiden für PCR und qPCR

Die Software SECentral (*Scientific & Educational Software* mit folgenden Add-Ins: Clone Manager 5, Primer Designer 4, Align Plus 4) wurde zum Designen von Primern für Standard-PCR und qPCR verwendet. Dazu wurde die Gensequenz im Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) oder bei Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) gesucht und die Sequenz (für Standard-PCR: genomische Sequenz, für qPCR: mRNA-Sequenz) in den Clone Manager 5 kopiert. Anschließend wurden die Exons beschriftet und über Primer Designer 4 geeignete Primer gesucht. Folgende Bedingungen wurden für die Suche genutzt:

GC-Gehalt sollte zwischen 40% und 60% sein, keine Primerdimere und drei und mehr gleiche auf einander folgende Basen sollte vermieden werden. Des Weiteren wurde im Genome Browser die spezifische Bindung der Oligonukleotide überprüft und ob die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) beider Primer zueinander passen. Dazu wurde der web-basierte  $T_m$ -Rechner von Applied Biosystems (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techttools/calc/>) verwendet. Besondere Anforderungen wurden an die Primer für qPCR gestellt: die Schmelztemperatur sollte um 60°C liegen, das zu amplifizierende Fragment sollte zwischen 100 und 200 bp lang sein und in verschiedenen Exonen bzw. ein Primer über eine Exongrenze binden, so dass eine Amplifikation genomischer DNA von der Vervielfältigung von cDNA unterschieden werden kann.

#### 4.5.12. Sequenzierung

Für die Überprüfung und Analyse von DNA-Sequenzen wurde eine Form der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger angewandt, die auf Fluoreszenzfarbstoffe basiert. Hierbei bewirken fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxy-NTPs) einen Kettenabbruch beim *cycle sequencing* (Sanger et al., 1977), so dass Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. In einer Gelelektrophorese werden die Fragmente aufgetrennt und daraus ist die DNA-Sequenz ableitbar. Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurden Proben für Sequenzierreaktionen vorbereitet. Dazu wurden 600 bis 700 ng Plasmid-DNA bzw. 50-250 ng DNA von PCR-Produkten in Abhängigkeit von der Größe des Produktes eingesetzt. Als Primer wurden geeignete Oligonukleotide der PCR als auch der qPCR in einer Konzentration von 20 pmol verwendet. Das Gesamtvolumen des DNA- und Primer-Gemisch betrug routinemäßig 7 µl. Die Sequenzierung wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

### 4.6. Proteinanalytische Methoden

#### 4.6.1. Protein-Isolation

##### 4.6.1.1. Proteinextraktion aus Gewebe

Um Proteine aus Gewebe zu isolieren, wurde ein Gewebestück (~50 mg) auf Trockeneis eingewogen und in Lysing Matrix D Reaktionsgefäße mit 10x Volumen Lysispuffer zerkleinert (3x 15 sec, Stufe 4,5). Als Lysispuffer wurde entweder der 2x SDS-Lysispuffer zur Extraktion sämtlicher Proteine oder der E1A-Lysispuffer, versetzt mit Protease-Inhibitoren, zur Extraktion gelöster Proteine aus dem Gewebe verwendet. Zwischen den einzelnen Zerkleinerungsstufen wurden die Proben für mind. 1 min auf Eis gelagert, um eventueller Degradation durch Proteasen vorzubeugen. Nach kompletter Zerkleinerung des Gewebes wurde der Überstand in

ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 10 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert, um sämtlichen Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde erneut abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

**2x SDS-Lysispuffer:** 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 4% SDS

**E1A-Lysispuffer:** 50 mM HEPES (pH 7,0-7,5), 150 mM NaCl, 0,1% NP40

#### **Protease-Inhibitoren**

**Trasylol** (Stocklösung 10 mg/ml, in H<sub>2</sub>O) – 1:500

**Pepstatin A** (Stocklösung 1 mg/ml, in Ethanol) – 1:1000

**Leupeptin** (Stocklösung 1 mg/ml, in H<sub>2</sub>O) – 1:1000

**PefaBlock** (Stocklösung 100 mg/ml, in 50% Glycerol) – 1:200

#### **4.6.1.2. Proteinextraktion aus Zellen**

Für die Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen wurden die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale (6-well) mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend 200 µl Lysispuffer (2x SDS-Lysispuffer oder E1A-Puffer mit Protease-Inhibitoren) auf die Zellen gegeben; mit einem Gummischaber wurden die Zellen vom Boden gelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellklumpen zerkleinert und die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

#### **4.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

##### **4.6.2.1. Bradford-Test**

Die Bradford-Methode dient der photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen. Dafür wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 verwendet, dessen nicht gebundene, kationische Form sein Absorptionsmaximum bei 470 nm hat. Durch Bindung an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs, das nun als anionische Sulfonatform stabilisiert wird, zu 595 nm. Der Nachteil der Methode liegt im begrenzten Einsatz von bestimmten Lysispuffern, denn Detergenzien wie SDS oder Denaturierungssubstanzen wie DTT oder Harnstoff stören die Reaktion, so dass dieser Test zur Proteinbestimmung nur bei Verwendung von E1A-Lysispuffer angewandt werden konnte. Für die Messung wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit dH<sub>2</sub>O vermischt und 2 µl der Proteinproben dazugeben. Zur Bestimmung der Konzentration wurde bei jeder Messung eine BSA-Standardreihe mitgeführt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden in mehreren

Verdünnungsstufen gemessen. Anschließend wurde die Konzentration der Proben anhand der BSA-Reihe ermittelt.

**Bradford-Reagenz:** 100 mg Coomassie-Brilliant-Blau G250, 50 ml 95% Ethanol, 100 ml Phosphorsäure, auf 200 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

#### 4.6.2.2. BCA-Proteinassay

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der totalen Proteinmenge ist die Verwendung des BCA-Assays, der mit Detergenzien kompatibel ist. Hierbei wird die Reduktion von zweiwertigem zu einwertigem Kupferion und die anschließende Bindung an zwei Moleküle Bicinchoninsäure (BCA) genutzt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt. Zu Beginn wurden BCA-Lösung A und BCA-Lösung B im Verhältnis 50:1 vermischt und zu 1 ml des BCA-Ansatzes wurden jeweils 5 µl der Proteinproben dazugegeben und vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C im Dunkeln mit nachfolgender Messung der Absorption. Auch hier wurde bei jeder Messung eine BSA-Standardreihe mitgeführt und die Proteinkonzentration anhand dieser bestimmt.

#### 4.6.3. SDS-PAGE

Diese Methode ist eine Form der Gelelektrophorese, bei der Proteine hauptsächlich nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wird zur Analyse von denaturierten Proteinen verwendet, als Trennungsmatrix dient ein Polyacrylamidgel, dem SDS, ein anionisches Detergenz, beigelegt ist, welches die Eigenladungen der Proteine überdeckt. Polyacrylamidgele (PAA-Gele) sind relativ kleinporig (3-6 nm), die Porengröße ist abhängig von der Konzentration des Acrylamids sowie vom Vernetzungsgrad. Kleine Moleküle sind in der Lage, schneller durch die Poren zu wandern als größere. Dementsprechend sind nach der Elektrophorese die Proteine ihrer Größe nach im Gel angeordnet und können über verschiedene Methoden, z.B. Silberfärbung oder Western Blot, sichtbar gemacht werden.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamid-Gele (2x)**

	Trenngel		Sammelgel
	8%	10%	
H <sub>2</sub> O dest.	4,73 ml	4,1 ml	2,8 ml
Acylamidstammlsg. 30%	2,67 ml	3,3 ml	670 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	Sammelgelpuffer 500 µl
TEMED	6 µl	4 µl	4 µl
10% (w/v) APS	100 µl	100 µl	40 µl

Zuerst wurde das Trenngel in gewünschter Konzentration unter Verwendung einer Gelkammer luftblasenfrei gegossen. Hierbei war zu beachten, dass APS und TEMED zuletzt dazugegeben wurden, da diese die Polymerisation des Gels einleiten. Das Gel wurde sofort mit einer Schicht Isopropanol bedeckt, um eine gerade Grenzfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels konnte das Sammelgel gegossen werden. Zuvor wurde das Isopropanol sorgfältig durch Spülen mit dH<sub>2</sub>O entfernt und die Gelkante mit Whatman-Papier getrocknet. Das Sammelgel wurde ebenfalls zügig verarbeitet und ein gesäuberter Kamm zur Ausbildung der Taschen in das Sammelgel gesteckt. Nach Aushärten des Sammelgels konnte das Gel für die SDS-PAGE verwendet werden. Die Proteinproben wurden mit 6x Probenpuffer versehen, für 5 min aufgekocht und anschließend aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 10-12 mA für das Sammelgel und 20-24 mA für das Trenngel bei angepasster Spannung. Als Größenkontrolle wurde ein Molekularmarker der Firma Biorad mitgeführt.

**Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS

**Sammelgelpuffer:** 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8% SDS

**6x SDS-Probenpuffer:** 130 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20% Glycerin, 4,6% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 0,2 g Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O

**SDS-Laufpuffer:** 25 mM Trizma Base, 200 mM Glycin (pH 8,3), 0,1% SDS

#### 4.6.4. Western Blot

Als Western Blot (oder auch Immunblot) wird der Transfer von Proteinen von einem Acrylamidgel auf eine Membran, z.B. Nitrocellulose- oder PVDF-Membran, bezeichnet. Nachfolgend können die Proteine durch die Bindung spezifischer Antikörper detektiert werden. Zuvor muss das Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt werden. Blotten meint im engeren Sinne nur das Übertragen der Proteine auf eine Trägermatrix. Dies geschieht z.B. mit Hilfe des

„Tankblotting“, bei dem die Membran und das Gel als „Sandwich“ in Kassetten gelegt werden, die dann in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer dem elektrischen Feld ausgesetzt werden. Für die Detektion der Proteine wird nach dem Blockieren ein primärer Antikörper dazugegeben, der spezifisch gegen das entsprechende Protein gerichtet ist, im nächsten Schritt wird der überschüssige erste Antikörper gewaschen und der zweite Antikörper, der an den konstanten Teil des primären Antikörpers bindet, zugegeben. Dadurch wird das Signal verstärkt, da mehrere sekundäre Antikörper an den Primärantikörper binden. An dem zweiten Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, eine Peroxidase aus dem Meerrettich. Dieses Enzym katalysiert z.B. die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, wobei Licht emittiert wird.

#### 4.6.4.1. Proteintransfer

Die Proben wurden zuerst gelelektrophoretisch (siehe Kapitel 4.6.3) aufgetrennt und anschließend wurden vier Filterpapiere (Whatman-Papier) und die Nitrocellulose-Membran (Amersham) auf Gelgröße zugeschnitten. Es wurde ein „Sandwich“ zusammengebaut, zuvor wurden die Filterpapiere und Vliese mit dem Transferpuffer getränkt. Das Sandwich bestand von unten (- Pol) nach oben (+ Pol) aus einer Lage Vlies, zwei Filter, gefolgt von dem Gel, darauf wurde vorsichtig unter Zuhilfenahme einer Pinzette die Membran gelegt. Dann folgten wieder zwei Filter und zuletzt ein Vlies. Entscheidend war, dass zwischen Gel und Membran sowie auch zwischen diesen und den Filterpapieren keine Luftblasen vorhanden waren. Potentiell vorhandene Luftblasen wurden mit einer Walze vorsichtig entfernt. Das Sandwich wurde in eine Kassette eingebracht, die in den Tank gestellt und mit Transferpuffer bedeckt wurde. Für das Blotting wurden folgende Parameter eingestellt: 70 min, 60 V, RT.

**Transferpuffer:** 20 mM Tris-HAc und 0,1% SDS (pH 8,3), 20% Isopropanol, in H<sub>2</sub>O

#### 4.6.4.2. Ponceau-Färbung

Ponceau-S ist ein Azofarbstoff zur Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membranen. Die Methode dient der Kontrolle eines erfolgreichen Blottens. Dabei bindet das Ponceau-S reversibel an Proteine. Die Färbelösung wurde auf die Membran gegeben und unter Schwenken für wenige Minuten (2-3 min) inkubiert. Wasser spült anschließend die Farbe von der leeren Membran schneller fort, als von den geblotteten Proteinen, wodurch die Proteinbanden auf der Membran visualisiert werden.

**Ponceau-S-Lösung:** 1% Ponceau-S in 5%-iger Essigsäure-Lösung

#### 4.6.4.3. Detektion mit Pierce ECL

Nach dem Transfer wurde das „Sandwich“ auseinander gebaut und die Membran mit TBS-T gespült. Das Blockieren der freien Bindungsstellen der Membran sowie unspezifische Proteinbindestellen erfolgte mit einer 5%-igen Milch-Lösung in TBS-T. Der primäre Antikörper wurde in vorab bestimmter Konzentration dazu gegeben. Die Inkubation fand über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler statt oder alternativ 1,5 h bei Raumtemperatur. Der überschüssige primäre Antikörper wurde gewaschen, indem die Membran einmal kurz mit TBS-T gespült wurde und dann anschließend 3x 10 min ebenfalls mit TBS-T auf dem Schüttler gewaschen wurde. Der zweite Antikörper wurde zur Membran gegeben, welcher 45 min bei Raumtemperatur schüttelnd einwirkte. Der überschüssige zweite Antikörper wurde wie der erste gewaschen: 1x mal kurz spülen und 3x 10 min in TBS-T waschen.

Für die Anwendung des ECL-(*enhanced chemiluminescent substrate*) Kits von Pierce wurde zuvor die Arbeitslösung frisch angesetzt. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Die Membran wurde in eine Filmkassette mit der Proteineseite nach oben gelegt. Auf die Membran wurde nun die fertige ECL-Arbeitslösung gegeben und die Membran mit einer Folie bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurden zur Visualisierung Röntgenfilme belichtet und anschließend entwickelt.

**TBS-T:** TBS, 0,1% (v/v) Tween20

#### 4.6.4.4. Membran-Stripping

Wenn eine Membran für mehrere Antikörperentwicklungen verwendet wurde, musste sie dazwischen „gestrippt“ werden, d.h. die primären und sekundären Antikörper wurden mit Hilfe einer Strip-Lösung entfernt. Dazu wurde erst die ECL-Lösung von der Membran entfernt (4x 5 min Waschen mit TBS-T), im Anschluss daran wurde die Membran mit der Strip-Lösung bedeckt und 10-15 min schüttelnd inkubiert. Darauf folgend wurde die Membran mit TBS-T gespült, 2x 10 min mit TBS-T auf dem Schüttler gewaschen und anschließend erneut mit einer 5%-igen Milch-Lösung in TBS-T blockiert.

**Strip-Lösung:** 0,1 M Glycin (pH 2,5), in H<sub>2</sub>O

#### 4.6.5. ELISA – Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

Das ELISA-Verfahren ist ein antikörperbasiertes Verfahren zum Nachweis von Proteinen, Viren oder auch niedermolekularen Verbindungen (z.B. Hormone, Toxine, Antikörper). Dabei wurde eine spezielle Variante des ELISA angewandt: der Sandwich-ELISA. Für das Verfahren wurden zwei verschiedene Antikörper, die das gleiche Protein an unterschiedlichen Epitopen binden, verwendet. Zuerst wurden die Vertiefungen einer speziellen Mikrotiterplatte (Maxisorb, Nunc) mit dem ersten Primärantikörper (Beschichtungsantikörper, Verdünnung 1:100 in PBS) beschichtet: 100 µl/96-well, die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen (200 µl PBS/96-well). Zum Absättigen freier Bindungsstellen folgte ein Blockierungsschritt mit 5% Milch in PBS (200 µl/96-well) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Als nächstes wurde die Proteinlösung (20 µg Protein in 100 µl PBS) in die Vertiefungen gegeben und bei 37°C für 90 min inkubiert. Die Proteinlösung wurde verworfen und die Platte 3x mit PBS (200 µl/96-well) gewaschen, um ungebunden Proteine zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem 2. Primärantikörper (Detektionsantikörper, Verdünnung in 5% Milch 1:500), erneut bei 4°C über Nacht. Es entsteht das sogenannte Sandwich: das zu untersuchende Protein ist zwischen den beiden Antikörpern gebunden und sie bilden einen Antikörper-Protein-Antikörper-Komplex. Am folgenden Tag wurde der überschüssige Antikörper durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt und der HRP-gekoppelter Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des 2. Primärantikörpers gerichtet ist (Verdünnung in 5% Milch 1:5000) in die Vertiefungen pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen der Platte mit PBS erfolgte die Detektion mit Hilfe des Substrats OPD (*o*-Phenylenediamin-Dihydrochlorid, Sigma). Das Substrat in Tablettenform wurde zuvor in 20,6 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gelöst, dann wurden der Lösung 19,4 ml 0,1 M Zitronensäure (pH 5,0) und 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben und durchmischt. Von dieser klaren Substratlösung wurden 100 µl in die Vertiefungen pipettiert und nach ca. 5 minütiger Inkubation die Reaktion mit 100 µl 2 N HCl pro Vertiefung gestoppt. Der Farbumschlag zu Gelb-Braun wurde bei 492 nm analysiert.

#### 4.6.6. Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation (IP) dient der Analyse von Interaktionspartnern eines Proteins, die mittels Antikörper in einer Lösung angereichert werden. Dabei wird ein Antikörper an Sepharosekügelchen gekoppelt, der in einem Gewebelysat sein spezifisches Protein bindet und dieses samt weiteren gebundenen Proteinen heraus präzipitiert. Nachfolgend können die

mitgebundenen Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blots detektiert werden.

Zu Beginn wurden 2 ml Sepharosekügelchen (Amersham Biosciences) in 20% Ethanol abgenommen und dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, zwischendurch wurden die Kügelchen für 3 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Sepharose mit E1A-Puffer äquilibriert: die Kügelchen wurden dreimal mit dem Puffer gewaschen und nachfolgend in 10-fachem Volumen der Kügelchen in E1A-Puffer aufgenommen. Für die IP wurden jeweils 10 µl Sepharosekügelchen verwendet, die mit 2 µg eines bestimmten Antikörpers schüttelnd inkubiert wurden (4°C, über Nacht). Am Folgetag wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 500 µl E1A-Puffer entfernt (Zentrifugation: 300 x g, 3 min, 4°C) und die Sepharosekügelchen abschließend in 500 µl E1A-Puffer mit Protease-Inhibitoren ein weiteres Mal äquilibriert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und 50-2000 µg Proteinlysate zu den Sepharosekügelchen gegeben (Endvolumen 300 µl). Der Ansatz inkubierte 1 h bei 4°C mit ständigem Schütteln, danach wurde er dreimal mit 500 µl E1A-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 300 x g, 3 min, 4°C). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt und das Pellet für die anschließende SDS-PAGE in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 min aufgeköcht.

## 4.7. Computer-assistierte Analysen

### 4.7.1. Analyse der Gefäßdichte mit Hilfe von ImageJ

Für die quantitative Auswertung von CD31-Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Software ImageJ verwendet. Von den Färbungen wurden konfokale Aufnahmen (10x Luft-Objektiv, 0,7x Scanzoom) erstellt. Zuerst wurde ein Schwarz-weiß-Bild des entsprechenden Kanals (CD31-positiv – grüner Kanal) erzeugt, an dem der Grenzwert so eingestellt wurde, dass alle CD31<sup>+</sup> Zellen als Pixel, aber kein zusätzlicher Hintergrund erkannt wurde. Dabei wurden alle positiven Bereiche, die kleiner als 19 µm<sup>2</sup> waren, nicht als Gefäße gezählt und dementsprechend für die Analyse nicht berücksichtigt. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass positive Bereiche kleiner 19 µm<sup>2</sup>, die möglicherweise keine Gefäße darstellten, für die Analyse nicht berücksichtigt wurden. Die Anzahl, Größe und Gesamtfläche der CD31-positiven Partikel wurden anschließend ermittelt und konnten dann mit Hilfe der GraphPad Prism Software ausgewertet werden. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des zweiseitigen-t-Tests für unabhängige Stichproben ermittelt.

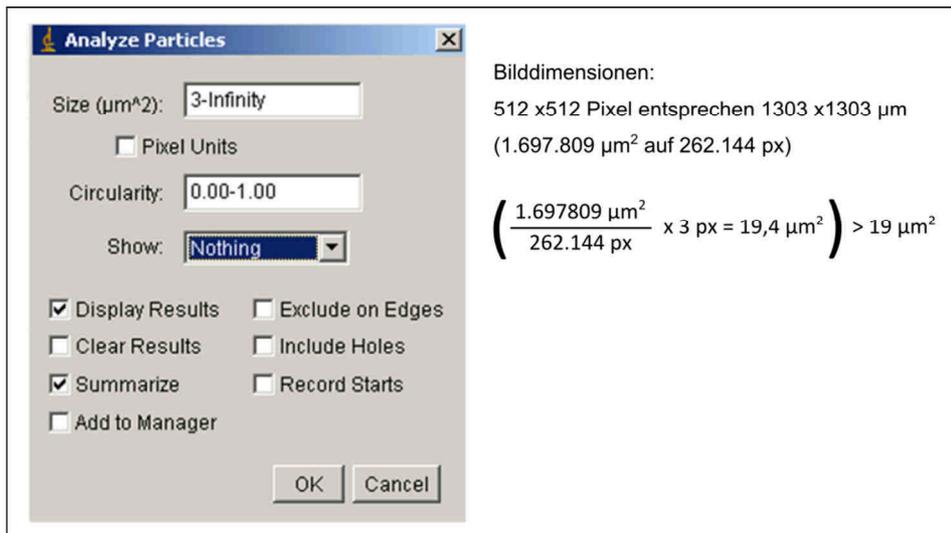


Abbildung 15: Einstellungen für die Partikelanalyse

#### 4.7.2. GraphPad Prism für die statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4. Soweit nicht anders angegeben wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben (Studentischer t-Test) mit 95% Zufriedenheitsintervall verwendet. Für die Signifikanzberechnung der Überlebenskurven der verschiedenen Mauslinien wurde der Chi<sup>2</sup>-Test zugrunde gelegt. Die Bedeutung und Darstellung der p-Werte ist in nachfolgender Tabelle aufgeschlüsselt.

Tabelle 9: Bedeutung und Darstellung der Signifikanz

p-Wert	Beschreibung	Darstellung
>0,05	Nicht signifikant	-
0,01-0,05	Signifikant	*
0,001-0,01	Sehr signifikant	**
<0,001	Extrem signifikant	***

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Einfluss von mutiertem p53 (mutp53) im WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell

Da Mutationen im *p53*-Gen in der Hälfte aller Tumore und in knapp 25% aller Mammakarzinome auftreten, war es Ziel dieser Arbeit u.a. herauszufinden, ob die Expression bestimmter p53-Mutationen die Aggressivität der Erkrankung erhöht. Für die Untersuchungen des Einflusses von mutierten p53 auf die Tumorprogression wurde das in der Abt. Tumorstudiologie (HPI) bereits etablierte WAP-T Mausmodell verwendet (Schulze-Garg et al., 2000; Krepulat et al., 2005; Heinlein et al., 2008). Dazu wurden die Effekte von zwei verschiedenen p53-Mutanten untersucht, die häufig in humanen Brustkrebs vorkommen: an der Aminosäure-Position 248 (entspricht in der Maus der Position 245) wurde Arginin (R) durch Tryptophan (W) ersetzt und an der Position 273 (in der Maus: 270) wurde Arginin durch Histidin (H) ausgetauscht (IARC-Datenbank, R15 Nov. 2010, Petitjean et al., 2007). Frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die gewebsspezifische Expression von mutp53 in der Brustdrüse von BALB/c-Mäuse allein nicht ausreicht, um ein Tumorwachstum zu induzieren (Heinlein, 2006). Die meisten beschriebenen onkogenen Funktionen von mutp53 (mutp53 GoF) wurden zuerst in einem p53-negativen Hintergrund beobachtet, da ein dominant-negativer Effekt von mutp53 aufgrund des Fehlens von Wildtyp-p53 ausgeschlossen werden konnte (Wolf et al., 1984; Shaulsky et al., 1991a; Dittmer et al., 1993). Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde aus diesen Gründen entschieden, WAP-T Mäuse als induzierbares Modell für Mammakarzinome zu verwenden. WAP-T Mäuse tragen die frühe Region des SV40 als Transgen unter Kontrolle des WAP-Promotors. Nach Induktion des Transgens wird T-Ag spezifisch in den luminalen Zellen der Brustdrüse exprimiert und sorgt u.a. für eine funktionelle Inaktivierung von wtp53. Nach 6-8 Monate entstehen die ersten makroskopischen Tumore. Wegen einfacherer Züchtung wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit der WAP-T-NP8 Mauslinie gearbeitet. Für eine gewebsspezifische Expression von mutp53 in den Tumorzellen wurden bitransgenen Mauslinien durch Kreuzen von monotransgenen WAP-mutp53 Linien mit WAP-T-NP8 generiert (WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> bzw. WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R270H</sup> Mauslinien, siehe 3.1.1). Anschließend wurden diese bitransgene Mäuse mit der monotransgenen WAP-T-NP8 Mauslinie verglichen. Mono- und bitransgene Mäuse weisen ähnliche Expressionslevel von T-Ag auf, so dass Effekte, die auf der Expression von T-Ag beruhen, in allen Linien gleich sind und außer Acht gelassen werden können. Die Expression von mutp53 ist in den monotransgenen WAP-mutp53 Mauslinien verschieden: so zeigen Tiere der W10 und H8 Linien während der Laktation eine

starke Expression des Proteins, während W1 eine intermediäre, W4 und H22 eine geringe mutp53-Expression aufweisen (Krepulat et al., 2005). Die Linien-spezifische mutp53-Expression ist ebenfalls in den bitransgenen Mausstämmen wiederzufinden. Die Planung und erste Datensammlung für die Auswertung der verschiedenen Tumormaus-Kohorten wurden bereits von Dr. F. Krepulat und Dr. C. Heinlein (Abt. Tumorstudiologie, HPI) erhoben. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden Linien wie in Tabelle 10 bezeichnet:

**Tabelle 10: Nomenklatur der Mausstämmen und Expressionslevel von mutp53 während der Laktation**

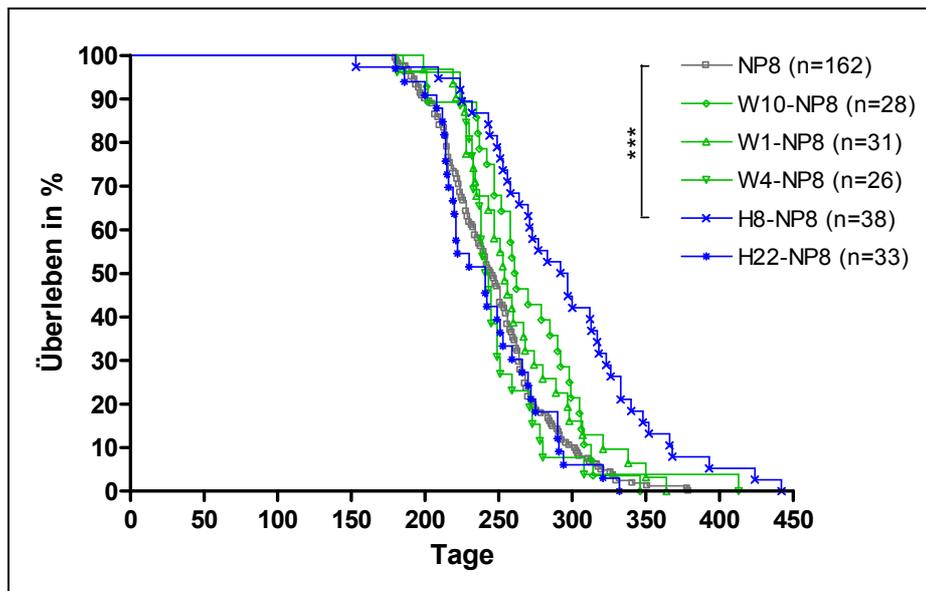
Nomenklatur	mutp53- Expressionslevel	Abkürzung
WAP-T-NP8	∅	NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R245W</sup> -W10	hoch	W10-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R245W</sup> -W1	mittel	W1-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R245W</sup> -W4	gering	W4-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R270H</sup> -H8	hoch	H8-NP8
WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R270H</sup> -H22	sehr gering	H22-NP8

### 5.1.1. Phänotypischer Vergleich mono- und bitransgener Mäuse

Um den *Gain of function* einer mutp53-Expression in einem funktionellen p53-Null-Hintergrund zu untersuchen, wurden die Linien zuerst phänotypisch charakterisiert. Dazu wurden das Überleben der Tiere, die Tumorlast, der Malignitätsgrad der Tumore sowie die Entwicklung pulmonaler Metastasen verglichen.

#### 5.1.1.1. Überlebensrate

Die phänotypische Analyse wurde zunächst mit der Untersuchung des Überlebens der verschiedenen Mauslinien nach einmaliger Induktion begonnen. Dazu wurden acht Wochen alte Tiere einmal verpaart und nach ca. 8-10 Monaten aufgrund des Erreichens der Präparationskriterien (Tumorgröße und/oder schlechter Allgemeinzustand) getötet und präpariert. Es galt zu beobachten, ob die Expression von mutp53 in den bitransgenen Mäusen zu einer veränderten Überlebensrate führt.



**Abbildung 16: Überlebenskurven der verschiedenen Mauslinien**

Bitransgene Mauslinien zeigen keine deutlichen Unterschiede in der Überlebensrate im Vergleich zu den monotransgenen NP8. Die Tiere erreichten die Kriterien für Präparationen durchschnittlich im Alter von 245 Tagen. Ausnahme ist die H8-NP8 Linie: die Mäuse wurden im Durchschnitt 294 Tage alt (Chi<sup>2</sup>-Test,  $P < 0,0001$ ).

Anhand der Abbildung wird offensichtlich, dass es keinen großen Unterschied in den Überlebenskurven der verschiedenen bitransgenen Linien im Vergleich zur NP8 Linie gibt. Die Tiere der NP8 Linie wurde durchschnittlich im Alter von 245 Tagen (ca. 8 Monate), die der W10-NP8 nach 261 Tagen, Tiere der W1-NP8 Linie nach durchschnittlich 254 Tagen, die der W4-NP8 Linie im Alter von 242 Tagen und die H22-NP8 Mäuse nach ca. 241 Tage präpariert. Eine bessere Überlebensrate wiesen die Tiere der H8-NP8 Linie auf, diese wurde im Durchschnitt erst nach 294 Tagen (knapp 10 Monate) präpariert.

Die bessere Überlebensrate der H8-NP8 Mauslinie lässt sich durch zwei Hypothesen erklären: entweder weisen diese Mäuse eine verzögerte Tumorentstehung oder eine veränderte Kinetik des Tumorzustands auf. Um dies zu beantworten, wurden Latenz zwischen Induktion und Tumorzustand sowie Wachstumskinetik für NP8 und H8-NP8 Mäuse bestimmt. Grundlage der Berechnung war das Wurfdatum, da zu diesem definierten Zeitpunkt die Transgenexpression aktiv war. Zuerst wurde der Zeitpunkt der Tumorentstehung bestimmt: ca. 140 Tage nach dem Wurf wurden in NP8 Mäusen erstmals Tumore entdeckt, bei H8-NP8 Mäusen traten Tumore durchschnittlich erst nach 191 Tagen auf. Das Präparationskriterium war in beiden Linien ca. 25 Tage nach der Entdeckung des ersten Tumors erreicht, also bei NP8 nach ca. 164 Tagen und bei H8-NP8 nach 217,5 Tagen (Tabelle 11). Das Tumorzustand ist in beiden Linien vergleichbar und wird offenbar nicht durch die mutp53-Expression beeinflusst. In Bezug auf die Tumorentstehung konnte ermittelt werden, dass in H8-NP8 Tieren der

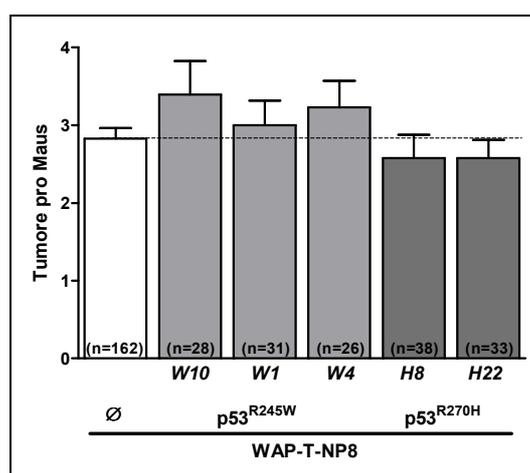
Wachstumsbeginn von Tumoren deutlich verzögert war als im Vergleich zu NP8 Mäusen, was das spätere Erreichen der Präparationskriterien erklärt.

**Tabelle 11: Zusammenfassung des Tumorwachstums bezogen auf NP8 und H8-NP8**

	Zeitraum von Induktion (Wurf) bis Zeitpunkt des Ereignisses (Tage $\pm$ SEM)		
	Beginn Tumorwachstum	Präparation	Wachstumsdauer
NP8 (n=93)	140,1 $\pm$ 4,126	164,1 $\pm$ 4,341	24,0
H8-NP8 (n=21)	191,0 $\pm$ 12,47	217,5 $\pm$ 12,85	26,5
Unterschied zwischen den Linien	50,91 $\pm$ 10,49	53,42 $\pm$ 10,96	

### 5.1.1.2. Tumorlast

Nachfolgend wurde die Anzahl der Tumore pro Maus ermittelt. Während der Präparation wurden alle acht murinen Mammagewebe makroskopisch begutachtet und Tumore vermessen. Bei multiplen Tumoren einer Brustdrüse wurden sämtliche Tumore vermessen und in die Auswertung mit einbezogen. Als Tumor gewertet wurden Gewebsveränderungen bzw. Knötchen, die aus einer Brustdrüse heraus entstanden sind und eine Größe von mind. 0,3 cm im Durchmesser aufwiesen. Bei der Auswertung wurden ausschließlich Mammakarzinome berücksichtigt.



**Abbildung 17: Anzahl der Tumore pro Maus**

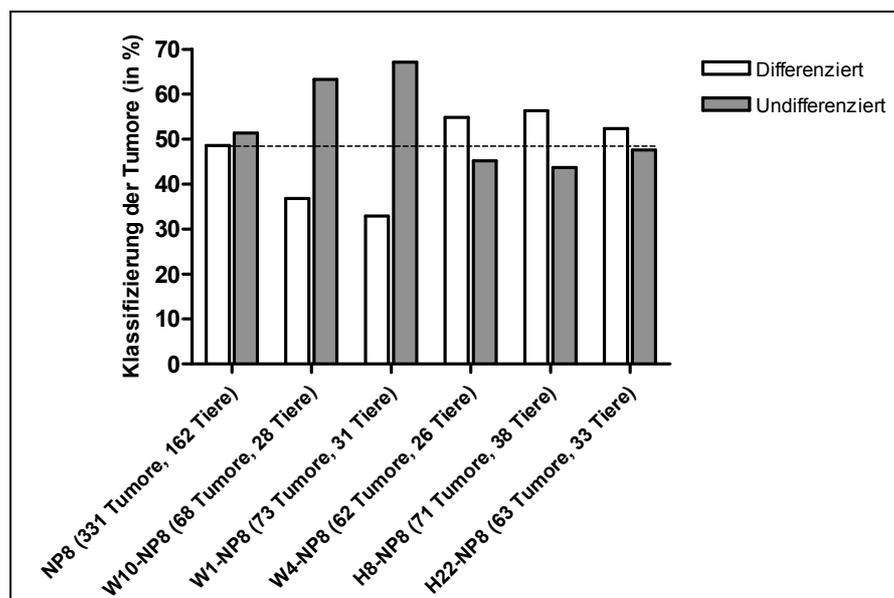
Ermittelt wurde die Zahl der Tumore größer 0,3 cm, die eine Maus durchschnittlich pro Linie entwickelt. Dabei wurden mittels t-Test keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

NP8 Tiere entwickeln im Durchschnitt 2,8 Tumore pro Tier. Die Anzahl der Tumore in Mäusen, die die R245W-Mutation exprimieren, ist leicht erhöht: W10-NP8 entwickeln durchschnittlich 3,4, W1-NP8 3,0 und die W4-NP8 3,2 Tumore pro Maus. Hingegen weisen die Mäuse mit

mutp53<sup>R270H</sup> eine etwas verringerte Anzahl an Tumoren (~2,5 pro Tier) auf. Bezüglich der Tumorlast lässt sich kein signifikanter Einfluss (Studentischer t-Test) von mutp53 beobachten. Dennoch ist eine Tendenz einer erhöhten Tumorlast in W10-NP8 offensichtlich, was sich möglicherweise auf den Einfluss von mutp53<sup>R245W</sup> zurückführen lässt.

### 5.1.1.3. Klassifizierung der Mammakarzinome (*Grading*)

Für nachfolgende Analysen wurden die Tumore während der Präparation der Tumortiere geteilt. So wurde jeweils ein Teil in Stickstoff schockgefroren, in Kryomatrix eingebettet bzw. mittels Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend histochemisch gefärbt. Hämalaun und Eosin (H&E) Färbungen wurden standardmäßig an allen entnommenen Tumoren durchgeführt, damit diese durch den Pathologen Prof. Udo Schumacher (UKE, Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie) begutachtet und klassifiziert werden konnten. Die Einteilung der Malignitätsgrade erfolgte anhand der Richtlinien zur Klassifizierung muriner Mammakarzinome (Cardiff et al., 2000). Nicht invasive, intraepitheliale Neoplasien werden hierbei dem Grad 0 zugeordnet, gut bis mäßig differenzierte, invasive Adenokarzinome werden als Grad 1 bzw. 2 bezeichnet, während schlecht differenzierte bis undifferenzierte invasive Adenokarzinome dem Grad 3 und 4 entsprechen. In der folgenden Auswertung wurden zur Vereinfachung Grad 1 und 2 als differenzierte, Grad 3 und 4 als undifferenzierte Mammakarzinome zusammengefasst.



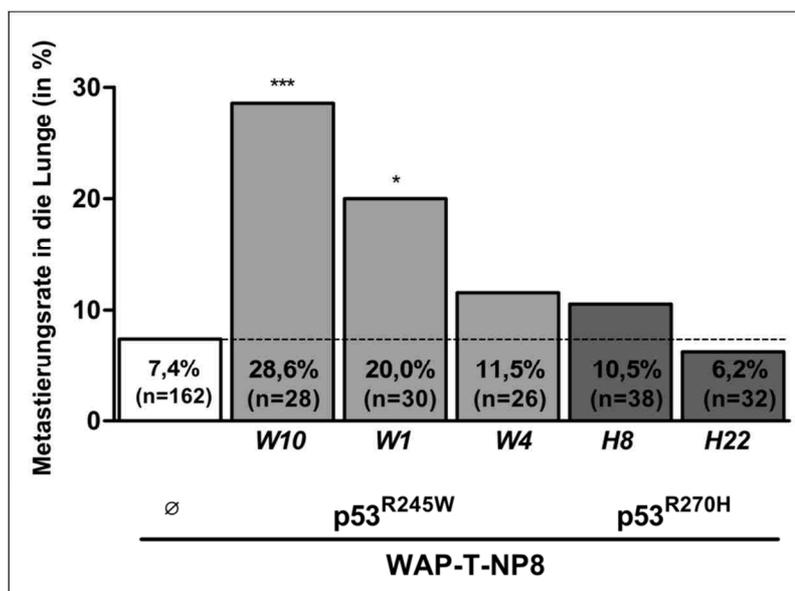
**Abbildung 18: Histologische Klassifizierung der Mammakarzinome**

Dargestellt ist die prozentuale Beurteilung der Mammakarzinome und Einteilung in differenzierte (Grad 1 und Grad 2) und undifferenzierte (Grad 3 und Grad 4) Karzinome.

Die graphische Darstellung zeigt die Aufteilung der klassifizierten Mammakarzinome in differenzierte und undifferenzierte Tumore für die verschiedenen Mauslinien. Dabei ist zu erkennen, dass NP8 Mäuse ca. 50% differenzierte und undifferenzierte Mammakarzinome entwickeln. Ein ähnliches Muster ist auch in den Tumoren der H22-NP8 Mäuse zu finden. Mäuse der W4-NP8 als auch der H8-NP8 Linie entwickeln geringfügig mehr differenzierte (56%) als undifferenzierte (44%) Tumore. Interessanterweise war zu beobachten, dass W10-NP8 und W1-NP8 Mäuse vermehrt undifferenzierte (~65%) als differenzierte (~35%) Mammakarzinome entwickeln. Mäuse, die eine mittlere bis starke mutp53<sup>R245W</sup>-Expression aufweisen, tendieren somit zur verstärkten Entwicklung undifferenzierter Tumore.

#### 5.1.1.4. Metastasierung

Die häufigste Todesursache bei Brustkrebspatientinnen ist nicht der Brustkrebs selbst, sondern die Streuung von Tumorzellen (Disseminierung) in entfernte Organe und ihr Heranwachsen zu Metastasen (Robert-Koch-Institut, 2010). Es wird vermutet, dass Mutationen im *p53*-Gen dies noch verstärken (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004; Song et al., 2007). Je nach Tumorart werden bestimmte Organe von Tumorzellen bevorzugt besiedelt. Bei Brustkrebspatientinnen werden öfter Metastasen im Knochenmark, in Leber und Lunge sowie im axillaren Lymphknoten gefunden (Hess et al., 2006). In der folgenden Analyse wurden aus diesem Grund die Lungen der präparierten Mäuse auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht.



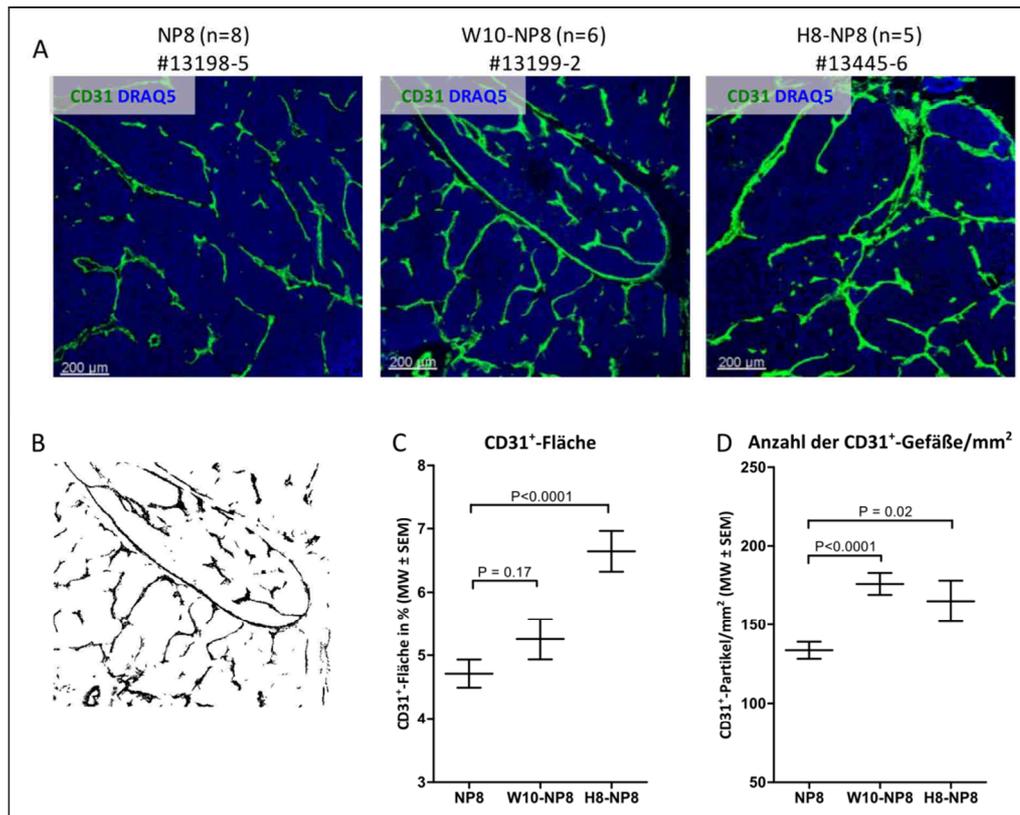
**Abbildung 19: Entwicklung von pulmonalen Metastasen**

Mäuse mit mutp53<sup>R245W</sup> (speziell W10-NP8 und W1-NP8) entwickelten 3- bis 4-fach mehr Lungenmetastasen im Vergleich zu NP8 Tieren. Die Metastasierungsrate in den Mauslinien mit mutp53<sup>R270H</sup> ähnelte der von monotransgenen NP8 Mäusen. Pro Tier wurde ein Schnitt der Lunge H&E gefärbt und auf Vorhandensein von Metastasen begutachtet (t-Test, Signifikanz bezogen auf NP8).

Monotransgene NP8 Mäuse, die ein Mammakarzinom tragen, entwickeln in ca. 7% der Fälle Metastasen in der Lunge. Die Linien W10-NP8 und W1-NP8, die mutp53<sup>R245W</sup> auf mittlerem bis starkem Niveau während der Laktation exprimieren, weisen eine 3- bis 4-fach höhere Metastasierungsrate als NP8 Mäuse auf, wohingegen W4-NP8 Tiere, die mutp53 nur auf geringem Level exprimieren, nur eine leicht erhöhte Tendenz zur Metastasierung haben. Dies kann mit der Expressionsstärke des mutierten Proteins zusammenhängen, aber auch mit dem Integrationsort des Gens im Genom. Die Expression von mutp53<sup>R270H</sup> in den Mammakarzinomen bitransgener Mäuse hatte hingegen keinen deutlichen Einfluss auf die Ausbildung pulmonaler Metastasen. Hier konnte nur eine leichte Tendenz zur erhöhten Metastasierungsrate in den H8-NP8 Mäusen beobachtet werden.

#### 5.1.1.5. Mutp53-abhängige Vaskularisierung der WAP-T Mammakarzinome

Eine eigenständige Vaskularisierung des Tumors wird in der Literatur mit Tumorprogression und einer erhöhten Metastasierung in Zusammenhang gebracht (Folkman, 1997; Locopo et al., 1998; Nathanson, 2003). So wurde bereits gezeigt, dass Tumore ab einer Größe von ca. 3 mm<sup>3</sup> pro-angiogenetische Faktoren (z.B. VEGF – *vascular endothelial growth factor*) in die Umgebung sezernieren, um die durch Diffusion unzureichende Nährstoffversorgung des Tumors mittels Gefäßneubildung (Neoangiogenese) zu fördern. Dadurch wird die nutritive Versorgung des Tumors weiterhin gewährleistet und bietet außerdem eine Möglichkeit zur vereinfachten Disseminierung von Tumorzellen (Folkman, 1971; Klagsbrun and A. D'Amore, 1996; Hicklin and Ellis, 2005; Banerjee et al., 2007). Um zu prüfen, ob p53-Mutationen einen Effekt auf die Tumolvaskularisierung haben, wurde die Anzahl der Blutgefäße der NP8 Tumore mit der von mutp53-hochexprimierenden W10-NP8 und H8-NP8 Tumoren verglichen. Dazu wurden 10 µm dicke Kryoschnitte angefertigt, die Blutgefäße mit einem CD31-Antikörper markiert und mit Hilfe eines Alexa<sup>®</sup>- bzw. DyLight<sup>®</sup>-gekoppelten Zweitantikörpers visualisiert. Um die CD31-Färbung quantitativ zu bestimmen, wurde der gesamte Gewebeschnitt des Tumors mit Hilfe eines Laser-Konfokalmikroskops (10x Objektiv, 0,7-facher Scan Zoom) begutachtet und aufgenommen. Für die Auswertung wurde die Software ImageJ verwendet, dazu wurden die Bilder binarisiert und Partikel (Gruppen von mind. 3 zusammenhängenden Pixel) analysiert (siehe Kapitel 4.7.1).



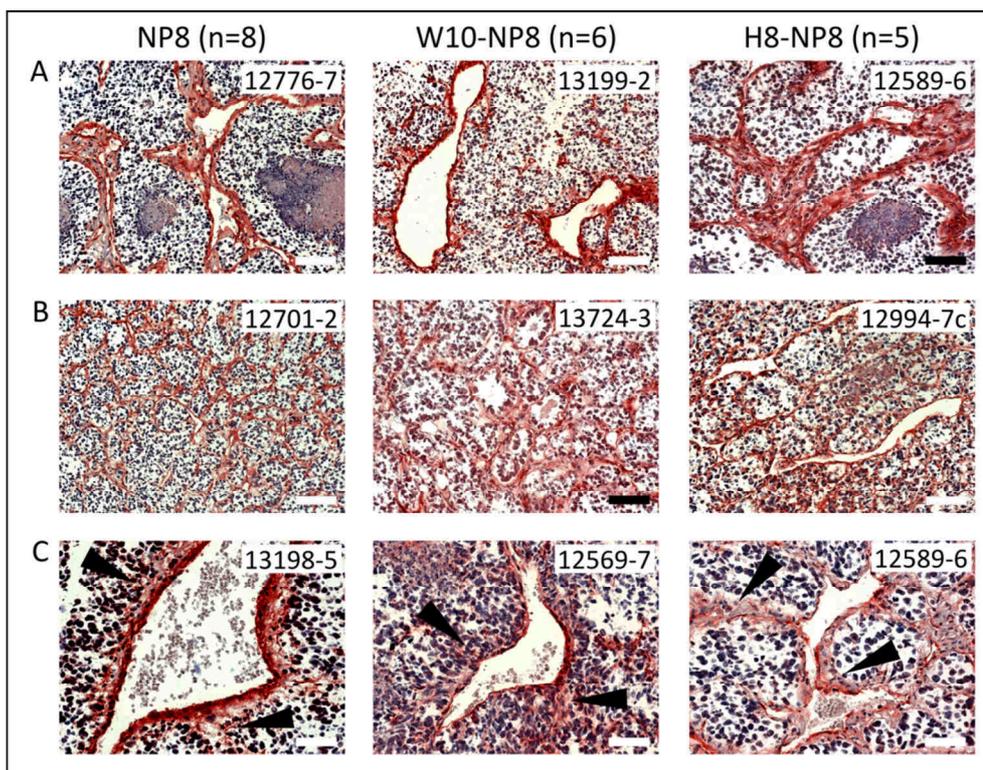
**Abbildung 20: Einfluss von mutp53 auf die Vaskularisierung in WAP-T Tumoren**

A) Repräsentative Beispiele von Immunfluoreszenzfärbungen auf 10 µm dicken Kryoschnitten von WAP-T Tumoren zur Detektion von endothelialen Zellen bzw. Blutgefäßen (CD31<sup>+</sup>). Mit DRAQ5 wurden die Zellkerne angefärbt, Bilder wurden konfokal aufgenommen (Maßstab 200 µm). B) Abbildung einer binarisierten CD31-Färbung für die Quantifizierung in ImageJ, bei der der Threshold bereits eingestellt wurde und unspezifische Signale manuell entfernt wurden. C-D) Mit Hilfe des Programms ImageJ wurden die Aufnahmen nach CD31-positiver Fläche ausgewertet. In den Tumoren, die zusätzlich mutp53 exprimieren, konnte eine größere CD31<sup>+</sup>-Fläche detektiert werden. (C). Anzahl der CD31<sup>+</sup>-Partikel pro mm<sup>2</sup>: bezogen auf die Fläche entwickelten sich in den Tumoren mit mutp53-Expression mehr Blutgefäße/mm<sup>2</sup> (D). Es wurde jeweils der Mittelwert ± Standardfehler dargestellt.

In Abbildung 20A sind Immunfluoreszenzfärbungen von je einem Tumor pro Gruppe exemplarisch dargestellt. Anhand dieser Färbungen sind bereits die Unterschiede in der CD31-Färbung offensichtlich. Tumore, die zusätzlich mutp53 exprimieren, weisen im Vergleich zu NP8 Tumoren größere und auch eine höhere Anzahl an Blutgefäßen auf. Nach Auswertung der ImageJ-Ergebnisse konnten die Unterschiede quantifiziert werden: in Abbildung 20C wurde der prozentuale Anteil der CD31<sup>+</sup>-Fläche in den Tumoren verglichen. In NP8 Tumoren sind ca. 4,7% der Gesamtumorfläche Blutgefäße, in W10-NP8 Tumoren beträgt der Anteil der Gefäße ca. 5,3%. Eine signifikant größere CD31<sup>+</sup>-Fläche weisen die H8-NP8 Tumore auf, dort beträgt die CD31<sup>+</sup>-Fläche ungefähr 6,6%. Bezogen auf die Anzahl der CD31<sup>+</sup>-Partikel pro mm<sup>2</sup>, also die Anzahl der Gefäße (bestehend aus mind. 3 zusammenhängenden Pixel) pro mm<sup>2</sup> sind ebenfalls signifikante Unterschiede zu erkennen (Abbildung 20D): Tumore, die zusätzlich eine p53-Mutante exprimieren, entwickeln deutlich mehr Blutgefäße pro mm<sup>2</sup>. So weisen NP8 Tumore ca. 133 CD31<sup>+</sup>-Partikel pro mm<sup>2</sup> auf, während bei W10-NP8 Tumoren ein Durchschnitt von 176

und in H8-NP8 Tumoren ungefähr 165 CD31<sup>+</sup>-Partikel ermittelt wurden. Es wird deutlich, dass Tumore, die zusätzlich mutp53-Protein exprimieren, eine erhöhte Vaskularisierung in Form von mehr Blutgefäßen pro mm<sup>2</sup> und eine gesteigerte Anzahl CD31<sup>+</sup>-Partikeln aufweisen.

Als nächstes wurde die Qualität der die Blutgefäße umgebenden extrazellulären Matrix durch Färbungen für Kollagen IV auf Paraffinschnitten der Tumore untersucht. Kollagen IV gehört zu den netzbildenden Kollagenen, das von epithelialen Zellen sezerniert wird, und Bestandteil der Basallamina und der extrazellulären Matrix (ECM) ist. Kennzeichen vieler Tumore ist die Fähigkeit, Basalmembranen enzymatisch – vornehmlich durch Matrix-Metalloproteasen – abzubauen. Durch den Integritätsverlust der ECM wird die Permeabilität der Blutgefäße lokal erhöht, was das Einwandern der Tumorzellen in die Blutgefäße und damit die Metastasierung erleichtert (Gerstel et al., 2011). Für die Analyse der Blutgefäßqualität wurden die gleichen Tumore (acht NP8, sechs W10-NP8, fünf H8-NP8 Tumore) analysiert, die bereits für die Untersuchung der Vaskularisierung verwendet wurden.



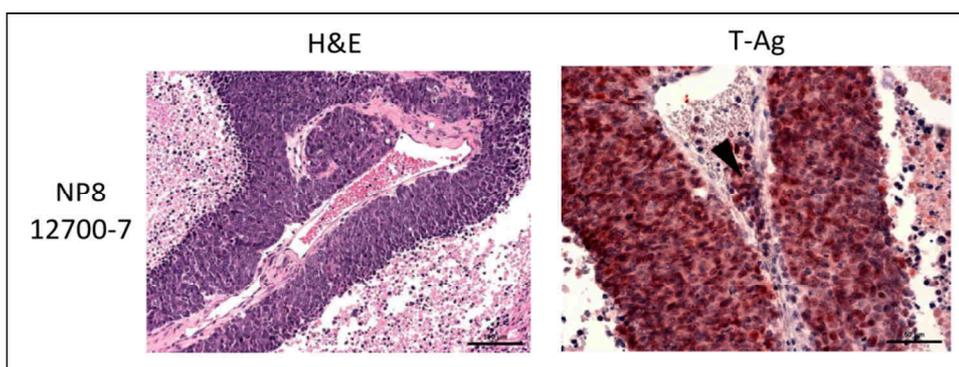
**Abbildung 21: Kollagen IV-Färbung an Tumorschnitten**

Immunhistochemische Färbungen von Kollagen IV auf Paraffinschnitten von NP8, W10-NP8 und H8-NP8 Tumoren. In den Tumoren sind heterogene Kollagen IV-Muster zu beobachten: A) Kollagen IV ist vornehmlich um Gefäße lokalisiert. B) Das Kollagen ist im Tumor diffus verteilt, unabhängig von Gefäßen. C) Jede Gruppe enthält Tumore, die einen lokalen Abbau von Kollagen IV (Pfeile) aufweisen (Maßstab: Reihe A+B weiß 100 µm, schwarz 75 µm, Reihe C 50 µm).

Innerhalb jeder Gruppe weisen die Tumore ein heterogenes Kollagen IV-Muster auf. In einigen Tumoren sind Blutgefäße in kompakte Kollagenschichten eingebettet. Andere Tumore weisen eine relativ diffuse Kollagen-Verteilung auf, die nicht immer mit der Anwesenheit von Blutgefäßen korreliert. Generell lässt sich feststellen, dass in den meisten Tumoren die Gefäße von einer dichten, kompakten Kollagen IV-Schicht umgeben sind, die keine Anzeichen einer Degradation zeigt. Nur vereinzelt lassen sich Degradationen erkennen, aber auch hier ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mutp53-exprimierende Tumore eine erhöhte Vaskularisierung aufweisen, was mit verstärktem Tumorwachstum, Invasivität und Metastasierung korreliert (Locopo et al., 1998). Mit Hilfe der Kollagen IV-Färbung wurde die Qualität der Blutgefäße untersucht, die aber keine Unterschiede zwischen den Mauslinien aufzeigte.

Die phänotypische Analyse der verschiedenen Mauslinien zeigte, dass alle Linien zur Metastasierung befähigt sind. Obwohl kein Unterschied in der Qualität der Blutgefäße mittels Kollagen IV-Färbung nachgewiesen werden konnte, ist eine erhöhte Permeabilität der Gefäße nicht ausgeschlossen, was die Invasivität der Tumorzellen belegt. So konnten Tumorzellen innerhalb eines Blutgefäßes u.a. in einem NP8 Tumor nachgewiesen werden; dies wurde durch eine T-Ag-Färbung (IHC) bestätigt.



**Abbildung 22: Disseminierte Tumorzellen im Blutgefäß am Beispiel eines NP8 Tumors**

In den H&E-Färbungen wurden Zellen am Beispiel eines NP8 Tumors innerhalb der Blutgefäße entdeckt. Mit Hilfe der T-Ag-Färbung wurde der Ursprung der Zellen als Tumorzellen bestätigt (Maßstab der H&E-Färbung 100 µm, Maßstab der T-Ag-Färbung 50 µm).

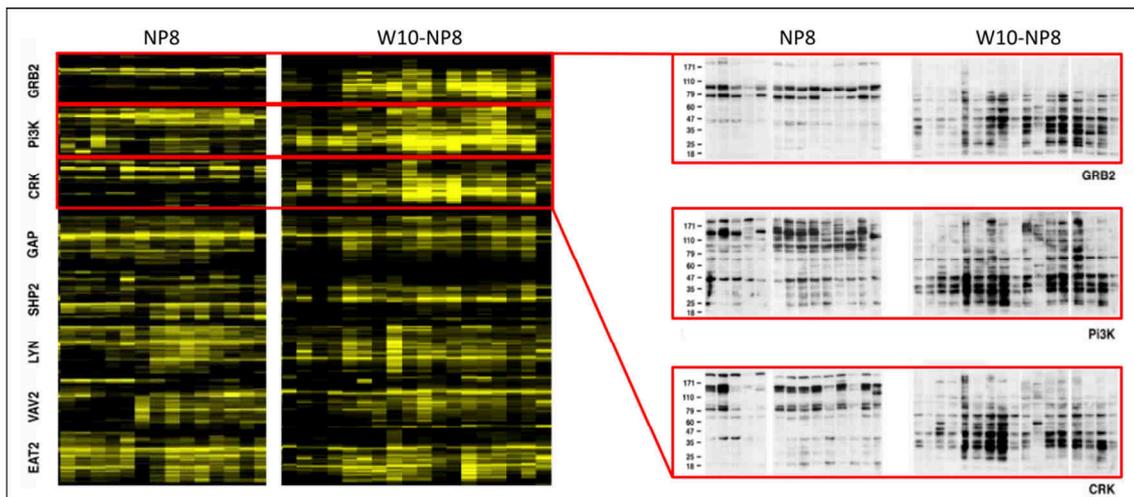
Im WAP-T Mausmodell wurde der Effekt von zwei p53-*Hotspot*-Mutanten, die im humanen Brustkrebs oft vorkommen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression beider Mutanten (mutp53<sup>R245W</sup>, mutp53<sup>R270H</sup>) keinen Unterschied bezüglich der Überlebensrate aufwies. Ausnahme ist die H8-NP8 Linie: die Tiere erreichten die Präparationskriterien ca. 50

Tage später. Dieser Unterschied beruht auf einer verzögerten Tumorinitiation, während die Wachstumskinetik identisch zu der von NP8 Tumoren ist. Die Expression von mutp53<sup>R270H</sup> führte im WAP-T Modell nur tendenziell zu Veränderungen der Aggressivität der Tumore, die sich auch vornehmlich auf die Metastasierung bezieht: H8-NP8 Tiere entwickelten knapp 2-fach mehr Lungenmetastasen, während die Metastasierungsrate in H22-NP8 identisch zu NP8 Tieren war. Dagegen war der Effekt der mutp53<sup>R245W</sup>-Expression (speziell die Linien W10-NP8 und W1-NP8) deutlicher: diese entwickelten mehr Tumore pro Maus, welche auch häufiger als undifferenzierte Tumore klassifiziert wurden. Weiterhin entwickelten die Tiere beider Linien signifikant mehr pulmonale Metastasen (W10-NP8 4-fach, W1-NP8 3-fach) als NP8 Tiere. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bitransgene Tumore, sowohl mutp53<sup>R245W</sup> als auch mutp53<sup>R270H</sup> exprimierende, eine höhere Anzahl an Blutgefäßen pro mm<sup>2</sup> Tumorrofläche entwickelten als NP8 Tumore. Allerdings wurden keine Qualitätsunterschiede der Blutgefäße anhand der Kollagen IV-Färbung beobachtet. Somit konnte ein Effekt der p53-Mutationen, insbesondere für mutp53<sup>R245W</sup>, auf die Erhöhung der Malignität in den Tumoren beobachtet werden.

### **5.1.2. Phospho-Tyrosin-Profilen zur Identifikation modulierter Signalwege in W10-NP8 Mäusen**

In den folgenden Abschnitten dieser Arbeit sollte ein Einblick in die molekularen Mechanismen, die für den aggressiveren Phänotyp der bitransgenen Mäuse, insbesondere der W10-NP8 Linie, verantwortlich sind, gewonnen werden. Mit Hilfe einer von Herrn Dr. Nollau (UKE, Institut für Klinische Chemie) entwickelten, auf SH2-Domänen basierenden Methode wurden hier mögliche Modulationen wichtiger, über Tyrosin-Kinasen gesteuerter Signaltransduktionswege, die viele essentielle Zellfunktionen, wie z.B. Proliferation und Differenzierung kontrollieren, untersucht. In Tumorzellen sind diese Signalwege oft dereguliert. Um zu untersuchen, ob eine solche Deregulation für den aggressiveren Phänotyp in W10-NP8 Mäusen verantwortlich sein könnte, wurde in Kooperation mit Dr. Nollau eine globale Charakterisierung der Phospho-Tyrosin-Signaltransduktionswege mit Hilfe von Phospho-Tyrosin-Profilen durchgeführt. Transiente Tyrosin-Phosphorylierungen von in Signalkaskaden beteiligten Proteinen zeigen eine Modulation der Aktivität des Proteins an. Da phosphorylierte Tyrosine der Proteine als Bindestellen für spezifische SH2-Domänen (*src-homology 2*) enthaltende Proteine dienen, kann die Aktivierung von Phospho-Tyrosin-Proteinen durch die Bindung spezifischer SH2-Domänen detektierbar gemacht werden. In den vorliegenden Analysen wurden Phospho-Tyrosin-Profilen mit Hilfe eines *far*-Western Blots erstellt, bei dem statt Antikörper SH2-Domänen-Sonden von wichtigen Signalproteinen (z.B.

Abl, Crk, Grb2, Shp-2, PI3K) zur Detektion spezifisch phosphorylierter Proteine eingesetzt wurden. Die SH2-Domänen, fusioniert mit Glutathion-S-Transferase (GST) und markiert mit Glutathion-Peroxidase, binden mit hoher Spezifität an Tyrosin-phosphorylierte und damit aktivierte Signalproteine, wodurch der Status der Tyrosin-Phosphorylierung einer Probe analysiert wird (Methode beschrieben in Nollau and Mayer, 2001). Hier wurden Phospho-Tyrosin-Profile für Proteinproben von undifferenzierten NP8 und W10-NP8 Tumoren erstellt.



**Abbildung 23: Phospho-Tyrosin-Profil der undifferenzierten NP8 und W10-NP8 Tumoren**

In den beiden Gruppen sind unterschiedliche Protein-Interaktionen anhand von Phosphorylierungsmustern der SH2-Domänen von Grb2, PI3K und Crk zu sehen (linke Abb.: zusammenfassende Heatmap zur Darstellung einzelner Bandenintensitäten der *far*-Western Blots, rechte Abb.: Ergebnisse der *far*-Western Blots für Grb2, PI3K und Crk). Das differenzielle Bandenmuster spricht für eine Aktivierung unterschiedlicher Signalproteine und damit einer unterschiedlichen Aktivität der entsprechenden Signalwege.

In Abbildung 23 ist die Zusammenfassung der Ergebnisse des Phospho-Tyrosin-Profiles für 14 undifferenzierte NP8 und 17 undifferenzierte W10-NP8 Tumoren dargestellt. Auffällig sind voneinander abweichende Bandenmuster phosphorylierter Proteine, die durch eine Bindung der SH2-Domäne von *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und dem Adaptermolekül Crk verursacht werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Signalwege (wie MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege), in denen diese wichtigen Faktoren involviert sind, in mono- und bitransgenen Tumoren unterschiedlich reguliert sind. Diese Annahme unterstützend wurde in der Literatur bereits gezeigt, dass einzelne p53-Mutationen, wie z.B. R175H, den Egfr/PI3K/Akt-Signalweg aktivieren und dadurch den invasiven Phänotyp von Uteruskarzinomzellen verstärken (Dong et al., 2009). Leider ermöglicht die Methode es nicht, den Phosphorylierungsstatus einzelner Proteinkomponenten eines Signalwegs zu ermitteln. Hierfür wären zusätzliche Western Blots mit Antikörpern, gerichtet gegen spezifische phosphorylierte Proteine, notwendig.

Zusammengefasst ermöglichte die Methode des Phospho-Tyrosin-Profilings die Identifizierung einer differenziellen Regulation von Signalwegen, was sich durch eine Verschiebung der Phosphorylierungsmuster verschiedener Proteinen beobachten ließ. Für ein besseres Verständnis des mutp53-vermittelten GoF auf molekularer Ebene wurde daher entschieden, weiterführende Studien mittels Genexpressionsanalysen durchzuführen.

### 5.1.3. Globale Genexpression in WAP-T-NP8 vs. WAP-T-NP8 x WAP-mutp53<sup>R245W</sup> Tumoren

Die Vergleichsanalysen in Kapitel 5.1.1 zwischen monotransgenen WAP-T-NP8 und bitransgenen mutp53<sup>R245W</sup>-exprimierenden Tumortieren (W1-NP8 und W10-NP8 Mauslinien) offenbarten einen ausgeprägten Phänotyp der bitransgenen Tiere. Diese Mäuse entwickelten mehr undifferenzierte Tumore, eine erhöhte Vaskularisierung der Läsionen und bis zu 4-fach mehr Lungenmetastasen. Am stärksten ausgeprägt war der Effekt im Phänotyp der W10-NP8 Linie, bei der bereits eine differenzielle Modulation von Signaltransduktionswegen beobachtet wurde (Kapitel 5.1.2). Aus diesem Grund wurden Tumore dieser Linie ebenfalls für die Genexpressionsanalyse eingesetzt. Die Verwendung von Mikroarrays ermöglicht die Analyse einer Vielzahl von Genen in einem Experiment und gibt, zusätzlich zu den Phospho-Tyrosin-Profilen, weitere Hinweise auf deregulierte Signalwege.

In den vorliegenden Analysen wurden jeweils acht NP8 und acht W10-NP8 Tumore verwendet, die zuvor nach einheitlichen Kriterien ausgewählt wurden: so wurden nur Proben verwendet, die als eindeutig undifferenziert (Grad 3 und Grad 4) klassifiziert wurden und die nur einen geringen Nekroseanteil aufwiesen. Die Auswahl der Tumore mit anschließender RNA-Präparation wurde bereits von Dr. C. Heinlein (Abt. Tumorstudiologie, HPI) vorgenommen.

Gemäß Herstellerangaben sollten mit dem Maus Genom Array über 39.000 verschiedene Transkripte auf einem Chip untersucht werden können. Nach einer Reannotation der Transkripte wurde die Anzahl der korrekt annotierten Gene auf ~18.000 reduziert (Liu et al., 2007), alle Auswertungen der Expressionsarrays basieren auf dieser korrigierten Annotation. Die erste statistische Auswertung wurde von Dr. G. Tolstougov (Abt. Tumorstudiologie, HPI) und Benjamin Otto (UKE, Institut für Klinische Chemie, Zentrallaboratorien; Otto, 2008) durchgeführt. Dabei wurde ersichtlich, dass in diesem Tumorsprobenstich nur 39 Gene differenziell reguliert sind (Tabelle 12), wozu auch *Trp53* gehört. Die Expression von *Trp53* fungiert als Positivkontrolle für das bitransgene WAP-T-NP8xWAP-mutp53 Mausmodell. Die p53-Sonde auf dem Array unterscheidet nicht zwischen Wildtyp und mutiertem p53-Transkript. So wird in den bitransgenen Tumoren zusätzlich die Expression von mutp53<sup>R245W</sup> gemessen, was in einer 11-fachen Hochregulation des Gens gegenüber NP8 Tumoren

resultiert. Die erste Analyse dieser Genliste bezüglich bekannter Zusammenhänge mit einem mutp53-Funktionszugewinn bzw. einer Metastasierung ergaben keine Ergebnisse. Für nur ein Gen wurde bereits eine Relation zu Wildtyp-p53 beschrieben: so stimuliert wtp53 die Transkription von *Igfbp2* (*Insulin-like growth factor binding protein 2*), welches dann den IGF-Rezeptor hemmt und damit die Aktivierung des IGF-1-Signalwegs und weiterer implizierter Wege (z.B. PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2) verhindert (Grimberg et al., 2006; Zhu et al., 2011). *In vitro* Experimente zeigten, dass die Aktivierung des IGF-1-Signalwegs mit einem aggressiveren Phänotyp von Tumorzellen (Wachstum, Migration, Invasion) korreliert (Peiró et al., 2011; Walsh and Damjanovski, 2011).

Ein weiteres interessantes Gen, das in den W10-NP8 Proben knapp 4-fach geringer als in monotransgenen Tumoren exprimiert wird, ist *Ceacam1*. In einer Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit Dr. A. Horst (UKE, Institut für Klinische Chemie) wurde gezeigt, dass WAP-T-NP8 Mäuse mit *Ceacam1-Knockout* drastisch mehr Lungenmetastasen (67%, n=9 Tiere) entwickelten als WAP-T-NP8 Tiere mit intaktem *Ceacam1*-Gen (7,4%, n=162 Tiere) (Wegwitz, 2010).

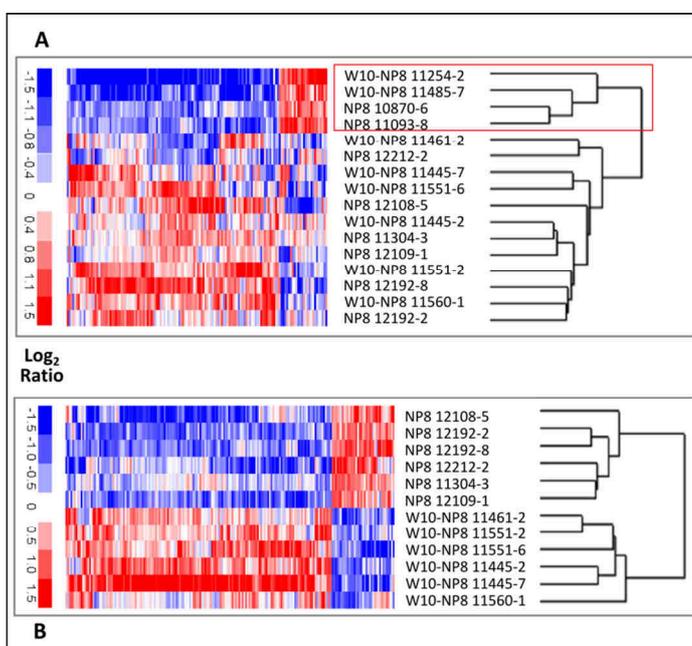
Insgesamt ergab die erste Auswertung der Genexpressionsanalyse wenig Anhaltspunkte für potentielle in dem mutp53-Funktionszugewinn involvierte Zielgene bzw. Signaltransduktionswege. Dieses unerwartete Ergebnis könnte unter anderem durch eine zu hohe Heterogenität in der Genexpression der Tumorproben innerhalb einer Gruppe verursacht worden sein. Um diese Heterogenität von Beginn an einzuschränken, wurde der Fokus der Genexpressionsanalyse auf undifferenzierte Tumore gelegt und anhand von H&E-Färbungen einheitliche Tumore ohne bzw. mit nur geringem Nekroseanteil ausgewählt. Die dennoch auftretende Tumorerheterogenität in diesem isogenen Modell könnte in der Individualität der Tumorentstehung und -progression begründet sein, was sich in der unterschiedlichen Genexpression einzelner Tumore widerspiegelt und dadurch die Auswertung der Analyse erschwert. Deshalb wurde entschieden, die Expressionsdaten mit Hilfe des Programms dChip erneut zu analysieren, um mögliche „Ausreißerproben“ aus den jeweiligen Datensätzen zu identifizieren und die Zusammenstellung neuer, homogenerer Gruppen zu ermöglichen. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. F. Wegwitz.

**Tabelle 12: Ergebnisse der ersten statistischen, bioinformatischen Auswertung der Mikroarrayexperimente (Auswertung von G. Tolstonog und B. Otto)**

Herunterreguliert in W10-NP8			Hochreguliert in W10-NP8		
Gen	Beschreibung	Unterschied	Gen	Beschreibung	Unterschied
Lect1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	9.9	Trp53	Transformation related protein 53	11.2
Col9a3; Tcf15	Procollagen, type IX, alpha 3; Transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	9.5	Ly6d	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D	10.7
Igfbp2	Insulin-like growth factor binding protein 2	5.2	Cadps2	Ca2+-dependent activator protein for secretion 2	4.0
Chn2	Chimerin (chimaerin) 2	4.5	Pcolce2	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	3.5
Clca5	Chloride channel calcium activated 5	4.5	Eif4ebp2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	2.5
Cyt11	Cytokine like 1	4.2	AI480556	Expressed sequence AI480556	2.2
1300013J15Rik	RIKEN cDNA 1300013J15 gene	4.1	Man1b1	Mannosidase, alpha, class 1B, member 1	2.1
Rbp7	Retinol binding protein 7, cellular	3.9	Aes	Amino-terminal enhancer of split	2.1
Etv1	Ets variant gene 1	3.8	Foxp4	Forkhead box P4	1.9
Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1	3.7	Khsrp	KH-type splicing regulatory protein	1.6
1500015O10Rik	RIKEN cDNA 1500015O10 gene	3.7	Rfx1	Regulatory factor X, 1 (influences HLA class II expression)	1.4
Col9a1	Procollagen, type IX, alpha 1	3.6	Ubr2	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2	1.4
Col11a1	Procollagen, type XI, alpha 1	3.5	Ccdc97	Coiled-coil domain containing 97	1.3
Car6	Carbonic anhydrase 6	3.5	Med16	Mediator complex subunit 16	1.3
Capn6	Calpain 6	3.4			
Tes	Testis derived transcript	3.3			
Akap12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	3.3			
Tesc	Tescalcin	3.3			
Wasf1	WASP family 1	3.2			
Mia1	Melanoma inhibitory activity 1	3.2			
2310057J18Rik	RIKEN cDNA 2310057J18 gene	3.1			
Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	2.7			
Psb7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7	2.7			
Pkd2l2	Polycystic kidney disease 2-like 2	2.5			
Rpl27a	Ribosomal protein L27A	1.7			

Die Mikroarray-Daten wurden in das Programm eingelesen und normalisiert (*invariant set, model-based expression*). Anschließend wurden nur die Gene berücksichtigt, die in mindestens 50% der Proben als „anwesend“ eingeschätzt wurden (Fluoreszenzwert höher als 64 und damit über dem Hintergrundrauschen). Mit Hilfe dieser Methode wurden 11.724 Gene mit aktiver/präsenter Expression herausgefiltert. So konnte bei einem erneuten Clustering (verwendete Algorithmen: *Distance metric* – Rank Korrelation; *Linkage* Methode – Durchschnitt; Genanordnung – *Peaking time*) gezeigt werden, dass jede Gruppe zwei Ausreißer aufweist, die sich in der Expression von mindestens 140 Genen von den verbliebenen Proben deutlich unterscheiden (Abbildung 24A). Diese sogenannten Ausreißerproben bilden eine eigene Gruppe und wurden aus diesem Grund für die nachfolgenden Betrachtungen nicht berücksichtigt (Probennummer NP8 10870-6, NP8 11093-8, W10-NP8 11254-2 und W10-NP8 11485-7).

Die verbleibenden zwölf Proben (jeweils sechs NP8 und W10-NP8 Tumore) wurden daraufhin erneut auf Unterschiede in ihrer Genexpression untersucht. Kriterien waren ein mindestens zweifacher Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Gruppen und ein p-Wert  $\leq 0,05$ . Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Unterschied zwischen den Gruppen nicht nur zufällig ist, sondern durch Signifikanz bestätigt werden kann. Dadurch wurden 198 differenziell regulierte Gene gefunden (siehe Anhang 8.1).



**Abbildung 24: Heatmap differenziell exprimierter Gene in NP8 und W10-NP8 Tumoren**

Das Programm dChip wurde zur Auswertung der Mikroarrays verwendet. Die Werte sind als  $\text{Log}_2$ -Werte dargestellt. A) Die Tumorproben wurden anhand ihrer Genexpression gruppiert, dabei wurde festgestellt, dass jeweils zwei NP8 und zwei W10-NP8 Tumore sich in ihrer Genexpression von den anderen Tumoren unterscheiden. Es handelt sich um die Proben 10870-6, 11093-8, 11254-2 und 11485-7. B) Heatmap der 198 mind. 2-fach differenziell regulierten Gene zwischen NP8 und W10-NP8 Proben.

Darüber hinaus wurde aber festgestellt, dass in der Gruppe der differenziell regulierten Gene eine deutliche Anreicherung von Kandidaten vorliegt, die mit dem Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) assoziiert sind (siehe Tabelle 13). Die EMT wurde in der Literatur als anerkannter Prozess beschrieben, der für eine erhöhte Invasivität und Mobilität von Tumorzellen und dadurch für eine gesteigerte Metastasierung sorgt (Thiery, 2002).

So sind in W10-NP8 Tumoren gut beschriebene EMT-Induktoren wie die Transkriptionsfaktoren *Zeb1* und *Snai1* 2- bis 3-fach stärker reguliert als in NP8 Tumoren (Polyak and Weinberg, 2009). Auch der Wachstumsfaktor *Tgf $\beta$ 1*, welcher häufig für die EMT-Induktion *in vitro* genutzt wird (Muraoka et al., 2002), ist in dieser Genliste hochreguliert. Weiterhin sind viele Zelloberflächenrezeptoren wie *Pdgfra*, *Pdgfrb*, *Itga5*, *Fgfr1* und *Notch4* oder Liganden wie *Wnt5a*, die mit vielen EMT-assoziierten Signalwegen verbunden sind, in den bitransgenen Tumoren mindestens 2-fach stärker exprimiert. So führt die Aktivierung von *Pdgfra*, *Pdgfrb* und *Itga5* zum Anschalten des PI3K/Akt-Signalwegs (Zhang et al., 2007; Hamidouche et al., 2009), die von *Notch4* zur Initialisierung des Notch-Signalwegs (Harrison et al., 2010), Ligandbindung an *Fgfr1* aktiviert den MAPK/ERK-Weg (Tomlinson et al., 2009), während die Bindung von *Wnt5a* an den Frizzled-Rezeptor zur Internalisierung von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und damit zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt (Mikels and Nusse, 2006). Auch nachgeschaltete Gene einiger Signalwege sind stärker in den W10-NP8 Tumoren exprimiert. Dazu gehören *Wisp1*, welches im Wnt-Signalweg eine Rolle spielt (Xu et al., 2000), *Tgf $\beta$ 1i1/Hic-5*, das über den Rho/ROCK-Signalweg Zellmigration reguliert (Tumbarello and Turner, 2007), *Ltbp4*, welches Tgf $\beta$ -Funktionen moduliert (Kretschmer et al., 2011), *Igfbp7*, was im Insulin-Signalweg involviert ist (Nousbeck et al., 2009) und *Map3k11* (auch *Mlk3* genannt), eine Serin-Threonin-Kinase, die im MAPK/p38-Signalweg beteiligt ist (Brancho et al., 2005). Fehlregulationen dieser Signalwege sind oftmals mit schwerwiegenden Erkrankungen assoziiert (Howe and Brown, 2004; Baselga, 2011; Hu et al., 2012). Eine mögliche differenzielle Regulation einiger Wege durch PI3K, Grb2 und Crk wurde bereits mit Hilfe der Phospho-Tyrosin-Profile gezeigt (siehe 5.1.2). Die Genliste beinhaltet weitere Gene, die mit dem Aufbau bzw. mit der Degradation der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Auf der einen Seite sind diverse Kollagene in W10-NP8 Tumoren überexprimiert (*Prokollagene 1 $\alpha$ 1*, *5 $\alpha$ 1-3*, *6 $\alpha$ 2-3* und *15 $\alpha$ 1*). Dabei sind für Kollagen 1 und Kollagen 15 EMT- bzw. Zellmotilität-begünstigende Eigenschaften bekannt (Medici and Nawshad, 2010; Tao et al., 2011). Andererseits sind vier verschiedene Matrix-Metalloproteasen (*Mmp3*, *Mmp10*, *Mmp11* und *Mmp12*), die in der Lage sind, die extrazelluläre Matrix zu degradieren, in den W10-NP8 Tumoren stärker exprimiert. Durch die Umstrukturierung der ECM wird u.a. die Mobilität und Invasivität von Tumorzellen verstärkt (Martin et al., 2010).

**Tabelle 13: Ergebnis der Genexpressionsanalyse: EMT-assoziierte Gene (Unterschied der W10-NP8 zu NP8)**

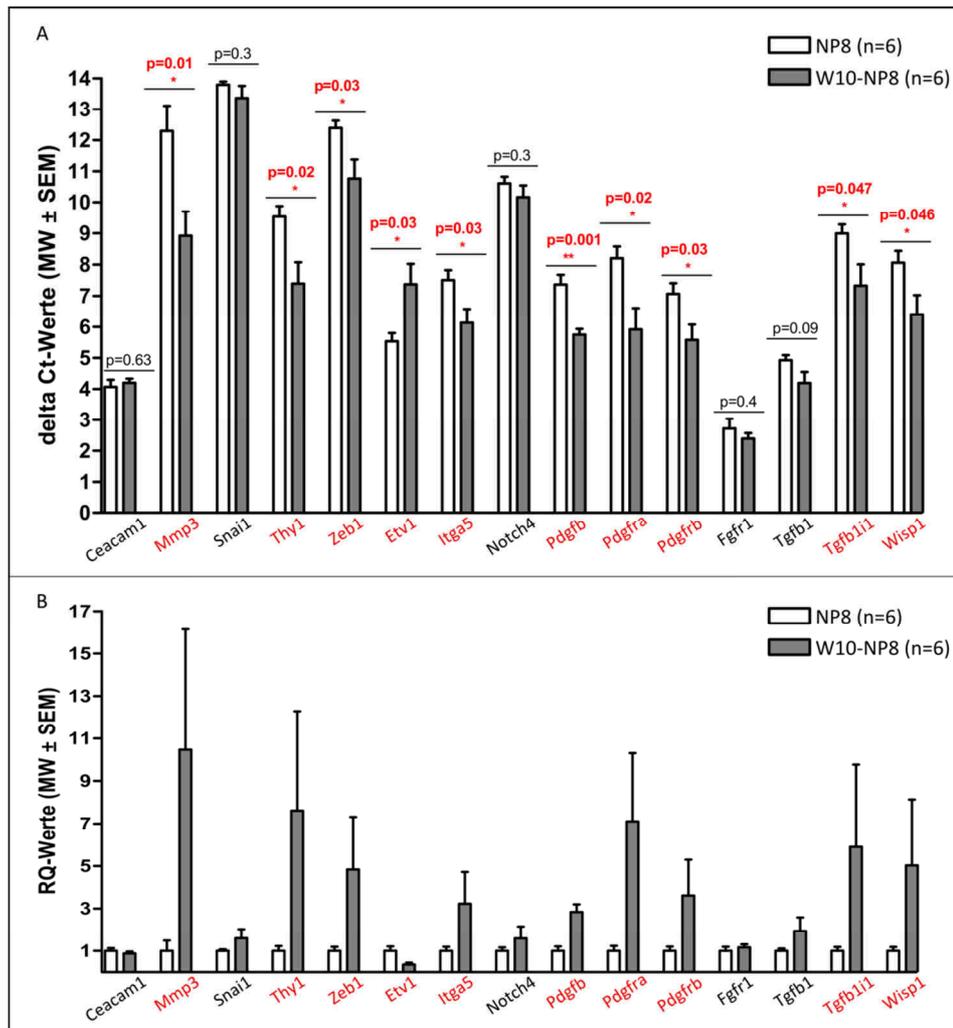
Gen	Beschreibung	Unterschied	p-Wert
<b>Transkriptionsfaktoren</b>			
Trp53	Transformation related protein 53	+5.46	0.002
Snai1	Snail homolog 1 (Drosophila)	+2.83	0.000
Zeb1	Zinc finger E-box binding homeobox 1	+2.55	0.014
Etv1	Ets variant gene 1	-3.56	0.040
<b>Zelloberflächenrezeptoren</b>			
Thy1	Thymus cell antigen 1, theta	+4.08	0.004
Pdgfra	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	+3.89	0.021
Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	+2.17	0.006
Itga5	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	+3.01	0.002
Eng	Endoglin	+2.35	0.003
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	+2.01	0.008
Notch4	Notch gene homolog 4 (Drosophila)	+2.00	0.007
Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1	-3.81	0.000
<b>Wachstumsfaktoren</b>			
Pdgfb	Platelet derived growth factor, B polypeptide	+3.34	0.000
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	+2.30	0.000
<b>Faktoren assoziiert mit bekannten Signaltransduktionswegen</b>			
Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	+3.01	0.026
Wnt5a	Wingless-related MMTV integration site 5A	+2.83	0.039
Igfbp7	Insulin-like growth factor binding protein 7	+2.06	0.003
Map3k11	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 11	+2.46	0.009
Ltbp4	Latent transforming growth factor beta binding protein 4	+2.50	0.013
Tgfb1i1 (Hic-5)	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	+2.91	0.020
<b>Extrazelluläre Matrix – Matrix-Metalloproteasen</b>			
Mmp3	Matrix metalloproteinase 3	+4.79	0.020
Mmp10	Matrix metalloproteinase 10	+4.14	0.014
Mmp11	Matrix metalloproteinase 11	+2.14	0.037
Mmp12	Matrix metalloproteinase 12	+2.55	0.019
<b>Extrazelluläre Matrix – Kollagene</b>			
Col1a1	Procollagen, type I, alpha 1	+4.50	0.002
Col5a1	Procollagen, type V, alpha 1	+3.14	0.025
Col5a2	Procollagen, type V, alpha 2	+2.50	0.022
Col5a3	Procollagen, type V, alpha 3	+2.93	0.002
Col6a2	Procollagen, type VI, alpha 2	+2.83	0.025
Col6a3	Procollagen, type VI, alpha 3	+2.36	0.008
Col15a1	Procollagen, type XV	+3.01	0.000

#### 5.1.4. Validierung der EMT-Signatur

Im nächsten Schritt galt es, die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zu validieren, indem die Expressionsunterschiede der Kandidatengene mittels einer weiteren Methode (d.h. qPCR) bestätigt werden sollten. Hierzu wurde 1 µg der Tumor-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt, anschließend die quantitative PCR durchgeführt und die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001) für die Quantifizierung zugrunde gelegt. Im Allgemeinen ist die Verwendung eines Haushaltsgens (*House keeping gene* – HKG) für die relative Quantifizierung ausreichend. Da im Fall der WAP-T Tumore starke Abweichungen in der Expression einzelner HKGs nachgewiesen wurden, sollten die Proben manuell auf fünf verschiedene HKGs (*β-Aktin*, *Gapdh*, *Hprt1*, *Rplp1* und *18sRNA*) normiert werden. Durch diese Methode wurde eine viel präzisere Normierung erhofft.

Als Strategie für die Validierung wurden 3'-UTR Primer designt, deren Lage in etwa der Sondenpositionen für die Gene auf dem Array entsprachen und damit das Ergebnis des Mikroarrays besser widerspiegeln. Das bedeutet, dass sich die Lokalisation der Primer zumeist auf das letzte Exon und das 3'-UTR Ende beschränkt. Die Positionen der Sonden wurde mit Hilfe des auf der Webseite <http://projects.insilico.us/SpliceCenter/PrimerCheck.jsp> aufgeführten Programms ermittelt, gleichzeitig konnte hier die Lokalisation der erstellten Primer im Gen überprüft werden (Ryan et al., 2008). Für die statistische Berechnung wurden die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte zugrunde gelegt (siehe Kapitel 4.7.2). Bei der Darstellung der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte im Balkendiagramm ist zu beachten, dass ein geringerer  $\Delta\text{Ct}$ -Wert eine stärkere Expression des Gens aufgrund der Berechnung mit einem negativen Exponenten bedeutet (siehe Kapitel 4.5.5).

Durch qPCR war es möglich, für einen Großteil der Kandidatengene eine differenzielle Expression zu verifizieren. Bedauerlicherweise wurde kein Genexpressionsunterschied für *Ceacam1* detektiert, für die Gene *Snai1*, *Notch4*, *Fgfr1*, *Loxl1* und *Tgfb1* konnte eine nicht-signifikante Tendenz einer erhöhten Expression in W10-NP8 Tumoren gezeigt werden. Eine differenzielle Expression von zehn Genen konnte als signifikant bestätigt werden (Abbildung 25A). Dazu gehören *Mmp3* (Matrix-Metalloprotease 3), *Thy1* (*Thymus cell antigen 1*), *Zeb1* (*Zinc finger E-box binding homeobox 1*), *Etv1* (*Ets variant 1*), *Itga5* (*Integrin  $\alpha$ 5*), *Pdgfb* (*Platelet derived growth factor B*), *Pdgfra* (*Platelet derived growth factor receptor A*), *Pdgfrb* (*Platelet derived growth factor receptor B*), *Tgfb1i1* (*Tgfb1 induced transcript 1*) und *Wisp1* (*WNT1 inducible signaling pathway protein 1*).



**Abbildung 25: Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mit Hilfe der qPCR**

A) Es wurden die  $\Delta$ Ct-Werte der Kandidatengene aus NP8 Tumoren (weiß) mit denen der W10-NP8 Proben (grau) verglichen. Von den 15 getesteten Genen konnte für 10 Gene eine differenzielle Genexpression bestätigt werden (t-Test, mit p-Wert  $\leq 0,05$ ). Die Normierung erfolgte auf fünf HKGs. B) Darstellung des relativen Unterschieds (RQ): es zeigt den Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen (NP8, W10-NP8): neun von zehn Genen sind in den W10-NP8 Tumoren stärker exprimiert als in NP8 Tumoren, die Expression von *Etv1* ist in den bitransgenen Tumoren geringer. Mit Hilfe des Standardfehlers vom Mittelwert wird die Varianz der Genexpression innerhalb der Gruppe (A und B: jeweils n=6 biologischen Replikate) dargestellt. In Rot jeweils die Gene, die unterschiedlich reguliert sind.

Für eine vereinfachte Darstellung wurde in Abbildung 25B der Expressionsunterschied der Gene zwischen der Gruppe der NP8 und der W10-NP8 Tumore abgebildet. So wurden die Gene in den W10-NP8 Tumoren 3- bis 10-fach stärker exprimiert als in den NP8. Für *Etv1* wurde eine ca. dreifach geringere Expression in den bitransgenen Proben nachgewiesen. Anhand der Fehlerbalken wird deutlich, dass die Werte der qPCR bereits innerhalb einer Gruppe stark schwanken. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine generell stark variierende Genexpression innerhalb der Gruppen, was unter Umständen die verhältnismäßig geringe Anzahl an differenziell regulierten Genen in den Tumoren erklären könnte.

## 5.2. Etablierung von experimentellen Zellsystemen zur Untersuchung des Funktionszugewinns von mutp53 *in vitro*

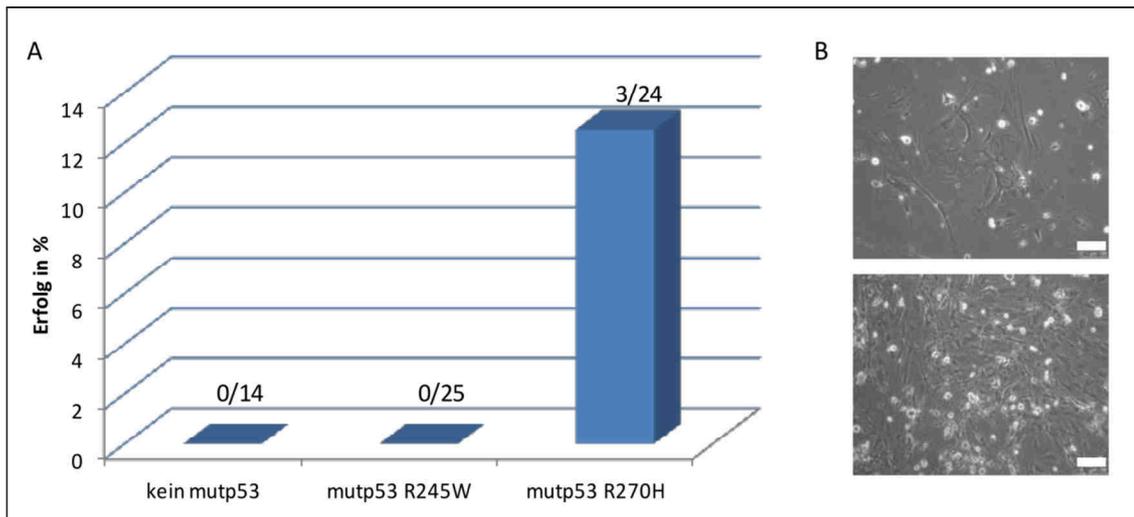
### 5.2.1. Entwicklung stabiler, homöostatischer Zellsysteme aus transgenen Tumoren

Um den onkogenen Funktionszugewinn von mutp53 *in vitro* zu untersuchen, bestand ein Ziel der Arbeit in der Etablierung von Zelllinien aus WAP-T Tumoren, die kein mutp53 bzw. mutp53<sup>R245W</sup> oder mutp53<sup>R270H</sup> exprimieren. Dabei war es entscheidend, dass die Tumorzellen die Expression bestimmter Markergene (Transgene, Epithelial- und Mesenchymalmarker) aufwiesen sowie in der Lage waren, Tumore zu initiieren und in entfernte Organe zu disseminieren. Dies sollte die Ähnlichkeit zu endogenen Tumoren bestätigen. Zusätzlich böten solche Zellen eine einfache Möglichkeit die Funktion ausgewählter Zielgene der EMT-Signatur zu überprüfen. Dazu wurden Zellen von Tumoren verschiedener transgener Mauslinien in der Zellkultur vereinzelt und unter Standard-Kulturbedingungen gehalten (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.4).

Tabelle 14: Anzahl der Tumore für Zellextraktion

ohne mutp53	mutp53 <sup>R245W</sup>	mutp53 <sup>R270H</sup>
	1x W1-NP8	11x H22-NP8
14x NP8	8x W4-NP8	12x H8-NP8
	16x W10-NP8	1x H22-T1 (G-2)

Die Mehrzahl der in Kultur genommenen Tumorzellen wurde innerhalb kurzer Zeit bzw. nach wenigen Passagen ( $\leq P5$ ) seneszent bzw. apoptotisch und starb ab, erkennbar an der großflächigen, abgeflachten Morphologie der Zellen (Abbildung 26B). Des Weiteren wurde eine Änderung vom epithelialen Phänotyp (Kopfsteinpflaster-artige Morphologie) zu einem fibroblastischen, mesenchymalen Erscheinungsbild mit langgestreckten, spindelförmigen Zellen beobachtet. Neben den bereits charakterisierten und publizierten G-2 Zellen (Wegwitz et al., 2010) gelang es, zwei weitere Zelllinien aus bitransgenen Tumoren, einem H8-NP8 und einem H22-NP8 Tumor, zu etablieren (Abbildung 26A), die im weiteren Verlauf als H8N8 und H22N8 Zellen bezeichnet werden. Interessanterweise konnten nur stabile Zellen aus Tumoren mit der p53-Mutation R270H generiert werden. Dies spricht für einen spezifischen (onkogenen) Überlebensvorteil *in vitro*, der auf diese p53-Mutation beruht.



**Abbildung 26: Erfolge der Etablierung von WAP-T Tumorzellen und Morphologie der Primärzellen in Kultur**

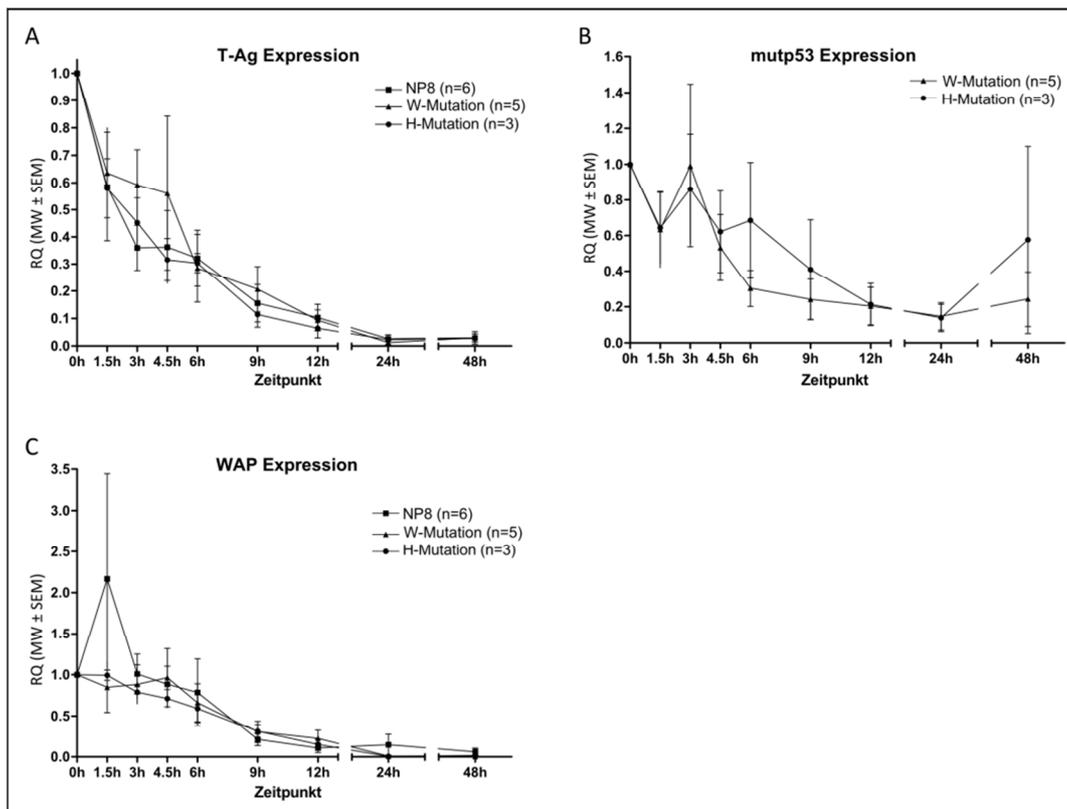
A) Es konnten drei stabile Zelllinien aus bitransgenen Tumoren mit mutp53<sup>R270H</sup> etabliert werden: G-2, H8N8 und H22N8. B) Phasenkontrastbilder von NP8 Tumor 13882-7 und H8N8 Tumor 13932-1: Zellen mit abgeflachter Morphologie geben einen Hinweis auf Seneszenz (oben), spindelförmige, langgezogene Zellen weisen auf eine Veränderung von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp hin (unten) (Maßstab 100 µm). Primäre WAP-T Tumorzellen wurden vereinzelt und unter Standard-Zellkulturbedingungen gehalten.

### 5.2.2. Überlebensvorteil in Zellkultur für WAP-T Zellen mit mutp53<sup>R270H</sup>

Auf der Suche nach möglichen Ursachen für das massive Absterben von Tumorzellen in der Zellkultur wurde die Herunterregulation der Transgenexpression von T-Ag und mutp53 unter Zellkulturbedingungen vermutet. Denn die Expression von T-Ag als auch von mutp53 ist für ein verbessertes Überleben von Zellen verantwortlich (Zambetti and Levine, 1993; Klein et al., 2005). In Übereinstimmung mit dieser Vermutung zeigten bereits Klein und Kollegen, dass in einem WAP-SVT/t Mausmodell die T-Ag-Expression herunterreguliert wird, wenn primäre Tumorzellen in der Zellkultur gehalten werden. Dabei nahmen die Tumorzellen die Morphologie und das Wachstumsverhalten von nicht-tumorigenen Zellen an und starben ab (Klein et al., 2005).

Um ein mögliches Abschalten der Transgenexpression von primären WAP-T Tumorzellen unter Zellkulturbedingungen zu überprüfen, wurde die Expression von T-Ag und mutp53 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kulturbeginn durch qPCR bestimmt. Zusätzlich wurde die Aktivität des endogenen WAP-Promotors durch Messung des WAP-Transkripts analysiert.

Dafür wurden Zellen von sechs NP8 Tumoren und acht bitransgenen Tumoren (fünf Tumore mit mutp53<sup>R245W</sup>, drei Tumore mit mutp53<sup>R270H</sup>) in bestimmten Abständen nach Kulturbeginn geerntet, RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression von T-Ag und mutp53 in den Zellen untersucht.



**Abbildung 27: Genexpressionsanalyse der Transgene in primären WAP-T Tumorzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zellisolierung**

Bestimmung der Transgen- und WAP-Expression durch qPCR. A,B) Die Expression der Transgene (T-Ag und  $\text{mutp53}^{\text{R245W}} / \text{mutp53}^{\text{R270H}}$ ) sinkt innerhalb von Stunden drastisch ab. Nach knapp 24 h ist z.B. die T-Ag-Expression kaum noch messbar. Für  $\text{mutp53}$  wurden schwankende Werte ermittelt, die dennoch die gleiche Tendenz aufweisen. C) Da die Transgene unter Kontrolle des WAP-Promotors stehen, wurde ebenfalls die Expression des endogenen WAP überprüft. Auch hier ist die Expression bereits nach kurzer Zeit (9 h) halbiert und nach 24 h stark reduziert.

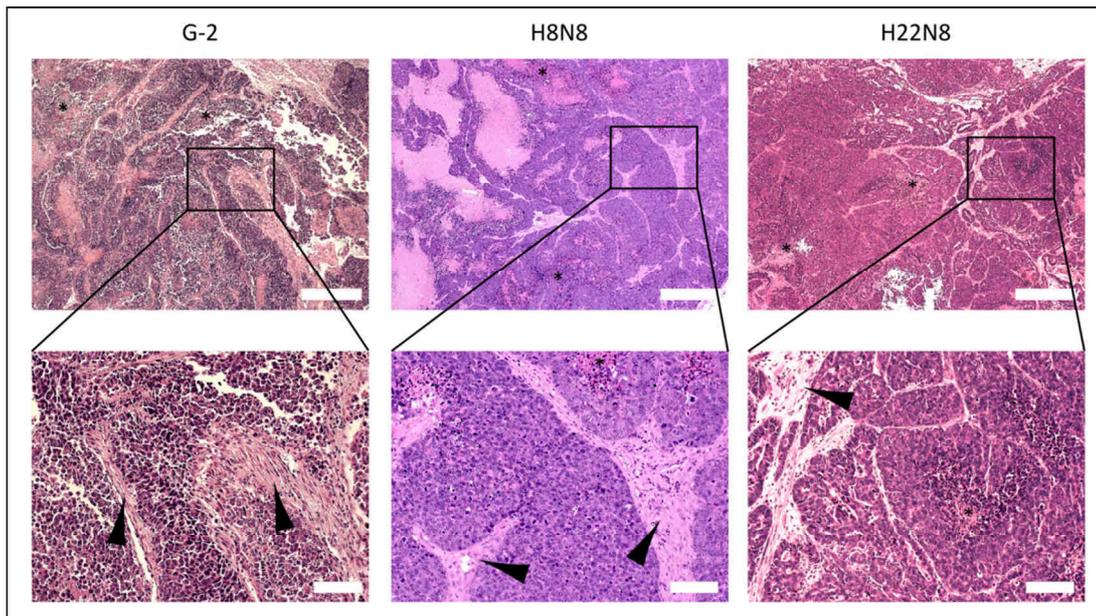
Für die T-Ag-Expression ist in allen Proben, unabhängig von einer  $\text{mutp53}$ -Expression, ein starker Rückgang zu beobachten (Abbildung 27A): nach ca. drei Stunden ist die Expression um 50% reduziert und nach 24 Stunden ist die Expression von T-Ag kaum noch detektierbar. Die  $\text{mutp53}$ -Expression wies eine weniger starke Reduktion der Genexpression mit größeren Schwankungen innerhalb der Gruppen auf (Abbildung 27B): nach 24 Stunden reduzierte sich die  $\text{mutp53}$ -Expression um das etwa 5-fache. Der Expressionsanstieg nach 48 Stunden der  $\text{mutp53}^{\text{R270H}}$ -exprimierenden Tumorzellen beruht auf einer abweichenden  $\text{mutp53}$ -Expression einer einzelnen Probe, während die zwei verbleibenden Proben eine deutlich reduzierte  $\text{mutp53}$ -Expression aufwiesen. Die Expression der Transgene in WAP-T Tumoren wird durch den WAP-Promotor reguliert, der durch laktotrophe Hormone aktiviert wird. Da auch die Zugabe von Hormonen wie Insulin und Prolaktin keinen Einfluss auf die Etablierung neuer Tumorzelllinien hatte (Daten nicht gezeigt), wurde die Aktivität des Promotors untersucht, indem die Expression des endogenen WAP-Transkripts analysiert wurde.

Diese nimmt im Zeitverlauf deutlich ab und bereits nach 24 Stunden ist die Expression des endogenen WAP kaum noch detektierbar, was auf das Abschalten des WAP-Promotors hinweist. Somit können die Zellen T-Ag nicht mehr exprimieren, was zur Reaktivierung von wtp53 führt. Eine p53-vermittelte Apoptose oder Seneszenz, die anschließend massiven Zelltod induziert, ist also sehr wahrscheinlich.

### 5.2.3. Charakterisierung der generierten WAP-T Zelllinien

In der Abteilung Tumorstudiologie des Heinrich-Pette-Instituts wurde vor einiger Zeit bereits eine klonale Zelllinie aus einem bitransgenen Tumor (WAP-T-H22xWAP-mutp53<sup>R270H</sup>) etabliert und beschrieben (Wegwitz et al., 2010). Diese klonale Zelllinie zeichnet sich durch das Vorhandensein von verschiedenen Kompartimenten aus: in der Kultur befinden sich Zellen, die epitheliale Marker wie Epcam und Keratine exprimieren, sowie Zellen, die den mesenchymalen Marker Vimentin exprimieren, aber auch Zellen, die sich in verschiedenen Übergangsstadien befinden. Die intrinsische Heterogenität wurde durch Repopulierungsanalysen bestätigt: Zellen wurden in ihre epithelialen und mesenchymalen Kompartimenten durch FACS-Sortierung getrennt und beide Zellkompartimente waren in der Lage, zu wachsen, deren Pendanten zu bilden und wieder eine gemischte Population zu generieren. Diese Analysen zeigten, dass G-2 Zellen ein metastabiles Zellsystem bilden, wobei die Differenzierungsübergänge durch EMT bzw. MET ermöglicht werden (Wegwitz, 2010; Wegwitz et al., 2010).

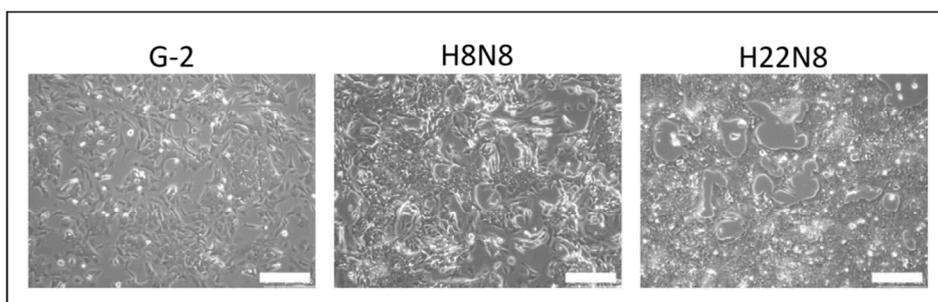
Ursprung der drei WAP-T Zelllinien G-2, H8N8 und H22N8 war jeweils ein undifferenzierter, nicht-metastasierender Tumor (siehe H&E-Färbungen in Abbildung 28). Die Tumore wiesen schlecht differenzierte Strukturen einer murinen Brustdrüse auf und zeichneten sich durch eine unregelmäßige, invasive Zellverteilung aus.



**Abbildung 28: H&E-Färbung der Primärtumore, aus denen die Zelllinien generiert wurden**

Anhand der H&E-Färbung ist der Differenzierungsgrad der Tumore gut erkennbar. Es handelte sich bei allen drei Tumoren um undifferenzierte Tumore mit nekrotischem Anteil (\*). Die Pfeile markieren große Stroma-Areale innerhalb des Gewebes, die typisch für undifferenzierte Tumore sind. (Maßstab: obere Reihe 500 µm, untere Reihe 100 µm)

Die Tumorzellvereinzelung erfolgte mit Hilfe eines Kollagenaseverdaus. Zur Vermeidung zellulären Stresses und dem daraus resultierenden Zelltod wurden die Zellen in dichter Konzentration ausgesät. Die zwei neu generierten Zelllinien zeichnen sich, wie die G-2 Zellen, durch ein adhärentes Wachstumsverhalten ohne Kontaktinhibition aus und sind dadurch fähig, 3-dimensionale Strukturen in der Zellkultur zu bilden. Die Morphologie der Zellen entspricht einem epithelialen Phänotyp, gekennzeichnet durch die Pflasterstein-artige Zellform. Darüber hinaus sind auch andere Zelltypen in den Zellpopulationen enthalten, die eine mesenchymale Ausprägung mit langgestreckter, spindelförmiger Form aufweisen (Abbildung 29). Von den G-2 Zellen ist bekannt, dass sie ein heterogenes, aber stabiles Zellsystem darstellen, welches sich selbst erhält (Wegwitz et al., 2010). Es ist anzunehmen, dass dieses auch auf die H8N8 und H22N8 Zellen zutrifft.



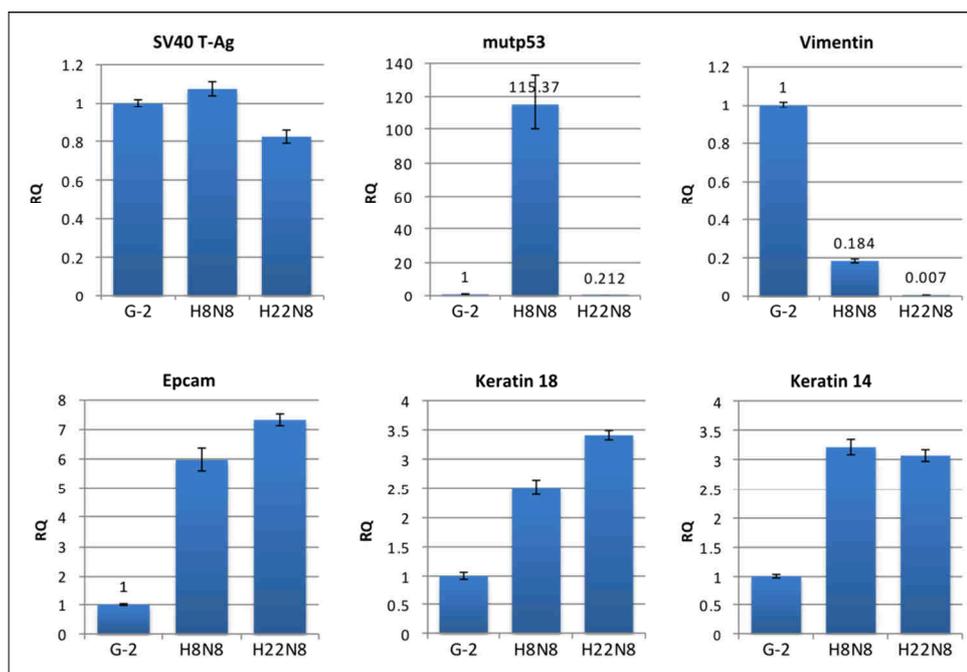
**Abbildung 29: Phasenkontrastbilder der etablierten Tumorzellsysteme**

In den Phasenkontrastbildern ist die epitheliale Morphologie der Zellen zu erkennen (G-2 Passage 30, H8N8 Passage 23, H22N8 Passage 49), Maßstab 250 µm.

Um weitere Analysen *in vitro* vornehmen zu können, bestand das Ziel in der Etablierung von Zelllinien, die den Phänotyp des Tumors widerspiegeln. Dazu wurden die Zelllinien hinsichtlich der Expression der Transgene und bestimmter Marker analysiert, die ebenfalls im Tumor vorkommen. Zusätzlich zur Expression von T-Ag und mutp53 ist die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker entscheidendes Charakteristikum für die Zelllinien. Zu den epithelialen Markern gehören Epcam und die Keratine 14 und 18: Epcam ist ein Adhäsionsmolekül epithelialer Zellen, dessen Expression mit vielen Karzinomen assoziiert wird (Haisma et al., 1999); daher wurde es als pan-epithelialer Differenzierungsmarker eingesetzt. Mit Hilfe der Keratin-Expression, ebenfalls spezifisch von epithelialen Zellen exprimiert, konnte zwischen myoepithelialen und luminalen Zellen unterschieden werden (Taylor-Papadimitriou et al., 1989). Zur Detektion mesenchymaler Zellen wurde Vimentin, ein Intermediärfilament dieser Zelltypen, verwendet.

Nachfolgend wurden Genexpressionsanalysen via qPCR durchgeführt und die Expression dieser Markergene mit der in G-2 Zellen verglichen. Weiterführende Charakterisierung fokussiert sich auf die H8N8 und H22N8 Zellen.

Die Daten der Genexpressionsanalyse (Abbildung 30) zeigen, dass alle drei Zelllinien das SV40 T-Ag auf etwa gleichem Level exprimieren, während die Expression von *mutp53* in den Zelllinien der *in vivo* Expression während der Laktation entspricht. Die G-2 Zellen und auch die H22N8 Zellen stammen aus Mauslinien, die während der Laktation *mutp53* nur auf sehr geringem Level bzw. nur sehr wenige Zellen das Protein exprimieren. Dies spiegelt sich in der Genexpression der Zellen wider. Im Vergleich zu den G-2 exprimieren H8N8 Zellen *mutp53* 115-fach stärker, wohingegen die Expression in den H22N8 5-fach reduziert ist.

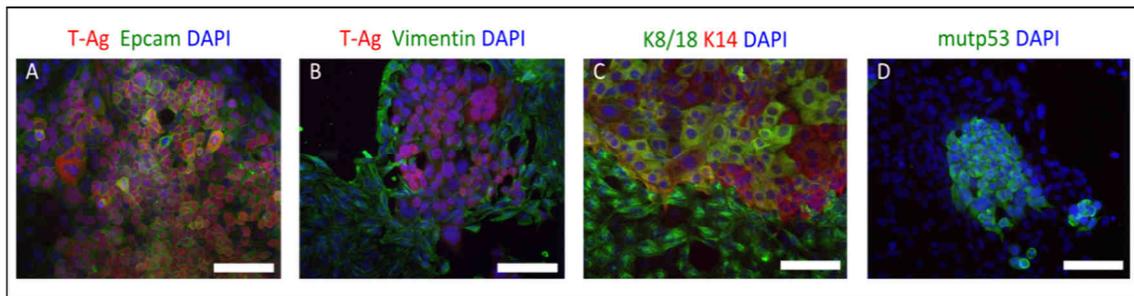


**Abbildung 30: Genexpression der Transgene und epithelialer sowie mesenchymaler Marker mittels qPCR**

Anhand der qPCR-Ergebnisse wurde deutlich, dass *T-Ag* in allen drei Zelllinien auf gleichem Level exprimiert wird. Unterschiede sind in der Expression von *mutp53* zu sehen: in den H8N8 Zellen wird *mutp53* 100-fach stärker als in den G-2 Zellen, und sogar über 500-fach stärker als in H22N8 Zellen exprimiert. Weiterhin ist zu beobachten, dass beide Zelllinien, H8N8 und H22N8, einen stärker ausgeprägten epithelialen Phänotyp als G-2 Zellen aufweisen (stärkere Expression epithelialer Marker wie *Epcam*, *Keratin 18* und *Keratin 14*, und geringere Expression des mesenchymalen Markers *Vimentin*).

Die neu etablierten Zelllinien H8N8 und H22N8 zeigten eine höhere Expression epithelialer Marker als in G-2 Zellen: so ist *Epcam* 6- bis 7-fach stärker und *Keratin 14* und *Keratin 18* 3-fach stärker exprimiert. Wohingegen der mesenchymale Marker *Vimentin* deutlich schwächer exprimiert wird: in den H8N8 ist eine 5-fach geringere und in den H22N8 sogar eine über 100-fach geringere Expression gemessen worden. In allen drei Zelllinien konnte die Expression von epithelialen als auch mesenchymalen Markern nachgewiesen werden, die sich nur in ihrer Ausprägung unterscheiden.

Für die weitere Charakterisierung wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und einige Tage später für Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Marker verwendet. Die Zellen wurden auf die Anwesenheit der Transgene, der epithelialen Marker wie *Epcam* und Keratine und des mesenchymalen Markers *Vimentin* untersucht.

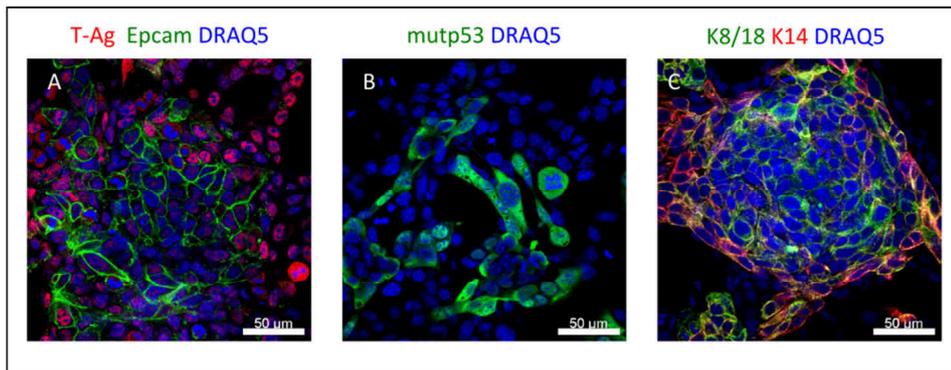


**Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung einer frühen Passage der H8N8 Zellen (Passage 6)**

Auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden für Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Es wurde die Expression der Epithelialmarker (Epcam, Keratin 8/18, Keratin 14), Mesenchymalmarker (Vimentin) und der Transgene (SV40 T-Ag und mutp53) analysiert, Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Maßstab 50 µm).

Anhand Abbildung 31 ist zu sehen, dass ein Großteil der Zellen positiv für Epcam ist und gleichzeitig T-Ag exprimiert. Die T-Ag-Expression beschränkt sich auf epitheliale Zellen (Abbildung 31A, B), was dem Bild im Tumor entspricht. Dennoch sind auch Zellen vorhanden, die epithelial sind, aber kein bzw. nur wenig T-Ag exprimieren. Die Analyse von Keratinen dient in einer gesunden Brustdrüse der Unterscheidung der epithelialen *Lineages* (oder Entwicklungslinie) der Zellen und eine Ko-Expression luminaler und myoepithelialer Marker wird mit einem Progenitorzellstatus assoziiert (Böcker et al., 2009). In Zellkultur zeigen H8N8 Zellen ein differenzielles Expressionsmuster der Keratine. Anhand der Ko-Färbung von Keratin 14 und Keratin 8/18 wurde deutlich, dass sowohl einfach-positive Zellen, positiv für je ein Keratin, als auch doppelt-positive Zellen vorhanden sind. Außerdem wurde festgestellt, dass eine größere Zellanzahl Keratin 8/18 exprimiert als Keratin 14 (Abbildung 31C). Mutp53 ist nur in einer geringen Anzahl von Zellen vorhanden. Es wurde beobachtet, dass mutp53 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma einiger Zellen lokalisiert ist.

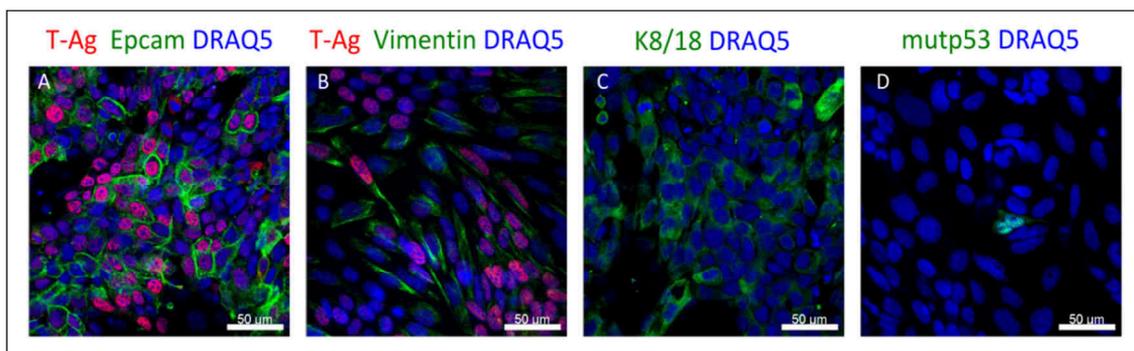
Die gleiche Analyse wurde mit einer späteren Passage der H8N8 Zellen durchgeführt, um die Stabilität der Markerexpression zu überprüfen. Dies konnte an H8N8 Zellen der Passage 101 bestätigt werden (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung einer späten Passage der H8N8 Zellen (Passage 101)**

Immunfluoreszenzfärbungen der H8N8 Zellen (konfokale Aufnahmen): Es wurde die Expression der Epithelialmarker (Epcam, Keratin 8/18, Keratin 14) und der Transgene (SV40 T-Ag und mutp53) in den Zellen einer späten Passage untersucht, die eine stabile Markerexpression aufweisen (Maßstab 50 µm).

Die H22N8 Zellen wurden äquivalent untersucht (Abbildung 33). Die T-Ag-Expression ist mit der in den H8N8 Zellen vergleichbar. Es gibt Zellen mit einer starken als auch intermediären T-Ag-Expression, aber auch Zellen, die T-Ag-negativ sind. In der Doppelfärbung T-Ag mit Vimentin ist offensichtlich, dass die T-Ag-Expression sich nicht nur auf epitheliale Zellen beschränkt, sondern auch von Zellen exprimiert wird, die den mesenchymalen Marker Vimentin exprimieren (hier bereits in einer frühen Passage). Ein Großteil der Zellen exprimiert Keratin 8/18, die Expression von mutp53 beschränkt sich auf vereinzelte Zellen, was der Expression im H22-NP8 Tumor entspricht. Auch die H22N8 Zellen spiegeln den Phänotyp des Ursprungtumors wider und die Zellen konnten darüber hinaus ihr stabiles Erscheinungsbild mit epithelialen und mesenchymalen Zellen etablieren.



**Abbildung 33: Immunfluoreszenzanalyse von H22N8 Zellen (Passage 14)**

Immunfluoreszenzfärbungen von H22N8 Zellen (konfokale Aufnahmen): Es wurde die Expression der Epithelialmarker (Epcam, Keratin 8/18), Mesenchymalmarker (Vimentin) und der Transgene (SV40 T-Ag und mutp53) untersucht (Maßstab 50 µm).

Durch die Analysen konnte gezeigt werden, dass die H8N8 und H22N8 Zellen den beschriebenen G-2 Zellen ähneln. Weiterhin konnte für die Zellen gezeigt werden, dass sie ein stabiles und homöostatisches Zellsystem mit sowohl epithelialen als auch mesenchymalen

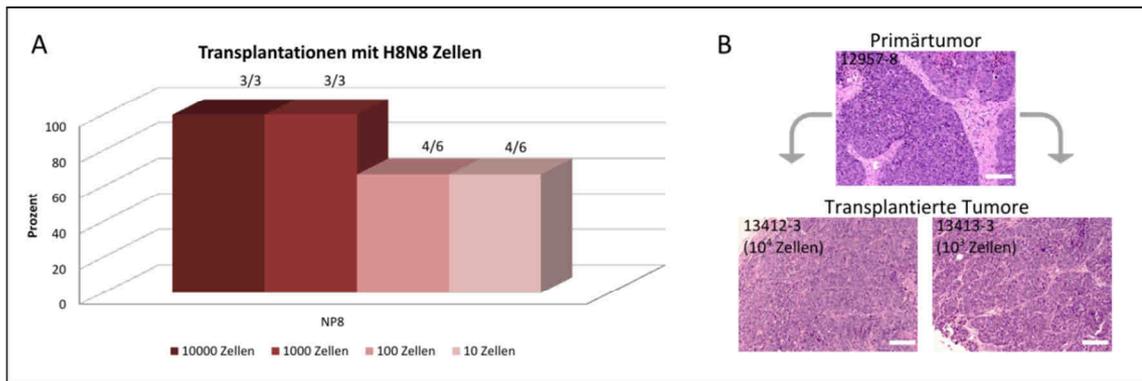
Zellen darstellen. Die Stabilität in der Ausbildung beider Kompartimente wurde für die H8N8 Zellen zusätzlich durch Softgarklonierungsexperimente (Daten nicht gezeigt) bestätigt.

#### **5.2.4. Analyse der Tumorigenität und Disseminierungseigenschaften der WAP-T Zelllinie H8N8**

Weitere wichtige Eigenschaften, die die WAP-T Tumorzelllinien als *in vitro* Modell für das Maussystem aufweisen sollten, ist die Fähigkeit nach Transplantation Tumore zu initiieren, die endogenen undifferenzierten WAP-T Tumoren phänotypisch ähneln, sowie die Fähigkeit Metastasen zu bilden. Für die G-2 Zellen wurde dies bereits untersucht: 10 Zellen sind für eine Tumorbildung ausreichend, und sie verursachen in geringer Frequenz pulmonale Metastasen (Wegwitz et al., 2010). Für die nachfolgenden Experimente wurde der Fokus auf die H8N8 Zellen gelegt, da diese im Vergleich zu den H22N8 Zellen deutlich mehr mutp53 exprimieren (siehe 5.2.3) und der Effekt des mutierten Proteins analysiert werden soll. Als Transplantationsempfänger wurden nicht-induzierte NP8 Mäuse verwendet, da sie einen nahezu syngen Hintergrund besitzen. In früheren Transplantationsexperimenten mit G-2 Zellen wurde gezeigt, dass die Tumor-initiiierende Effizienz in Wildtyp-BALB/c deutlich verringert ist. Möglicherweise führt die Transgenexpression zur Erkennung der Zellen als „fremd“ durch das Immunsystem.transgenexpre

##### **5.2.4.1. Tumor-initiiierende Fähigkeiten der H8N8 Zellen**

Um die Tumor-initiiierenden Eigenschaften der H8N8 Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen in einem Gemisch aus Matrigel und Zellkulturmedium (1:1) orthotop in das Mammagewebe #3 (abdominal, linke Seite) unverpaarter NP8 Mäusen injiziert. Matrigel ist eine kommerzielle Mischung von ECM-Komponenten, die die Eigenschaft besitzt, auf Eis dickflüssig zu sein und bei Temperaturen über 16°C zu polymerisieren. Die Anwendung von Matrigel ermöglicht eine Fixierung der Zellen am Injektionsort. Um die Frequenz der tumorigenen Zellen einschätzen zu können, wurden verschiedene Zellzahlen transplantiert:  $10^4$ ,  $10^3$ , 100 und 10 Zellen. Die Mäuse wurden beim Erreichen des Präparationskriteriums (Tumorgroße zwischen 1,4 cm und 1,5 cm Durchmesser) präpariert und einige Organe für spätere Analysen zur Disseminierungsfähigkeit der H8N8 Zellen entnommen: neben Milz, Leber und Lunge wurden weitere Mammagewebe (#2 und #7) sowie Blut und Knochenmark entnommen und in Stickstoff schockgefroren (siehe Kapitel 4.3.2). Nach sechs Monaten wurde das Zeitlimit des Experiments erreicht und Tiere, die bis dahin keinen Tumor entwickelt haben, wurden nach gleichem Schema präpariert.



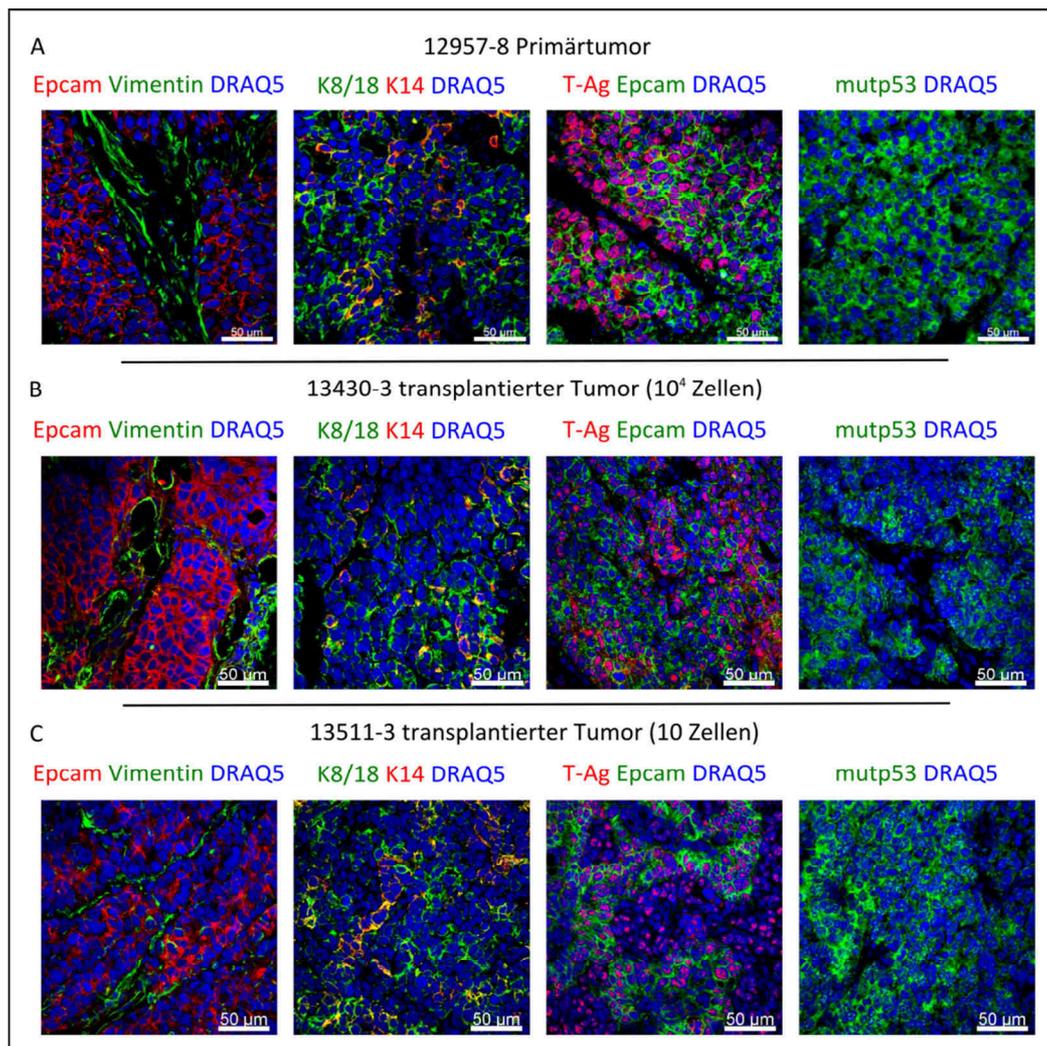
**Abbildung 34: Tumorigenität der H8N8 Zellen in NP8 Mäusen**

A) H8N8 Zellen unterschiedlicher Konzentrationen wurden in NP8 Mäusen transplantiert, um die Tumor-initiiierenden Eigenschaften zu untersuchen. Die Frequenz der H8N8 Zellen, zu Tumoren auszuwachsen, ist hoch: 10 Zellen sind ausreichend. B) H&E-Färbungen des Primärtumors (Ursprung der H8N8 Zellen) und zweier transplantierten Tumore, die einen ähnlichen Differenzierungsgrad aufweisen (Maßstab: 100 µm).

Wie in Abbildung 34A zu sehen ist, entwickelten 78% der transplantierten NP8 Mäuse Mammakarzinome. Sichtbar ist auch die Abhängigkeit der transplantierten Zellzahl, dennoch sind zehn Zellen für eine Tumorentstehung (4 von 6 Transplantationen) ausreichend, was für eine hohe Anzahl von Tumor-initiiierenden Zellen in der H8N8 Zelllinie spricht.

Anhand H&E-Färbungen der ursprünglichen und transplantierten Läsionen wurde gezeigt, dass Primär- und Sekundärtumore morphologisch sehr ähnlich sind (Abbildung 35B), sämtliche Sekundärtumore wurden als undifferenzierte Mammakarzinome (Grad 3) klassifiziert.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte ebenfalls bestätigt werden, dass durch Transplantation von H8N8 Zellen Tumore entstehen, die sowohl dem Ursprungstumor hinsichtlich Morphologie und Markerprofile ähneln als auch untereinander vergleichbar sind (Abbildung 35). So wurden die Transgene T-Ag und mutp53 in transplantierten Tumoren (unabhängig von der transplantierten Zellzahl) ebenso nur von Epithelzellen und in ähnlicher Konzentration exprimiert. Gleiches trifft auf die Expression von Epithelial- und Mesenchymalmarkern zu: mehrheitlich exprimieren Tumorzellen das Keratin 8/18, seltener das Keratin 14, in wenigen Fällen werden beide Keratine in einer Zelle ko-exprimiert. Die Expression von Vimentin beschränkt sich in Tumoren auf mesenchymale Zellkompartimente wie z.B. Stroma.

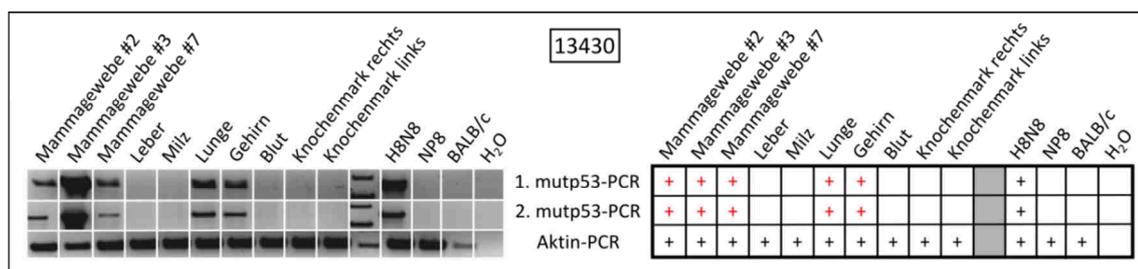


**Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung von transplantierten Tumoren**

Expression der Transgene und epithelialer und mesenchymaler Marker im Primärtumor (A) und in transplantierten Tumoren (B:  $10^4$  Zellen transplantiert und C: 10 Zellen transplantiert): in den Tumoren wird Epcam von epithelialen Zellen und Vimentin von Stroma des Tumors exprimiert. Viele Zellen sind Keratin 8/18-positiv, Keratin 14-positiv ist eine geringere Anzahl von Zellen. Es sind auch Zellen vorhanden, die beide Keratine ko-exprimieren. Die Transgene T-Ag und mutp53 werden von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Die Expression der untersuchten Proteine in den transplantierten Tumoren ist mit der des Primärtumors vergleichbar (konfokale Aufnahmen, Maßstab 50  $\mu\text{m}$ ).

#### 5.2.4.2. Disseminierung und Metastasierung von H8N8 Zellen in entfernte Organe

Die Fähigkeit zu disseminieren ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung. Um die Disseminierungseigenschaften der H8N8 Zellen zu studieren, wurde DNA aus verschiedenen Organen (Mammagewebe, Milz, Leber, Lunge, Gehirn, Blut, Knochenmark) isoliert und mittels PCR auf die Anwesenheit des *mutp53*-Transgens untersucht. Mutp53 ist in den transplantierten H8N8 Zellen vorhanden, aber nicht in den Zellen der NP8 Mäuse, welche nur das SV40 T-Ag Transgen besitzen. Mit dieser Methode konnte eine hohe Sensitivität erreicht werden: bei der Etablierung und Optimierung der Methode gelang es, noch 100 H8N8 Zellen in 50 mg Lebergewebe (BALB/c) nachzuweisen.



**Abbildung 36: Beispiel für die Analyse der disseminierten H8N8 Zellen nach Transplantation**

Es wurden zehn verschiedene Organe (Mammagewebe #2, #3 (Tumor), #7, Leber, Milz, Lunge, Gehirn, Blut, Knochenmark (rechts und links)) auf die Anwesenheit von H8N8 Zellen mittels PCR untersucht. Die mutp53-spezifische PCR erfolgte über den HA-Tag des Transgens, sie wurde 2-mal durchgeführt und eindeutige Banden in beiden PCRs wurden als positiv gewertet. Für die PCRs wurden jeweils 200 ng DNA eingesetzt. Als DNA-Ladekontrolle diente die Aktin-PCR. Kontrollen für die mutp53-PCR: H8N8 Zellen als Positivkontrolle, Gewebe von NP8 und BALB/c als mutp53-Negativkontrolle, H<sub>2</sub>O als Kontaminationskontrolle.

Von den insgesamt 18 transplantierten Tieren entwickelten 14 Mäuse Mammakarzinome. Zwei Tiere (2x 100 Zellen transplantiert) bekamen Fibrosarkome an anderen Stellen als MG #3 und zwei weitere Mäuse (2x 10 Zellen transplantiert) entwickelten keinen Tumor innerhalb der Dauer des Experiments von 6 Monaten. Des Weiteren wurden von drei Tieren (1x 10<sup>4</sup>, 2x 10<sup>3</sup> Zellen transplantiert) nicht alle Organe entnommen, so dass diese insgesamt sieben Tiere für die Analyse der Disseminierungseigenschaften der H8N8 Zellen nicht berücksichtigt wurden. Die Organe der verbleibenden elf Mäuse wurden auf disseminierte H8N8 Zellen untersucht. Das Ergebnis der PCR ist in Tabelle 15 zusammengefasst.

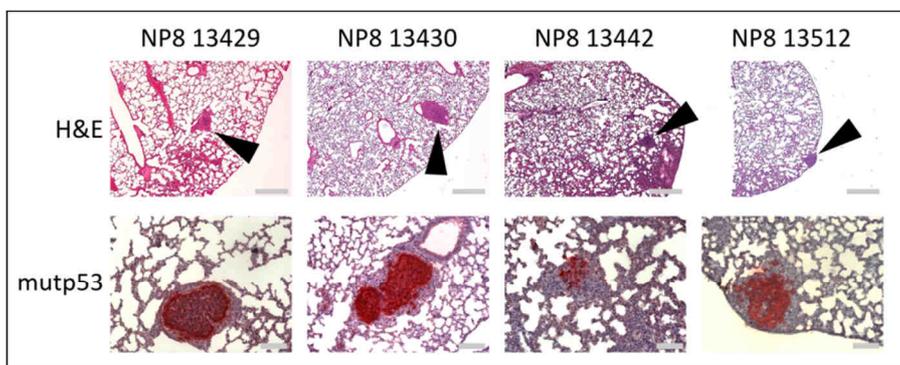
**Tabelle 15: Übersicht der auswertbaren Tiere und PCR-Ergebnisse der disseminierten Tumorzellen in distante Organe**

MG – Mammagewebe, KM – Knochenmark

Zell-zahl	Histo-Nr.	MG #2	Tumor (MG #3)	MG #7	Leber	Milz	Lunge	Gehirn	Blut	KM rechts	KM links	Nr. Organe
10 <sup>4</sup>	13429	+	+	+	+	+	+	+				6
	13430	+	+	+			+	+				4
10 <sup>3</sup>	13437	+	+					+		+		3
100	13428		+	+			+			+		3
	13441	+	+	+	+		+					4
	13438		+				+					1
	13442		+		+			+				2
10	13510		+									0
	13511		+									0
	13439		+					+				1
	13512		+	+	+	+						3
Prävalenz für bestimmte Organe (in %)		36.4	100.0	45.5	36.4	18.2	45.5	45.5	0.0	18.2	0.0	

Es konnte gezeigt werden, dass H8N8 Zellen in der Lage sind, sich in entfernte Organe auszubreiten. Im Durchschnitt wurden in 3,0 Organen pro Maus disseminierte Tumorzellen gefunden. Selbst Tumore, die aus nur 10 Zellen initiiert wurden, sind zur Disseminierung befähigt. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine Prävalenz für bestimmte Organe zur Disseminierung vorhanden ist. Häufig waren Gehirn, Lunge und Mammagewebe #7 betroffen, hier wurden in 45,5% der Fälle, also in 5 von 11 Tieren, H8N8 Zellen detektiert. Hingegen konnten im Blut und im Knochenmark des linken Beins keine disseminierten Tumorzellen entdeckt werden.

Um die Frage zu klären, ob die H8N8 Zellen neben der Disseminierung auch zur Metastasierung befähigt sind, wurden die Lungen anhand eines Schnitts (H&E-Färbung) pro Tier untersucht. In knapp 30% der Fälle entwickelten die tumortragende Empfängertiere Metastasen in der Lunge (4 von 14 Mäusen). Um die Abstammung der Metastasen von den Tumorzellen nachzuweisen, wurden mutp53-Färbungen an Paraffinschnitte der Lungen durchgeführt. Da mutp53 nur in den transplantierten Zellen, nicht aber in den Zellen der Empfängertiere, exprimiert wird, konnte die Abstammung der Metastasen vom Tumor nachgewiesen werden.



**Abbildung 37: Entwicklung pulmonaler Metastasen nach Transplantation von H8N8 Zellen**

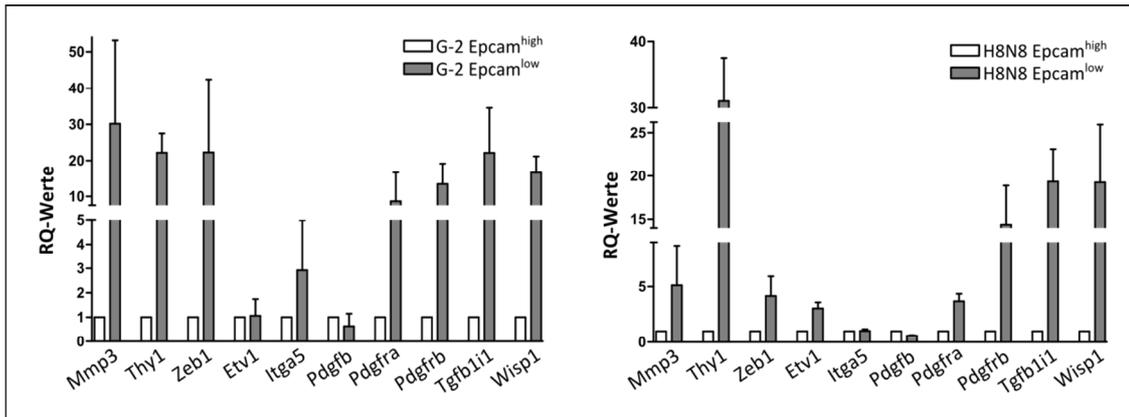
Nach Transplantation von H8N8 Zellen konnten in einigen Fällen Lungenmetastasen mittels IHC detektiert werden. In den H&E-Färbungen sind die Metastasen durch Pfeile markiert. Anhand der mutp53-Färbung konnte die Abstammung der Metastasen von H8N8 Zellen bestätigt werden. (Maßstab H&E: 500 µm, mutp53: 100 µm).

Die vorangegangenen Experimente dienten der weiteren Charakterisierung der H8N8 Zellen. Die Zellen zeichnen sich durch ein hohes tumorigenes Potential aus: bereits 10 Zellen sind für die Initiation neuer Tumore ausreichend. Weiterhin sind die Zellen in der Lage, sich vom Tumor zu lösen und sich in entfernte Organe auszubreiten, was für den Start des Metastasierungsprozesses unumgänglich ist. Ferner konnte auch gezeigt werden, dass H8N8 Zellen durchaus den Mehrschritt-Prozess der Metastasierung vollenden und Metastasen bilden können.

### 5.2.5. Übertragung der EMT-Ergebnisse auf das *in vitro* Zellsystem

Für die G-2 Zellen wurde bereits das Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen Populationen gezeigt: diese können anhand ihrer Markerexpression (epithelial oder mesenchymal) in eine quasi-epitheliale und eine quasi-mesenchymale Population unterschieden werden. Beide Populationen sind in der Lage, das jeweils andere Kompartiment mittels EMT-Prozess wiederherzustellen. Die Zellen bilden ein homöostatisches System (Wegwitz et al., 2010). In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die H8N8 Zellen in ihren Eigenschaften hinsichtlich Markerexpression (epithelial, mesenchymal) und Morphologie der transplantierten Tumore den endogenen undifferenzierten Tumoren sehr ähneln und mit den G-2 Zellen vergleichbar sind. Mit Hilfe von Softgarklonierungen wurde für die H8N8 Zellen ebenfalls nachgewiesen, dass sie ein homöostatisches Zellsystem darstellen. Mit Hilfe der beiden Zellsysteme sollte die EMT-Signatur der bitransgenen Tumoren *in vitro* bestätigt werden.

Für die Validierung der EMT-Signatur wurden H8N8 und G-2 Zellen mit Epcam-Antikörper inkubiert und durch FACS-Sortierung in eine epitheliale (Epcam<sup>high</sup>) und eine mesenchymale (Epcam<sup>low</sup>) Population separiert. Aus den Populationen wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und für qPCR-Analysen verwendet. Hierbei wurden für die einzelnen Gene der EMT-Signatur in Exon lokalisierte Primer eingesetzt. Anhand Abbildung 38 wird deutlich, dass die Mehrzahl der Gene der EMT-Signatur in dem quasi-mesenchymalen Kompartiment stärker exprimiert ist als in der quasi-epithelialen, Epcam<sup>high</sup> Zellpopulation. Gene, die in den Kompartimenten der G-2 Zellen nicht reguliert sind, sind *Pdgfb* und *Etv1*. In den H8N8 Zellen ist zusätzlich *Itga5* nicht differenziell reguliert, während *Etv1* gegensätzlich exprimiert ist. Ursache für die nicht-differenzielle Expression von *Pdgfb* und *Itga5* in den Populationen könnte in einer andersartigen Regulation der Signalwege in der Zellkultur aufgrund fehlender Zell-Zell-Kontakte, speziell Tumor-Stroma-Interaktionen, sowie fehlender Wachstumsfaktoren begründet sein.



**Abbildung 38: Validierung der EMT-Signatur in G-2 und H8N8 Zellen**

Nach Epcam<sup>high</sup> und Epcam<sup>low</sup> sortierte Zellen (n=3) wurden für qPCR-Analysen eingesetzt, um die EMT-Signatur, die aus den Mikroarrays gewonnen wurde, auf *in vitro* Systeme zu übertragen. Die Expression der meisten Gene ist in dem mehr mesenchymalen Kompartiment höher als in der epithelialen Population. *Pdgfb* ist in beiden Zelllinien nicht differenziell reguliert, in den G-2 Zellen ist zusätzlich *Etv1* nicht reguliert. In den H8N8 gibt es keinen Unterschied in der *Itga5*-Expression und die des *Etv1*-Gens ist gegensätzlich reguliert.

Beide Zellsysteme weisen für die meisten Gene der EMT-Signatur (8 von 10 Genen) eine differenzielle Expression auf. So korreliert die Expression der EMT-assoziierten Gene mit dem quasi-mesenchymalen Kompartiment, während sie in quasi-epithelialen Zellen schwächer exprimiert sind. Das Experiment unterstützt außerdem die Gültigkeit der EMT-Signatur in den Tumoren. Zusätzlich konnte die Eignung der Zelllinien für die Erforschung des Metastasierungsprozesses *in vitro* verifiziert werden.

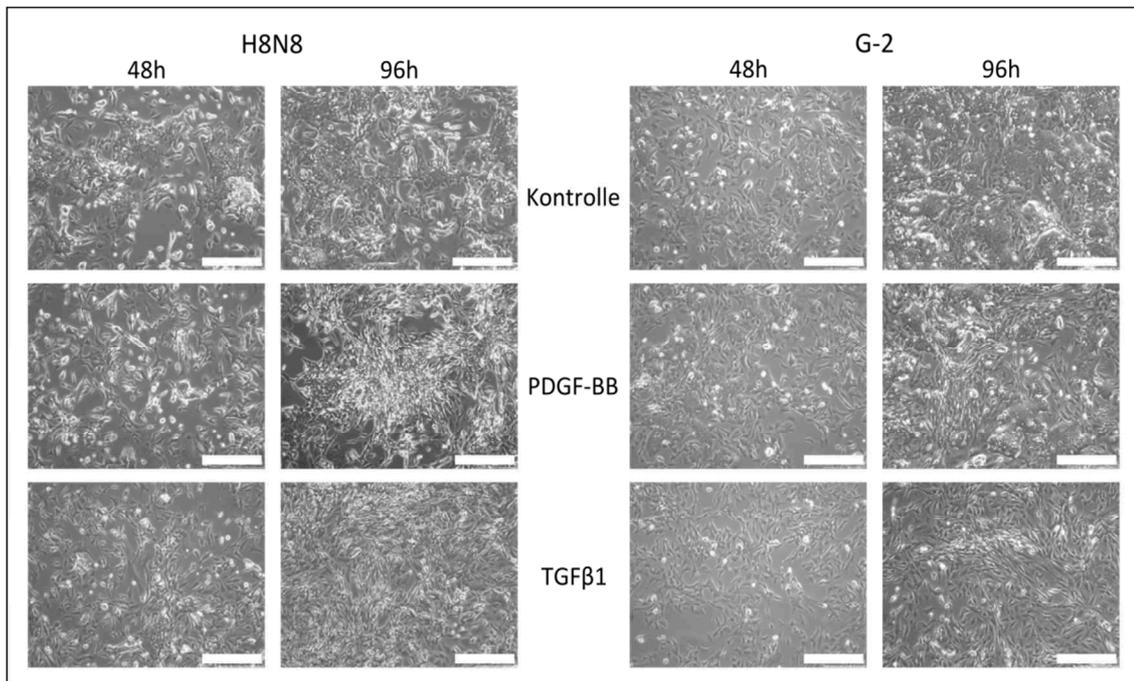
### 5.3. Manipulation des WAP-T Tumorzellsystems

#### 5.3.1. Tgf $\beta$ 1-/PDGF-Stimulation zur Induktion von EMT

Nach Evaluierung der EMT-Signatur in den H8N8 und G-2 Zellen galt es zu überprüfen, ob die Induktion von EMT in den Zellen die Regulation der gleichen Gene beeinflusst. So bestand die Frage, ob eine EMT tatsächlich für die Regulation der Gensignatur verantwortlich ist und dadurch die Metastasierung in den bitransgenen Mäusen forciert. In den Mikroarrays wurde eine erhöhte Expression von *Tgf $\beta$ 1* und *Pdgfb* in den bitransgenen Tumoren gefunden. Tgf $\beta$ 1 ist in der Literatur als potenter EMT-Induktor beschrieben und wird häufig verwendet, um den Prozess der EMT *in vitro* auszulösen (Xu et al., 2009; Wendt et al., 2011; Chen et al., 2012). Für PDGF-D wurde 2007 beschrieben, dass es ebenfalls in der Lage ist, in Prostata-Krebszellen EMT zu induzieren (Kong et al., 2008). Beide Moleküle wurden deshalb als Induktoren für die epithelial-mesenchymale Transition in den Zellen verwendet.

H8N8 und G-2 Zellen wurden mit Tgf $\beta$ 1 (10 ng/ml) bzw. mit PDGF-BB (50 ng/ml) über einen Zeitraum von sieben Tagen behandelt (täglicher Mediumwechsel mit erneuter Zugabe der

Wachstumshormone, kein Umsetzen der Zellen in diesem Zeitraum) und dabei Veränderungen in der Zellmorphologie beobachtet.

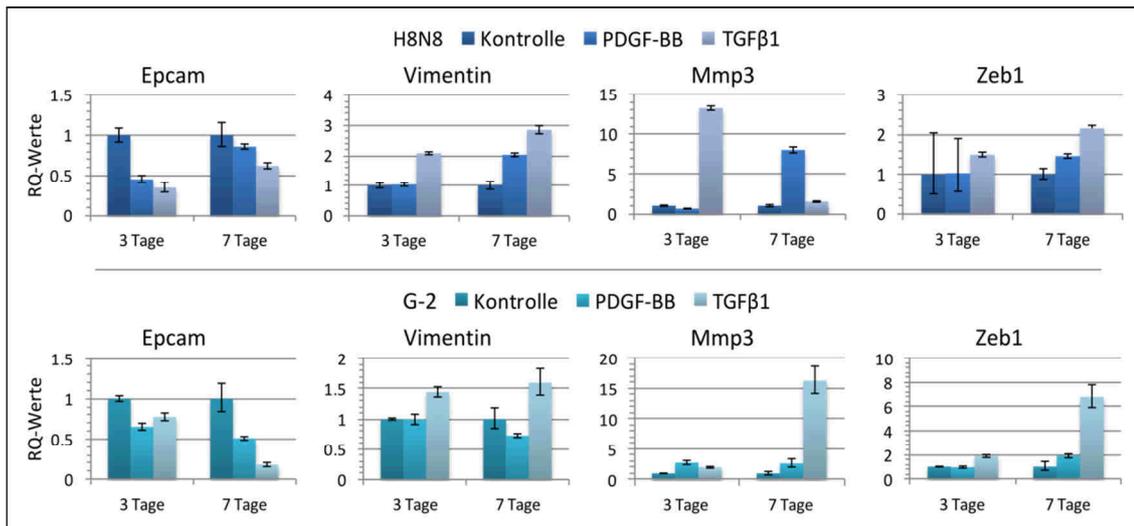


**Abbildung 39: Einfluss von Tgfβ1 und PDGF-BB auf die Morphologie der Tumorzellen**

Behandlungen der H8N8 und G-2 Zellen mit Tgfβ1 bzw. PDGF-BB über einen Zeitraum von 7 Tagen führten zu einer Veränderung der Zellmorphologie. Die Mehrzahl der Zellen wies einen langgestreckten, mesenchymalen Phänotyp auf, wenn sie mit Tgfβ1 oder PDGF-BB behandelt wurden. Die Kontrollzellen hingegen behielten ihren mehrheitlich epithelialen Phänotyp, sie bildeten viele kompakte Inseln. (Maßstab: 250 µm)

Während die Kontrollzellen einen eher epithelialen Phänotyp zeigten (sie wiesen das typische Kopfsteinpflaster-artige Aussehen auf und gruppierten sich bevorzugt in kompakten Inseln), waren bei den mit Tgfβ1- oder PDGF-BB-behandelten H8N8 und G-2 Zellen morphologische Veränderungen erkennbar (Abbildung 39): die Zellen waren länglicher, lagerten sich kaum noch in Gruppen zusammen und schienen eine mehr mesenchymale Morphologie zu besitzen. Mit zunehmender Konfluenz (96 h) wurde die Veränderung deutlicher. Die Veränderungen der Zellmorphologie unter Zugabe von Tgfβ1 bzw. PDGF-BB gab den ersten Hinweis, dass beide Faktoren eine EMT in WAP-T Tumorzellen induzieren können.

Um dies zu untermauern, wurde im nächsten Schritt eine Analyse der Genexpression einiger relevanter Gene (*Epcam* als Epithelialmarker, *Vimentin* als Mesenchymalmarker, *Mmp3* und *Zeb1* als EMT-assoziierte Gene) durchgeführt. Dabei sollte überprüft werden, ob die Behandlungen der Zellen mit den Wachstumsfaktoren tatsächlich die molekularen Merkmale einer EMT und Verstärkung mesenchymaler Charakteristika in den Zellen hervorruft. Dafür wurden die Zellen mit Tgfβ1 bzw. PDGF-BB behandelt und nach drei bzw. sieben Tagen geerntet und die Genexpression mit Hilfe der qPCR untersucht.

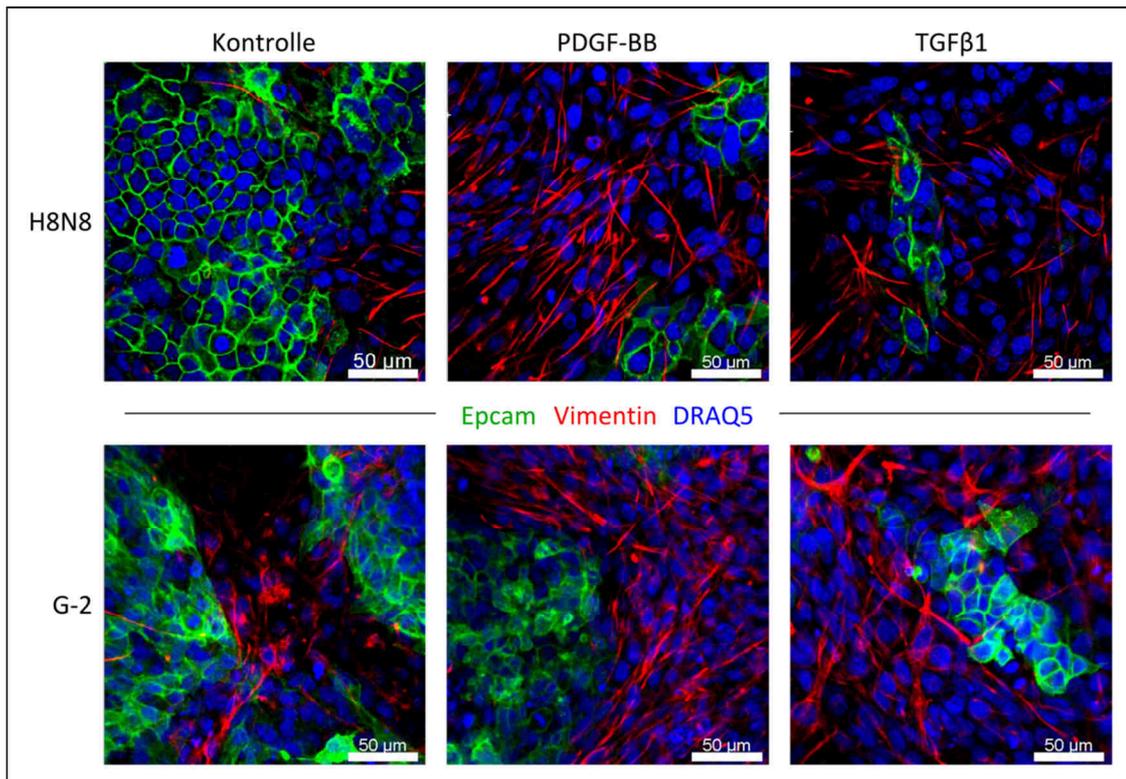


**Abbildung 40: Quantitative PCR der H8N8 und G-2 Zellen nach Tgfβ1- bzw. PDGF-BB-Stimulation**

In der oberen Reihe ist das Ergebnis der qPCR der H8N8, in der unteren Reihe das Ergebnis der G-2 Zellen dargestellt. Die Behandlung mit Tgfβ1 oder PDGF-BB führt zumeist zur Reduktion von *Epcam*, zur Hochregulation von *Vimentin*, *Mmp3* und *Zeb1*. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge einer 2 mg/ml BSA in PBS-Lösung verwendet.

In beiden Zelllinien wurde beobachtet, dass der größte Effekt auf die Genexpression durch eine 7-tägige Tgfβ1-Behandlung hervorgerufen wurde. In den H8N8 Zellen war nach drei Tagen eine deutliche Reduktion von *Epcam* zu beobachten, die allerdings nach sieben Tagen nicht mehr so stark ausfiel. Möglicherweise lag das an der zunehmenden Konfluenz der Zellen, die dann offensichtlich mehr epitheliale Marker exprimierten. Dennoch war in den H8N8 Zellen nach sieben Tagen ein signifikanter Anstieg der *Vimentin*-Expression (PDGF-BB: 2-fach, Tgfβ1: knapp 3-fach) zu beobachten. Die PDGF-BB-Behandlung führte nach sieben Tagen zu einer 8-fach stärkeren *Mmp3*-Expression als in den Kontrollzellen. Durch Tgfβ1-Stimulation wurde bereits nach drei Tagen ein drastischer Anstieg der *Mmp3*-Expression festgestellt, allerdings war sie nach sieben Tagen deutlich reduziert und nicht mehr signifikant verschieden zur Kontrolle. Ob hier die Konfluenz der Zellen ebenfalls eine Rolle spielte, ist derzeit nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Bezüglich der *Zeb1*-Expression stellte sich heraus, dass nur durch Stimulation von Tgfβ1 die Expression des Gens um das 2-fache gesteigert wurde.

Ein ähnliches Bild ist auch in den G-2 Zellen zu finden: *Epcam* war nach sieben Tagen durch PDGF-BB-Stimulation 2-fach und durch Tgfβ1 sogar 5-fach reduziert. Die Expression von *Mmp3* und *Zeb1* stieg durch Behandlung mit Tgfβ1 nach sieben Tagen signifikant an: *Mmp3* 16-fach und *Zeb1* knapp 7-fach. Die Stimulation mit PDGF-BB führte lediglich zu einem circa 2-fachen Anstieg der EMT-assoziierten Gene. Die *Vimentin*-Transkription zeigte keine eindeutigen Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen und der Kontrolle.



**Abbildung 41: Immunfluoreszenzfärbungen der H8N8 und G-2 Zellen sieben Tage nach Tgfβ1- und PDGF-BB-Stimulation**

Die Zellen wurden sieben Tagen lang mit Tgfβ1 bzw. PDGF-BB behandelt. Es ist zu erkennen, dass in beiden Zelllinien der Anteil der Vimentin-positiven Zellen höher ist, dennoch sind auch epitheliale (Epcam-positiv) Zellen vorhanden.

Zur Analyse der Proteinlevel von Epcam und Vimentin wurden H8N8 und G-2 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und sieben Tage mit Tgfβ1 (10 ng/ml) oder PDGF-BB (50 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert und eine Ko-Färbung mit Epcam- und Vimentin-Antikörper durchgeführt. Die Bilder wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops aufgenommen. Es wurde eine Erhöhung der Anzahl von Vimentin-exprimierenden Zellen durch Stimulation mit Tgfβ1 oder auch mit PDGF-BB beobachtet. Dennoch waren auch epitheliale, Epcam-positive Zellen vorhanden, die sich meist Insel-artig zusammenlagerten. Aber im Vergleich zur Kontrolle war der Anteil der epithelialen Zellen durch die Behandlung reduziert. Auch die Zellkernmorphologie hatte sich durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren verändert: in epithelialen Zellen war der Kern überwiegend rund und kompakt, während viele Kerne der behandelten Zellen eine langgezogene Form aufwiesen, was zusätzlich mit einer Vimentin-Expression korrelierte. Die Immunfluoreszenzbilder bestätigten die Morphologieveränderung der Zellen in Abbildung 39.

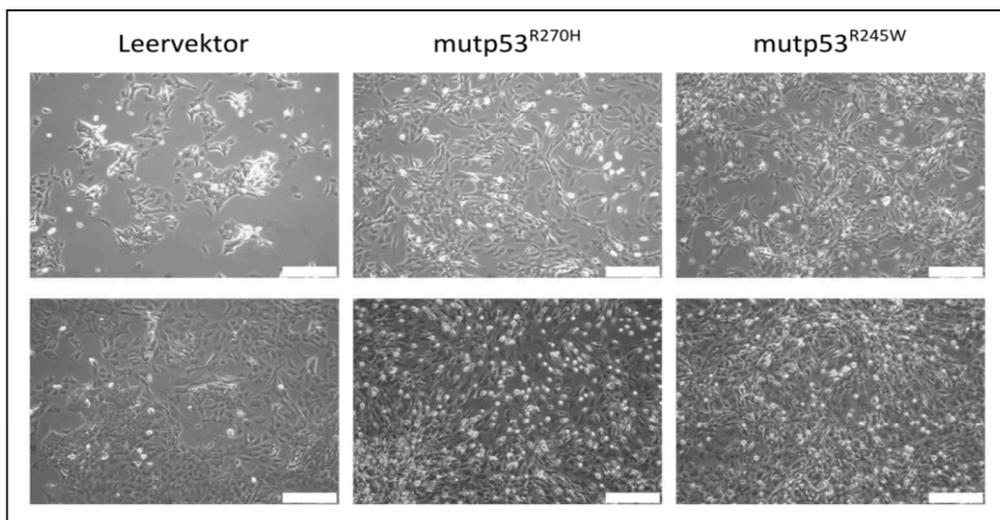
Zusammenfassend wurde beobachtet, dass Tgfβ1 in der Lage ist, den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition in den WAP-T Tumorzellsystemen zu initiieren und dadurch die Expression epithelialer, mesenchymaler und EMT-assoziiierter Gene beeinflussen kann. Unter

den gleichen experimentellen Bedingungen (Konzentration, Konfluenz, usw.) weist PDGF-BB einen geringeren Wirkungsgrad als Tgf $\beta$ 1 für die Induktion von EMT in WAP-T Tumorzellen auf. Dennoch bewirken beide Reagenzien die Induktion einer EMT, die zur Hochregulation von zwei Genen der EMT-Signatur (*Zeb1* und *Mmp3*) führt. Die Ergebnisse der EMT-Induktion *in vitro* weisen darauf hin, dass die veränderte Expression der Gene wie *Zeb1* und *Mmp3* in den Tumoren vermutlich durch Aktivierung des EMT-Prozesses bedingt ist.

### 5.3.2. Einfluss von mutp53 (R270H und R245W) in G-2 Zellen auf den EMT-Prozess

Im Folgenden wurde überprüft, welche Auswirkung die ektope Expression von mutp53 auf die epithelial-mesenchymale Transition, im speziellen auf die Expression von Epcam, Vimentin, *Zeb1* und *Mmp3*, hat. Hierfür wurden die G-2 Zellen verwendet, da diese mutp53 im Gegensatz zu H8N8 Zellen nur sehr schwach exprimieren (Abbildung 30).

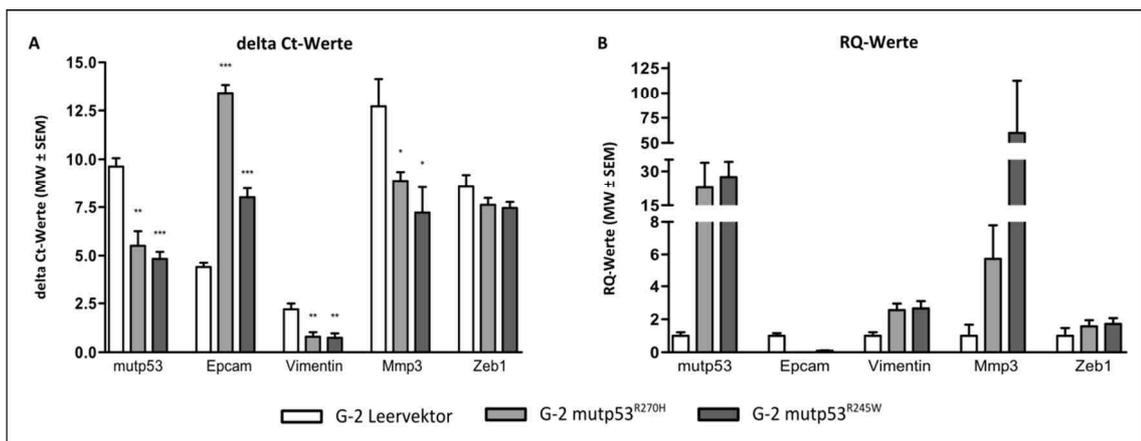
Die Produktion infektiöser, aber replikationsinkompetenter Viren erfolgte durch Ko-Transfektion des lentiviralen Vektors und den Helferplasmiden (Gag/Pol, Rev, Vsv-G) in 293T Zellen. Die anschließende Infektion von G-2 Zellen mit dem Virus führte zu Integration des *mutp53-HA*-Konstrukts in die genomische DNA der Zellen. Als Kontrolle dienten G-2 Zellen, die mit dem LeGO-iG2-Leervektor infiziert wurden. Nach mehrmaligem Infizieren mit neuem Virusüberstand zur Verbesserung der Transduktionseffizienz wurden die Zellen zur Anreicherung mindestens 2x nach GFP sortiert.



**Abbildung 42: Mutp53-überexprimierende G-2 Zellen**

In der oberen Reihe sind Phasenkontrastbilder von G-2 Zellen in geringerer Zelldichte, in der unteren Reihe konfluent gewachsenen Zellen zu sehen. Die Zellen mit dem Leervektor zeigen vermehrt eine epitheliale Morphologie, während Zellen, die mutp53 überexprimieren, ein verändertes Aussehen aufwiesen, sie erschienen länglicher und mehr mesenchymal. Besonders deutlich wird der Effekt, wenn mutp53<sup>R245W</sup> exprimiert wird (Maßstab: 250  $\mu$ m).

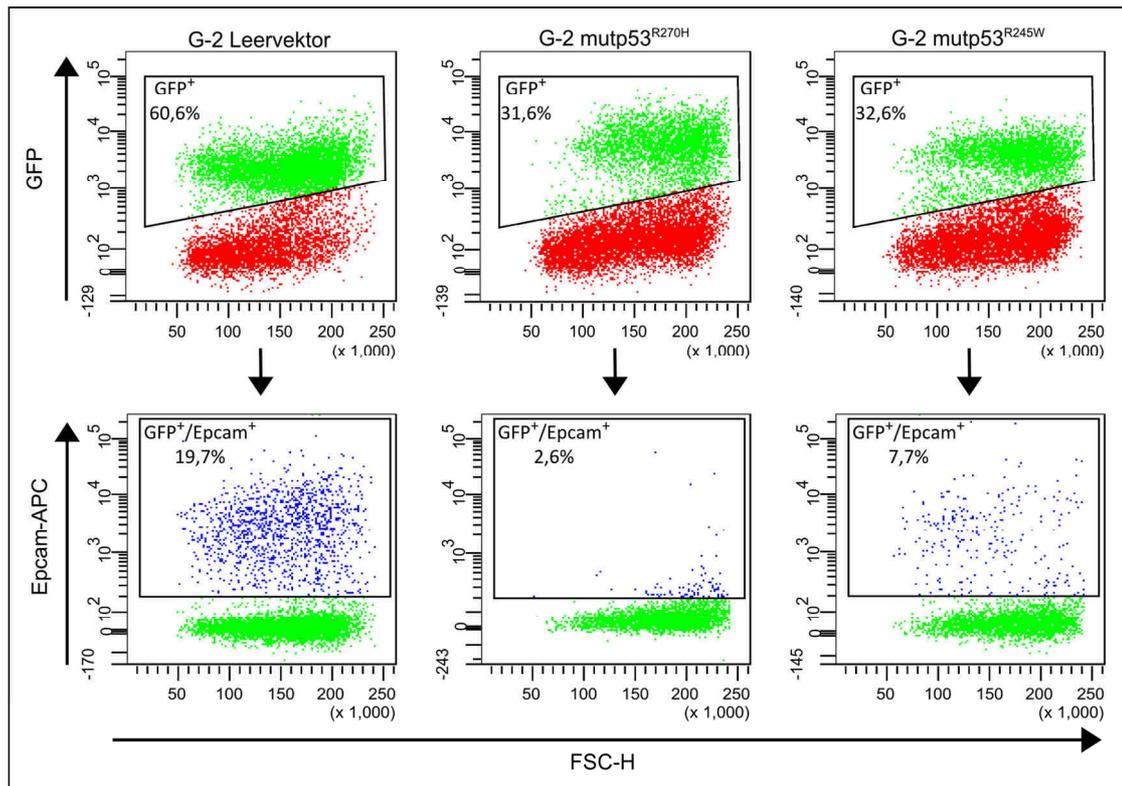
Die Überexpression von *mutp53*, sowohl R245W- als auch R270H-Mutation, führte zu Veränderungen im Erscheinungsbild der G-2 Zellen (Abbildung 42). Die Zellen wiesen nicht mehr die typische epitheliale Morphologie auf: während Epithelzellen sich durch eine runde, kompakte Zellform auszeichneten, wies die Mehrzahl der *mutp53*-exprimierenden Zellen einen eher langgestreckten, mesenchymalen Zellkörper auf. Ob die *mutp53*-Expression auch die Genexpression bestimmter Gene wie *Epcam*, *Vimentin*, *Mmp3* und *Zeb1* beeinflusst, wurde nachfolgend untersucht.



**Abbildung 43: Relative Quantifizierung einer ektopten *mutp53*-Expression und der Effekt auf die Expression weitere Gene**

Die Genexpression von *mutp53*, *Epcam*, *Vimentin*, *Zeb1* und *Mmp3* wurden mit Hilfe der qPCR untersucht (n=3). A) Darstellung der  $\Delta$ Ct-Werte für die Signifikanzberechnung (t-Test,  $p < 0,05$ ), die sich auf den Leervektor bezieht. Niedrigere  $\Delta$ Ct-Werte bedeuten eine höhere Expression des Gens. Die Expression von *mutp53*, *Epcam*, *Vimentin* und *Mmp3* war signifikant verschieden zu Leervektor transduzierten Zellen, wenn die Zellen *mutp53* überexprimierten. B) Darstellung der RQ-Werte: die ektope Überexpression von *mutp53* führte zu Hochregulation von *Vimentin* und *Mmp3*, während die *Epcam*-Expression in *mutp53*-überexprimierenden Zellen reduziert war. Die *Zeb1*-Expression wurde durch die *mutp53*-Expression nicht beeinflusst.

Mittels qPCR wurde die Effizienz der *mutp53*-Transduktion überprüft. In den überexprimierenden Zellen ist *mutp53* ca. 25-fach stärker transkribiert. Die Expression von *mutp53* führte zur drastischen Reduktion der *Epcam*-Expression (*mutp53*<sup>R245W</sup>: 100-fach, *mutp53*<sup>R270H</sup>: 500-fach), gleichzeitig war die Expression des mesenchymalen Markers *Vimentin* erhöht. Beide p53-Mutationen führten zu einem ~2,5-fachen Anstieg der *Vimentin*-Expression. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob *mutp53* EMT-assoziierte Gene reguliert. Dazu wurde die Expression von *Mmp3* und *Zeb1* untersucht: während eine nicht-signifikante Tendenz für eine verstärkte *Zeb1*-Expression in Zellen, die zusätzlich *mutp53* exprimierten, beobachtet werden konnte, wurde für *Mmp3* ein deutlicher Anstieg der Expression gemessen, wobei die Werte stark schwankten (3-fach bis 217-fach).



**Abbildung 44: *Mutp53*-Expression in G-2 Zellen und seine Wirkung auf den Epcam-Spiegel**

G-2 Zellen wurden mit *mutp53*<sup>R245W</sup> oder *mutp53*<sup>R270H</sup> (LeGO-iG2) transduziert und die Anzahl der Epcam-positiven Zellen in der GFP-exprimierenden Zellfraktion mittels FACS analysiert. Es wird deutlich, dass die zusätzliche Expression von *mutp53* zum Verlust von Epcam führt.

Es wurde der Effekt der *mutp53*-Expression zusätzlich auf den Proteinlevel von Epcam mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 44). Circa 20% der Zellen, die mit dem LeGO-iG2-Leervektor transduziert wurden, tragen das Epcam-Molekül auf der Zelloberfläche. Die ektope Expression von *mutp53* führte zu einer starken Reduktion der Epcam-positiven Zellanzahl. In Zellen, die *mutp53*<sup>R270H</sup> exprimieren, wurde Epcam nur von 2,6% der Zellen exprimiert und in Zellen mit *mutp53*<sup>R245W</sup> waren nur noch knapp 8% Epcam-positiv. Dies entspricht einer 13-fachen bzw. einer fast 4-fachen Reduktion der Zellen, die den Epithelialmarker exprimierten.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die Expression von *mutp53* (R245W und R270H) in G-2 Zellen zum Verlust der *Epcam*-Transkription und zur reduzierten Anzahl von Epcam-positiven Zellen führt. Zusätzlich wurde eine erhöhte Expression des Mesenchymalmarkers *Vimentin* und des EMT-assoziierten Gens *Mmp3* in der qPCR nachgewiesen. *Zeb1* war hingegen in *mutp53*-exprimierenden Zellen nur tendenziell reguliert. Die Ergebnisse korrelieren mit der mehr mesenchymalen Morphologie der Zellen nach *mutp53*-Transduktion. Diese Experimente liefern deutliche Hinweise auf eine Beteiligung von *mutp53* am EMT-Prozess.

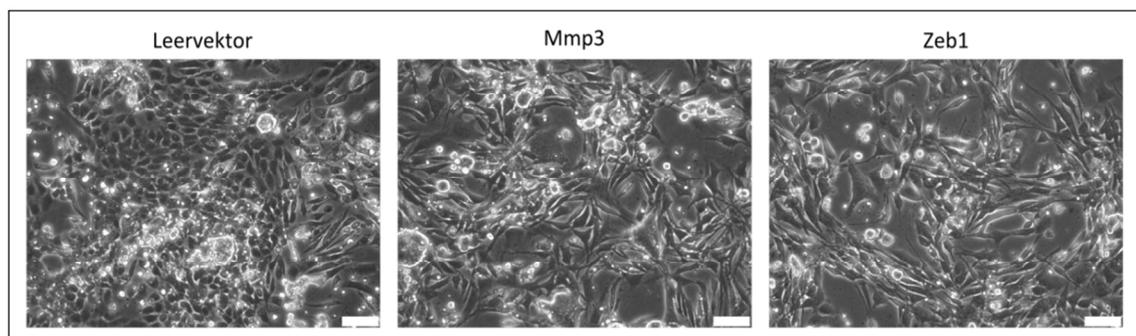
### 5.3.3. Überexpression von EMT-relevanten Genen (*Zeb1/Mmp3*) in H8N8

#### Zellen

Als nächstes wurde der Einfluss einzelner Gene der EMT-Signatur in den Tumorzellsystemen untersucht, ob diese Gene für die erhöhte Metastasierungsrate in den W10-NP8 Tumoren verantwortlich sein könnten. Der Fokus wurde auf *Zeb1*, als Induktor der EMT bekannt, und auf *Mmp3*, welches eine Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix spielt und ebenfalls EMT durch Freisetzung von  $\beta$ -Catenin auslösen kann, gelegt.

Die Produktion lentiviraler Partikel erfolgte in 293T Zellen, die neben dem LeGO-iG2-Plasmid mit den zu untersuchenden Genen zusätzlich mit Helferplasmiden ko-transfiziert wurden. Als Kontrolle wurde erneut der LeGO-iG2-Leervektor verwendet. Anschließend wurden H8N8 Zellen mit den Viren mehrmals infiziert und die GFP-positiven Zellen über FACS (mindestens 2x) angereichert.

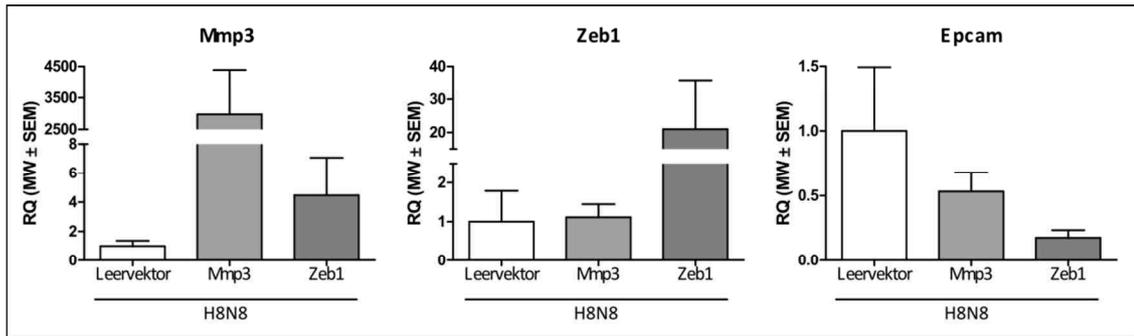
Die ektope Expression von *Zeb1* und *Mmp3* führte zu morphologischen Veränderungen der H8N8 Zellen (Abbildung 45). Während die Kontrollzellen, die mit dem LeGO-iG2-Leervektor transduziert waren, die typische Morphologie von H8N8 Zellen aufwiesen, also sich in vielen epithelialen Inseln gruppieren, aber auch einige mesenchymale Zellen vorhanden waren, war in den *Mmp3*- und *Zeb1*-überexprimierenden Zellen eine deutliche Verschiebung in Richtung mesenchymaler Morphologie zu beobachten. Hier wiesen die meisten Zellen nun eine langgestreckte, Fibroblasten-ähnliche Zellform auf.



**Abbildung 45: Einfluss der *Zeb1*- und *Mmp3*-Expression auf die Morphologie der H8N8 Zellen**

Die ektope Überexpression von *Mmp3* und *Zeb1* in den H8N8 Zellen führte zu einer veränderten Zellmorphologie. Die Zellen mit dem Leervektor zeigten eher eine epitheliale Morphologie, während die *Mmp3*- und *Zeb1*-überexprimierenden Zellen eher länglicher und mesenchymaler erschienen (Maßstab: 75  $\mu$ m).

Als nächstes wurde überprüft, ob die Transkription von *Zeb1* und *Mmp3* in der qPCR bestätigt werden kann und ob sie einen Einfluss auf die Expression des Epithelialmarkers *Epcam* haben. Dazu wurden vier verschiedene Passagen der modifizierten Zellen geerntet, RNA isoliert und cDNA hergestellt, die dann für qPCR-Analysen verwendet wurde.

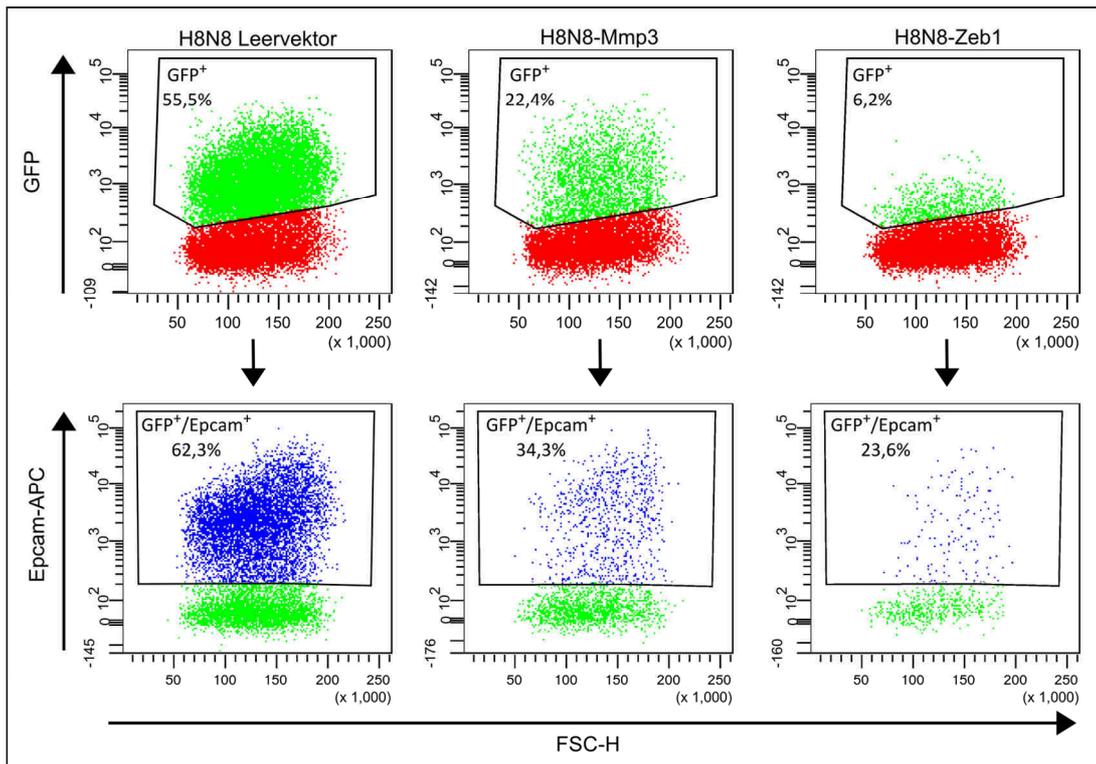


**Abbildung 46: Expression der Transgene *Mmp3* und *Zeb1* in H8N8 Zellen und deren Einfluss auf die *Epcam*-Expression**

H8N8 Zellen wurden mit lentiviralem Vektor (Leervektor, Zeb1 bzw. *Mmp3*) infiziert und anschließend wurden vier verschiedene Passagen bezüglich der Transgenexpression analysiert und zusammengefasst: in den *Mmp3*-überexprimierenden Zellen wurde eine 2500x gesteigerte Expression von *Mmp3* detektiert. *Zeb1*-überexprimierende Zellen wiesen eine ca. 20-fach stärkere Expression des Gens auf. Die Transgenexpressionen von *Zeb1* und *Mmp3* führten zur Reduktion der *Epcam*-Expression.

Zuerst wurden die Zellen auf ihre Transgenexpression untersucht: *Mmp3*-überexprimierende H8N8 Zellen zeigten eine 2500-fache Erhöhung in der Expression des *Mmp3*-Gens und *Zeb1*-überexprimierende Zellen hatten eine 20-fach höhere Expression des *Zeb1*-Gens im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression der Transgene bewirkte einen deutlichen Effekt auf die Expression des epithelialen Markers *Epcam*: in *Mmp3*-infizierten Zellen war die *Epcam*-Expression durchschnittlich 2-fach reduziert, wohingegen die *Zeb1*-Expression mit einer knapp 6-fachen Reduktion der *Epcam*-Expression korrelierte. Offenbar führt die Überexpression der Transgene in den H8N8 Zellen zu einer Verschiebung des Phänotyps, sie entfernen sich von einer epithelialen Morphologie und verlieren die *Epcam*-Expression. Interessant zu beobachten war, dass *Zeb1*-Überexpression in den Zellen zu einem ca. 4-fachen Anstieg der *Mmp3*-Expression führte. *Zeb1* als Transkriptionsfaktor induziert EMT und als nachfolgendes Zielgen wird *Mmp3*-Expression u.a. zur Degradation von ECM-Proteinen aktiviert (Blavier et al., 2010).

Der Effekt der ektopen Überexpression von *Mmp3* und *Zeb1* auf die Anzahl der *Epcam*-positiven Zellen wurde mittels FACS untersucht. Dazu wurden die GFP-positiven Zellen auf ihre Expression von *Epcam* analysiert. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl *Mmp3*- als auch *Zeb1*-Expression zu einer 2-fachen Reduktion der *Epcam*-positiven Zellpopulation führt. Dies entspricht dem gleichen Verhältnis, welches via qPCR ermittelt wurde.



**Abbildung 47: Ektope Expression der EMT-assoziierten Gene *Mmp3* und *Zeb1* in H8N8 Zellen und deren Effekt auf den Epcam-Proteinspiegel**

H8N8 Zellen wurden mit *Mmp3*- bzw. *Zeb1*-cDNA (LeGO-iG2) transduziert und der Epcam-Level der GFP-positiven Zellen via FACS analysiert. Es wurde eine 2-fache Reduktion der Epcam-Expression in Zellen beobachtet, die zusätzlich *Mmp3* oder *Zeb1* exprimierten.

Auch die Überexpression der EMT-assoziierten Gene *Zeb1* und *Mmp3* wirkt sich auf den Phänotyp in den H8N8 Zellen aus: sie entwickelten eine eher mesenchymale Morphologie und reduzierten die Epcam-Expression auf RNA- und Proteinebene. Dies spricht für eine Aktivierung eines EMT-Ereignisses in den Zellen.

#### 5.4. Relevanz *in vivo*

*Zeb1* und *Mmp3* sind mit dem Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition assoziiert und mit einem erhöhten mesenchymalen Phänotyp sowie mit der Verringerung des Epcam-Proteinlevels *in vitro* verknüpft. Um den Einfluss der Überexpression dieser Gene auf Tumorgenese, Disseminierung und Metastasierung *in vivo* zu untersuchen, wurden Transplantationsexperimente durchgeführt und verschiedene Organe auf disseminierte Tumorzellen untersucht.

### 5.4.1. Transplantation von *Zeb1*-/*Mmp3*-überexprimierenden H8N8 Zellen in NP8 Mäuse

Für die Analyse der transduzierten Zellen *in vivo* wurden  $10^3$  Zellen (H8N8-Leervektor, H8N8-Mmp3, H8N8-Zeb1) in das Mammagewebe #3 von jungfräulichen NP8 Mäusen transplantiert und die Tiere bei Erreichen des Präparationskriteriums (Tumorgroße  $\leq 1,5$  cm) getötet. Zusätzlich zum Tumor wurden mehrere Organe (Mammagewebe #2 und #7, Milz, Leber, Lunge, Gehirn, Blut, Knochenmark rechts und links) für DNA-Isolierung entnommen, ebenso wie in 5.2.4.2. Auf DNA-Ebene unterscheiden sich die H8N8 Zellen von denen der NP8 Mäuse durch das Vorhandensein des *mutp53*-Transgens. Dies kann eindeutig über den HA-Tag des *mutp53* vom endogenen *wtp53* unterschieden und spezifisch detektiert werden, so dass es sich als Marker für gestreute Zellen eignet. Es wurden insgesamt 15 Tiere untersucht.

**Tabelle 16: Wachstumsdauer der transplantierten H8N8 Zellen in NP8 Mäusen**

	Zeitraum von Transplantation bis zur Präparation (Tage $\pm$ SEM)		
	Beginn Tumorwachstum	Präparation	Wachstumsdauer
H8N8-Leervektor (n=5)	14,2 $\pm$ 0,735	29,2 $\pm$ 0,735	15,0
H8N8-Zeb1 (n=5)	13,6 $\pm$ 0,98	28,6 $\pm$ 0,6	15,0
H8N8-Mmp3 (n=5)	12,2 $\pm$ 0,735	33,2 $\pm$ 1,319	21,0

Das Tumorwachstum begann in allen drei Gruppen ca. 13 Tage nach Transplantation. Es gab nur geringfügige Unterschiede in der Wachstumsdauer der Tumore: Mäuse, die mit H8N8-Leervektor bzw. mit H8N8-Zeb1 transplantiert wurden, erreichten ein moribundes Stadium nach weiteren 15 Tagen, während Tumore, hervorgegangen aus H8N8-Mmp3, erst nach 21 Tagen so groß waren, dass die Präparationskriterien erfüllt waren. So ist anzunehmen, dass die Überexpression von *Zeb1* und *Mmp3* keinen Einfluss auf die Tumorinitiation hat. Bezüglich der Wachstumsdauer bzw. der Wachstumsgeschwindigkeit zeigten die Tumore aus H8N8-Mmp3 transplantierten Zellen ein etwas verzögertes Bild, welches sich nicht signifikant (Studentischer t-Test) zur Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore aus H8N8-Leervektor unterscheidet.

### 5.4.2. Disseminierung der Zellen in entfernte Organe

Die Disseminierung von modifizierten Zellen wurden mit Hilfe der PCR untersucht. Dazu wurde DNA aus den Geweben mittels Phenol-Chloroform-Fällung isoliert und 200 ng in die PCR eingesetzt. Aus unbekanntem Gründen funktionierte die Aktin-PCR als DNA-Ladekontrolle nicht, so dass auf ein anderes Gen (*Notch4*) zurückgegriffen wurde. *Notch4* konnte in allen

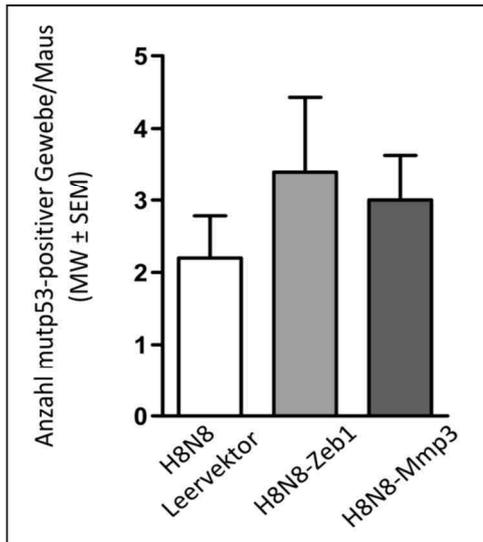
untersuchten Organen der Mäuse detektiert werden. Die PCR zur Detektion von *mutp53* über den HA-Tag wurde dreimal wiederholt und die Anzahl der positiven Organe, in denen *mutp53*-tragende Zellen detektiert wurden, ermittelt und mit Hilfe der GraphPad Prism Software analysiert.

**Tabelle 17: Ergebnisse der *mutp53*-PCRs für disseminierte Tumorzellen**

*mutp53*-PCR in 3-facher Wiederholung, ein Organ wurde als positiv (+) gewertet, wenn in 2 PCRs eine Bande nachgewiesen werden konnte (MG – Mammagewebe, KM – Knochenmark)

H8N8	Histo-Nr.	MG #2	Tumor (MG #3)	MG #7	Leber	Milz	Lunge	Gehirn	Blut	KM rechts	KM links
Leervektor	14236	+	+		+						
	14237		+					+			
	14238		+						+		
	14245		+	+	+	+		+			
	14246	+	+	+						+	
Zeb1	14239		+	+							
	14240	+	+	+				+	+	+	+
	14241	+	+	+			+			+	+
	14247		+	+	+	+	+				
	14248		+					+			
Mmp3	14242	+	+	+	+		+				
	14243	+	+	+							
	14244	+	+	+				+	+	+	
	14249		+	+			+				
	14250		+	+		+					

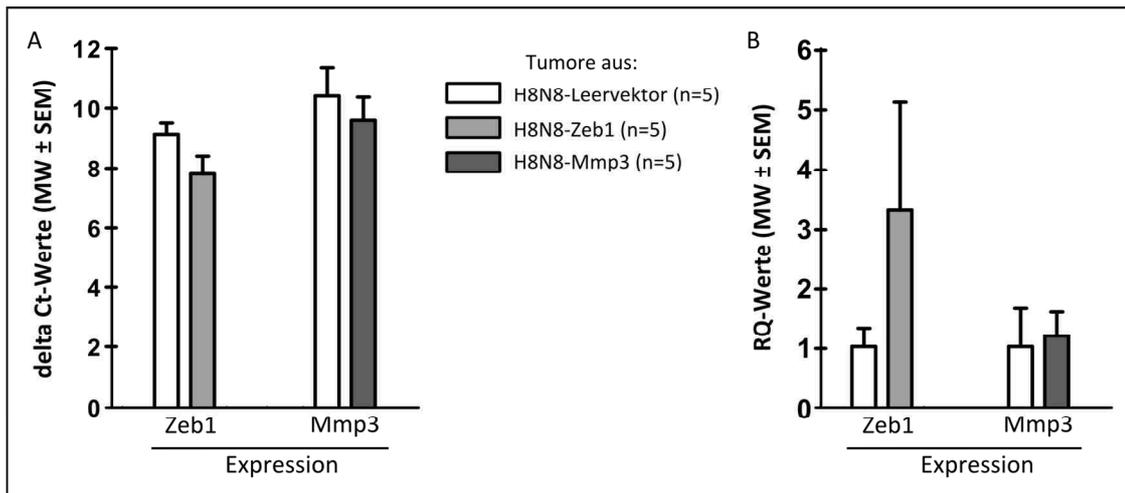
In der Tabelle 17 sind die Ergebnisse der *mutp53*-PCRs dargestellt. Ein (+) symbolisiert ein Organ, in dem *mutp53*-tragende Zellen in mindestens 2 PCRs detektiert wurden. Es wurde überprüft, ob die Überexpression von Zeb1 und Mmp3 die Prävalenz für bestimmte Organe beeinflusst. Leber und Milz wurden von H8N8-Zeb1 und H8N8-Mmp3 nur selten besiedelt (Zeb1: jeweils ein Tier, Mmp3: Leber 2 Tiere, Milz 1 Tier). Auffallend häufig konnten disseminierte Tumorzellen in dem Mammagewebe #7 nachgewiesen werden, besonders bei Tumoren, die aus H8N8-Zeb1 (80%, 4 von 5 Tieren) und H8N8-Mmp3 (100%, 5 von 5 Tieren) entstanden sind. In der Kontrollgruppe wurde nur in 40% der Fälle (2 von 5 Tieren) H8N8 Zellen in dem Mammagewebe nachgewiesen. Dies ist umso interessanter, als das Mammagewebe #7 am weitesten vom Tumor entfernt ist. So korreliert die erhöhte Migration bzw. das Besiedeln weit entfernter Organe mit der *Zeb1*- bzw. *Mmp3*-Expression in den Tumorzellen.



**Abbildung 48: Auswirkung der Überexpression von *Zeb1* und *Mmp3* auf die Disseminierungseigenschaft der H8N8 Zellen**

In dem Graphen ist die durchschnittliche Anzahl der Organe gezeigt, in denen disseminierte Tumorzellen nachgewiesen wurden. Die Überexpression von *Zeb1* und *Mmp3* führte nur zu einer nicht-signifikanten Erhöhung der Fähigkeit zur Disseminierung. Bei Mäusen, denen Kontrollzellen transplantiert wurden, wurden in 2,2 Organen H8N8 Zellen detektiert, während bei mit H8N8-Zeb1 bzw. H8N8-Mmp3 transplantierten Mäusen durchschnittlich in 3,4 bzw. 3,0 Geweben H8N8 Zellen nachgewiesen wurden.

In Abbildung 48 wurden die Ergebnisse der PCRs zusammengefasst und die Mittelwerte dargestellt. So wurde in der Kontrollgruppe (H8N8-Leervektor) in durchschnittlich 2,2 Organen pro Maus H8N8 Zellen nachgewiesen. Die ektope Expression von *Zeb1* und *Mmp3* führte zu einem nicht-signifikanten Anstieg der betroffenen Gewebeanzahl: in 3,4 bzw. 3,0 Geweben konnten *mutp53*-tragende H8N8 Zellen detektiert werden. Ein aussagekräftigeres Ergebnis für dieses Experiment könnte wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Tierzahl pro Gruppe erhalten werden. Möglich ist auch, dass die Expression der Transgene nach Transplantation in Empfängertiere aus nicht bekannten Gründen reduziert wird. Dies könnte eine Reduktion der erwarteten Disseminierungs- und/oder Metastasierungsbegünstigung verursachen. Um zu überprüfen, ob die Expression von *Zeb1* und *Mmp3* in den Tumorzellen ausgeschaltet wurde, wurde die Transgenexpression in den Tumoren überprüft. RNA wurde mit Hilfe von Trifast aus Gewebe isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der qPCR relativ quantifiziert.



**Abbildung 49: *Zeb-1* und *Mmp3*-Expression in transplantierten NP8 Tumoren mittels qPCR**

Modifizierte H8N8 Zellen (Überexpression von *Zeb1* und *Mmp3*) wurden in NP8 Mäuse transplantiert und die Tumore auf die Transgenexpression hin untersucht. A) Dargestellt ist der Mittelwert der  $\Delta Ct$ -Werte einer Gruppe: die Expression beider Transgene unterscheidet sich nicht signifikant zu der Expression der Gene in Tumorzellen, die aus H8N8 mit Leervektor entstanden sind (t-Test). B) Darstellung der RQ-Werte: bei Tumoren aus H8N8-Zeb1 scheint ein Unterschied vorhanden zu sein, dieser begründet sich nur auf die starke Expression von *Zeb1* in zwei Proben (2-fach und 10-fach). Bezüglich der *Mmp3*-Expression gibt es innerhalb der Gruppe ebenfalls Schwankungen, die aber nicht so stark ausfallen.

Zuerst wurden die Signifikanzen der Genexpression zwischen den Gruppen anhand der  $\Delta Ct$ -Werte bestimmt. Hierfür erfolgte die Normierung auf zwei Haushaltsgene (*Gapdh* und *Hsc70*). Anhand der t-Test-Berechnung konnten keine Signifikanzen zwischen Tumoren, die aus H8N8-Leervektor oder aus H8N8-Zeb1 bzw. H8N8-Mmp3 entstanden sind, ermittelt werden (Abbildung 49A). Die Tendenz einer stärkeren Expression für beide Transgene ist aber zu beobachten. Bei Tumoren aus H8N8-Zeb1 exprimieren nur noch zwei Tumore *Zeb1* unterschiedlich zu H8N8-Leervektor: ein Tumor wies eine 2-fach und ein weiterer eine 10-fach höhere *Zeb1*-Expression auf. Dies führt bei der Darstellung der RQ-Werte zu einem deutlichen Unterschied. Für eine *Mmp3*-Expression konnte ebenfalls keine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen bestätigt werden. Auch in dieser Gruppe schwanken die RQ-Werte enorm: so weist nur noch ein Tumor eine 2-fach höhere *Mmp3*-Expression im Vergleich zu den Tumoren aus H8N8-Leervektor, wohingegen zwei Tumore sogar eine 5-fach geringere Expression für *Mmp3* zeigen.

In diesen Experimenten wurde der Einfluss von *Zeb1* und *Mmp3* auf ihre Fähigkeit zu disseminieren untersucht. H8N8 Zellen, die die Transgene überexprimieren, wurden in NP8 Mäuse transplantiert. Sämtliche Tumore wuchsen zeitgleich. Bei der Untersuchung der Organe nach disseminierten Tumorzellen wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Dennoch konnte die Tendenz für eine erhöhte Disseminierung für Zellen aus *Zeb1*- und *Mmp3*-überexprimierende Tumoren festgestellt werden. Möglicherweise würde eine

Erhöhung der Fallzahl zu einem eindeutigeren Ergebnis führen. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von qPCR-Analysen die Transgenexpression in den Tumoren untersucht und beobachtet, dass die ursprüngliche Überexpression von *Zeb1* und *Mmp3* in den Tumorzellen nicht mehr gegeben ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Expression im Tumor abgeschaltet wird. Dass dennoch eine tendenziell erhöhte Disseminierung beobachtet wurde, könnte mit einem späten Abschalten der Transgenexpression in den Tumorzellen zusammenhängen, so dass die Disseminierung der Zellen womöglich zu einem frühen Zeitpunkt während der Tumorgenese stattfand. Eine weitere Ursache für das Abschalten der Transgenexpression könnte auf eine erneute Phänotyp-Änderung der eher mesenchymalen, Transgen-exprimierenden Zellen zurück zu epithelialen Zellen mit abgeschalteter Transgenexpression im Tumors zurückzuführen sein.

## **5.5. Potentielle Mechanismen der EMT-Regulation durch mutp53 im WAP-T Mausmodell**

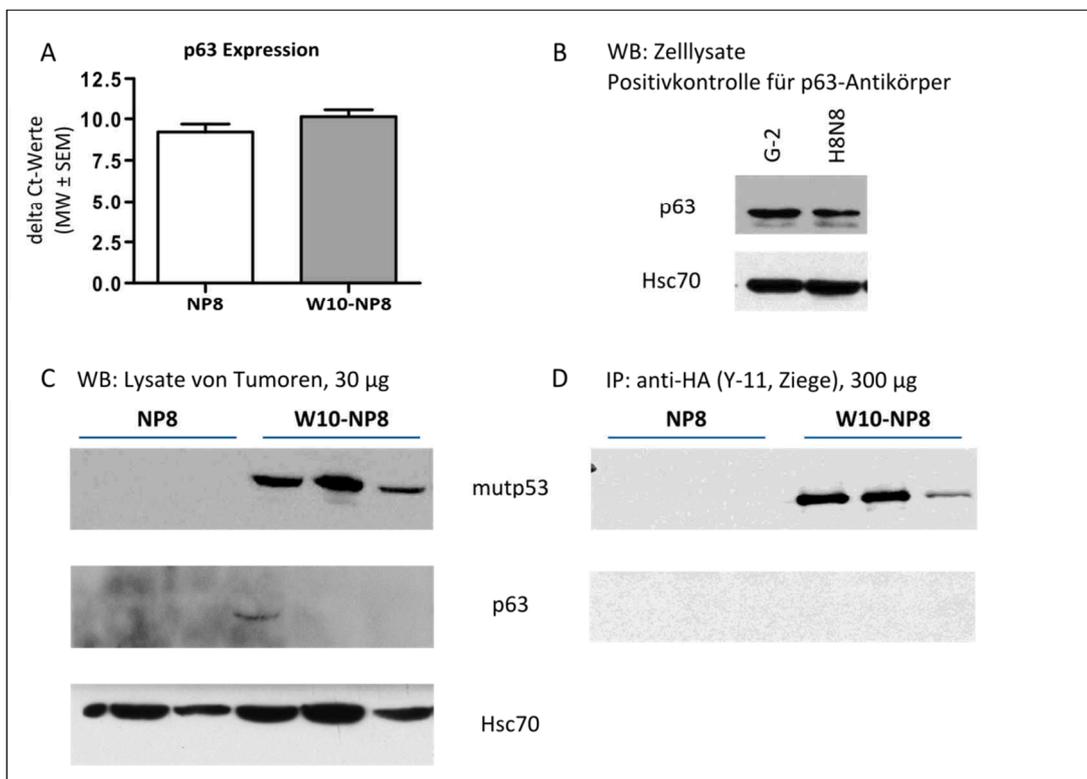
### **5.5.1. Überprüfung der Wechselwirkung von mutp53 (R245W und R270H) und dem Tumorsuppressor p63**

Ein möglicher Mechanismus für den mutp53-vermittelten GoF ist die Interaktion von mutp53 mit p63. Hierbei führt die direkte oder auch über Smad-Proteine vermittelte Bindung beider Proteine zur Inhibition von p63 und dessen Tumor-suppressiven Funktionen (Adorno et al., 2009; Muller et al., 2009; Melino, 2011).

Trp63 gehört zur p53-Familie. Neben seinen Funktionen in der Entwicklung von Haut und Skelett kann p63 auch als Tumor- und Metastasierungssuppressor fungieren (Melino, 2011; Muller et al., 2011). Für das Protein wurden zwei Isoformen beschrieben, die unterschiedliche Funktionen ausüben: die TAp63-Isoform ist die vollständige Variante von p63 und enthält eine Transaktivierungsdomäne, welche bei der  $\Delta$ Np63-Isoform fehlt. So kann TAp63 den epithelialen Phänotyp von Zellen durch Regulation von Mikro-RNAs aufrechterhalten, eine transkriptionelle Regulation des Zellzyklus ausüben und Apoptose bzw. Seneszenz induzieren (Gressner et al., 2005; Guo et al., 2009; Melino, 2011).  $\Delta$ Np63 übt neben der eigentlichen Hauptfunktion in der Epidermis während der embryonalen Entwicklung mitunter auch gegensätzliche Funktionen zu TAp63 aus, indem es dessen transkriptionelle Aktivität inhibiert (Melino, 2011). In Tumoren wurden beide Isoformen auf Transkriptebeine gefunden, aber auf Proteinebene dominiert  $\Delta$ Np63 (Sniezek et al., 2004; DeYoung et al., 2006). Weiterhin wurde gezeigt, dass  $\Delta$ Np63 sowohl TAp63 als auch wtp53 in dominant-negativer Weise inhibieren kann (Yang et al., 1998). Mutp53 (z.B. im Humansystem R175H, R273H) ist in der Lage,

physisch mit p63 zu interagieren und dadurch dessen Suppressorfunktionen zu hemmen. Über phosphoryliertes Smad2 kommt es zur Bildung von ternären Komplexen mit p63 und mutp53, wodurch die Expression von p63-Zielgenen (z.B. DICER, miR-130B, SHARP1) unterdrückt wird, von denen bekannt ist, dass sie in der Hemmung der Metastasierung involviert sind (Adorno et al., 2009). Eine direkte Interaktion von mutp53 mit p63 fördert Endozytose von Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , was zur Aktivierung des Akt-Signalwegs führt und dadurch Migration und Invasion von Zellen fördert (Muller et al., 2009).

Um ein mögliches Zusammenspiel von mutp53 mit p63 in den WAP-T Mammakarzinomen zu untersuchen, wurde zuerst der p63-Level in den Tumoren bestimmt und mittels Immunopräzipitation (IP) eine etwaige Komplexbildung beider Proteine überprüft.



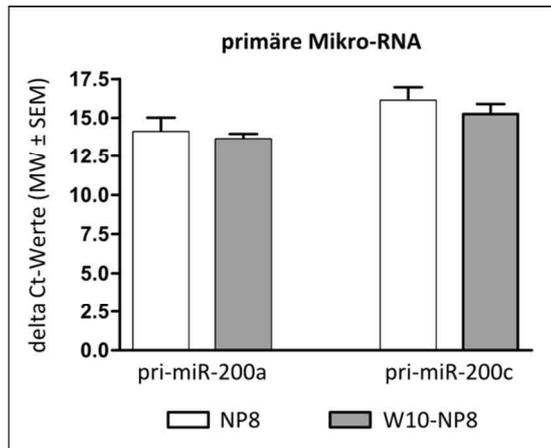
**Abbildung 50: p63-Level in NP8 und W10-NP8 Tumoren sowie das Ergebnis der Immunopräzipitation**

A) Es wurde der Transkriptlevel von p63 in je sechs NP8 und W10-NP8 Tumoren bestimmt, die auch für die Genexpressionsanalyse eingesetzt wurden. p63 wurde sowohl in NP8 als auch in W10-NP8 Tumoren in etwa auf gleichem Level exprimiert. Die Normalisierung erfolgte auf fünf verschiedene HKGs. B) G-2 und H8N8 Zelllysate dienten als Positivkontrolle des p63-Antikörpers. Die obere Bande entspricht TA-p63, die untere Bande ist  $\Delta Np63$ . C) Von jeweils drei NP8 und drei W10-NP8 Tumoren wurde der Proteinlevel von p63 bestimmt: im Western Blot sind keine eindeutigen Banden in den Proben erkennbar. Als zusätzliche interne Kontrolle wurde mutp53, welches nur in den bitransgenen Tumoren exprimiert wird, über den HA-Tag detektiert. D) Eine Immunopräzipitation wurde mit anti-HA-Antikörper durchgeführt, um eine potentielle Anreicherung geringer Mengen von p63 über Bindung an mutp53 zu überprüfen. Mutp53 ist im Präzipitat wie erwartet detektierbar, p63 konnte aber nicht nachgewiesen werden.

NP8 und W10-NP8 Tumorproben, die auch für die Genexpressionsanalyse verwendet wurden, wurden mit Hilfe von qPCR auf ihren p63-mRNA-Level untersucht. Die Ct-Werte wurden auf fünf HKGs (*β-Aktin*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP1* und *18sRNA*) normiert. In beiden Gruppen konnte eine schwache p63-Transkription auf etwa gleichem Niveau (Ct-Werte zwischen 28 und 30) nachgewiesen werden. Von jeweils drei Tumoren wurde der Proteinlevel für p63 analysiert. Hier konnten keine spezifischen Banden für p63 detektiert werden. Da eine Interaktion von mutp53 und p63 aus der Literatur bekannt ist, wurde versucht, p63 über eine IP gegen den HA-Tag des mutp53 anzureichern. Dazu wurden 300 µg Proteinlysate aus verschiedenen Tumoren eingesetzt, um zu versuchen, p63 anzureichern. Wie in Abbildung 50C zu sehen ist, konnte in dem Präzipitat mutp53 (als Positivkontrolle), aber keine Anreicherung von p63 detektiert werden. Diese ersten Experimente lieferten einen starken Hinweis darauf, dass mutp53 im WAP-T Mausmodell nicht mit p63 interagiert und dass für den Phänotyp der W10-NP8 Mäuse ein anderer Mechanismus zugrunde liegen muss.

Um die Beteiligung von p63 im mutp53-vermittelten GoF aber sicher ausschließen zu können, wurde die in der Literatur beschriebene Regulation von p63-regulierten Zielgenen überprüft. Basierend auf der Veröffentlichung von Knouf und Kollegen, in der gezeigt wurde, dass sowohl p73 als auch p63 die Transkription der miR-200 Mikro-RNA-Familie aktiviert (Knouf et al., 2012), wurde die Expression der miR-200 Familie analysiert. Die miR-200 Familie ist in zwei Clustern organisiert: auf Chromosom 3 sind miR-200b, miR-200a und miR-429 lokalisiert, auf Chromosom 12 sind miR-200c und miR-141 als ein Transkript organisiert. Die miR-200 Familie wird hauptsächlich in epithelialen Zellen exprimiert und reprimiert post-transkriptionell die Expression der EMT-Induktoren Zeb1 und Zeb2, wodurch der epitheliale Phänotyp der Zellen aufrechterhalten wird (Christoffersen et al., 2007; Gregory et al., 2008). Die Zeb-Faktoren wiederum können die Transkription der Mikro-RNAs hemmen und somit die epithelial-mesenchymale Transition initiieren, beide Gruppen können sich über einen doppelt-negativen *Feedback-Loop* selbst regulieren (Bracken et al., 2008; Burk et al., 2008). Da in bitransgenen Tieren die *Zeb1*-Expression erhöht ist, bestand die Annahme, dass dieser *Feedback-Loop* gestört ist, und es infolge dessen zu einer Reprimierung der miR-200 Familie kommen könnte. Für die Analyse wurden die auch in der Genexpressionsanalyse verwendeten RNA-Proben (6 NP8, 6 W10-NP8) verwendet. Für die Mikroarray-basierte Analyse wurden die Proben über Säulen (RNeasy MinElute™ Cleanup, Qiagen) aufgereinigt. Mit Hilfe solcher Säulen werden große Fragmente (>200 Nukleotide) angereichert, während kleinere Fragmente, vornehmlich Degradationsprodukte, verloren gehen. Dies reduziert bei Mikroarray-Analysen Hintergrundsignale, verhindert aber dadurch auch die direkte Quantifizierung der in der Regel

22 Nukleotide langen Mikro-RNAs. Aus diesem Grund wurden Primer designt, die an dem jeweiligen primären Mikro-RNA-Transkript der beiden Cluster binden, wodurch aber nur eine indirekte Erfassung der Mikro-RNA-Expression möglich ist. Für die quantitative Analyse wurden die Ct-Werte der Proben auf fünf HKGs normalisiert und die  $\Delta$ Ct-Werte der NP8 Tumore mit denen der W10-NP8 Tumore verglichen.



**Abbildung 51: Quantifizierung der primären Mikro-RNAs in NP8 und W10-NP8 Tumoren**

Für die Transkripte beider Cluster konnte kein Unterschied in der Expression in beiden Gruppen nachgewiesen werden.

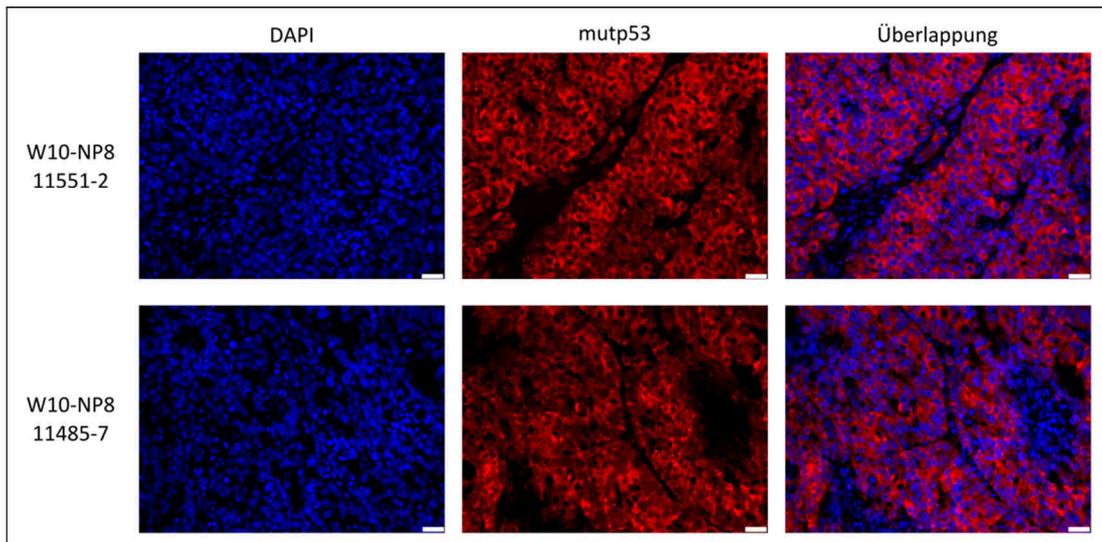
Die Quantifizierung der primären Mikro-RNAs offenbarte keine differenziellen Expressionen beider miR-Cluster, so dass man davon ausgehen kann, dass eine p63-vermittelte Regulation der miR-200 Familie keine Rolle bei der verstärkten Metastasierung in den mutp53<sup>R254W</sup>-exprimierenden WAP-T Tumoren spielt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass nur primäre und nicht reife Mikro-RNAs analysiert wurden. So besteht immer noch die Möglichkeit, dass eine unterschiedliche Expression der primären Mikro-RNAs nicht ermittelt werden konnte, da diese nach Transkription zügig prozessiert werden.

Die Annahme, dass mutp53 im WAP-T Mausmodell p63 reguliert und dabei dessen Tumorsuppressorfunktion außer Kraft setzt, konnte somit nicht bestätigt werden. In unserem Modell ist p63 auf transkriptioneller Ebene detektierbar, allerdings nur in geringen Mengen, wohingegen das p63-Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Potentiell geringe Mengen von p63, die ggf. an mutp53 binden könnten, konnten auch mit Hilfe einer mutp53-Immunopräzipitation nicht angereichert werden. Dies wurde zusätzlich bestätigt, indem p63-regulierte Signalwege wie z.B. die miR-200 Familie untersucht wurden, die aber keine unterschiedliche Regulation aufwiesen. Offenbar spielt p63 und die Regulation der miR-200 Familie keine Rolle für den aggressiveren Phänotyp der W10-NP8 Mäuse. Aus diesem Grund wurde nach weiteren möglichen mutp53-vermittelten Mechanismen gesucht.

### 5.5.2. Effekt der mutp53-Expression auf die Lokalisation des Glucocorticoid-rezeptors

Die grundlegende Funktion von wtp53 als Transkriptionsfaktor erfolgt nach Aktivierung und Akkumulation des Proteins im Zellkern, so dass die Expression von Zielgenen durch Bindung an den Promotor reguliert werden kann (Shaulsky et al., 1991b; Römer et al., 2006; Vousden and Prives, 2009). Auch für die transformierenden Eigenschaften von mutp53 wird hauptsächlich eine transkriptionelle Regulation von onkogen wirkenden Genen postuliert, was im Einklang zu der überwiegend nukleären Lokalisation von mutp53 in malignen Läsionen steht (Rotter et al., 1983; Iggo et al., 1990; Shaulsky et al., 1990; Soussi and Bérout, 2001). Darüber hinaus wurde aber auch eine zytoplasmatische Lokalisation von mutp53 in Abhängigkeit von p53-Mutationen, Stresssignalen oder auch zellulären Kontexten beobachtet (Rotter et al., 1983; Lukashchuk and Vousden, 2007). Für den mutp53-vermittelten GoF sind Einflüsse auf die Transkription und Protein-Protein-Interaktionen beschrieben, die vornehmlich im Zellkern stattfinden (Brosh and Rotter, 2009). Für zytoplasmatisches mutp53 sind bisher kaum Funktionen bekannt: generell liegt die Vermutung nahe, dass mutp53, ebenso wie wtp53, im Zytoplasma inaktiv vorliegt, da es seine Rolle als Transkriptionsfaktor nicht mehr ausüben kann. Erst vor wenigen Jahren wurde entdeckt, dass zytoplasmatisches mutp53 Autophagie (Abbau von zelleigenen Bestandteilen bei Nährstoffmangel) in Krebszellen inhibieren kann (Morselli et al., 2008). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass dies mit einer erhöhten Tumorprogression korreliert (Botti et al., 2006; Maiuri et al., 2009).

Da der mutp53-vermittelte invasive Phänotyp im WAP-T Modell offenbar nicht auf dem herkömmlichen Mechanismus der funktionellen p63-Inhibierung beruht, wurde die Lokalisation von mutp53 in W10-NP8 Tumoren untersucht. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte eine verstärkte Lokalisation von mutp53 im Zytoplasma beobachtet werden, wie in nachfolgender Abbildung exemplarisch dargestellt ist.



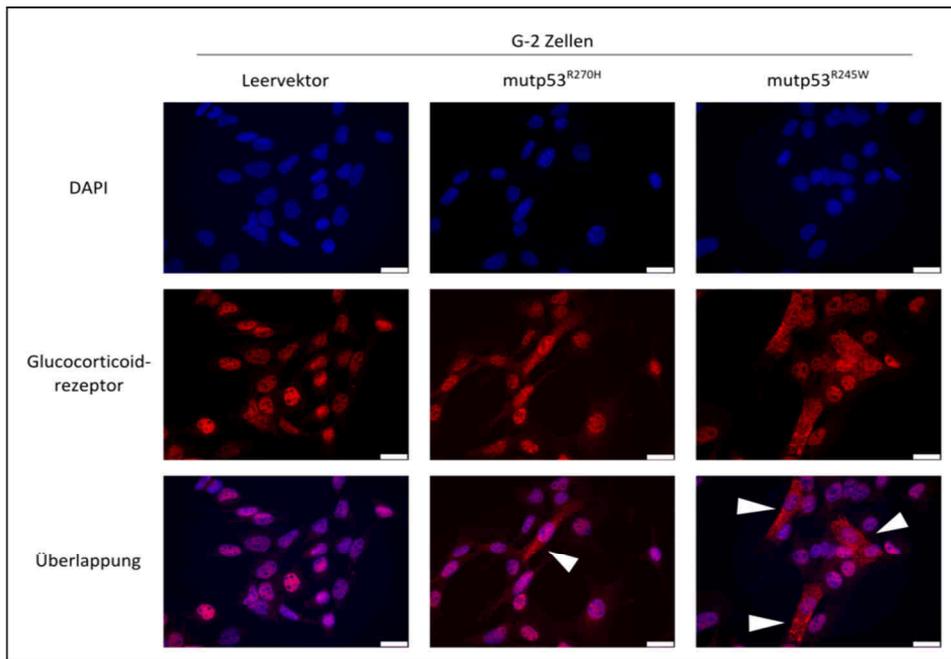
**Abbildung 52: Zytoplasmatische Lokalisation von mutp53 in W10-NP8 Tumoren**

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Lokalisation von mutp53 in W10-NP8 Tumoren untersucht. Dabei wurde eine Anhäufung des mutp53-Proteins im Zytoplasma beobachtet (Maßstab: 25 µm).

In Vorarbeiten unserer Abteilung wurde beobachtet, dass Temperatur-sensitives mutp53 mit dem Glucocorticoidrezeptor (GR) im Zytoplasma interagiert und präzipitiert werden kann (Daten: Dr. W. Bohn, unveröffentlicht).

Der GR gehört zu den nukleären Hormonrezeptoren. Im nicht-aktiven Zustand befindet sich der Rezeptor in einem Multiproteinkomplex mit Hitzeschockproteinen (z.B. Hsp90, Hsp70) und verschiedenen Kinasen des MAPK-Signalwegs wie Src im Zytoplasma (Pratt, 1998), nach Aktivierung durch Hormonbindung transloziert der GR in den Zellkern und reguliert die Transkription von Zielgenen bzw. moduliert die Aktivität weiterer Transkriptionsfaktoren (Hollenberg et al., 1985; Weinberger et al., 1985; Ray et al., 1999). Zusätzlich wurde eine Beeinflussung der Aktivität von Signaltransduktionswegen (z.B. MAPK-, Ras-Raf-Signalweg) durch aktivierte GRs gezeigt (Widén et al., 2000; Kassel et al., 2001; Clark and Lasa, 2003). Die wichtigsten durch GR vermittelten Funktionen sind eine entzündungshemmende und immun-suppressive Wirkung (Herrlich, 2001). Ein weiterer Effekt von GR wird derzeit kontrovers diskutiert: während vor allem in hämatopoetischen Erkrankungen, aber auch bei Prostatakrebs, eine pro-apoptotische Wirkung durch Aktivierung von GRs gezeigt wurde (Frankfurt and Rosen, 2004; Yemelyanov et al., 2006), wurde in anderen Krebserkrankungen z.B. bei Brust- und Eierstockkrebs ein anti-apoptotischer Effekt beobachtet (Rutz and Herr, 2004; Wu et al., 2004; Runnebaum and Brüning, 2005).

Angesicht dieser Eigenschaften könnte die Wechselwirkung von mut53 mit dem GR eine interessante Alternative zu herkömmlichen GoF-Mechanismen darstellen und für den aggressiveren Phänotyp der Tumore verantwortlich sein.



**Abbildung 53: Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors in G-2 Zellen, transduziert mit mutp53**

Es wurde untersucht, ob die Expression von mutp53 zur veränderten Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors führt. In den Kontrollzellen ist der Rezeptor vor allem im Zellkern zu finden, während in Zellen mit mutp53<sup>R270H</sup> wenige Zellen zu beobachten sind, in denen der Rezeptor zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die Expression von mutp53<sup>R245W</sup> scheint den Effekt zu verstärken (Maßstab: 25 µm).

Um potentielle Wechselwirkungen von mutp53 und GR zu untersuchen, wurde der Einfluss einer Expression von mutp53<sup>R245W</sup> oder mutp53<sup>R270H</sup> auf die Lokalisation des GR überprüft. Dazu wurden G-2 Zellen mit ektopter mutp53-Expression verwendet (siehe Kapitel 5.3.2). Es konnte gezeigt werden, dass in G-2 Kontrollzellen der GR hauptsächlich im Kern zu finden ist, so dass man annehmen kann, dass der Rezeptor in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor aktiv ist. In G-2 Zellen, die mit mutp53 transduziert sind, sind darüber hinaus auch Zellen mit einer zytoplasmatischen Lokalisation des Rezeptors zu beobachten, der dann in seiner transkriptionell-inaktiven Form vorliegt. Besonders in Zellen, die mutp53<sup>R245W</sup> exprimieren, ist der Rezeptor vermehrt im Zytoplasma zu finden. Möglicherweise hat die mutp53-Expression einen Effekt auf die Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors und damit auf seine Funktion.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mutp53 in den bitransgenen Tumoren überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist. Die ektope Expression von mutp53 in G-2 Zellen korreliert dabei mit einer vermehrten Translokation des Glucocorticoidrezeptors in das Zytoplasma der Zellen. In Übereinstimmung mit den Phospho-Tyrosin-Profilen und den Daten der Mikroarray-basierten Genexpressionsanalyse, mit deren Hilfe eine differenzielle Regulation verschiedener Signalwege in den Tumoren beobachtet wurde, ist eine Modulation dieser Wege aufgrund einer Interaktion mit dem GR durchaus vorstellbar. Dies würde einen neuen, bisher nicht beschriebenen mutp53-Mechanismus für GoF darstellen.

## 6. Diskussion

Mammakarzinome sind die häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen in den westlichen Ländern. Die Ursachen der Brustkrebsentstehung sind noch nicht im Detail geklärt. Sicher ist jedoch, dass der Entstehung des Tumors genetische Veränderungen vorausgehen, die einzelnen Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen, so dass diese sich ungehindert vermehren können (Hanahan and Weinberg, 2011). Weitere genetische und epigenetische Veränderung sind notwendig, damit es zur Ausbildung eines Karzinoms kommt. Der Primärtumor selbst ist aber nicht für die Letalität ursächlich, sondern die Ausbildung von Metastasen.

In einem Viertel aller Brustkrebskrankungen ist das Tumorsuppressorprotein p53 mutiert (mutp53) und dadurch nicht mehr in der Lage, seine protektiven Funktionen auszuüben (*Loss of function*) (Kato et al., 2003). Die meisten *missense*-Mutationen führen zu einem mutierten p53-Protein, welches vorhandenes Wildtyp-Protein bindet und als Folge auch dessen Funktion beeinträchtigt (Dominant-negativer Effekt) (Milner et al., 1991; Sigal and Rotter, 2000). Seit mehr als 10 Jahren wird für bestimmte p53-Mutationen ein Zugewinn an neuen onkogenen Funktionen postuliert, die eine erhöhte Aggressivität und Metastasierung von Tumorzellen verursachen (Wolf et al., 1984; Shaulsky et al., 1991; Dittmer et al., 1993; Brosh and Rotter, 2009). In humanen Mammakarzinomen korreliert die Expression von mutp53 mit einer schlechteren Prognose für Patienten (Olivier et al., 2006). Dennoch konnte der aggressivere Phänotyp aufgrund von Akkumulationen weiterer genetischer Alterationen, des Vorhandenseins des zweiten wtp53-Allels bzw. einer geringen Fallzahl für einzelne Mutationen nicht eindeutig einem *Gain of function* von mutiertem p53 zugeordnet werden (Olivier et al., 2010; Oren and Rotter, 2010). So wurden gesicherte GoF-Effekte bisher nur in *in vitro* und *in vivo* Modellen gezeigt (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004; Bossi et al., 2006, 2008). Dabei stellen Mausmodelle eine sehr hilfreiche Alternative für die Untersuchung des mutp53-vermittelten Funktionszugewinns dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage eines mutp53-vermittelten GoF in der Mammakarzinogenese mit Hilfe des WAP-T Mausmodells nachgegangen. Hierfür wurden vergleichende Untersuchungen zwischen den monotransgenen WAP-T-NP8 und den bitransgenen Linien WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> und WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R270H</sup> durchgeführt und die onkogenen Funktionszugewinne von mutp53 charakterisiert.

## 6.1. Effekt der mutp53-Expression auf die Malignität der Mammakarzinome im WAP-T Mausmodell

Gentechnisch veränderte Mausmodelle eignen sich zur Identifikation von Tumor-relevanten Genen, die eine Tumor-suppressive oder -fördernde Wirkung aufweisen können und deren Funktion durch Modifikation in diesem Prozess detailliert untersucht werden kann. Für eine präzise Analyse der Fragestellung *in vivo* ist die Wahl eines geeigneten Mausmodells entscheidend. In der Literatur sind aktuell ca. 600 verschiedene Mausmodelle für p53-Aberrationen unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren beschrieben (<http://cancermodels.nci.nih.gov/camod/>), die eine große Anzahl von p53-Varianten (z.B. *Knockout*, *Knockin*, Mutationen oder auch verschiedene bitransgene Modelle) umfassen. Um einen dominant-negativen Effekt von mutp53 über wtp53 auszuschließen, ist für GoF-Studien eine p53-Null-Situation erforderlich.

Hauptsächlich verwendete Mausmodelle für die Analyse eines mutp53-vermittelten Effekts sind Modelle, die das Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) widerspiegeln, welches durch angeborene p53-Mutationen und dadurch mit einem erhöhten Tumorrisiko und vielfältigem Tumorspektrum in frühen Jahren gekennzeichnet ist (Kleihues et al., 1997). Für die Analysen eines mutp53-abhängigen GoF wurden Mäuse mit p53-Mutationen (R270H oder R172H) in homozygoten p53-*Knockout*-Hintergrund generiert, die den Phänotyp des LFS sowohl im Auftreten frühzeitiger Krebserkrankungen als auch im Tumorspektrum (z.B. Lymphome, Sarkome, Karzinome) reflektieren (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004). Um spezifisch den Einfluss von mutp53 auf die Mammakarzinogenese zu untersuchen, eignen sich die o.g. Mausmodelle daher nicht.

Im Gegensatz dazu bietet das WAP-T Mausmodell alle Voraussetzungen für das Studium eines mutp53-vermittelten GoF in diesem Prozess. Für die Initiation von Tumoren wurde das SV40 T-Ag unter Kontrolle des WAP-Promotors verwendet. SV40 T-Ag bietet den Vorteil gegenüber anderen zur Tumorinduktion verwendeten Genen (z.B. Her2/neu, BRCA1/2, PyMT) (Fantozzi and Christofori, 2006), dass es gleichzeitig durch Bindung an wtp53 dessen funktionelle Inaktivierung bewirkt. Dies entspricht einem konditionellen p53-*Knockout*, wodurch ein Keimbahn-basierter p53-*Knockout* vermieden werden kann, der mit einer erhöhten Tumoranfälligkeit in früherer Lebensphase einhergeht (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004). Der WAP-Promotor wird durch laktotrophe Hormone, die erst während einer Schwangerschaft gebildet werden, spezifisch in den Epithelzellen des Mammagewebes aktiviert, so dass die Transgenexpression zum Ende der Schwangerschaft beginnt (Muller et al., 1988; Hennighausen, 1990). Dies ermöglicht die physiologische Entwicklung der adulten murinen

Brustdrüsen und ahmt die humane Situation bezüglich der Brustkrebsentstehung aufgrund einer spontanen Mutation im *p53*-Gen nach.

Um den Einfluss von *mutp53* auf die Metastasierung von Mammakarzinomzellen zu ergründen, ist ein gering metastasierendes Modell von Vorteil. Das WAP-T Modell zeichnet sich durch eine 100%-ige Tumorinduktion nach relativ kurzer Latenz (6-10 Monate) und eine geringe Metastasierungsrate (7%) aus. Andere Modelle wie z.B. das Her2/neu1 Mausmodell oder das *Brca1-Knockout* Modell sind aufgrund einer hohen Metastasierungsrate (> 90%) bzw. einer geringen Tumorzinzidenz ungeeignet (Brodie et al., 2001; Moody et al., 2002). Eine weitere Eigenschaft des Mausmodells besteht in seiner Vergleichbarkeit zu humanen Läsionen. Obwohl die Verwendung von SV40 T-Ag im Mausmodell nicht der Tumorinduktion im Menschen entspricht, bewirkt es ähnliche funktionelle Alterationen, wie sie in der humanen Mammakarzinogenese beobachtet werden. Dementsprechend wurden die WAP-T Mammakarzinome bereits als sehr ähnlich zu humanen Läsionen beschrieben: zum einen konnten in histologischen Analysen die morphologischen, zytologischen und molekularen Ähnlichkeiten der WAP-T Tumore zu humanen Karzinomen bestätigt werden und zum anderen wurde in humanen Tumoren die Inaktivierung von *p53* und *pRb* beschrieben, was im WAP-T Mausmodell durch die T-Ag-Expression erreicht wird (Schulze-Garg et al., 2000; Heinlein et al., 2008; Jannasch et al., 2009, Otto et al., Int. J. Cancer, Manuskript eingereicht). Zusätzlich ermöglicht das WAP-T Mausmodell durch die Expression von T-Ag die Erforschung des mehrstufigen Prozesses der Karzinogenese: 60 Tage nach Absetzen des Wurfs werden überwiegend Dysplasien beobachtet, 120 Tage nach Absetzen treten zahlreiche intraepitheliale Neoplasien auf. Das Tumorstadium beginnt nach einer Latenz von ca. 6-10 Monaten. (Heinlein et al., 2008). Aus diesen Gründen ist das WAP-T Mausmodell für die Analyse eines *mutp53*-vermittelten GoF während der Mammakarzinogenese besonders geeignet.

Um den Effekt von *mutp53* auf die Malignität der Mammakarzinome zu untersuchen, wurden *mutp53*-exprimierende Mäuse im NP8-Hintergrund (WAP-T-NP8xWAP-*mutp53*<sup>R245W</sup> und WAP-T-NP8xWAP-*mutp53*<sup>R270H</sup>) generiert und die Phänotypen hinsichtlich verschiedener Aspekte wie z.B. das Überleben, die Tumor-Klassifizierung, die Vaskularisierung und die Metastasierung mit den WAP-T-NP8 Tieren verglichen.

Das Überleben der bitransgenen Mäuse, mit Ausnahme der H8-NP8 Linie, unterscheidet sich nicht von dem der NP8 Mäuse, in denen eine *p53*-Null-Situation simuliert wurde. Die H8-NP8 Tiere hingegen wiesen ein durchschnittlich um 50 Tage verlängertes Überleben auf. Während die Wachstumskinetik der Tumore vergleichbar zu NP8 Tumoren ist, wurde eine verspätete

Tumorinitiation in den H8-NP8 Mäusen beobachtet, wodurch die längere Überlebenserwartung der H8-NP8 Mäuse erklärt werden kann. Genaue Ursachen hierfür sind unbekannt, könnten aber in den Expressionsunterschieden von *mutp53*<sup>R270H</sup> in den H22-NP8 und H8-NP8 Linien begründet sein.

Anhand der Tumor-Klassifizierung wurde ein höherer Prozentsatz von undifferenzierten Tumoren in den Linien W10-NP8 und W1-NP8 beobachtet, während Tumore der Linien H8-NP8 und H22-NP8 tendenziell öfter als differenziert klassifiziert wurde.

Da humaner Brustkrebs bevorzugt in Lunge, Leber, Gehirn und Knochen streut (Hess et al., 2006; Chu and Allan, 2012) und im WAP-T Modell die Fähigkeit zur Metastasierung gegeben ist, wurde auch hier der Einfluss von *mutp53* auf Invasivität und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen in den Lungen untersucht. In W10-NP8 und W1-NP8 wurde eine 3- bis 4-fach höhere Metastasierungsrate beobachtet, während in H8-NP8 nur ein knapp 1,5-facher Unterschied zu NP8 Mäusen detektiert wurde.

Eine erhöhte Metastasierung geht im Allgemeinen mit der Neubildung von Blutgefäßen in Tumoren einher (Hanahan and Weinberg, 2000). In den untersuchten Tumoren der bitransgenen Mauslinien (R245W und R270H) konnte ebenfalls eine erhöhte Tumolvaskularisierung beobachtet werden, was ein möglicher Faktor für die höhere Metastasierungsrate in den bitransgenen Tieren sein kann.

## 6.2. Einfluss von *mutp53* auf eine EMT-vermittelte Metastasierung

Da in den *mutp53*-exprimierenden Mauslinien eine erhöhte Malignität der Mammakarzinome beobachtet wurde, bestand ein Ziel der Arbeit darin, zugrunde liegende Mechanismen zu identifizieren. Den stärksten Effekt einer *mutp53*-Expression auf die Malignität der Mammakarzinome zeigte die W10-NP8 Linie, so dass undifferenzierte Tumore dieser Linie für einen Vergleich der globalen Genexpression mit entsprechenden NP8 Tumoren herangezogen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass eine Vielzahl differenziell regulierter Gene mit dem Prozess der EMT assoziiert ist. In der Literatur wird der EMT-Prozess häufig mit der Metastasierung verknüpft (Thiery, 2002). Es wird vermutet, dass Karzinomzellen temporär ihren epithelialen, immobilen Phänotyp ändern und mesenchymale Eigenschaften annehmen. Diese beinhalten u.a. Apoptoseresistenz, Mobilität und Invasivität (Micalizzi et al., 2010). Weiterhin beschreibt eine wachsende Zahl von Veröffentlichungen, dass die mobilen Zellen einen Stammzell-ähnlichen Phänotyp entwickeln, welcher mit Dedifferenzierung, Selbsterneuerung und eingeschränkter Proliferation der Zellen einhergeht (Brabletz et al., 2005b; Drasin et al., 2011; Takebe et al., 2011). Am Ort der Besiedlung erfolgt der reverse Prozess (MET) und es entwickelt sich eine Metastase mit epithelialen Phänotyp (Thiery, 2002;

Brabletz et al., 2005b). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass Metastasen histopathologisch dem Primärtumor ähneln. Für das Auswachsen der Metastasen scheint der epitheliale, redifferenzierte und proliferative Phänotyp der Zellen notwendig zu sein (Brabletz et al., 2005a; Polyak and Weinberg, 2009).

Einige Monate nach Identifizierung der EMT-Signatur in WAP-T-NP8xWAP-mutp53<sup>R245W</sup> Tumoren (siehe Anhang 8.1) wurden Publikationen veröffentlicht, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen mutp53, EMT und der damit assoziierten Metastasierung beschrieben, wobei sich die Daten vorrangig auf *in vitro* Experimente beziehen (Roger et al., 2010; Kogan-Sakin et al., 2011; Zhang et al., 2011). So zeigten zwei Gruppen, dass eine Expression von mutp53 in Kolonkarzinomzellen (V143A, R175H, R273H) bzw. in immortalisierten Prostatazellen (R175H) mit einem EMT-assoziierten Phänotyp korreliert. Zusätzlich wurde eine erhöhte Expression von EMT-relevanten Genen wie *Zeb1* und *Slug* in den Kolonkarzinomzellen oder eine verstärkte *Twist1*-Expression in den Prostatazellen beobachtet (Roger et al., 2010; Kogan-Sakin et al., 2011). Zhang und Kollegen untersuchten einen mutp53-vermittelten Effekt auf die Morphogenese in einem Mamma-Zellkulturmodell. Die ektopische Expression verschiedener p53-Mutanten (R175H, R248W, R273H) führte zu einer Zerstörung der Azini-Architektur und zur Ausbildung unregelmäßiger Strukturen, was zusätzlich mit einer Reduktion von E-Cadherin und einer erhöhten Expression der EMT-assoziierten Proteine Twist, Snail und Slug korrelierte (Zhang et al., 2011).

Die in dieser Arbeit entdeckte Gensignatur enthält neben den gut beschriebenen EMT-Aktivatoren *Snai1*, *Zeb1* und *Tgfβ1* (Muraoka et al., 2002; Polyak and Weinberg, 2009) auch eine Anreicherung von verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren. Dazu gehören u.a. *Pdgfra*, *Pdgfrb*, *Fgfr1*, *Notch4* und *Itga5*, deren Aktivierung zum Anschalten von EMT-assoziierten Signalwegen wie z.B. PI3K-, MAPK-, Notch- und Integrin-Signalwegen führen kann (Hood and Cheresch, 2002; Grego-Bessa et al., 2004; Jechlinger et al., 2006; Acevedo et al., 2007; Hardy et al., 2011; Keely, 2011). Weiterhin wurde eine verstärkte Expression von ECM-relevanten Genen wie Matrix-Metalloproteasen (*Mmp3*, *Mmp10*, *Mmp11* und *Mmp12*) und verschiedenen Prokollagenen (*Col1*, *Col5*, *Col6* und *Col15*) gefunden. Die erhöhte Expression von MMPs und Kollagenen während der EMT wurde bereits in humanen Mamma-Epithelzellen und in einem Neuroblastom-Xenograft-Modell bestätigt (Taube et al., 2010; Anastassiou et al., 2011).

Die Relevanz der EMT-Signatur konnte anhand ausgewählter Gene (*Zeb1*, *Mmp3*, *Thy1*, *Itga5*, *Pdgfb*, *Pdgfra*, *Pdgfrb*, *Tgfb1i1*, *Wisp1* und *Etv1*) in den WAP-T Zelllinien G-2 und H8N8 bestätigt werden: beide homöostatischen Tumorzellsysteme reflektieren den Phänotyp endogener Tumore und weisen Zellpopulationen verschiedener Differenzierungsstadien mit entsprechender Expression epithelialer oder mesenchymaler Marker auf. Die Zellen wurden nach entweder epithelialen oder mesenchymalen Merkmalen aufgetrennt und auf die Expression der EMT-assoziierten Gene hin untersucht. Die Expression der meisten untersuchten Gene (7 von 10) war in der quasi-mesenchymalen Population stärker exprimiert. Dies geht mit der Annahme einher, dass diese Population den Teil repräsentiert, der die EMT bereits durchlaufen hat und dadurch den mobilen Part der Zellen darstellt (Micalizzi et al., 2010).

Mit Hilfe der G-2 Zellen wurde der Einfluss von mutp53 auf die Morphologie und Expression bestimmter Gene der EMT-Signatur *in vitro* untersucht. Obwohl die G-2 Zellen aus einem bitransgenen Tumor stammen, wird mutp53<sup>R270H</sup> nur auf sehr geringem Niveau exprimiert, so dass das Protein nur in wenigen Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Somit eignen sich diese Zellen dennoch für eine Überexpression von mutp53. Die ektope Expression sowohl von mutp53<sup>R245W</sup> als auch von mutp53<sup>R270H</sup> in G-2 Zellen führte zu einer Veränderung der Zellmorphologie: die Mehrzahl der Zellen wiesen nun einen eher mesenchymalen Phänotyp auf. Zusätzlich korrelierte dies mit einer signifikanten Hochregulation der mesenchymalen Marker *Vimentin* und *Mmp3* sowie einer deutlichen Repression des epithelialen Markers *Epcam*. Für den EMT-assoziierten Faktor *Zeb1* wurde eine 1,6-fach verstärkte Expression in mutp53-exprimierenden G-2 Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass beide p53-Mutanten befähigt sind, den Phänotyp der G-2 Zellen in Richtung einer mehr mesenchymalen Ausprägung zu verschieben. Möglicherweise wird die EMT durch *Mmp3*-Hochregulation in den Zelllinien aktiviert; alternativ stellt die Expression von *Mmp3* das Ergebnis einer fortschreitenden EMT dar, da MMPs für einen ECM-Abbau verantwortlich sind, was die Tumorprogression und Invasion von Tumorzellen begünstigt (Lochter et al., 1997; Deryugina and Quigley, 2006). Darüber hinaus wird zusätzlich die Bedeutsamkeit der mutp53-abhängigen EMT-Signatur in den bitransgenen Tumoren bestätigt. Um den Einfluss der mutp53-Überexpression in G-2 Zellen auf die Disseminierung und Metastasierung im WAP-T Mausmodell zu untersuchen, wurden die modifizierten Zellen bereits in NP8 Mäuse transplantiert, die Auswertung der Daten steht aber derzeit noch aus.

### 6.3. Modulation der WAP-T Tumorzellsysteme

Die WAP-T Tumorzellsysteme G-2 und H8N8 reflektieren die endogenen, undifferenzierten WAP-T Tumore aufgrund ihrer vergleichbaren Markerexpression (epithelial, mesenchymal), Morphologie und durch das Vorhandensein von mindestens zwei distinkten Subpopulationen. Dadurch stellen sie geeignete Werkzeuge dar, um die Ursachen für den aggressiveren Phänotyp in den bitransgenen Mäusen u.a. durch Modulation der Zellen *in vitro* aufzuklären.

In den Genexpressionsanalysen wurde eine erhöhte Expression der Wachstumsfaktoren *Tgfβ1* und *Pdgfb* in den bitransgenen Tumoren gefunden. Die Fähigkeit, EMT zu induzieren, wurde bereits für beide Faktoren beschrieben (Kong et al., 2008; Xu et al., 2009). Durch Behandlung von G-2 und H8N8 Zellen mit *Tgfβ1* und PDGF-BB wurde nun in dieser Arbeit geprüft, ob (i) beide Wachstumsfaktoren eine EMT im WAP-T Zellsystem induzieren können und ob (ii) dabei ausgewählte, für die Fragestellung relevante Gene reguliert werden. In beiden Zelllinien bewirkte die *Tgfβ1*- bzw. PDGF-BB-Behandlung eine verstärkt mesenchymale Morphologie der Zellen; dies korrelierte mit der Hemmung der *Epcam*- und mit der Erhöhung der *Vimentin*-Expression. Des Weiteren wurde eine Regulation von EMT-relevanten Genen wie *Zeb1* und *Mmp3* nachgewiesen, die verstärkt exprimiert wurden, was den Prozess der EMT in den WAP-T Tumorzellen und dessen Eignung als *in vitro* Modell zur Erforschung des EMT-Prozesses bestätigt.

*Zeb1* und *Mmp3* stellen interessante Zielgene dar, die vermutlich in einer mutp53-vermittelten EMT eine Rolle spielen. Zum einen korreliert eine erhöhte *Zeb1*-Expression oftmals mit undifferenzierten, invasiven Kolon-, Pankreas- und Mammakarzinomen (Spaderna et al., 2006; Wellner et al., 2009; Chang et al., 2011; Soini et al., 2011). Zum anderen spielt *Zeb1* bei der Induktion von EMT eine entscheidende Rolle (Kalluri and Weinberg, 2009). Des Weiteren wurde bereits eine potentielle Regulation von *Zeb1* durch p53 vorgeschlagen. So induziert wtp53 die Expression von miR-200c (Chang et al., 2011; Kim et al., 2011), welche durch Bindung an das *Zeb1*-Transkript dessen Translation inhibiert und somit den epithelialen Phänotyp der Zelle fördert (Brabletz and Brabletz, 2010). Eine p53-Mutation führt vermutlich zur Deregulation des Mechanismus, da mutp53 die Expression von miR-200c wahrscheinlich nicht mehr induzieren kann.

Eine veränderte Expression verschiedener MMPs (auf Transkription- und auf Proteinebene) wurde in einem Zusammenhang mit der Entwicklung von invasiven, malignen Tumoren und einer generell schlechteren Prognose gebracht: z.B. korrelieren hohe Level von MMP2 und MMP11 mit einer schlechteren Prognose bei Brustkrebs; hohe MMP1- und MMP13-Expression geht mit schlechter Prognose bei kolorektalen Karzinomen einher; MMP1, MMP11 und

MMP13 sind in Prostatakarzinomen stärker exprimiert als in benignen Prostataerkrankungen (Basset et al., 1997; Johnsen et al., 1998; Fingleton, 2006; Jezierska and Motyl, 2009; Escaff et al., 2010; Surlin et al., 2011). Als Ursache für die schlechtere Prognose wird eine unterstützende Funktion in einer Vielzahl von metastasierungsrelevanten Prozessen durch MMPs vermutet: die Hauptfunktion der MMPs ist die Umstrukturierung der ECM und die Reprimierung der zellulären Adhäsion, was Tumorzellen die Migration erleichtert (Pilcher et al., 1997; Kessenbrock et al., 2010). Mmp3 wurde sowohl als transkriptionelles Zielgen als auch als Regulator des Wnt-Signalwegs und damit als EMT-Aktivator beschrieben: zum einen wird die Mmp3-Expression durch  $\beta$ -Catenin positiv reguliert, zum anderen kann Mmp3 durch Spaltung von E-Cdh mit einhergehender nukleärer Translokation von  $\beta$ -Catenin den Wnt-Signalweg beeinflussen (Lochter et al., 1997; Radisky et al., 2005; Kalluri and Zeisberg, 2006; Blavier et al., 2010). Eine verstärkte Expression von Mmp3 und Mmp10 beeinflusst die Blutgefäßstabilität in Mäusen, so dass zirkulierende Tumorzellen, intradermal injiziert, vermehrt die pulmonalen Blutgefäße verlassen und sich im Gewebe ansiedeln konnten. Inhibition der beiden Matrix-Metalloproteasen verminderte die Permeabilität der Blutgefäße und inhibierte die Ausbildung von Lungenmetastasen (Huang et al., 2009). Da Mmp3 und Mmp10 in den W10-NP8 Tumoren stärker exprimiert sind, können sie für die höhere Vaskularisierung und Metastasierung in den bitransgenen Mäusen verantwortlich sein.

Um die Auswirkungen der Expression von *Zeb1* und *Mmp3* als mutp53-regulierte Gene während der EMT bzw. der Metastasierung zu verstehen, wurde deren ektope Expression in H8N8 Zellen untersucht. Die Überexpression der Transgene (*Mmp3*: ~ 2500-fach; *Zeb1*: ~20-fach) führte zu einer 2- bis 5-fachen Reduktion der *Epcam*-Transkription und verminderte den Anteil der *Epcam*-positiven Zellen. Auch morphologisch verursachte die Transgenexpression die Ausprägung eines eher mesenchymalen Phänotyps. Dies korreliert mit den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen, die ebenfalls zeigten, dass die Expression epithelialer Marker wie *Epcam*, *E-Cdh*, *Connexine*, *ZO-1* usw. durch *Zeb1* reprimiert, während die von mesenchymalen Markern wie *Vimentin*, *N-Cdh* oder auch verschiedene MMPs hochreguliert wird (Vandewalle et al., 2009; Drasin et al., 2011; Thomson et al., 2011). Interessanterweise wurde in *Zeb1*-überexprimierenden H8N8 Zellen eine ca. 4-fach erhöhte Expression für *Mmp3* beobachtet. Ähnliches beobachtete auch eine chinesische Gruppe: eine *Zeb1*-Überexpression geht mit einer deutlich erhöhten MMP1-Expression einher (Hu et al., 2011). Die Autoren zeigten ebenso, dass die Expression von *Zeb1* zur Sekretion von MMP1 führt. Offenbar kann die *Zeb1*-Expression die Sekretion von MMPs und Wachstumsfaktoren in die Mikroumgebung eines Tumors verursachen und dadurch die Metastasierung beeinflussen.

Möglicherweise führt die *Zeb1*-Überexpression in H8N8 Zellen zu einem ähnlichen Effekt, indem es die Expression von *Mmp3* reguliert.

Die *Zeb1*- und *Mmp3*-überexprimierenden Zelllinien wurden bereits für *in vivo* Analysen zur Disseminierung verwendet. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen diese Zellen leicht erhöhte Disseminierungseigenschaften auf, die aufgrund einer starken Varianz und einer geringen Tieranzahl pro Gruppe nicht signifikant waren. Es ist anzunehmen, dass die Vergrößerung der Tieranzahl zu einem deutlicheren Ergebnis führen würde. Die recht milde Erhöhung der Disseminierung könnte ebenso in einer Unterdrückung der Transgenexpression in den transplantierten Zellen *in vivo* begründet sein. Der Transkriptionslevel der Transgene offenbarte eine deutliche Reduktion in den Tumoren im Vergleich zu der Expression, die die Zellen unter Zellkulturbedingungen aufwiesen. Eine potentielle Ursache hierfür stellt die Verwendung von GFP als Selektionsmarker dar. Offenbar kann GFP in hohen Level toxisch in Zellen wirken und zum selektiven Abtöten der Zellen bzw. zum Abschalten der Expression führen (Cubitt et al., 1995). Im Falle einer Expressionshemmung von GFP bedeutet dies eine zeitgleiche Repression des Transgens, da beide Gene unter Kontrolle desselben Promotors (SFFV) stehen. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Tumore von Zellen initiiert wurden, die das Transgen nicht (mehr) tragen. Es wäre möglich, dass nur eine kleine Population von Zellen das Transgen verloren hat, die anschließend für die Tumorumitiation verantwortlich ist. Dennoch sind leichte Effekte einer *Zeb1*- bzw. *Mmp3*-Expression auf die Disseminierung von Tumorzellen erkennbar, so dass eine Wiederholung der Experimente mit einer erhöhten Tieranzahl und stabiler Transgenexpression sinnvoll ist.

## **6.4. Potentielle mutp53-vermittelte Mechanismen der Metastasierung**

### **6.4.1. Mutp53-GoF – im WAP-T Mausmodell unabhängig von p63**

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen eines mutp53-abhängigen GoF beschrieben. Als wesentliche Ursache für den onkogenen Funktionszugewinn von mutp53 wird die funktionelle Inaktivierung von p63 durch mutp53 angesehen (Melino, 2011). Wie wtp53 agiert auch p63 als Tumorsuppressor, dessen Expression in aggressiveren, metastatischen Tumoren verloren geht (Urist et al., 2002; Koga et al., 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass humane p53-Mutanten (R175H, R273H) mit p63 interagieren können und dabei dessen Tumorsuppressorfunktionen inhibieren (Adorno et al., 2009; Muller et al., 2009). So zeigten Muller et al., dass für die Invasion in mutp53-exprimierenden H1299 Zellen ein erhöhtes Rezeptor-Recycling von  $\beta$ 1-Integrine und Egfr1, gebunden an *Rab-coupling protein* (Rcp),

erforderlich ist, was mit einer gesteigerten Aktivierung der Egfr- und Integrin-Signalwege einhergeht. Die p63-vermittelte Inhibition der Rcp-Expression wird hierbei durch mutp53 verhindert (Caswell et al., 2008; Muller et al., 2009). Adorno und Kollegen untersuchten den Effekt einer Tgf $\beta$ -Stimulation auf die Invasivität von H1299 Zellen im Zusammenhang mit einer mutp53-Expression (R175H): eine Tgf $\beta$ -Stimulation führte zu einer verstärkten Mobilität und Invasion der Zellen *in vitro* und *in vivo*, wohingegen die ektope Expression von p63 den durch Tgf $\beta$ -induzierten, mesenchymalen Phänotyp inhibieren konnte. Als Ursache für den invasiveren Phänotyp nach Tgf $\beta$ -Stimulation entdeckten sie die Bildung eines ternären Komplexes zwischen p63, Smad2 und mutp53, aufgrund dessen die Tumorsuppressorfunktionen von p63 inhibiert wurden (Adorno et al., 2009).

Um zu überprüfen, ob der im WAP-T Mausmodell beobachtete mutp53-abhängige GoF über eine Wechselwirkung mit p63 vermittelt wird, wurden sowohl der Transkriptions- als auch der Proteinlevel von p63 in den Tumoren untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass p63, unabhängig von mutp53, auf geringem Level transkribiert wurde und auf Proteinebene kaum detektiert werden konnte. Da sowohl monotransgene als auch bitransgene WAP-T Tumore, zwar in unterschiedlichen Ausprägungen, zur Metastasierung befähigt sind, korreliert dies mit der Literatur, die zeigt, dass die p63-Expression in metastatischen Tumoren reduziert ist (Urist et al., 2002; Koga et al., 2003). Obwohl nur eine geringe p63-Transkription in den WAP-T Tumoren detektiert werden konnte, sollte durch Überprüfung der Regulation von potentiellen Zielgenen ein p63-regulierter Mechanismus ausgeschlossen werden. Ein interessantes Ziel stellt die Aktivierung der miR-200 Familie durch p63 dar, denn diese Mikro-RNAs können die Zeb1-Expression inhibieren (Knouf et al., 2012). Die Transkriptionsanalyse der zwei primären miR-200 Cluster ergab keinen Unterschied zwischen mono- und bitransgenen Tumoren, wobei die Transkripte in den Tumoren nur in sehr geringen Mengen detektiert wurden. Als mögliche Ursachen können eine gleichartige Regulation der Mikro-RNAs und eine nicht geeignete Analyse der primären Mikro-RNA-Transkripte auf Grund deren schnellen Prozessierung in Frage kommen. In der Literatur wurde eine durch wtp53-vermittelte Erhöhung der miR-200c-Expression beschrieben, die mit einer Repression der Zeb-Faktoren und dem Erhalt des epithelialen Phänotyps einhergeht (Chang et al., 2011; Kim et al., 2011). Im WAP-T Mausmodell könnte diese Funktion von wtp53 gestört sein, da wtp53 durch T-Ag sequestriert wird. Daher ist zu vermuten, dass in dem WAP-T-NP8xWAP-mutp53 Mausmodell der GoF von mutp53 nicht über bereits bekannte Mechanismen wie z.B. p63-Inaktivierung erfolgt, sondern andere regulatorische Prozesse zugrunde liegen.

#### 6.4.2. Potentiell neuer mutp53-vermittelter Mechanismus: Beeinflussung der Aktivität des Glucocorticoidrezeptors

Da bekannte Mechanismen wie die funktionelle Inhibierung von p63 für den GoF von mutp53 offenbar keine Relevanz in dem WAP-T Modell haben, sollten weitere Möglichkeiten für die Funktionsausübung des mutp53-Proteins eruiert werden. Ein Ansatzpunkt dafür könnte sein, dass in den W10-NP8 Tumoren eine verstärkte Lokalisation von mutp53 im Zytoplasma beobachtet wurde. Derzeit sind Funktionen für zytoplasmatisches mutp53 aber nur wenig erforscht. Generell wird aber vermutet, dass eine Lokalisation von p53 im Zytoplasma mit einer schlechteren Prognose z.B. bei Darm- und Brustkrebs korreliert (Sun et al., 1992; Bosari et al., 1994; Stenmark-Askmal et al., 1994). Bei der Suche nach möglichen Mechanismen für einen mutp53-abhängigen GoF im Zytoplasma konnten wir an eine vor einigen Jahren in unserer Abteilung gefundene Beobachtung anknüpfen, dass mutp53 den Glucocorticoidrezeptor (GR) im Zytoplasma sequestrieren kann (unveröffentlichte Daten von Dr. W. Bohn). Somit stellte sich die Frage, ob eine Translokation des GR auch in den bitransgenen Mäusen für den aggressiveren Phänotyp der Tumore verantwortlich sein könnte.

Der Glucocorticoidrezeptor (GR) übt seine vorrangig entzündungshemmende und immunsuppressive Funktion nach Aktivierung durch Glucocorticoidbindung im Zellkern als Transkriptionsfaktor aus und aktiviert bzw. inhibiert dabei die Expression von Zielgenen durch Bindung an *Glucocorticoid (GC)-response-Elemente (GRE)* in der DNA (Yamamoto, 1985; Drouin et al., 1993; Beato et al., 1995). Darüber hinaus kann der GR im Zytoplasma Apoptose transkriptionsunabhängig induzieren bzw. verschiedene Signalwege (u.a. Ras/Raf-, MAPK-, Tgf $\beta$ -Signalwege) durch Bindung an Raf-1, durch Inhibierung von Jnk oder p38/MAPK oder durch Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von verschiedenen Smads modulieren (Caelles et al., 1997; Song et al., 1999; Croxtall et al., 2000; Imasato et al., 2002; Bruna et al., 2003). Dies würde mit den Ergebnissen des in dieser Arbeit durchgeführten Phospho-Tyrosin-Profils korrelieren, welches verschiedene Modulationen von Komponenten z.B. der MAPK- und PI3K-Signalwege zeigt.

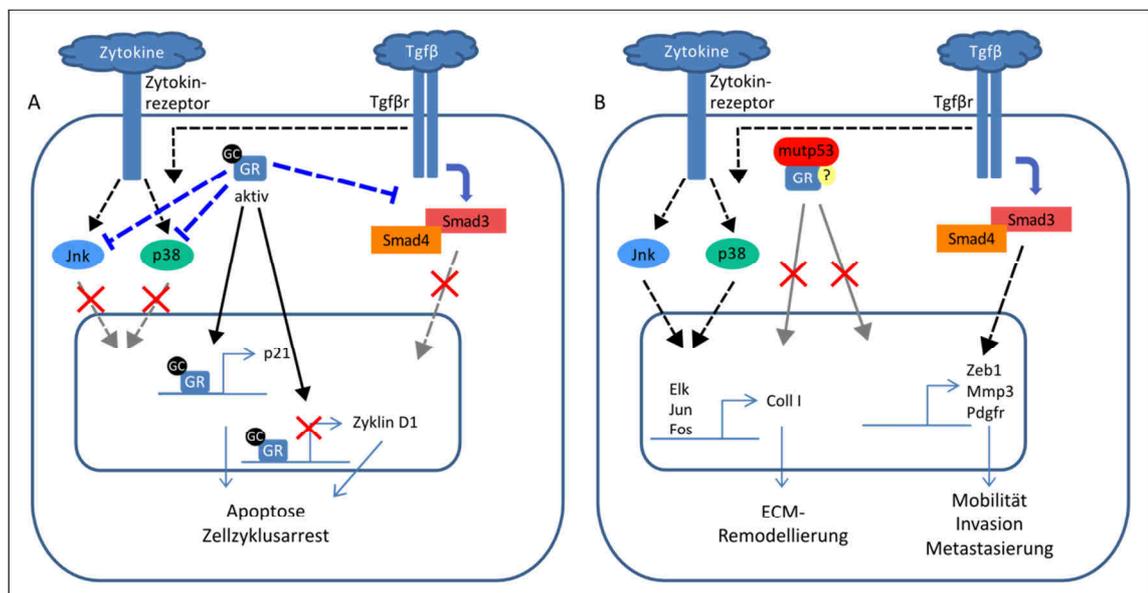
Erste Untersuchungen zeigten, dass eine ektope Expression von mutp53 (sowohl R245W als auch R270H) in den WAP-T Tumorzellsystemen eine Translokation des GR bewirkt. So ist der GR in den parentalen G-2 Zellen überwiegend im Zellkern lokalisiert, was eine Funktionsausübung als Transkriptionsfaktor vermuten lässt. Im Allgemeinen scheint die Funktion des GR Zelltyp-spezifisch und von den Stimulationsbedingungen abhängig zu sein. So kann nukleärer GR den Zellzyklus inhibieren bzw. Apoptose auslösen, z.B. durch verstärkte

Expression von p21 und p27 in Osteosarkomzellen, wodurch ein G<sub>1</sub>-Arrest hervorgerufen werden kann (Rogatsky et al., 1997). Apoptose kann ebenso durch Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 ausgelöst werden. Die beiden Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von anti-apoptotischen Genen wie z.B. TRAFs (*TNF Receptor-Associated Factors*) oder Bcl-2 und Bcl-xL, (Lee et al., 1999; Greenstein et al., 2002). Andere Publikationen offenbarten aber einen anti-apoptotischen und proliferationsfördernden Effekt von GC in Karzinomzellen, u.a. bei Brust-, Lungen-, Leber-, Gebärmutterhalskrebszellen (Rutz and Herr, 2004). So kann durch GC-Stimulation entweder die Expression der Serum- und GC-regulierte Kinase 1 (Sgk1), welche eine Rolle in der Inhibierung der Apoptose spielt (Mikosz et al., 2001), oder von dem anti-apoptotischen Protein Bcl-x<sub>L</sub> erhöht werden (Evans-Storms and Cidlowski, 2000).

In Zellen mit ektopter mutp53-Expression ist der GR verstärkt im Zytoplasma zu finden. Durch die Translokation des GR in das Zytoplasma wird dessen transkriptionelle Aktivität weitestgehend unterbunden, was zumindest einen partiellen Funktionsverlust bedeutet. Sowohl der Verlust der entzündungshemmenden Funktion durch GR-Aktivierung als auch die Aktivierung von anti-apoptotischen Zielgenen sind mit einem mutp53-GoF kompatibel. Dennoch ist zytoplasmatischer GR immer noch in der Lage, transkriptionsunabhängig Apoptose zu induzieren (Schlossmacher et al., 2011). Dieser Vorgang könnte durch mutp53 durch direkte oder auch indirekte Bindung an den GR gestört sein, was ebenfalls ein besseres Überleben der Tumorzellen bewirken würde. Des Weiteren ist der GR in der Lage, durch Inhibierung der transkriptionellen Funktion von Smad3 und Smad4 den Tgfβ-Signalweg zu modulieren (Song et al., 1999). Eine Hemmung der GR-Funktion durch mutp53 würde in einer Aktivierung des Tgfβ-Signalwegs resultieren. Diese Theorie unterstützend wurde eine erhöhte Expression von *Tgfβ1* und *Tgfβi1i1*, ein durch Tgfβ induziertes Gen, mit Hilfe der Mikroarrays in den bitransgenen Tumoren detektiert. Die Aktivierung des Tgfβ-Signalwegs könnte für die Induktion einer EMT im WAP-T Mausmodell eine wichtige Rolle spielen: da zum einen Tgfβ1 als potenter EMT-Induktor bekannt ist und zum anderen der MAPK-Signalweg über Aktivierung von p38/MAPK durch Tgfβ aktiviert werden kann (Yu et al., 2002; Kolosova et al., 2011). Die Hemmung des GR führt ebenso zur Aktivierung der zuvor durch den GR inhibierten Jnk und p38/MAPK, was mit einem aktivierten MAPK-Signalweg korrelieren würde. In den bitransgenen Tumoren wurde mit Hilfe des Phospho-Tyrosin-Profiles eine differenzielle Modulation des MAPK-Wegs im Vergleich zu den monotransgenen Tumoren gezeigt. Möglicherweise erfolgt dies über eine differenzielle Modulation von p38/MAPK in den bitransgenen Tumoren. Dies könnte auch die erhöhte Expression verschiedener Kollagene bedingen, die mit Hilfe der Mikroarrays detektiert

wurden, da eine p38/MAPK-vermittelte Expression von Kollagen I in pulmonalen Epithelzellen bereits nachgewiesen wurde (Kolossova et al., 2011).

Für einen mutp53-vermittelten GoF, der in den bitransgenen Mäusen mit einer erhöhten Metastasierung einhergeht, stellt die Modulation des GR einen neuen und attraktiven Mechanismus dar. Möglicherweise werden durch Hemmung des GR bestimmte Signalwege wie Tgfβ-, MAPK- und PI3K-Signalwege so moduliert, dass sie mit besserem Überleben, erhöhter Proliferation und Invasion von Tumorzellen korrelieren (siehe Abbildung 54). Weitergehende Analysen bezüglich der Funktion des GR und der Aktivität einzelner Kandidaten dieser Signalwege sind für die Bestätigung unabdingbar.



**Abbildung 54: Mögliche Aktivierung der Tgfβ- und MAPK-Signalwege durch mutp53-vermittelte Inaktivierung des Glucocorticoidrezeptors**

Glucocorticoidrezeptor (GR) liegt in aktiver Form vor, wenn Glucocorticoide (GC) gebunden sind. Der GR kann in den Zellkern wandern und dort die Expression von Zielgenen regulieren. Weiterhin kann der GR die Funktion von Jnk, p38, Smad3 und Smad4 hemmen, so dass die MAPK- und Tgfβ-Signalwege inaktiviert werden. B) Eine mögliche Bindung von mutp53 und ggf. weiterer Faktoren (wie z.B. GC oder Proteine, die den Rezeptor in einem inaktiven Zustand halten) führt zur einer vermehrten Lokalisation des GR im Zytoplasma. Dadurch kann der Rezeptor seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht mehr ausüben. Darüber hinaus kann der Rezeptor Jnk, p38, Smad3 und Smad4 nicht länger inhibieren, was zu einer Modulation der Signalwege führt (erstellt nach Zhang, 2009; Kharwanlang and Sharma, 2011).

## 6.5. Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, den mutp53-vermittelten Mechanismus des GoF in der Mammakarzinogenese im WAP-T Mausmodell besser zu verstehen. Dabei wurde ersichtlich, dass Mutationen von p53 dramatische Konsequenzen auf das Verhalten von Tumorzellen bezüglich Metastasierung haben können, wobei je nach Tumortyp bzw. Situation vermutlich verschiedene Mechanismen involviert sind. Die Erforschung der mutp53-abhängigen Mechanismen eröffnet neue Angriffspunkte auf den Prozess der Metastasierung, die für die Entwicklung neuer Therapeutika und günstigeren Bedingungen für den Patienten essentiell sein können. In dieser Arbeit wurde ein bislang noch nicht beschriebener potentieller Mechanismus für den mutp53 GoF entdeckt, die funktionelle Inaktivierung des GR durch zytoplasmatische Sequestrierung. Für das genaue Verständnis dieses Mechanismus sind aber weitere Untersuchungen unabdingbar.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aas, T., Børresen, A.L., Geisler, S., Smith-Sørensen, B., Johnsen, H., Varhaug, J.E., Akslen, L.A., and Lønning, P.E. (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat. Med.* 2, 811–814.
- Acevedo, V.D., Gangula, R.D., Freeman, K.W., Li, R., Zhang, Y., Wang, F., Ayala, G.E., Peterson, L.E., Ittmann, M., and Spencer, D.M. (2007). Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 12, 559–571.
- Adorno, M., Cordenosi, M., Montagner, M., Dupont, S., Wong, C., Hann, B., Solari, A., Bobisse, S., Rondina, M.B., Guzzardo, V., et al. (2009). A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* 137, 87–98.
- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., and Stark, G.R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8493–8497.
- Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. (2006). Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10, 191–202.
- Al Moustafa, A.-E., Achkhar, A., and Yasmeen, A. (2012). EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas. *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 671–684.
- Ali-Seyed, M., Laycock, N., Karanam, S., Xiao, W., Blair, E.T., and Moreno, C.S. (2006). Cross-platform expression profiling demonstrates that SV40 small tumor antigen activates Notch, Hedgehog, and Wnt signaling in human cells. *BMC Cancer* 6, 54.
- Anastassiou, D., Rumjantseva, V., Cheng, W., Huang, J., Canoll, P.D., Yamashiro, D.J., and Kandel, J.J. (2011). Human cancer cells express Slug-based epithelial-mesenchymal transition gene expression signature obtained in vivo. *BMC Cancer* 11, 529.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D.P., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1117–1130.
- Appella, E., and Anderson, C.W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 268, 2764–2772.
- Balic, M., Lin, H., Young, L., Hawes, D., Giuliano, A., McNamara, G., Datar, R.H., and Cote, R.J. (2006). Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin. Cancer Res.* 12, 5615–5621.
- Banerjee, S., Dowsett, M., Ashworth, A., and Martin, L.-A. (2007). Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 536–550.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol. Cell* 8, 1243–1254.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–3161.
- Bártek, J., Bárteková, J., Vojtěšek, B., Stasková, Z., Lukáš, J., Rejthar, A., Kovarik, J., Midgley, C.A., Gannon, J.V., and Lane, D.P. (1991). Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6, 1699–1703.
- Baselga, J. (2011). Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist* 16 Suppl 1, 12–19.
- Basset, P., Okada, A., Chenard, M.P., Kannan, R., Stoll, I., Anglard, P., Bellocq, J.P., and Rio, M.C. (1997). Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol.* 15, 535–541.
- Beato, M., Herrlich, P., and Schütz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851–857.
- Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M.M., and Birchmeier, W. (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J. Cell Biol.* 120, 757–766.
- Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235–248.

- Blandino, G., Levine, A.J., and Oren, M. (1999). Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 18, 477–485.
- Blavier, L., Lazaryev, A., Shi, X.-H., Dorey, F.J., Shackelford, G.M., and DeClerck, Y.A. (2010). Stromelysin-1 (MMP-3) is a target and a regulator of Wnt1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cancer Biol. Ther.* 10, 198–208.
- Böcker, W., Hungermann, D., and Decker, T. (2009). Anatomie der Brustdrüse. *Der Pathologe* 30, 6–12.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 793–805.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803–815.
- Bosari, S., Viale, G., Bossi, P., Maggioni, M., Coggi, G., Murray, J.J., and Lee, A.K. (1994). Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 681–687.
- Bossi, G., Lapi, E., Strano, S., Rinaldo, C., Blandino, G., and Sacchi, A. (2006). Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene* 25, 304–309.
- Bossi, G., Marampon, F., Maor-Aloni, R., Zani, B., Rotter, V., Oren, M., Strano, S., Blandino, G., and Sacchi, A. (2008). Conditional RNA interference in vivo to study mutant p53 oncogenic gain of function on tumor malignancy. *Cell Cycle* 7, 1870–1879.
- Botti, J., Djavaheri-Mergny, M., Pilatte, Y., and Codogno, P. (2006). Autophagy signaling and the cogwheels of cancer. *Autophagy* 2, 67–73.
- Boyapati, A., Wilson, M., Yu, J., and Rundell, K. (2003). SV40 17KT antigen complements dnaj mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts. *Virology* 315, 148–158.
- Brabletz, S., and Brabletz, T. (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop[mdash]a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 11, 670–677.
- Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., and Kirchner, T. (2005a). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs (Print)* 179, 56–65.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005b). Migrating cancer stem cells [mdash] an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 744–749.
- Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F., and Goodall, G.J. (2008). A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 68, 7846–7854.
- Brancho, D., Ventura, J.-J., Jaeschke, A., Doran, B., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2005). Role of MLK3 in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3670–3681.
- Brodie, S.G., Xu, X., Qiao, W., Li, W.M., Cao, L., and Deng, C.X. (2001). Multiple genetic changes are associated with mammary tumorigenesis in Brca1 conditional knockout mice. *Oncogene* 20, 7514–7523.
- Brooks, C.L., and Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 164–171.
- Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701–713.
- Bruna, A., Nicolàs, M., Muñoz, A., Kyriakis, J.M., and Caelles, C. (2003). Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *Embo J.* 22, 6035–6044.
- Bull, S.B., Ozcelik, H., Pinnaduwege, D., Blackstein, M.E., Sutherland, D.A.J., Pritchard, K.I., Tzontcheva, A.T., Sidlofsky, S., Hanna, W.M., Qizilbash, A.H., et al. (2004). The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 86–96.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497–1501.
- Burdick, M.M., and Konstantopoulos, K. (2004). Platelet-induced enhancement of LS174T colon carcinoma and THP-1 monocytoïd cell adhesion to vascular endothelium under flow. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287, C539–547.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 9, 582–589.

- Buschmann, T., Minamoto, T., Wagle, N., Fuchs, S.Y., Adler, V., Mai, M., and Ronai, Z. (2000). Analysis of JNK, Mdm2 and p14(ARF) contribution to the regulation of mutant p53 stability. *J. Mol. Biol.* *295*, 1009–1021.
- Caelles, C., González-Sancho, J.M., and Muñoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* *11*, 3351–3364.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 729–740.
- Cardiff, R.D., Anver, M.R., Gusterson, B.A., Hennighausen, L., Jensen, R.A., Merino, M.J., Rehm, S., Russo, J., Tavassoli, F.A., Wakefield, L.M., et al. (2000). The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* *19*, 968–988.
- Caron de Fromental, C., and Soussi, T. (1992). TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* *4*, 1–15.
- Caspari, T. (2000). How to activate p53. *Curr. Biol.* *10*, R315–317.
- Caswell, P.T., Chan, M., Lindsay, A.J., McCaffrey, M.W., Boettiger, D., and Norman, J.C. (2008). Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *J. Cell Biol.* *183*, 143–155.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* *401*, 616–620.
- Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A., and Poon, R.Y.C. (2004). How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol. Cell. Biol.* *24*, 3536–3551.
- Chang, C.-J., Chao, C.-H., Xia, W., Yang, J.-Y., Xiong, Y., Li, C.-W., Yu, W.-H., Rehman, S.K., Hsu, J.L., Lee, H.-H., et al. (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat. Cell Biol.* *13*, 317–323.
- Chappuis, P.O., Estreicher, A., Dieterich, B., Bonnefoi, H., Otter, M., Sappino, A.P., and Iggo, R. (1999). Prognostic significance of p53 mutation in breast cancer: frequent detection of non-missense mutations by yeast functional assay. *Int. J. Cancer* *84*, 587–593.
- Chen, J., Marechal, V., and Levine, A.J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4107–4114.
- Chen, W., and Hahn, W.C. (2003). SV40 early region oncoproteins and human cell transformation. *Histol. Histopathol.* *18*, 541–550.
- Chen, W., Possemato, R., Campbell, K.T., Plattner, C.A., Pallas, D.C., and Hahn, W.C. (2004). Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell* *5*, 127–136.
- Chen, X.-F., Zhang, H.-J., Wang, H.-B., Zhu, J., Zhou, W.-Y., Zhang, H., Zhao, M.-C., Su, J.-M., Gao, W., Zhang, L., et al. (2012). Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 3549–3556.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2004). Cytoplasmic p53: bax and forward. *Cell Cycle* *3*, 429–431.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* *13*, 994–1002.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010–1014.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* *265*, 346–355.
- Christoffersen, N.R., Silahtaroglu, A., Orom, U.A., Kauppinen, S., and Lund, A.H. (2007). miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B. *RNA* *13*, 1172–1178.
- Chu, J.E., and Allan, A.L. (2012). The Role of Cancer Stem Cells in the Organ Tropism of Breast Cancer Metastasis: A Mechanistic Balance between the “Seed” and the “Soil”? *Int J Breast Cancer* *2012*, 209748.
- Clark, A.R., and Lasa, M. (2003). Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Pharmacol* *3*, 404–411.
- Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., and Wyllie, A.H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* *362*, 849–852.
- Cowin, P., Rowlands, T.M., and Hatsell, S.J. (2005). Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology* *17*, 499–508.
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* *358*, 502–511.
- Croxtall, J.D., Choudhury, Q., and Flower, R.J. (2000). Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* *130*, 289–298.

- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 448–455.
- Deb, D., Scian, M., Roth, K.E., Li, W., Keiger, J., Chakraborti, A.S., Deb, S.P., and Deb, S. (2002). Hetero-oligomerization does not compromise “gain of function” of tumor-derived p53 mutants. *Oncogene* *21*, 176–189.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *76*, 2420–2424.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* *82*, 675–684.
- Deppert, W., and Pates, R. (1979). Simian virus 40 specific proteins on surface of HeLa cells infected with adenovirus 2--SV40 hybrid virus Ad2+ND2. *Nature* *277*, 322–324.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* *425*, 577–584.
- Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 9–34.
- Deyoung, M.P., and Ellisen, L.W. (2007). p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* *26*, 5169–5183.
- DeYoung, M.P., Johannessen, C.M., Leong, C.-O., Faquin, W., Rocco, J.W., and Ellisen, L.W. (2006). Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* *66*, 9362–9368.
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A.J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nat. Genet.* *4*, 42–46.
- Dong, P., Xu, Z., Jia, N., Li, D., and Feng, Y. (2009). Elevated expression of p53 gain-of-function mutation R175H in endometrial cancer cells can increase the invasive phenotypes by activation of the EGFR/PI3K/AKT pathway. *Mol. Cancer* *8*, 103.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I.J., and Wishart, D.S. (2004). PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res.* *32*, W660–664.
- Drasin, D.J., Robin, T.P., and Ford, H.L. (2011). Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res.* *13*, 226.
- Drouin, J., Sun, Y.L., Chamberland, M., Gauthier, Y., De Léan, A., Nemer, M., and Schmidt, T.J. (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *Embo J.* *12*, 145–156.
- Duan, W., Ding, H., Subler, M.A., Zhu, W.-G., Zhang, H., Stoner, G.D., Windle, J.J., Otterson, G.A., and Villalona-Calero, M.A. (2002). Lung-specific expression of human mutant p53-273H is associated with a high frequency of lung adenocarcinoma in transgenic mice. *Oncogene* *21*, 7831–7838.
- Duan, W., Gao, L., Wu, X., Hade, E.M., Gao, J.-X., Ding, H., Barsky, S.H., Otterson, G.A., and Villalona-Calero, M.A. (2009). Expression of a mutant p53 results in an age-related demographic shift in spontaneous lung tumor formation in transgenic mice. *PLoS ONE* *4*, e5563.
- Dulić, V., Stein, G.H., Far, D.F., and Reed, S.I. (1998). Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 546–557.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* *75*, 817–825.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 8763–8767.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* *312*, 646–649.
- Escaff, S., Fernández, J.M., González, L.O., Suárez, A., González-Reyes, S., González, J.M., and Vizoso, F.J. (2010). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br. J. Cancer* *102*, 922–929.
- Evans-Storms, R.B., and Cidlowski, J.A. (2000). Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor-kappaB. *Endocrinology* *141*, 1854–1862.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J., and Livingston, D.M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* *73*, 487–497.
- Eyfeldt, J.E., Thorlacius, S., Steinarsdottir, M., Valgardsdottir, R., Ogmundsdottir, H.M., and Anamthawat-Jonsson, K. (1995). p53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. *Cancer Res.* *55*, 646–651.

- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 Is a RING Finger-Dependent Ubiquitin Protein Ligase for Itself and P53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945–8951.
- Fantozzi, A., and Christofori, G. (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 8, 212.
- Fata, J.E., Werb, Z., and Bissell, M.J. (2004). Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res.* 6, 1–11.
- Felding-Habermann, B., Habermann, R., Saldívar, E., and Ruggeri, Z.M. (1996). Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J. Biol. Chem.* 271, 5892–5900.
- Feng, Z., Zhang, C., Wu, R., and Hu, W. (2011). Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol* 3, 44–50.
- Ferrero, J.M., Ramaioli, A., Formento, J.L., Francoal, M., Etienne, M.C., Peyrottes, I., Ettore, F., Leblanc-Talent, P., Namer, M., and Milano, G. (2000). P53 determination alongside classical prognostic factors in node-negative breast cancer: an evaluation at more than 10-year follow-up. *Ann. Oncol.* 11, 393–397.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453–458.
- Fidler, I.J., Yano, S., Zhang, R.-D., Fujimaki, T., and Bucana, C.D. (2002). The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol.* 3, 53–57.
- Fingleton, B. (2006). Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front. Biosci.* 11, 479–491.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083–1093.
- Flores, E.R., Sengupta, S., Miller, J.B., Newman, J.J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2005). Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 7, 363–373.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186.
- Folkman, J. (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 79, 1–8.
- Forouzanfar, M.H., Foreman, K.J., Delossantos, A.M., Lozano, R., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., and Naghavi, M. (2011). Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet* 378, 1461–1484.
- Fraley, S.I., Feng, Y., Krishnamurthy, R., Kim, D.-H., Celedon, A., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2010). A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat. Cell Biol.* 12, 598–604.
- Frankfurt, O., and Rosen, S.T. (2004). Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Curr Opin Oncol* 16, 553–563.
- Freedman, D.A., and Levine, A.J. (1999). Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein—thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 59, 1–7.
- Freedman, D.A., Wu, L., and Levine, A.J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 96–107.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 445–457.
- Friedl, P., Noble, P.B., Walton, P.A., Laird, D.W., Chauvin, P.J., Tabah, R.J., Black, M., and Zänker, K.S. (1995). Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer Res.* 55, 4557–4560.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., and Prives, C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1874–1887.
- Gay, L.J., and Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 11, 123–134.
- Gerstel, D., Wegwitz, F., Jannasch, K., Ludwig, P., Scheike, K., Alves, F., Beauchemin, N., Deppert, W., Wagener, C., and Horst, A.K. (2011). CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation. *Oncogene.*
- Geyer, R.K., Yu, Z.K., and Maki, C.G. (2000). The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat. Cell Biol.* 2, 569–573.
- Giono, L.E., and Manfredi, J.J. (2006). The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J. Cell. Physiol.* 209, 13–20.
- Goh, A.M., Coffill, C.R., and Lane, D.P. (2011). The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol* 223, 116–126.

- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J.* *18*, 6462–6471.
- Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N.L., and Rosen, S.T. (2002). Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin. Cancer Res.* *8*, 1681–1694.
- Grego-Bessa, J., Díez, J., Timmerman, L., and de la Pompa, J.L. (2004). Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle* *3*, 718–721.
- Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* *10*, 593–601.
- Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze-Schleithoff, E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Lena, A.M., Candi, E., Terrinoni, A., Catani, M.V., et al. (2005). TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *Embo J.* *24*, 2458–2471.
- Grimberg, A., Coleman, C.M., Shi, Z., Burns, T.F., MacLachlan, T.K., Wang, W., and El-Deiry, W.S. (2006). Insulin-like growth factor binding protein-2 is a novel mediator of p53 inhibition of insulin-like growth factor signaling. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 1408–1414.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* *90*, 595–606.
- Guarino, M., Rubino, B., and Ballabio, G. (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* *39*, 305–318.
- Guo, X., Keyes, W.M., Papazoglu, C., Zuber, J., Li, W., Lowe, S.W., Vogel, H., and Mills, A.A. (2009). TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1451–1457.
- Gurova, K.V., Rokhlin, O.W., Budanov, A.V., Burdelya, L.G., Chumakov, P.M., Cohen, M.B., and Gudkov, A.V. (2003). Cooperation of two mutant p53 alleles contributes to Fas resistance of prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* *63*, 2905–2912.
- Haisma, H.J., Pinedo, H.M., Rijswijk, A., der Meulen-Muileman, I., Sosnowski, B.A., Ying, W., Beusechem, V.W., Tillman, B.W., Gerritsen, W.R., and Curiel, D.T. (1999). Tumor-specific gene transfer via an adenoviral vector targeted to the pan-carcinoma antigen EpCAM. *Gene Ther.* *6*, 1469–1474.
- Hamidouche, Z., Fromigué, O., Ringe, J., Häupl, T., Vaudin, P., Pagès, J.-C., Srouji, S., Livne, E., and Marie, P.J. (2009). Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 18587–18591.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hardy, K.M., Yatskevych, T.A., Konieczka, J., Bobbs, A.S., and Antin, P.B. (2011). FGF signalling through RAS/MAPK and PI3K pathways regulates cell movement and gene expression in the chicken primitive streak without affecting E-cadherin expression. *BMC Dev. Biol.* *11*, 20.
- Harms, K., Nozell, S., and Chen, X. (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 822–842.
- Harms, K.L., and Chen, X. (2006). The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death & Differentiation* *13*, 890–897.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* *75*, 805–816.
- Harrison, H., Farnie, G., Howell, S.J., Rock, R.E., Stylianou, S., Brennan, K.R., Bundred, N.J., and Clarke, R.B. (2010). Regulation of Breast Cancer Stem Cell Activity by Signaling Through the Notch4 Receptor. *Cancer Res* *70*, 709–718.
- Harvey, D.M., and Levine, A.J. (1991). p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* *5*, 2375–2385.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* *387*, 296–299.
- Hay, E.D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* *233*, 706–720.
- Heinlein, C. (2006). Einfluss von mutiertem p53 auf die Entwicklung von Mammakarzinomen in einem transgenen Mausmodell [Mus musculus (Linnaeus)].
- Heinlein, C., Krepulat, F., Löhler, J., Speidel, D., Deppert, W., and Tolstonog, G.V. (2008). Mutant p53(R270H) gain of function phenotype in a mouse model for oncogene-induced mammary carcinogenesis. *Int. J. Cancer* *122*, 1701–1709.

- Hennighausen, L. (1990). The mammary gland as a bioreactor: production of foreign proteins in milk. *Protein Expr. Purif.* 1, 3–8.
- Hermeking, H., and Benzinger, A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin. Cancer Biol.* 16, 183–192.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1, 3–11.
- Hernandez-Boussard, T., Montesano, R., and Hainaut, P. (1999). Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genet. Anal.* 14, 229–233.
- Herrlich, P. (2001). Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene* 20, 2465–2475.
- Hess, K.R., Varadhachary, G.R., Taylor, S.H., Wei, W., Raber, M.N., Lenzi, R., and Abbruzzese, J.L. (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* 106, 1624–1633.
- Hicklin, D.J., and Ellis, L.M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 23, 1011–1027.
- Hinds, P., Finlay, C., and Levine, A.J. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* 63, 739–746.
- Hinds, P.W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I., and Weinberg, R.A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70, 993–1006.
- Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5–8.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635–641.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53.
- Hood, J.D., and Cheresh, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2, 91–100.
- Hotary, K., Li, X.-Y., Allen, E., Stevens, S.L., and Weiss, S.J. (2006). A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev.* 20, 2673–2686.
- Howe, L.R., and Brown, A.M.C. (2004). Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* 3, 36–41.
- Hsiao, M., Low, J., Dorn, E., Ku, D., Pattengale, P., Yeargin, J., and Haas, M. (1994). Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *Am. J. Pathol.* 145, 702–714.
- Hu, F., Wang, C., Guo, S., Sun, W., Mi, D., Gao, Y., Zhang, J., Zhu, T., and Yang, S. (2011).  $\delta$ EF1 promotes osteolytic metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells by regulating MMP-1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1809, 200–210.
- Hu, Y.-Y., Zheng, M.-H., Zhang, R., Liang, Y.-M., and Han, H. (2012). Notch signaling pathway and cancer metastasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 727, 186–198.
- Huang, Y., Song, N., Ding, Y., Yuan, S., Li, X., Cai, H., Shi, H., and Luo, Y. (2009). Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Res.* 69, 7529–7537.
- Hung, C.-M., Kuo, D.-H., Chou, C.-H., Su, Y.-C., Ho, C.-T., and Way, T.-D. (2011). Osteolysis suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition via repression of the c-Met/Akt/mTOR pathway in human breast cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9683–9690.
- Iggo, R., Gatter, K., Bartek, J., Lane, D., and Harris, A.L. (1990). Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335, 675–679.
- Imasato, A., Desbois-Mouthon, C., Han, J., Kai, H., Cato, A.C.B., Akira, S., and Li, J.-D. (2002). Inhibition of P38 MAPK by Glucocorticoids Via Induction of MAPK Phosphatase-1 Enhances Nontypeable Haemophilus Influenzae-Induced Expression of Toll-Like Receptor 2. *J. Biol. Chem.* 277, 47444–47450.
- Iwai, S., Yonekawa, A., Harada, C., Hamada, M., Katagiri, W., Nakazawa, M., and Yura, Y. (2010). Involvement of the Wnt- $\beta$ -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 37, 1095–1103.
- Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., and Grünert, S. (2002). Ras and TGF[ $\beta$ ] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 156, 299–313.
- Jannasch, K., Dullin, C., Heinlein, C., Krepulat, F., Wegwitz, F., Deppert, W., and Alves, F. (2009). Detection of different tumor growth kinetics in single transgenic mice with oncogene-induced mammary carcinomas by flat-panel volume computed tomography. *Int. J. Cancer* 125, 62–70.

- Jechlinger, M., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., Kraut, N., Capodiecci, P., Donovan, M., Cordon-Cardo, C., Beug, H., and Grünert, S. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J. Clin. Invest.* *116*, 1561–1570.
- Jenkins, J.R., Rudge, K., and Currie, G.A. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* *312*, 651–654.
- Jezierska, A., and Motyl, T. (2009). Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med. Sci. Monit.* *15*, RA32–40.
- Johnsen, M., Lund, L.R., Rømer, J., Almholt, K., and Danø, K. (1998). Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 667–671.
- Jong, Y.-J., Li, L.-H., Tsou, M.-H., Chen, Y.-J., Cheng, S.H., Wang-Wuu, S., Tsai, S.-F., Chen, C.-M., Huang, A.T., Hsu, M.-T., et al. (2004). Chromosomal comparative genomic hybridization abnormalities in early- and late-onset human breast cancers: correlation with disease progression and TP53 mutations. *Cancer Genet. Cytogenet.* *148*, 55–65.
- Jürgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 4997–5002.
- Kalluri, R., and Neilson, E.G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* *112*, 1776–1784.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* *119*, 1420–1428.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 392–401.
- Kalo, E., Buganim, Y., Shapira, K.E., Besserglick, H., Goldfinger, N., Weisz, L., Stambolsky, P., Henis, Y.I., and Rotter, V. (2007). Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 8228–8242.
- Kamradt, M.C., Walter, S., Koudelik, J., Shafer, L., Weijzen, S., Velders, M., and Vaughan, A.T. (2001). Steroid-mediated inhibition of radiation-induced apoptosis in C4-1 cervical carcinoma cells is p53-dependent. *Eur. J. Cancer* *37*, 2240–2246.
- Kassel, O., Sancono, A., Krätzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., and Cato, A.C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J.* *20*, 7108–7116.
- Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., and Ishioka, C. (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 8424–8429.
- Keely, P.J. (2011). Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *16*, 205–219.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Baker, S.J., Nigro, J.M., Rotter, V., Levine, A.J., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. *Oncogene* *6*, 131–136.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* *141*, 52–67.
- Kharwanlang, B., and Sharma, R. (2011). Molecular interaction between the glucocorticoid receptor and MAPK signaling pathway: a novel link in modulating the anti-inflammatory role of glucocorticoids. *Indian J. Biochem. Biophys.* *48*, 236–242.
- Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W.E.F., Goldbrunner, R., Herms, J., and Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat. Med.* *16*, 116–122.
- Kim, E., and Deppert, W. (2006). The versatile interactions of p53 with DNA: when flexibility serves specificity. *Cell Death Differ.* *13*, 885–889.
- Kim, H.-D., Meyer, A.S., Wagner, J.P., Alford, S.K., Wells, A., Gertler, F.B., and Lauffenburger, D.A. (2011a). Signaling network state predicts twist-mediated effects on breast cell migration across diverse growth factor contexts. *Mol. Cell Proteomics* *10*, M111.008433.
- Kim, K., Lu, Z., and Hay, E.D. (2002). Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol. Int.* *26*, 463–476.
- Kim, T., Veronese, A., Pichiorri, F., Lee, T.J., Jeon, Y.-J., Volinia, S., Pineau, P., Marchio, A., Palatini, J., Suh, S.-S., et al. (2011b). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *The Journal of Experimental Medicine* *208*, 875–883.
- Klagsbrun, M., and A. D'Amore, P. (1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *7*, 259–270.

- Kleihues, P., Schäuble, B., zur Hausen, A., Estève, J., and Ohgaki, H. (1997). Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am. J. Pathol.* *150*, 1–13.
- Klein, A., Guhl, E., Zollinger, R., Tzeng, Y.-J., Wessel, R., Hummel, M., Graessmann, M., and Graessmann, A. (2005). Gene expression profiling: cell cycle deregulation and aneuploidy do not cause breast cancer formation in WAP-SVT/t transgenic animals. *J. Mol. Med.* *83*, 362–376.
- Cluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* *275*, 1132–1136.
- Knouf, E.C., Garg, K., Arroyo, J.D., Correa, Y., Sarkar, D., Parkin, R.K., Wurz, K., O'Briant, K.C., Godwin, A.K., Urban, N.D., et al. (2012). An integrative genomic approach identifies p73 and p63 as activators of miR-200 microRNA family transcription. *Nucleic Acids Res.* *40*, 499–510.
- Koga, F., Kawakami, S., Fujii, Y., Saito, K., Ohtsuka, Y., Iwai, A., Ando, N., Takizawa, T., Kageyama, Y., and Kihara, K. (2003). Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin. Cancer Res.* *9*, 5501–5507.
- Kogan-Sakin, I., Tabach, Y., Buganim, Y., Molchadsky, A., Solomon, H., Madar, S., Kamer, I., Stambolsky, P., Shelly, A., Goldfinger, N., et al. (2011). Mutant p53(R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells. *Cell Death Differ.* *18*, 271–281.
- Kolosova, I., Nethery, D., and Kern, J.A. (2011). Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* *226*, 1248–1254.
- Kong, D., Wang, Z., Sarkar, S.H., Li, Y., Banerjee, S., Saliganan, A., Kim, H.-R.C., Cher, M.L., and Sarkar, F.H. (2008). Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells. *Stem Cells* *26*, 1425–1435.
- Kouros-Mehr, H., and Werb, Z. (2006). Candidate regulators of mammary branching morphogenesis identified by genome-wide transcript analysis. *Dev. Dyn.* *235*, 3404–3412.
- Krepulat, F., Löhler, J., Heinlein, C., Hermannstädter, A., Tolstonog, G.V., and Deppert, W. (2005). Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice. *Oncogene* *24*, 4645–4659.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol.* *31*, 472–483.
- Kretschmer, C., Conradi, A., Kemmer, W., and Sterner-Kock, A. (2011). Latent transforming growth factor binding protein 4 (LTBP4) is downregulated in mouse and human DCIS and mammary carcinomas. *Cell Oncol (Dordr)* *34*, 419–434.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299–303.
- Kuperwasser, C., Hurlbut, G.D., Kittrell, F.S., Dickinson, E.S., Laucirica, R., Medina, D., Naber, S.P., and Jerry, D.J. (2000). Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am. J. Pathol.* *157*, 2151–2159.
- Kuwana, T., and Newmeyer, D.D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 691–699.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* *278*, 261–263.
- Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.-A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., et al. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* *119*, 861–872.
- Lányi, A., Deb, D., Seymour, R.C., Ludes-Meyers, J.H., Subler, M.A., and Deb, S. (1998). “Gain of function” phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid-binding domain. *Oncogene* *16*, 3169–3176.
- Laptenko, O., and Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* *13*, 951–961.
- Laronga, C., Yang, H.Y., Neal, C., and Lee, M.H. (2000). Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* *275*, 23106–23112.
- Larue, L., and Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* *24*, 7443–7454.
- Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 9136–9141.

- Levine, A.J. (1993). The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 623–651.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453–456.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9, 749–758.
- Levine, A.J., Wu, M.C., Chang, A., Silver, A., Attiyeh, E.F., Lin, J., and Epstein, C.B. (1995). The spectrum of mutations at the p53 locus. Evidence for tissue-specific mutagenesis, selection of mutant alleles, and a “gain of function” phenotype. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 768, 111–128.
- Li, F., Tiede, B., Massagué, J., and Kang, Y. (2007). Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 17, 3–14.
- Li, R., Sutphin, P.D., Schwartz, D., Matas, D., Almog, N., Wolkowicz, R., Goldfinger, N., Pei, H., Prokocimer, M., and Rotter, V. (1998). Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene* 16, 3269–3277.
- Li, Y., Yang, J., Dai, C., Wu, C., and Liu, Y. (2003). Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* 112, 503–516.
- Lindahl, T., Landberg, G., Ahlgren, J., Nordgren, H., Norberg, T., Klaar, S., Holmberg, L., and Bergh, J. (2004). Overexpression of cyclin E protein is associated with specific mutation types in the p53 gene and poor survival in human breast cancer. *Carcinogenesis* 25, 375–380.
- Lindley, L.E., and Briegel, K.J. (2010). Molecular characterization of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 399, 659–664.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52.
- Liu, H., Zeeberg, B.R., Qu, G., Koru, A.G., Ferrucci, A., Kahn, A., Ryan, M.C., Nuhanovic, A., Munson, P.J., Reinhold, W.C., et al. (2007). AffyProbeMiner: a web resource for computing or retrieving accurately redefined Affymetrix probe sets. *Bioinformatics* 23, 2385–2390.
- Liu, K., Ling, S., and Lin, W.-C. (2011). TopBP1 Mediates Mutant p53 Gain of Function through NF- $\kappa$ B and p63/p73. *Molecular and Cellular Biology* 31, 4464–4481.
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139, 1861–1872.
- Locopo, N., Fanelli, M., and Gasparini, G. (1998). Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 52, 159–173.
- Lohrum, M.A., Woods, D.B., Ludwig, R.L., Bálint, E., and Vousden, K.H. (2001). C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8521–8532.
- Lotem, J., and Sachs, L. (1995). A mutant p53 antagonizes the deregulated c-myc-mediated enhancement of apoptosis and decrease in leukemogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9672–9676.
- Lukashchuk, N., and Vousden, K.H. (2007). Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8284–8295.
- Madan, E., Gogna, R., Bhatt, M., Pati, U., Kuppusamy, P., and Mahdi, A.A. (2011). Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget* 2, 948–957.
- Maddocks, O.D.K., and Vousden, K.H. (2011). Metabolic regulation by p53. *J. Mol. Med.* 89, 237–245.
- Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., and Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 16, 87–93.
- Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O’Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., et al. (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat. Genet.* 25, 47–54.
- Martin, F.T., Dwyer, R.M., Kelly, J., Khan, S., Murphy, J.M., Curran, C., Miller, N., Hennessy, E., Dockery, P., Barry, F.P., et al. (2010). Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res. Treat.* 124, 317–326.
- Matas, D., Sigal, A., Stambolsky, P., Milyavsky, M., Weisz, L., Schwartz, D., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2001). Integrity of the N-terminal transcription domain of p53 is required for mutant p53 interference with drug-induced apoptosis. *Embo J.* 20, 4163–4172.

- Medici, D., and Nawshad, A. (2010). Type I collagen promotes epithelial-mesenchymal transition through ILK-dependent activation of NF-kappaB and LEF-1. *Matrix Biol.* **29**, 161–165.
- Meek, D.W., and Anderson, C.W. (2009). Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000950.
- Melino, G. (2011). p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. *Cell Death Differ.*
- Menendez, D., Inga, A., and Resnick, M.A. (2009). The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 724–737.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 117–134.
- Midgley, C.A., and Lane, D.P. (1997). p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene* **15**, 1179–1189.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* **4**, e115.
- Mikosz, C.A., Brickley, D.R., Sharkey, M.S., Moran, T.W., and Conzen, S.D. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 16649–16654.
- Miller, L.D., Smeds, J., George, J., Vega, V.B., Vergara, L., Ploner, A., Pawitan, Y., Hall, P., Klaar, S., Liu, E.T., et al. (2005). An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13550–13555.
- Milner, J., and Medcalf, E.A. (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* **65**, 765–774.
- Milner, J., Medcalf, E.A., and Cook, A.C. (1991). Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 12–19.
- Minn, A.J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G.P., Giri, D.D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W.L., Blasberg, R., and Massagué, J. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J. Clin. Invest.* **115**, 44–55.
- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 631–636.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237–1245.
- Moody, S.E., Perez, D., Pan, T., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sterner, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D., and Chodosh, L.A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* **8**, 197–209.
- Moody, S.E., Sarkisian, C.J., Hahn, K.T., Gunther, E.J., Pickup, S., Dugan, K.D., Innocent, N., Cardiff, R.D., Schnall, M.D., and Chodosh, L.A. (2002). Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell* **2**, 451–461.
- Morselli, E., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Kepp, O., Criollo, A., Vicencio, J.M., Soussi, T., and Kroemer, G. (2008). Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* **7**, 3056–3061.
- Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., et al. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* **188**, 2033–2045.
- Muller, P.A.J., Caswell, P.T., Doyle, B., Iwanicki, M.P., Tan, E.H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D.A., Ludwig, R.L., Gosselin, P., et al. (2009). Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* **139**, 1327–1341.
- Muller, P.A.J., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *The Journal of Cell Biology* **192**, 209–218.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **275**, 13321–13329.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R., and Leder, P. (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**, 105–115.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Müller, B., Wiesmüller, L., Deppert, W., and Grosse, F. (1996). p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* **85**, 1089–1099.

- Muraoka, R.S., Dumont, N., Ritter, C.A., Dugger, T.C., Brantley, D.M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L.R., Ryan, S., Gotwals, P.J., et al. (2002). Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J. Clin. Invest.* *109*, 1551–1559.
- Muraoka-Cook, R.S., Shin, I., Yi, J.Y., Easterly, E., Barcellos-Hoff, M.H., Yingling, J.M., Zent, R., and Arteaga, C.L. (2006). Activated type I TGFbeta receptor kinase enhances the survival of mammary epithelial cells and accelerates tumor progression. *Oncogene* *25*, 3408–3423.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* *85*, 817–827.
- Nabeshima, K., Inoue, T., Shima, Y., Kataoka, H., and Kono, M. (1999). Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol. Histopathol.* *14*, 1183–1197.
- Nakamura, K., Yano, H., Schaefer, E., and Sabe, H. (2001). Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of Fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of specific phosphorylation events using site-directed antibodies. *Oncogene* *20*, 2626–2635.
- Napier, S.L., Healy, Z.R., Schnaar, R.L., and Konstantopoulos, K. (2007). Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J. Biol. Chem.* *282*, 3433–3441.
- Nathanson, S.D. (2003). Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* *98*, 413–423.
- Nguyen, D.X., and Massagué, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Reviews Genetics* *8*, 341–352.
- Nicholls, C.D., McLure, K.G., Shields, M.A., and Lee, P.W.K. (2002). Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *J. Biol. Chem.* *277*, 12937–12945.
- Niculescu, A.B., 3<sup>rd</sup>, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 629–643.
- Nie, L., Sasaki, M., and Maki, C.G. (2007). Regulation of P53 Nuclear Export Through Sequential Changes in Conformation and Ubiquitination. *J. Biol. Chem.* *282*, 14616–14625.
- Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., and Männel, D.N. (1999). Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* *59*, 1295–1300.
- Nollau, P., and Mayer, B.J. (2001). Profiling the Global Tyrosine Phosphorylation State by Src Homology 2 Domain Binding. *Pnas* *98*, 13531–13536.
- Nousbeck, J., Sarig, O., Avidan, N., Indelman, M., Bergman, R., Ramon, M., Enk, C.D., and Sprecher, E. (2009). Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 Regulates Keratinocyte Proliferation, Differentiation and Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology* *130*, 378–387.
- Novak, A., Hsu, S.-C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelley, C., Grosschedl, R., and Dedhar, S. (1998). Cell Adhesion and the Integrin-Linked Kinase Regulate the LEF-1 and B-Catenin Signaling Pathways. *Pnas* *95*, 4374–4379.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* *119*, 847–860.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001008.
- Olivier, M., Langerød, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., Theillet, C., Rodriguez, C., Lidereau, R., Bièche, I., et al. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *12*, 1157–1167.
- Oren, M., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001107.
- Otto, B. (2008). Identifikation von metastasierungsrelevanten Genen in humanen und murinen Tumorzellen. Universität.
- Overgaard, J., Yilmaz, M., Guldborg, P., Hansen, L.L., and Alsner, J. (2000). TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta Oncol* *39*, 327–333.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., and Kruzel, E. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3032–3040.

- Palumbo, J.S., Talmage, K.E., Massari, J.V., La Jeunesse, C.M., Flick, M.J., Kombrinck, K.W., Jirousková, M., and Degen, J.L. (2005). Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105, 178–185.
- Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649–651.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 365–375.
- Peiró, G., Adrover, E., Sánchez-Tejada, L., Lerma, E., Planelles, M., Sánchez-Payá, J., Aranda, F.I., Giner, D., and Gutiérrez-Aviñó, F.J. (2011). Increased insulin-like growth factor-1 receptor mRNA expression predicts poor survival in immunophenotypes of early breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 24, 201–208.
- Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190–193.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28, 622–629.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pharoah, P.D., Day, N.E., and Caldas, C. (1999). Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 80, 1968–1973.
- Picksley, S.M., Vojtesek, B., Sparks, A., and Lane, D.P. (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;—fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* 9, 2523–2529.
- Pilcher, B.K., Dumin, J.A., Sudbeck, B.D., Krane, S.M., Welgus, H.G., and Parks, W.C. (1997). The Activity of Collagenase-1 Is Required for Keratinocyte Migration on a Type I Collagen Matrix. *J Cell Biol* 137, 1445–1457.
- Pinedo, H.M., Verheul, H.M., D'Amato, R.J., and Folkman, J. (1998). Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 352, 1775–1777.
- Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273.
- Pratt, W.B. (1998). The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217, 420–434.
- Prives, C., and Manley, J.L. (2001). Why is p53 acetylated? *Cell* 107, 815–818.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993–1000.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., et al. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123–127.
- Ray, D.W., Suen, C.S., Brass, A., Soden, J., and White, A. (1999). Structure/function of the human glucocorticoid receptor: tyrosine 735 is important for transactivation. *Mol. Endocrinol.* 13, 1855–1863.
- Reynisdóttir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massagué, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9, 1831–1845.
- Rideout, W.M., 3<sup>rd</sup>, Coetzee, G.A., Olumi, A.F., and Jones, P.A. (1990). 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249, 1288–1290.
- Robert-Koch-Institut (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8458–8467.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., and Hay, R.T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J.* 18, 6455–6461.
- Rogatsky, I., Trowbridge, J.M., and Garabedian, M.J. (1997). Glucocorticoid Receptor-Mediated Cell Cycle Arrest Is Achieved Through Distinct Cell-Specific Transcriptional Regulatory Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3181–3193.
- Roger, L., Jullien, L., Gire, V., and Roux, P. (2010). Gain of oncogenic function of p53 mutants regulates E-cadherin expression uncoupled from cell invasion in colon cancer cells. *J. Cell. Sci* 123, 1295–1305.
- Römer, L., Klein, C., Dehner, A., Kessler, H., and Buchner, J. (2006). p53—a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 45, 6440–6460.

- Rotter, V. (1983). p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 2613–2617.
- Rotter, V., Abutbul, H., and Ben-Ze'ev, A. (1983). P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *Embo J.* *2*, 1041–1047.
- Runnebaum, I.B., and Brüning, A. (2005). Glucocorticoids Inhibit Cell Death in Ovarian Cancer and Up-Regulate Caspase Inhibitor clAP2. *Clin Cancer Res* *11*, 6325–6332.
- Rutz, H.P., and Herr, I. (2004). Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. *Cancer Biol. Ther.* *3*, 715–718.
- Ryan, M.C., Zeeberg, B.R., Caplen, N.J., Cleland, J.A., Kahn, A.B., Liu, H., and Weinstein, J.N. (2008). SpliceCenter: A suite of web-based bioinformatic applications for evaluating the impact of alternative splicing on RT-PCR, RNAi, microarray, and peptide-based studies. *BMC Bioinformatics* *9*, 313.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *74*, 5463–5467.
- Schlossmacher, G., Stevens, A., and White, A. (2011). Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J. Endocrinol.* *211*, 17–25.
- Schulze-Garg, C., Löhler, J., Gocht, A., and Deppert, W. (2000). A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene* *19*, 1028–1037.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 6565–6577.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1991a). Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res.* *51*, 5232–5237.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M.S., Levine, A.J., and Rotter, V. (1991b). Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* *6*, 2055–2065.
- Sheng, Q., Love, T.M., and Schaffhausen, B. (2000). J domain-independent regulation of the Rb family by polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* *74*, 5280–5290.
- Sherr, C.J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 731–737.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325–334.
- Shintani, Y., Fukumoto, Y., Chaika, N., Svoboda, R., Wheelock, M.J., and Johnson, K.R. (2008). Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J. Cell Biol.* *180*, 1277–1289.
- Sigal, A., and Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* *60*, 6788–6793.
- Sipos, F., and Galamb, O. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J. Gastroenterol.* *18*, 601–608.
- Skoczylas, C., Henglein, B., and Rundell, K. (2005). PP2A-dependent transactivation of the cyclin A promoter by SV40 ST is mediated by a cell cycle-regulated E2F site. *Virology* *332*, 596–601.
- Smith, M.L., Gourdon, D., Little, W.C., Kubow, K.E., Eguiluz, R.A., Luna-Morris, S., and Vogel, V. (2007). Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* *5*, e268.
- Snizek, J.C., Matheny, K.E., Westfall, M.D., and Pietenpol, J.A. (2004). Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* *114*, 2063–2072.
- Soini, Y., Tuhkanen, H., Sironen, R., Virtanen, I., Kataja, V., Auvinen, P., Mannermaa, A., and Kosma, V.-M. (2011). Transcription factors zeb1, twist and snai1 in breast carcinoma. *BMC Cancer* *11*, 73.
- Solozobova, V., and Blattner, C. (2011). p53 in stem cells. *World J Biol Chem* *2*, 202–214.
- Song, C.Z., Tian, X., and Gelehrter, T.D. (1999). Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor-beta signaling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 11776–11781.
- Song, H., Hollstein, M., and Xu, Y. (2007). p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat. Cell Biol.* *9*, 573–580.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 10869–10874.

- Soussi, T., and Bérout, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 1, 233–240.
- Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T., and Brabletz, T. (2006). A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 131, 830–840.
- Steegenga, W.T., van der Eb, A.J., and Jochemsen, A.G. (1996). How phosphorylation regulates the activity of p53. *J. Mol. Biol.* 263, 103–113.
- Stenmark-Askmal, M., Stål, O., Sullivan, S., Ferraud, L., Sun, X.F., Carstensen, J., and Nordenskjöld, B. (1994). Cellular accumulation of p53 protein: an independent prognostic factor in stage II breast cancer. *Eur. J. Cancer* 30A, 175–180.
- Sternlicht, M.D., Kouros-Mehr, H., Lu, P., and Werb, Z. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74, 365–381.
- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccarini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M., et al. (2002). Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J. Biol. Chem.* 277, 18817–18826.
- Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F.N., Yang, C.-Q., Kalluri, R., Müller, G.A., and Neilson, E.G. (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 61, 1714–1728.
- Stürzbecher, H.W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., and Jenkins, J.R. (1992). A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene* 7, 1513–1523.
- Sun, X.F., Carstensen, J.M., Zhang, H., Stål, O., Wingren, S., Hatschek, T., and Nordenskjöld, B. (1992). Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 340, 1369–1373.
- Surlin, V., Ioana, M., and Pleşea, I.E. (2011). Genetic patterns of metalloproteinases and their tissular inhibitors - clinicopathologic and prognostic significance in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 52, 231–236.
- Szymańska, K., and Hainaut, P. (2003). TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim. Pol.* 50, 231–238.
- Takebe, N., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2011). Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res.* 13, 211.
- Tao, G., Levay, A.K., Gridley, T., and Lincoln, J. (2011). Mmp15 is a direct target of Snai1 during endothelial to mesenchymal transformation and endocardial cushion development. *Dev. Biol.* 359, 209–221.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., et al. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 15449–15454.
- Taylor, W.R., Egan, S.E., Mowat, M., Greenberg, A.H., and Wright, J.A. (1992). Evidence for synergistic interactions between ras, myc and a mutant form of p53 in cellular transformation and tumor dissemination. *Oncogene* 7, 1383–1390.
- Taylor-Papadimitriou, J., Stampfer, M., Bartek, J., Lewis, A., Boshell, M., Lane, E.B., and Leigh, I.M. (1989). Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J. Cell. Sci.* 94 ( Pt 3), 403–413.
- Terzian, T., Suh, Y.-A., Iwakuma, T., Post, S.M., Neumann, M., Lang, G.A., Van Pelt, C.S., and Lozano, G. (2008). The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes Dev* 22, 1337–1344.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol* 15, 740–746.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131–142.
- Thomas, S.N., Schnaar, R.L., and Konstantopoulos, K. (2009). Podocalyxin-like protein is an E-/L-selectin ligand on colon carcinoma cells: comparative biochemical properties of selectin ligands in host and tumor cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 296, C505–513.
- Thomas, S.N., Zhu, F., Schnaar, R.L., Alves, C.S., and Konstantopoulos, K. (2008). Carcinoembryonic antigen and CD44 variant isoforms cooperate to mediate colon carcinoma cell adhesion to E- and L-selectin in shear flow. *J. Biol. Chem.* 283, 15647–15655.

- Thompson, T., Tovar, C., Yang, H., Carvajal, D., Vu, B.T., Xu, Q., Wahl, G.M., Heimbrook, D.C., and Vassilev, L.T. (2004). Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 53015–53022.
- Thomson, S., Petti, F., Sujka-Kwok, I., Mercado, P., Bean, J., Monaghan, M., Seymour, S.L., Argast, G.M., Epstein, D.M., and Haley, J.D. (2011). A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin. Exp. Metastasis* *28*, 137–155.
- Tomlinson, D.C., Lamont, F.R., Shnyder, S.D., and Knowles, M.A. (2009). FGFR1 promotes proliferation and survival via activation of the MAPK pathway in bladder cancer. *Cancer Res* *69*, 4613–4620.
- Townsend, T.A., Wrana, J.L., Davis, G.E., and Barnett, J.V. (2008). Transforming growth factor-beta-stimulated endocardial cell transformation is dependent on Par6c regulation of RhoA. *J. Biol. Chem.* *283*, 13834–13841.
- Trimboli, A.J., Fukino, K., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., et al. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* *68*, 937–945.
- Tumbarello, D.A., and Turner, C.E. (2007). Hic-5 contributes to epithelial-mesenchymal transformation through a RhoA/ROCK-dependent pathway. *J. Cell. Physiol.* *211*, 736–747.
- Turashvili, G., Bouchal, J., Baumforth, K., Wie, W., Dziechciarkova, M., Ehrmann, J., Klein, J., Fridman, E., Skarda, J., Srovnal, J., et al. (2007). Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer* *7*, 55.
- Turner, B.C., Gumbs, A.A., Carbone, C.J., Carter, D., Glazer, P.M., and Haffty, B.G. (2000). Mutant p53 protein overexpression in women with ipsilateral breast tumor recurrence following lumpectomy and radiation therapy. *Cancer* *88*, 1091–1098.
- Urist, M.J., Di Como, C.J., Lu, M.-L., Charytonowicz, E., Verbel, D., Crum, C.P., Ince, T.A., McKeon, F.D., and Cordon-Cardo, C. (2002). Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am. J. Pathol.* *161*, 1199–1206.
- Vandewalle, C., Van Roy, F., and Berx, G. (2009). The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci* *66*, 773–787.
- Vikhanskaya, F., Lee, M.K., Mazzoletti, M., Broggin, M., and Sabapathy, K. (2007). Cancer-derived p53 mutants suppress p53-target gene expression—potential mechanism for gain of function of mutant p53. *Nucleic Acids Res.* *35*, 2093–2104.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* *408*, 307–310.
- Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2003). Knockdown stands up. *Trends Biotechnol.* *21*, 2–4.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 594–604.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* *137*, 413–431.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* *55*, 5187–5190.
- Walker, K.K., and Levine, A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 15335–15340.
- Walsh, L.A., and Damjanovski, S. (2011). IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF- $\beta$ 1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell Commun Signal* *9*, 10.
- Watson, C.J., and Khaled, W.T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* *135*, 995–1003.
- Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C., and Fehse, B. (2008a). A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.* *16*, 698–706.
- Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C., and Fehse, B. (2008b). A Multicolor Panel of Novel Lentiviral “Gene Ontology” (LeGO) Vectors for Functional Gene Analysis. *Molecular Therapy* *16*, 698–706.
- Wegwitz, F. (2010). Entdeckung, Charakterisierung und Modulation des Tumorstammzellsystems im WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell. Universität Hamburg.
- Wegwitz, F., Kluth, M.-A., Mänz, C., Otto, B., Gruner, K., Heinlein, C., Kühl, M., Warnecke, G., Schumacher, U., Deppert, W., et al. (2010). Tumorigenic WAP-T mouse mammary carcinoma cells: a model for a self-reproducing homeostatic cancer cell system. *PLoS ONE* *5*, e12103.
- Weinberg, R.L., Freund, S.M.V., Veprintsev, D.B., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (2004). Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J. Mol. Biol.* *342*, 801–811.

- Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Ong, E.S., Harmon, J.M., Brower, S.T., Cidlowski, J., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science* 228, 740–742.
- Weiss, L. (1992). Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin. Exp. Metastasis* 10, 191–199.
- Weiss, L. (2000). Patterns of Metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 19, 281–301.
- Weisz, L., Damalas, A., Lontos, M., Karakaidos, P., Fontemaggi, G., Maor-Aloni, R., Kalis, M., Levrero, M., Strano, S., Gorgoulis, V.G., et al. (2007). Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res.* 67, 2396–2401.
- Weisz, L., Zalcenstein, A., Stambolsky, P., Cohen, Y., Goldfinger, N., Oren, M., and Rotter, V. (2004). Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res.* 64, 8318–8327.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., et al. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol* 11, 1487–1495.
- Wendt, M.K., Taylor, M.A., Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2011). Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol. Biol. Cell* 22, 2423–2435.
- Weng, D., Penzner, J.H., Song, B., Koido, S., Calderwood, S.K., and Gong, J. (2012). Metastasis is an early event in mouse mammary carcinomas and is associated with cells bearing stem cell markers. *Breast Cancer Research: BCR* 14, R18.
- Widén, C., Ziliacius, J., Gustafsson, J.-Å., and Wikström, A.-C. (2000). Glucocorticoid Receptor Interaction with 14-3-3 and Raf-1, a Proposed Mechanism for Cross-Talk of Two Signal Transduction Pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 39296–39301.
- Wirtz, D. (2009). Particle-tracking microrheology of living cells: principles and applications. *Annu Rev Biophys* 38, 301–326.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., and Searson, P.C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer* 11, 512–522.
- Wolf, D., Harris, N., and Rotter, V. (1984). Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 38, 119–126.
- Wong, R.P.C., Tsang, W.P., Chau, P.Y., Co, N.N., Tsang, T.Y., and Kwok, T.T. (2007). p53-R273H gains new function in induction of drug resistance through down-regulation of procaspase-3. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1054–1061.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3<sup>rd</sup>, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., et al. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 17, 141–143.
- Wu, W., Chaudhuri, S., Brickley, D.R., Pang, D., Karrison, T., and Conzen, S.D. (2004). Microarray Analysis Reveals Glucocorticoid-Regulated Survival Genes That Are Associated With Inhibition of Apoptosis in Breast Epithelial Cells. *Cancer Res* 64, 1757–1764.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701–704.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156–172.
- Xu, L., Corcoran, R.B., Welsh, J.W., Pennica, D., and Levine, A.J. (2000). WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev.* 14, 585–595.
- Yamamoto, K.R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 19, 209–252.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305–316.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.
- Yemelyanov, A., Czornog, J., Chebotaev, D., Karseladze, A., Kulevitch, E., Yang, X., and Budunova, I. (2006). Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate. *Oncogene* 26, 1885–1896.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345–347.

- Yu, L., Hébert, M.C., and Zhang, Y.E. (2002). TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses. *Embo J* 21, 3749–3759.
- Zambetti, G.P., and Levine, A.J. (1993). A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *Faseb J.* 7, 855–865.
- Zhang, H., Bajraszewski, N., Wu, E., Wang, H., Moseman, A.P., Dabora, S.L., Griffin, J.D., and Kwiatkowski, D.J. (2007). PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J. Clin. Invest.* 117, 730–738.
- Zhang, Y., Yan, W., and Chen, X. (2011). Mutant p53 disrupts MCF-10A cell polarity in 3-dimensional culture via epithelial-to-mesenchymal transitions. *J Biol Chem.*
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19, 128–139.
- Zhu, C., Qi, X., Chen, Y., Sun, B., Dai, Y., and Gu, Y. (2011). PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 1587–1594.
- Zhu, C., Yago, T., Lou, J., Zarnitsyna, V.I., and McEver, R.P. (2008). Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion. *Ann Biomed Eng* 36, 604–621.
- Zhu, J., Zhang, S., Jiang, J., and Chen, X. (2000). Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 39927–39934.

## 8. Anhang

### 8.1. Listen der differenziell regulierten Gene

**Tabelle 18: Liste der mind. 2-fach herunterregulierten Gene in undifferenzierten W10-NP8 Tumoren**  
Alphabetisch sortiert, FC – *Fold change*

Symbol	Herunterregulierte Gene	Entrez Gene	FC	p-Wert
2610020H08Rik	RIKEN cDNA 2610020H08 gene	434234	-2.41	0.000
4933411K20Rik	RIKEN cDNA 4933411K20 gene	66756	-5.10	0.000
Acss2	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	60525	-2.51	0.027
AK220484	cDNA sequence AK220484	381157	-2.53	0.025
Akap12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	83397	-2.85	0.038
Apolipoprotein L, 3-like	Apolipoprotein L, 3-like	108956	-3.16	0.003
Arhgap26	Rho GTPase activating protein 26	71302	-2.25	0.036
Arid5b	AT rich interactive domain 5B (Mrf1 like)	71371	-2.03	0.000
Atrx	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (human)	22589	-2.53	0.001
Bhlhb8	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 8	17341	-5.39	0.045
Casc5	Cancer susceptibility candidate 5	76464	-6.73	0.000
Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1	26365	-3.81	0.000
Chn2	Chimerin (chimaerin) 2	69993	-2.97	0.008
Clca5	Chloride channel calcium activated 5	229933	-3.97	0.028
D030022P06Rik	RIKEN cDNA D030022P06 gene	546001	-3.36	0.000
Ddx46	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	212880	-2.14	0.000
Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	13209	-2.83	0.000
Esco1	Establishment of cohesion 1 homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	77805	-5.31	0.000
Etv1	Ets variant gene 1	14009	-3.56	0.040
Fads3	Fatty acid desaturase 3	60527	-2.31	0.000
Fcmd	Fukuyama type congenital muscular dystrophy homolog (human)	246179	-2.41	0.000
Foxi1	Forkhead box l1	14233	-5.74	0.025
Gm1752	Gene model 1752, (NCBI)	385658	-3.07	0.038
Il6ra	Interleukin 6 receptor, alpha	16194	-2.14	0.011
Insig1	Insulin induced gene 1	231070	-2.10	0.000
Morf4l1	Mortality factor 4 like 1	21761	-2.31	0.000
Ncapg	On-SMC 156emaphorin I complex, subunit G	54392	-3.92	0.000
Pkd2l2	Polycystic kidney disease 2-like 2	53871	-3.48	0.000
Ppp1cb	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	19046	-3.68	0.000
Rpe	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	66646	-4.06	0.000
Rpl17	Ribosomal protein L17	319195	-2.14	0.004
Sfrs18	Splicing factor, arginine/serine-rich 18	66625	-2.14	0.001
Slc34a2	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	20531	-2.11	0.002
Tcf15	Transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	277353	-7.94	0.000
Tesc	Tescalcin	57816	-4.63	0.023
Timd2	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2	171284	-2.68	0.022
Tspyl4	TSPY-like 4	72480	-2.06	0.002

**Tabelle 19: Liste der mind. 2-fach hochregulierten Gene in undifferenzierten W10-NP8 Tumoren**Alphabetisch sortiert, FC – *Fold change*

Symbol	Hochregulierte Gene	Entrez Gene	FC	p-Wert
2310016C16Rik	RIKEN cDNA 2310016C16 gene	69590	2.55	0.008
4930572J05Rik	RIKEN cDNA 4930572J05 gene	223626	7.26	0.001
Adam12	A disintegrin and metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha)	11489	2.45	0.025
Adamts2	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	216725	3.07	0.009
Adssl1	Adenylosuccinate synthetase like 1	11565	2.03	0.031
Ahdc1	AT hook, DNA binding motif, containing 1	230793	2.38	0.001
AI480556	Expressed sequence AI480556	233208	2.13	0.000
Akap2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	11641	2.45	0.021
Alcam	Activated leukocyte cell adhesion molecule	11658	3.36	0.022
Angptl2	Angiopoietin-like 2	26360	3.48	0.013
Angptl4	Angiopoietin-like 4	57875	3.27	0.015
Ankrd1	Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	107765	4.59	0.016
Antxr1	Anthrax toxin receptor 1	69538	2.57	0.014
Anxa11	Annexin A11	11744	2.17	0.000
Aoc3	Amine oxidase, copper containing 3	11754	4.08	0.001
Apbb2	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2	11787	2.14	0.006
Apobec3	Apolipoprotein B editing complex 3	80287	2.64	0.004
Arhgap10	Rho GTPase activating protein 10	78514	2.03	0.006
B4galt2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 2	53418	2.03	0.036
BC065085	cDNA sequence BC065085	219148	7.31	0.035
Bcat2	Branched chain aminotransferase 2, mitochondrial	12036	2.38	0.001
Bgn	Biglycan	12111	2.77	0.005
Bicc1	Bicaudal C homolog 1 (Drosophila)	83675	5.06	0.015
C030006K11Rik	RIKEN cDNA C030006K11 gene	223665	2.07	0.010
C030039L03Rik	RIKEN cDNA C030039L03 gene	112415	2.68	0.001
Cadps2	Ca <sup>2+</sup> -dependent activator protein for secretion 2	320405	6.11	0.003
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10	105844	2.03	0.003
Cbx6	Chromobox homolog 6	494448	3.03	0.032
Cbx7	Chromobox homolog 7	52609	2.27	0.008
Ccdc80	Coiled-coil domain containing 80	67896	2.69	0.047
Cd93	CD93 antigen	17064	2.17	0.009
Cdh13	Cadherin 13	12554	2.27	0.020
Cfp	Complement factor properdin	18636	2.22	0.009
Chrnb1	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (muscle)	11443	2.04	0.012
Cmtm8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8	70031	2.06	0.002
Col15a1	Procollagen, type XV	12819	3.01	0.000
Col1a1	Procollagen, type I, alpha 1	12842	4.50	0.002
Col5a1	Procollagen, type V, alpha 1	12831	3.14	0.025
Col5a2	Procollagen, type V, alpha 2	12832	2.50	0.022
Col5a3	Procollagen, type V, alpha 3	53867	2.93	0.002

Symbol	Hochregulierte Gene	Entrez Gene	FC	p-Wert
Col6a2	Procollagen, type VI, alpha 2	12834	2.83	0.025
Col6a3	Procollagen, type VI, alpha 3	12835	2.36	0.008
Cpxm1	Carboxypeptidase X 1 (M14 family)	56264	3.29	0.050
Cxcl4	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4	56744	3.20	0.018
Cygb	Cytoglobin	114886	2.45	0.032
Cyp2d22	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22	56448	2.50	0.026
Dak	Dihydroxyacetone kinase 2 homolog (yeast)	225913	2.08	0.007
Des	Desmin	13346	4.63	0.037
Dnm1	Dynamin 1	13429	2.41	0.005
Dtx3	Deltex3	80904	2.19	0.000
E430018J23Rik	RIKEN cDNA E430018J23 gene	101604	2.57	0.003
Ece1	Endothelin converting enzyme 1	230857	2.19	0.014
Edg3	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	13610	2.89	0.003
Eef1a2	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	13628	3.03	0.024
Emilin2	Elastin microfibril interfacier 2	246707	2.20	0.002
Eng	Endoglin	13805	2.35	0.003
Espn	Espin	56226	3.03	0.009
F13a1	Coagulation factor XIII, A1 subunit	74145	4.06	0.046
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	14182	2.01	0.008
Flnb	Filamin, beta	286940	2.36	0.001
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	14254	2.33	0.033
Fscn1	Fascin homolog 1, actin bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	14086	2.31	0.022
Fstl1	Follistatin-like 1	14314	2.85	0.035
Fstl3	Follistatin-like 3	83554	2.23	0.026
Gpr176	G protein-coupled receptor 176	381413	2.62	0.027
Gpr56	G protein-coupled receptor 56	14766	2.77	0.017
Gpsm3	G-protein 158emaphori modulator 3 (AGS3-like, C. elegans)	106512	2.33	0.001
Gpx7	Glutathione peroxidase 7	67305	2.99	0.043
H2afb3	H2A histone family, member B3	624957	2.27	0.000
H6pd	Hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	100198	2.01	0.036
Hal	Histidine ammonia lyase	15109	2.91	0.010
Hmga1	High mobility group AT-hook 1	15361	3.29	0.003
Hspb1	Heat shock protein 1	15507	2.27	0.004
Hspg2	Perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)	15530	3.51	0.003
Htra1	HtrA serine peptidase 1	56213	3.23	0.030
Icam2	Intercellular adhesion molecule 2	15896	2.06	0.038
Igfbp7	Insulin-like growth factor binding protein 7	29817	2.06	0.003
Inhba	Inhibin beta-A	16323	5.39	0.004
Itga5	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	16402	3.01	0.002
Jup	Junction plakoglobin	16480	2.06	0.000
Klhl23	Kelch-like 23 (Drosophila)	277396	4.79	0.004
Krt79	Keratin 79	223917	4.82	0.012
Large	Like-glycosyltransferase	16795	2.53	0.030

Symbol	Hochregulierte Gene	Entrez Gene	FC	p-Wert
Leng8	Leukocyte receptor cluster (LRC) member 8	232798	2.25	0.000
Lfng	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	16848	2.31	0.007
Lhfp	Lipoma HMGIC fusion partner	108927	3.12	0.008
Loxl1	Lysyl oxidase-like 1	16949	3.81	0.023
Loxl2	Lysyl oxidase-like 2	100047339	2.39	0.025
Lrp1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	16971	2.58	0.008
Lrrc61	Leucine rich repeat containing 61	243371	2.39	0.023
Lrrfip1	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	16978	2.03	0.001
Ltbp4	Latent transforming growth factor beta binding protein 4	108075	2.50	0.013
Map3k11	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 11	26403	2.46	0.009
Mapre3	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	100732	2.50	0.001
Mical1	Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1	171580	2.03	0.010
Mm.176231.1	Mm.176231.1		3.18	0.035
Mmp10	Matrix metalloproteinase 10	17384	4.14	0.014
Mmp11	Matrix metalloproteinase 11	17385	2.14	0.037
Mmp12	Matrix metalloproteinase 12	17381	2.55	0.019
Mmp3	Matrix metalloproteinase 3	17392	4.79	0.020
Mobk12b	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)	214944	3.68	0.024
Mrc2	Mannose receptor, C type 2	17534	4.00	0.036
Msrb3	Methionine sulfoxide reductase B3	320183	2.31	0.027
Nav1	Neuron navigator 1	215690	2.10	0.004
Notch4	Notch gene homolog 4 (Drosophila)	18132	2.00	0.007
Nr1d1	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	217166	2.45	0.037
Olfm1	Olfactomedin 1	56177	2.64	0.025
Olfml2b	Olfactomedin-like 2B	320078	2.62	0.006
Osr1	Odd-skipped related 1 (Drosophila)	23967	4.59	0.011
Palm	Paralemmin	18483	2.01	0.020
Parp3	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3	235587	2.22	0.009
Pcolce	Procollagen C-endopeptidase enhancer protein	18542	2.97	0.023
Pctk3	PCTAIRE-motif protein kinase 3	18557	2.10	0.017
Pdgfb	Platelet derived growth factor, B polypeptide	18591	2.83	0.000
Pdgfb	Platelet derived growth factor, B polypeptide	18591	3.34	0.000
Pdgfra	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	18595	3.89	0.021
Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	18596	2.17	0.006
Pdpm	Podoplanin	14726	3.68	0.006
Pla1a	Phospholipase A1 member A	85031	3.27	0.010
Porcn	Porcupine homolog (Drosophila)	53627	2.04	0.035
Ppic	Peptidylprolyl isomerase C	19038	2.16	0.030
Ppp1r14a	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	68458	2.75	0.013
Ppp2r3a	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B'', alpha	19054	2.38	0.004
Prrx1	Paired related homeobox 1	18933	2.41	0.024
Prss23	Protease, serine, 23	76453	2.28	0.008

Symbol	Hochregulierte Gene	Entrez Gene	FC	p-Wert
Ptms	Parathymosin	69202	2.01	0.000
Rarres2	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	71660	2.46	0.027
Rasal2	RAS protein activator like 2	226525	2.50	0.001
Rcn3	Reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	52377	2.95	0.032
Scx	Scleraxis	20289	3.12	0.015
Sdc1	Syndecan 1	20969	2.06	0.016
Sema3f	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (160emaphoring) 3 F	20350	2.00	0.001
Sept4	Septin 4	18952	2.11	0.013
Sf3a2	Splicing factor 3a, subunit 2	20222	2.19	0.000
Snai1	Snail homolog 1 (Drosophila)	20613	2.83	0.000
Spsb1	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	74646	2.08	0.007
Sspn	Sarcospan	16651	2.57	0.024
Sulf1	Sulfatase 1	240725	3.27	0.025
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	21803	2.30	0.000
Tgfb1i1	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	21804	2.91	0.020
Thy1	Thymus cell antigen 1, theta	21838	4.08	0.004
Tie1	Tyrosine kinase receptor 1	21846	2.95	0.008
Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	21859	2.39	0.019
Tmem45a	Transmembrane protein 45a	56277	2.55	0.011
Tnfsf9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	21950	2.04	0.015
Tnnt2	Troponin T2, cardiac	21956	5.43	0.006
Tpm2	Tropomyosin 2, beta	22004	4.20	0.012
Trp53	Transformation related protein 53	22059	5.46	0.002
Ttyh3	Tweety homolog 3 (Drosophila)	78339	2.20	0.000
Wdtdc1	WD and tetratricopeptide repeats 1	230796	2.73	0.001
Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	22402	3.01	0.026
Wnt5a	Wingless-related MMTV integration site 5A	22418	2.83	0.039
Wwox	WW domain-containing oxidoreductase	80707	2.10	0.000
Xylb	Xylulokinase homolog (H. influenzae)	102448	2.00	0.010
Zc3h3	Zinc finger CCCH type containing 3	223642	2.53	0.001
Zeb1	Zinc finger E-box binding homeobox 1	21417	2.55	0.014
Zfp703	Zinc finger protein 703	353310	2.62	0.000
Zfpm1	Zinc finger protein, multitype 1	22761	2.08	0.012
Znhit4	Zinc finger, HIT type 4	70020	2.06	0.000

## 8.2. Vektorkarten der verwendeten Plasmide

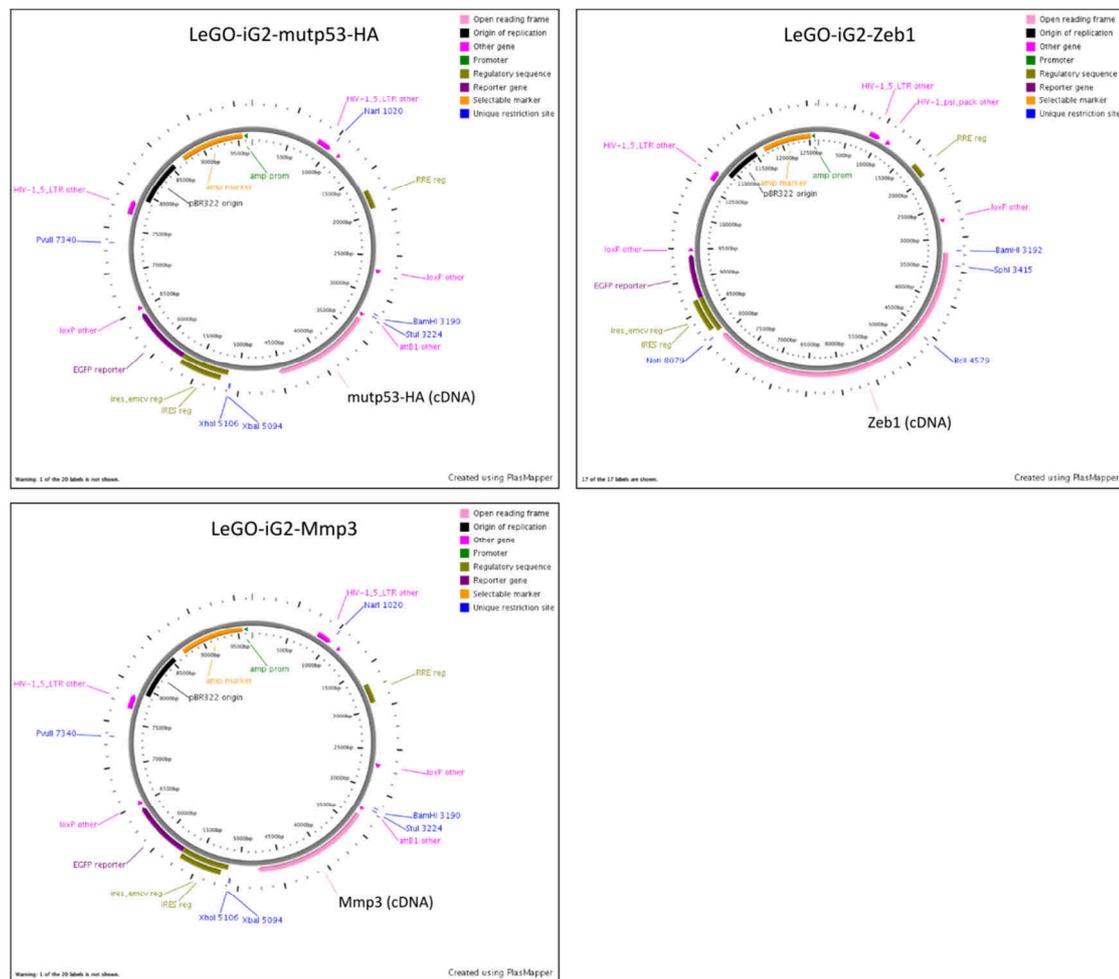


Abbildung 55: Karten der verwendeten Plasmide

Plasmidkarten wurden mit Hilfe des Web-basierten Programms Plasmapper erstellt (Dong et al., 2004)

## 8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Multistritt-Prozess der Metastasierung .....	2
Abbildung 2: Frühe Ereignisse während der EMT .....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung von EMT-assoziierten Signalwegen .....	6
Abbildung 4: Parallele EMT-Funktionen während der normalen Entwicklung einer Brustdrüse und in der Mammakarzinogenese .....	8
Abbildung 5: Struktur von p53 .....	11
Abbildung 6: Schema der p53-Funktionen .....	13
Abbildung 7: Prävalenzen für somatische p53-Mutationen in verschiedenen Krebserkrankungen und Mutationsarten im p53-Gen .....	15
Abbildung 8: Verteilung der Mutationshäufigkeit in den Codons von p53 .....	16
Abbildung 9: Interaktion von mutp53 mit p63 .....	18
Abbildung 10: Schema der Tumorentstehung in dem WAP-T Mausmodell .....	22
Abbildung 11: Überblick der Drei-Schritt-Mutagenese (Handbuch <i>QuikChange® Lightning Site-directed</i> Mutagenese Kit, Stratagene) .....	38
Abbildung 12: Schematische Darstellung des lentiviralen LeGO-mutp53 Konstrukts .....	39

Abbildung 13: Schematische Darstellung der lentiviralen LeGO-Mmp3 und LeGO-Zeb1 Konstrukte.....	40
Abbildung 14: Lokalisation und Benennung der murinen Mammagewebe und Unterteilung des Stagings.....	48
Abbildung 15: Einstellungen für die Partikelanalyse .....	67
Abbildung 16: Überlebenskurven der verschiedenen Mauslinien.....	70
Abbildung 17: Anzahl der Tumore pro Maus.....	71
Abbildung 18: Histologische Klassifizierung der Mammarkarzinome .....	72
Abbildung 19: Entwicklung von pulmonalen Metastasen .....	73
Abbildung 20: Einfluss von mutp53 auf die Vaskularisierung in WAP-T Tumoren .....	75
Abbildung 21: Kollagen IV-Färbung an Tumorschnitten .....	76
Abbildung 22: Disseminierte Tumorzellen im Blutgefäß am Beispiel eines NP8 Tumors.....	77
Abbildung 23: Phospho-Tyrosin-Profil der undifferenzierten NP8 und W10-NP8 Tumorproben .....	79
Abbildung 24: Heatmap differenziell exprimierter Gene in NP8 und W10-NP8 Tumoren.....	83
Abbildung 25: Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mit Hilfe der qPCR .....	87
Abbildung 26: Erfolge der Etablierung von WAP-T Tumorzellen und Morphologie der Primärzellen in Kultur.....	89
Abbildung 27: Genexpressionsanalyse der Transgene in primären WAP-T Tumorzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zellisolierung .....	90
Abbildung 28: H&E-Färbung der Primärtumore, aus denen die Zelllinien generiert wurden ....	92
Abbildung 29: Phasenkontrastbilder der etablierten Tumorzellsysteme .....	92
Abbildung 30: Genexpression der Transgene und epithelialer sowie mesenchymaler Marker mittels qPCR.....	94
Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung einer frühen Passage der H8N8 Zellen (Passage 6)..	95
Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung einer späten Passage der H8N8 Zellen (Passage 101) .....	96
Abbildung 33: Immunfluoreszenzanalyse von H22N8 Zellen (Passage 14) .....	96
Abbildung 34: Tumorigenität der H8N8 Zellen in NP8 Mäusen.....	98
Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung von transplantierten Tumoren.....	99
Abbildung 36: Beispiel für die Analyse der disseminierten H8N8 Zellen nach Transplantation .....	100
Abbildung 37: Entwicklung pulmonaler Metastasen nach Transplantation von H8N8 Zellen .	101
Abbildung 38: Validierung der EMT-Signatur in G-2 und H8N8 Zellen .....	103
Abbildung 39: Einfluss von Tgfβ1 und PDGF-BB auf die Morphologie der Tumorzellen .....	104
Abbildung 40: Quantitative PCR der H8N8 und G-2 Zellen nach Tgfβ1- bzw. PDGF-BB-Stimulation .....	105
Abbildung 41: Immunfluoreszenzfärbungen der H8N8 und G-2 Zellen sieben Tage nach Tgfβ1- und PDGF-BB-Stimulation .....	106
Abbildung 42: Mutp53-überxprimierende G-2 Zellen .....	107
Abbildung 43: Relative Quantifizierung einer ektopen mutp53-Expression und der Effekt auf die Expression weitere Gene .....	108
Abbildung 44: Mutp53-Expression in G-2 Zellen und seine Wirkung auf den Epcam-Spiegel..	109
Abbildung 45: Einfluss der Zeb1- und Mmp3-Expression auf die Morphologie der H8N8 Zellen .....	110

Abbildung 46: Expression der Transgene <i>Mmp3</i> und <i>Zeb1</i> in H8N8 Zellen und deren Einfluss auf die <i>Epcam</i> -Expression .....	111
Abbildung 47: Ektope Expression der EMT-assoziierten Gene <i>Mmp3</i> und <i>Zeb1</i> in H8N8 Zellen und deren Effekt auf den <i>Epcam</i> -Proteinspiegel .....	112
Abbildung 48: Auswirkung der Überexpression von <i>Zeb1</i> und <i>Mmp3</i> auf die Disseminierungseigenschaft der H8N8 Zellen .....	115
Abbildung 49: <i>Zeb-1</i> und <i>Mmp3</i> -Expression in transplantierten NP8 Tumoren mittels qPCR. ....	116
Abbildung 50: p63-Level in NP8 und W10-NP8 Tumoren sowie das Ergebnis der Immunopräzipitation .....	118
Abbildung 51: Quantifizierung der primären Mikro-RNAs in NP8 und W10-NP8 Tumoren.....	120
Abbildung 52: Zytoplasmatische Lokalisation von mutp53 in W10-NP8 Tumoren .....	122
Abbildung 53: Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors in G-2 Zellen, transduziert mit mutp53 .....	123
Abbildung 54: Mögliche Aktivierung der Tgf $\beta$ - und MAPK-Signalwege durch mutp53-vermittelte Inaktivierung des Glucocorticoidrezeptors .....	136
Abbildung 55: Karten der verwendeten Plasmide .....	161

#### 8.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mauslinien und deren spezifische mutp53-Expression.....	24
Tabelle 2: Pipettierschema eines Restriktionsverdau .....	37
Tabelle 3: Temperaturprogramm der Mutagenesereaktion .....	39
Tabelle 4: Pipettierschema einer cDNA-Synthese-Reaktion .....	53
Tabelle 5: Temperaturzyklus einer cDNA-Synthese-Reaktion .....	54
Tabelle 6: Temperatur-Programm einer qPCR.....	55
Tabelle 7: Pipettieransatz einer Standard-PCR .....	57
Tabelle 8: Temperatur-Programm einer Standard-PCR.....	57
Tabelle 9: Bedeutung und Darstellung der Signifikanz .....	67
Tabelle 10: Nomenklatur der Mausstämme und Expressionslevel von mutp53 während der Laktation .....	69
Tabelle 11: Zusammenfassung des Tumorwachstums bezogen auf NP8 und H8-NP8.....	71
Tabelle 12: Ergebnisse der ersten statistischen, bioinformatischen Auswertung der Mikroarrayexperimente (Auswertung von G. Tolstonog und B. Otto) .....	82
Tabelle 13: Ergebnis der Genexpressionsanalyse: EMT-assoziierte Gene (Unterschied der W10-NP8 zu NP8).....	85
Tabelle 14: Anzahl der Tumore für Zellextraktion .....	88
Tabelle 15: Übersicht der auswertbaren Tiere und PCR-Ergebnisse der disseminierten Tumorzellen in distante Organe.....	100
Tabelle 16: Wachstumsdauer der transplantierten H8N8 Zellen in NP8 Mäusen.....	113
Tabelle 17: Ergebnisse der mutp53-PCRs für disseminierte Tumorzellen.....	114
Tabelle 18: Liste der mind. 2-fach herunterregulierten Gene in undifferenzierten W10-NP8 Tumoren.....	156
Tabelle 19: Liste der mind. 2-fach hochregulierten Gene in undifferenzierten W10-NP8 Tumoren.....	157

## 8.5. Abkürzungen

(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
Ceacam1	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>
Crk	<i>V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	<i>4,6 Diamidino-2-phenylidol</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
dd	Doppelt destilliert oder bidestilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant-negativer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRAQ5	<i>1,5-bis[[2-(di-methylamino) ethyl]amino]-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione</i>
E-Cdh	<i>E-Cadherin</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced</i> )
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Etv1	<i>Ets variant gene 1</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FC	<i>Fold change</i>
FCS	fötales Kälberserum
Fgfr	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GC	Glucocorticoid
GoF	Funktionszugewinn ( <i>Gain of function</i> )
GR	Glucocorticoidrezeptor
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
H	Histidin
H&E	Hämalaun und Eosin
H8-NP8, H22-NP8	WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R270H</sup>
HA	Hämagglutinin
HKG	<i>House keeping gene</i>
IHC	Immunohistochemie
IP	Immunopräzipitation
IRES	<i>Internal ribosomal entry side</i>
Itga5	<i>Integrin alpha 5</i>
K	Keratin

kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
LB	<i>Lysogeny broth medium</i>
LoF	Funktionsverlust ( <i>Loss of function</i> )
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MG	Mammagewebe
MMP	Matrix-Metalloprotease
mutp53	Mutiertes p53
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Nkt	Nukleotid
NP8	WAP-T-NP8
NTD	N-terminale Domäne
OD	Optische Dichte
OD	Oligomerisierungsdomäne
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pdgf	<i>Platelet-derived growth factor</i>
Pdgfr	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
pRB	Retinoblastomgen
R	Arginin
RD	Regulatorische Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	Relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>Standard error of the mean</i> )
SFFV	<i>Spleen-focous forming virus</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
st	kleines T-Antigen (SV40)
SV40	Simian Virus 40
T-Ag	großes T-Antigen (SV40)
Tgfβ1	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tgfβ1i1	<i>Transforming growth factor beta inducible protein</i>
Thy1	<i>Thymocyte differentiation antigen 1</i>
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumeneinheit pro Gesamtvolumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
W	Tryptophan
w/v	Gewichtseinheit pro Gesamtvolumen
W1-NP8, W4-NP8, W10-NP8	WAP-T-NP8xWAP-mutp53 <sup>R245W</sup>
WAP	<i>Whey acid protein</i>

WB	Western Blot
Wisp1	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 1</i>
wtp53	Wildtyp-p53
Zeb1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

## 8.6. Sicherheitstechnische Daten

Nachfolgend sind die in der Arbeit verwendeten Gefahrstoffe aufgelistet. Für jede Substanz wurden die Sicherheitskodierungen und P- und H-Sätze nach dem „Global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien“ (GHS) angegeben.

### 8.6.1. Gefahrstoffe

Substanz	GHS-Kodierung	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 261, 305+351+338
Acrylamid	GHS06/08	H301, 312, 315, 317, 319, H332, 340, 350, 361f, 372	P201, 281, 301+310, 302+352, 304+340, 305+351+338
APS	GHS03/07/08	H272, 302, 319, 335, 334, 317	P280, 305+351+338, 302+352, 304+341, 342+311
Bisacrylamid	GHS07	H302	P264, 270, 301+312, 330
Chloroform	GHS07/08	H351, 302, 373, 315	P302+352, 314
DEPC	GHS07	H302, 315, 319, 332, 335	P280, 301+312, 302+352, 304+340, 305+351, 338
EDTA	GHS07	H319	P264, 280, 305+351+338, 337+313
Essigsäure	GHS02/05/07	H226, 332, 302, 314, 335	P280, 301+330+331, 305+351+338
Ethanol	GHS02	H225	P210, 240, 243, 280, 303+361+353
Ethidiumbromid	GHS06/08	H341, 330, 302	P281, 304+P340
Formaldehydlsg. 37%	GHS05/06/08	H330, 301+311, 314, 317, 335, 351, 370	P280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338
Isoamylalkohol	GHS02/07	H226, 332, 335	P210, 304+340
Isopropanol	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 233, 305+351+338
Methanol	GHS02/06/08	H225, 301, 311, 331, 370	P243, 280, 301+310, 302+350, 304+340, 307+311
Natriumazid	GHS06/09	H300, 410	P273
Natriumhydroxid	GHS05	H314, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338

---

Paraformaldehyd	GHS02/07/08	H228, 302, 315, 317, 319, 332, 335, 351	P202, 280, 302+352, 305+351+338, 308+313, 362
Phenol	GHS05/06/08	H301, 311, 314, 331, 341, 373	P261, 280, 301+310, 305+351+338, 310
Salzsäure 37 %	GHS05/07	H314, 335, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
SDS	GHS02/06	H228, 302, 311, 315, 319, 335	P210, 261, 280, 305+351+338
TEMED	GHS02/05/07	H225, 302, 314, 332	P243, 260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340
Triton X-100	GHS05/07	H302, 318	P280, 305+351+338
Trizma Base	GHS07	H315, 319, 335	P261, 305+351+338
Trypanblau	GHS08	H350	P201, 308+313
Wasserstoffperoxid 30%	GHS03/05/07	H: 271, 332, 302, 314	P220, 261, 280, 305+351+338, 310
β-Mercapto-ethanol	GHS05/06/09	H301, 310, 315, 317, 318, 330, 400, 410	P262, 280, 301+310, 302+350, 305+351+338, 363

---

## 8.6.2. Liste der GHS-Kodierungen und der zugehörigen Piktogramme

Piktogramm	GHS-Kodierung	Signalwort	Gefahrstoffklasse
	GHS01	Gefahr	instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, organische Peroxide
	GHS02	Gefahr	Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide
	GHS03	Gefahr	Entzündend (oxidierend) wirkend
	GHS04	Achtung	Gase unter Druck, verdichtete, verflüssigte, tiefgekühlt verfl., gelöste Gase
	GHS05	Gefahr/ Achtung	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	GHS06	Gefahr	Akute Toxizität
	GHS07	Achtung	Zusätzliche Kennzeichnung div. Kategorien
	GHS08	Gefahr	div. Gesundheitsgefahren
	GHS09	Achtung/ Gefahr	Gewässergefährdend

### 8.6.3. Auflistung der H- und P-Sätze

#### 8.6.3.1. H-Sätze

##### H200-Reihe: Physikalische Gefahren

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

##### H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

H370	Schädigt die Organe.
H371	Kann die Organe schädigen.
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.

**H400-Reihe: Umweltgefahren**

H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

**8.6.3.2. P-Sätze**

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P243	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
P261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

**P300-Reihe: Reaktion**

P310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P321	Besondere Behandlung.
P330	Mund ausspülen.
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P363	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

**Kombinationen der P-Sätze**

P301+310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+330+331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
P302+350	Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P302+352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P303+361+353	Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304+340	Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P304+341	Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305+351+338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P307+311	Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P308+313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat Einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P332+313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

## Danksagung

Viele Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt. Ihnen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Deppert für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen, dieses spannende Thema bearbeiten zu können sowie für seine unermüdliche Unterstützung, Geduld und Diskussionsbereitschaft im Verlauf dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Hahn möchte ich mich für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Florian Wegwitz. Dank seiner kompetenten Betreuung und unablässigen Unterstützung trug er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Mit seiner Diskussionsbereitschaft und stetigen Motivation half mir durch manch schwierige Zeiten. Ferner bin ich ihm dankbar für seinen Engagement beim Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich weiß, es war nicht immer einfach.

Weiterhin möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Mausgruppe für die fortwährende Unterstützung und für eine tolle Laboratmosphäre danken: Dr. Florian Wegwitz, Dr. Claudia Mänz, Annette Preuß, Julia Abe, Andrea Diesterbeck und Jasmin Oehlmann. Dank euch hat die Laborarbeit viel Spaß gemacht. Außerdem danke ich Claudia für das rasche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dr. Genrich Tolstonog und Dr. Benjamin Otto danke ich für die Hilfe bei den bioinformatischen Auswertungen. Bei Dr. Peter Nollau bedanke ich mich für die Kooperation und Unterstützung bei der Analyse der Phospho-Tyrosin-Profile.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen der Abteilung Tumorstudiologie und allen weiteren Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Instituts für das tolle Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft und die Freundschaft bedanken. Für unzählige Hilfestellungen und motivierende Gespräche, auch außerhalb vom Laboralltag, möchte ich Martina Hintz, Marion Kühl, Gundula Pilnitz-Stolze, Gabi Warnecke, Jara Wanger, Andreas Kluth und Katharina Gruner herzlich danken!

Freunde sind das Beste, was es gibt. Deswegen möchte ich all meinen Freunden danken, die mir beigestanden und mich über die ganze Zeit begleitet haben. Ganz besonders danke ich Astrid, Franzi und Conny für ihre Freundschaft und dafür, dass sie in guten wie in schlechten Zeiten für mich da waren. Heike danke ich für das schnelle Korrekturlesen und Beseitigen kleiner Fehler.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und Henry, die mich durch Ermutigung und Zuspruch jederzeit unterstützt haben. Danke, dass es euch gibt!