

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Gynäkologie

Prof. Dr. med Barbara Schmalfeldt

Die Rolle von Smurf1 bei der Progression des Mammakarzinoms: Einfluss auf die Entwicklung von Hirnmetastasen.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jule Cecilia Artzenroth
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.06.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Sabine Windhorst

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer

Für mein größtes Vorbild, meine Mutter.

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	I
2	Tabellenverzeichnis	I
3	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.2	Hirnmetastasierung beim Mammakarzinom	4
1.2.1	Epidemiologie und Klinik von Hirnmetastasen	4
1.2.2	Therapie von Hirnmetastasen	4
1.2.3	Die Blut-Hirn-Schranke	5
1.2.4	Molekulare Grundlagen der Entstehung von Hirnmetastasen beim Mammakarzinom	7
1.3	Smurf1	9
1.3.1	Aufbau und grundlegende Funktionen	9
1.3.2	Smurf1 in verschiedenen biologischen Prozessen	11
1.3.3	Smurf1 als Tumorpromotor verschiedener Tumore	13
1.3.4	Smurf1 im Mammakarzinom	14
1.4	Projektrelevante Vorarbeiten der AG Oliveira-Ferrer	15
1.5	Ziel der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellbiologische Methoden	28
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.4	Immunohistochemische Methoden	36
2.2.5	Statistik	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Auswahl der Brustkrebszelllinien anhand des Smurf1-mRNA Levels	39
3.2	Knockdown und Überexpression von Smurf1	41
3.2.1	Etablierung von Zelllinien mit stabilem Smurf1 Knockdown und Bestätigung mit qPCR und Western Blot	41

3.2.2	Etablierung von Zelllinien mit stabiler Smurf1 Überexpression und Bestätigung mit qPCR und WB Analysen	43
3.3	Adhäsion der SKBR3-Smurf1 KD und SKBR3-Smurf1^{hi} Zelllinien an hBMECs	46
3.3.1	Knockdown von Smurf1 in SKBR3 zeigt keinen Einfluss auf die Adhäsion an hBMEC 46	
3.3.2	Überexpression von Smurf1 in SKBR3 zeigt keinen Einfluss auf die Adhäsion an Hirnendothel	47
3.4	Adhäsion der MDA-MB-231-KD und MDA-MB-231-Smurf1^{hi} Zelllinien an hBMECs	48
3.4.1	Knockdown von Smurf1 in MDA-MB-231 zeigt keinen Einfluss auf die Adhäsion an das Hirnendothel	49
3.4.2	Überexpression von Smurf1 in MDA-MB-231 zeigt einen Einfluss auf die Adhäsion an Hirnendothel	50
3.5	Die Rolle von Smurf1 in der Invasion HER2-positiver und TN-Tumorzellen durch das Hirnendothel.....	51
3.5.1	Smurf1 KD und Überexpression in SKBR3 zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Invasion durch Hirnendothel	52
3.5.2	Knockdown und Überexpression von Smurf1 in MDA-MB-231 beeinflussen die Invasion durch Hirnendothel.....	54
4	Diskussion	56
4.1	Der Einfluss von Smurf1 auf die Adhäsionsfähigkeit von MaCa Zellen an hBMECs	56
4.2	Der Einfluss von Smurf1 auf die Invasionsfähigkeit von MaCa Zellen durch hBMECs	61
4.3	Limitationen der Methoden	65
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	67
5	Zusammenfassung.....	71
6	Summary	73
7	Literaturverzeichnis	74
8	Danksagung.....	84
9	Lebenslauf	86

10	Eidesstattliche Versicherung.....	87
-----------	--	-----------

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Entstehung von HM beim Mammakarzinom.....	8
Abbildung 1.2 Ubiquitin-Proteasom-System: Ablauf der Anlagerung von Ubiquitin an das Substrat. (Han et al., 2023)	10
Abbildung 1.3 Korrelation von Smurf1 mit der Progression des MaCa ex vivo	16
Abbildung 3.1 Charakterisierung der Smurf1-Expression in Brustkrebszelllinien mit unterschiedlichem molekularem Rezeptorprofil	40
Abbildung 3.2 Kontrolle des Transduktionserfolgs mittels qPCR und Western Blot.....	42
Abbildung 3.3 Immunhistochemischer Nachweis des Smurf1-Knockdowns in SKBR3 und MDA-MB-231.....	43
Abbildung 3.4 Kontrolle des Transduktionserfolgs mittels qPCR und Western Blot.....	44
Abbildung 3.5 Immunhistochemische Darstellung der Smurf1-Überexpression.....	45
Abbildung 3.6 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in SKBR3-KD Zelllinien	47
Abbildung 3.7 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in SKBR3-Smurf1 ^{hi}	48
Abbildung 3.8 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in MDA-MB-231-KD Zelllinien	50
Abbildung 3.9 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in MDA-MB-231-Smurf1 ^{hi} Zelllinien.....	51
Abbildung 3.10 Invasionsverhalten von SKBR3 durch hBMEC.....	53
Abbildung 3.11 Invasionsverhalten von MDA-MB-231 durch hBMEC.....	55

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Klassifikation des Mammakarzinoms (Cserni et al., 2018)	2
Tabelle 2.1 Chemikalien	18
Tabelle 2.2 Kits	19
Tabelle 2.3 Besondere Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 2.4 Plasmide	21
Tabelle 2.5 shRNA Sequenzen.....	21
Tabelle 2.6 Primer.....	21
Tabelle 2.7 Antikörper	22

Tabelle 2.8 Medium und Zellkultur-Zusätze	22
Tabelle 2.9 Zelllinien	23
Tabelle 2.10 Puffer und Lösungen	24
Tabelle 2.11 Geräte	26
Tabelle 2.12 MasterMix cDNA-Synthese	31
Tabelle 2.13 Programm zur cDNA-Synthese	31
Tabelle 2.14 MasterMix qPCR	31
Tabelle 2.15 qPCR-Programm.....	32
Tabelle 2.16 Stabil transfizierte Zelllinien	34
Tabelle 2.17 Herstellung der Standardreihe	35
Tabelle 2.18 Zusammensetzung der Gele	36

3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<i>ABC-Transporter</i>	ATP-binding cassette Transporter
ADH	Atypische duktale Hyperplasie
AEG1	astrocyte-elevated-gene 1
AG	Arbeitsgruppe
AJ	Adherens Junctions
AK	Antikörper
ALCAM	activated leucocyte cell adhesion molecule
aPKC	Atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase
ATCC	American Type Culture Collection
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMP	Bone morphogenic Protein
BRCA	Breast Cancer Gen
BRCP	Breast Cancer Resistance Protein
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCM2	Cerebral cavernous malformation 2
Cdh1	cdc20 homolog 1
cDNA	Komplementäre DNA
CDK	Cyclin dependent kinase
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary Zellen
CKIP-1	Casein kinase 2 interacting Protein-1
cMRT	Kraniale Magnetresonanztomographie
COX-2	Cyclooxygenase-2
CO2	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered, Regularly Interspaced Palindromic Repeat Associated Proteins
CRL5	Cullin-RING Ligase 5
CT	Computertomographie
CTC	Zirkulierende Tumorzellen
CXCL2	Chemokin-Ligand 2
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4

Da	Dalton
DAB2IP	disabeled ovarian carcinoma (DOC)-2/disabeled homolog (DAB)2 interactive protein
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
Dest.	destilliert
DMEM	Dubecco's modifies Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DUB	Deubiquitinierungsenzym
E. coli	Escherichia coli
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Östrogenrezeptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
et al.	Und andere
FAK	Focal adhesion kinases
GB	Glioblastom
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormone
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
hBMEC	Human brain microvascular endothelial cells
HECT	Homologous to E6AP C-Termius
HEK	Human embryonic kidney 293T
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2
HM	Hirnmetastasen
HR	Hormonrezeptor
HUVEC	Human umbilical endothelial cells
ICAM	Intercellulae adhesion molecule
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunohistochemie
IFN	Interferon
JAM	Junction adhesion molecule
JNK	c-Jun NH(2)-terminal kinase
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton

Ki-67	Kiel-Antigen Nr. 67
KISS-1	Kisspeptin-1
KNCC	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
KRC	Kolorektaleskarzinom
LIN	Lobuläre intraepitheliale Neoplasie
LMP-1	LIM mineralization protein-1
M	Fernmetastasen
MaCa	Mammakarzinom
MAPK	Mitogen-activated Proteinkinase
MC	Magenkarzinom
MDM	mouse double minute
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney - Zellen
MEK	mitogen-aktivierte Kinase
MEKK2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
MUC	Mucin
N	Nodalstatus
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NEDD4	Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 4
NF-KB	Nuclear Factor KB
Nm	Nanometer
O₂	Sauerstoff
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen
PBS (-/-)	Dulbecco's phosphate-buffered saline
PBS (+/+)	Dulbecco's phosphate-buffered saline mit MgCl ₂ and CaCl ₂
PC	Pankreaskarzinom
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkianse B
PKC	Proteinkinase C
PR	Progesteronrezeptor
PRICKLE1	Prickle Planar Cell Polarity Protein 1
PROTAC	Proteolysis targeting chimeras

PTEN	Phosphatase und tensin homolog
qPCR	Quantitative PCR
RANKL	Receptor activator of NF-KB-Ligand
RhoA	Ras homolog gene family member A
ROCK	Rho-assozierte Proteinkinase
RUNX2/3	Runt-related Transcription factor 2/3
RT	Raumtemperatur
SCF^{FBXL15}	Skp1-Cullin1-F-box protein-Roc1
SEM	Standardfehler
SFKs	SRC family kinase
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
Smad	Suppressor of Mothers against Decapentaplegic
Smurf1	Smad-specific E3-Ubiquitin-Protein Ligase 1
Smurf2	Smad-specific E3-Ubiquitin-Protein Ligase 2
SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing 1
ST6GALNAC5	alpha-2,6-sialyltransferase
STAT	signal transducer and activator of transcription
SYNV1	Synovolin-1
T	TumorgroÙe
Talin-H	Talin head Domäne
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline + Tween 20
T-DM1	Trastuzumab-Emtansin
TEER	Transendothelialer elektrischer Widerstand
TEMED	N, N, N', N' – tetra-methylethylenediamine
TGF	Transforming growth factor
Tis	Carcinoma in situ
TJ	Tight Junctions
TLR	Toll-like Receptor
TN	Triple-negativ
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF4	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 4
Ub	Ubiquitin
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
Wt	wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens

In der vorliegenden Arbeit wurde, wenn beide Geschlechter betroffen sind, das generische maskulin verwendet.

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Im Laufe ihres Lebens erkrankt eine von acht Frauen an Brustkrebs. Mit rund 69.900 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland ist das Mammakarzinom (MaCa) der häufigste maligne Tumor und die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau (Erdmann et al., 2021). Weltweit werden rund 2,3 Millionen Neuerkrankungen und 685.000 Todesfälle pro Jahr registriert (Sung et al., 2021). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. In den letzten Jahren konnte sowohl ein Rückgang der Inzidenz als auch der Sterblichkeit beobachtet werden, welches am ehesten auf die Einführung konsequenter Früherkennungsprogramme im Jahr 2005 zurückzuführen ist (Erdmann et al., 2021).

Risikofaktoren des MaCas können in hormonabhängige und hormonunabhängige Faktoren eingeteilt werden. Die wichtigsten sind hierbei ein langer hormonaktiver Zeitraum (Frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität), sowie verschiedene genetische Prädispositionen (z.B. Mutation in den Breast Cancer 1 und 2-Genen (BRCA1 und 2)) (Sun et al., 2017).

Zusätzlich zu den Risikofaktoren existieren Risikoläsionen, auf deren Boden ein invasives Karzinom entstehen kann. Hierzu zählen das duktales Carcinoma in situ (DCIS), die atypische duktales Hyperplasie (ADH) und die lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN) (Morrow et al., 2015).

Die häufigste Lokalisation ist mit 55% der Fälle der obere äußere Quadrant der Mamma. In den meisten Fällen bemerken die Patientinnen erst spät eine klinische Symptomatik. Das MaCa präsentiert sich vor allem durch eine unscharf begrenzte, nicht-verschiebbliche, nicht-schmerzhaft Raumforderung. Hinzu können Hauteinziehungen, Rötung, sowie Sekretion aus der Mamille kommen (Emens and Davidson, 2003).

Das MaCa metastasiert früh sowohl lymphogen als auch hämatogen. In den meisten Fällen erfolgt der lymphatische Abfluss über die ipsilateralen axillären Lymphknoten entlang der interpektoralen Lymphknoten. Hämatogen metastasiert das MaCa in Knochen, Lunge, Pleura, Leber, Thoraxwand und Gehirn (Emens and Davidson, 2003).

Diagnostiziert wird das MaCa in erster Linie durch die beidseitige Mammographie, sowie einer Stanz- oder Vacuumbiopsie zur Abklärung suspekter Befunde. Anschließend erfolgt bei klinischer Symptomatik, Tumoren >5 cm Durchmesser oder klinischem Lymphknotenbefall eine gezielte Ausbreitungsdiagnostik. Diese besteht aus einer Skelettszintigraphie zur Detektion von Knochenmetastasen, einer Computertomographie (CT) und Sonographie des Abdomens, zur Detektion von Lebermetastasen, sowie einem

Einleitung

CT des Thorax zur Detektion von pulmonalen Metastasen. Bei klinischem Verdacht auf Hirnmetastasen (HM) erfolgt zudem eine kraniale Magnetresonanztomographie (cMRT) (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021).

Die Klassifikation des MaCa erfolgt anhand der TNM-Kriterien und wird von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) in Stadien zusammengefasst (Tabelle 1.1 Klassifikation des Mammakarzinoms (Cserni et al., 2018)). Hierbei steht T für die Größe und das Wachstumsverhalten des Primärtumors, N für den Lymphknotenstatus und M für Fernmetastasen (Cserni et al., 2018).

Tabelle 1.1 Klassifikation des Mammakarzinoms (Cserni et al., 2018)

UICC-Stadium	TNM-Kriterien
0	Tis, N0, M0
I	T1, N0, M0
IIA	T0 oder T1, N1, M0 T2, N0, M0
IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
IIIA	T0, T1 oder T2, N2, M0 T3, N1, M0
IIIB	T4, N0-2, M0
IIIC	Alle T, N3, M0
IV	Alle T, alle N, M1
Tis: Carcinoma in situ T1a 1-5mm, T1b 6-10 mm, T1c 11-20 mm T2 21-50mm T3 > 51mm T4 Infiltration der Brustwand und/oder der Haut und/oder ipsilaterale Satellitenmetastasen und/oder inflammatorisches Mammakarzinom N1 1-3 Lymphknoten (LK) in der Axilla und/oder der ipsilateralen Mammaria interna Region N2 4-9 LK in der Axilla N3 >10 LK in der Axilla und/oder Befall infra- oder supraclaviculärer LK M1 Metastasen außerhalb der Brust und der benachbarten LK-Regionen	

Das MaCa kann anhand immunhistochemischer Färbungen in molekulare Subtypen unterteilt werden. Diese unterscheiden sich in ihrem therapeutischen Ansprechen, dem Auftreten von Fernmetastasen und damit ihrer Prognose (Sohn et al., 2016).

Entscheidend sind hier die Marker: Progesteronrezeptor (PR), Östrogenrezeptor (ER) und humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER2). Entsprechend ihrer Expression werden Hormonrezeptor (HR) positive (ER+, PR+), HER2 positive und Triple-negative (TN) Tumore unterschieden (Barzaman et al., 2020). Neben dem molekularen Subtyp spielt auch der Proliferationsmarker Kiel-Antigen Nr. 67 (Ki-67) eine wichtige Rolle für die Prognose. Angegeben wird die immunhistochemisch nachgewiesene Expression als

Einleitung

Rate positiver Zellen, hierbei sprechen Werte ab 20% für eine hohe Proliferationsrate des Tumors (Bryan et al., 2021, Goldhirsch et al., 2011).

Das therapeutische Vorgehen ist abhängig von dem Tumorstadium nach UICC und dem molekularen Subtyp. Man unterscheidet lokale Therapieoptionen wie die operative und die Strahlentherapie von systemischen zu welcher die Chemotherapie, aber auch die Immun- und Hormontherapie gezählt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021)).

Eine Hormontherapie kann bei Patientinnen mit >1% ER- bzw. PR-positiver Tumorzellen durchgeführt werden. Hierzu stehen vor allem Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-Analoga, selektive ER-Modulatoren oder Aromatasehemmer zur Verfügung. Für Patientinnen mit HER2-positivem MaCa stellt eine adjuvante Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab gegebenenfalls ergänzend mit Pertuzumab als duale Rezeptorblockade eine therapeutische Option dar (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021)).

Beim metastasierten MaCa haben die Therapien in der Regel ein palliatives Ziel. Zur Verfügung stehen hier vor allem systemische Behandlungsoptionen wie Hormontherapie, Anti-HER2 Therapie, sowie die klassische Chemotherapie mit zytostatischen Substanzen. Bei akuten Bedrohungen von Organfunktionen kann eine Lokaltherapie wie eine Operation oder Radiatio in Erwägung gezogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021)).

Weitere Therapieoptionen in der metastasierten Situation sind Cyclin Dependent Kinase 4/6-(CDK4-/6) Inhibitoren, Tyrosinkinase-Inhibitoren wie zum Beispiel Lapatinib, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Inhibitoren und Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP)-Inhibitoren.

Zur palliativen Behandlung gehört zudem eine symptomorientierte Therapie. So können Bisphosphonate und Anti-Receptor activator of Nuclear Factor KB (NF-κB)-Ligand (RANKL)-Antikörper zur Therapie bei Patientinnen mit Knochenmetastasen eingesetzt werden. Das therapeutische Vorgehen bei HM wird an späterer Stelle besprochen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021)).

1.2 Hirnmetastasierung beim Mammakarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Klinik von Hirnmetastasen

Trotz deutlich verbesserter Präventions- und Früherkennungsprogramme, sowie der Etablierung neuer therapeutischer Targets liegt der Anteil an Patientinnen, welche im Laufe ihrer Krebserkrankung HM entwickeln bei 10-16% (Lin et al., 2004). HM präsentieren sich meistens durch starke Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit oder Krampfanfälle (Klos and O'Neill, 2004). Die Hirnmetastasierung stellt nicht nur eine deutliche Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patientinnen dar, Betroffene haben ein deutlich reduziertes Gesamtüberleben mit einer 1-Jahres Überlebenschance von 20% (Yau et al., 2006, Ogawa et al., 2008).

Neben einem jungen Erkrankungsalter sind die Anzahl betroffener Lymphknoten, ein fortgeschrittenes Tumorstadium (Tabelle 1.1), das Vorliegen von weiteren Fernmetastasen, sowie der molekulare Subtyp des Primärtumors wichtige prädiktive Faktoren für das Auftreten von HM (Heitz et al., 2011, Pestalozzi et al., 2006). Eine höhere Inzidenz von HM wird bei Patientinnen mit ER/PR-negativen, HER2-positiven oder TN MaCas gesehen (Heitz et al., 2009, Soni et al., 2015). Die 5-Jahres Inzidenz für das Auftreten von HM bei HR-positiven Tumoren mit niedrigem Ki-67 Index beträgt etwa 0,1%, bei HR-positiven Tumoren mit hohem Ki-67 Index 3,3%, bei HER2-positiven Tumoren etwa 3,7% und bei TN MaCa 7,4%. In einem initial nur extrazerebral metastasierten Stadium (UICC IV) entwickeln 30-50% der HER2-positiven und 25-45% der TN MaCas im Verlauf auch HM. Ebenso ist der Zeitraum zwischen Erstdiagnose und dem Auftreten von Fernmetastasen bei HER2-positiven und TN im Vergleich zu HR-positiven MaCas reduziert (Achrol et al., 2019, Bryan et al., 2021, Lim and Lin, 2014, Qiu et al., 2016, Soni et al., 2015, Wang et al., 2021). Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung von HM scheint eine BRCA1-/2-Keimbahnmutation darzustellen (Albiges et al., 2005, Song et al., 2020).

1.2.2 Therapie von Hirnmetastasen

Die Therapie von HM setzt sich aus den klassischen Pfeilern der Krebstherapie zusammen: der operativen Therapie, der Strahlentherapie, der Chemotherapie, Immuntherapie, sowie verschiedenen zielgerichteten Therapiekonzepten (Leone and Leone, 2015).

Eine Lokalthherapie ist indiziert, solange die Patientin sich in einem guten Allgemeinzustand (Karnofsky-Index >70, Alter <65 Jahre) befindet und der Primärtumor, sowie extrakranielle Fernmetastasen kontrolliert sind. Hierzu gehört die operative Entfernung oder die Bestrahlung der Metastase, wobei die stereotaktische Bestrahlung der

Einleitung

HM die Therapie der ersten Wahl darstellt. Bei einem erhöhten intrakraniellen Druck durch raumfordernde Wirkung der Metastase(n) mit der sofortigen Notwendigkeit der Entlastung, weiteren lebensbedrohlichen Symptomen, oder Kontraindikationen für stereotaktische Bestrahlung ist eine operative Entfernung indiziert. Bei multiplen HM, die ein gezieltes operatives Vorgehen erschweren, besteht die Möglichkeit der Ganzhirnbestrahlung (Ditsch et al., 2020).

Auch in der Therapie von HM des MaCa nimmt der molekulare Subtyp des Primarius für zielgerichtete Therapien eine wichtige Rolle ein. HR-positive Tumore profitieren auch in der metastasierten Situation von einer endokrinen Therapie in Kombination mit einem CDK4-/6-Inhibitor (Cardoso et al., 2014). Bei HER2-positiven Patientinnen stehen auch in der metastasierten Situation die humanisierten Antikörper (AK) gegen HER2 zur Verfügung. Eine Erweiterung dieses Therapiekonzeptes ist die biochemische Verbindung zwischen dem AK Trastuzumab und dem Zytostatikum Emtansin (T-DM1) (Sanglier et al., 2023). Alternativ ist die Kombination von Capecitabine und Lapatinib möglich (Müller et al., 2018). Besonders für die Therapie des metastasierten TN MaCas bestehen weiterhin nur eingeschränkte therapeutische Möglichkeiten. Je nach Vortherapien stehen hier verschiedene platinhaltige chemotherapeutische Konzepte zur Verfügung.

Ein wichtiger Aspekt der Therapie von HM ist zudem die symptomatische Therapie. Hier spielt die Gabe von Glucocorticoiden zur Reduktion des perifokalen Ödems eine entscheidende Rolle zur Minimierung der Symptomlast und Verbesserung der individuellen Lebensqualität der Patientinnen (Müller et al., 2018).

Trotz neuer und erweiterter Therapiekonzepte besteht weiterhin die Herausforderung, dass viele Zytostatika und zielgerichtete Therapien die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht überwinden können. Die therapeutischen Möglichkeiten zur Therapie von Hirnmetastasen bleiben aufgrund dessen begrenzt.

1.2.3 Die Blut-Hirn-Schranke

Erstbeschreiber der BHS waren Paul Ehrlich 1885 und Edwin Goldman im Jahr 1913 (Ehrlich, 1885, Goldmann, 1913).

Die Hauptfunktion der BHS ist die Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS) zu gewährleisten. Das nicht-fenestrierte Kapillarendothel der zerebralen Gefäße sorgt für eine hochselektive Barriere zwischen dem ZNS und dem Blut, so dass lediglich ausgewählte Substanzen wie beispielsweise Glucose durch die BHS gelangen können und Pathogene und Toxine abgehalten werden (Zhao et al., 2015).

Gebildet wird die BHS vor allem durch das Endothel der Kapillaren. Diese sind durch spezielle Tight Junctions (TJ) verbunden, welche sich am lateralen apikalen Zellpol

Einleitung

befinden. Die TJ sorgen für eine restriktive parazelluläre Diffusion (Wolburg and Lippoldt, 2002). Gebildet werden die TJ durch Junction Adhesion Molecules (JAMs), Claudin-1, -3, -5 und Occludin, welche mit Proteinen des intrazellulären Zytoskeletts wie Zonula occludens (ZO) und Cingulinen verbunden sind. Wichtige regulatorische Proteine, um die Funktion der TJ zu gewährleisten sind Rho, Rac1 und Proteinkinase C (PKC) (Wolburg and Lippoldt, 2002).

Neben der Barrierefunktion haben TJ eine Kontrolle über Genexpression, Zellproliferation und Differenzierung (Balda and Matter, 2009).

Weiter kaudal unter den TJ bilden die Adherens Junctions (AJ) eine zusätzliche Zell-Zell-Verbindung und damit eine weitere Unterstützung der Barrierefunktion. Hergestellt wird der Kontakt über Cadherine, welche unter anderem über p120-Catenin oder Desmoplakin mit den Aktinfilamenten und damit dem intrazellulären Zytoskelett verbunden sind (Wolburg and Lippoldt, 2002). Durch intrazelluläre Kommunikation zwischen den TJ und AJ wird die Permeabilität der BHS beeinflusst.

Die Endothelzellen sind umgeben von der Basalmembran, welche aus Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat Proteoglykanen besteht. Sie enthält zudem die Perizyten, welche durch ihre kontraktile Elemente wichtig für die Veränderung des Gefäßdurchmessers sind und die endotheliale Proliferation und Angiogenese regulieren. Ebenfalls zur BHS gehören die Endfortsätze der Astrozyten. Ihre Funktion besteht in erster Linie in der Reduktion der Compliance der arteriellen Gefäße. Zudem verbinden sie die Endothelzellen mit dem neuronalen Netzwerk des ZNS und können so einen zielgerichteten Blutfluss in Areale mit hoher neuronaler Aktivität ermöglichen (Armulik et al., 2010, Daneman and Prat, 2015).

Eine aufgehobene Integrität und Stabilität der BHS ist assoziiert mit neurodegenerativen Erkrankungen und der Entstehung von Hirnmetastasen (Korczyński, 2015, Zlokovic, 2008).

Um die ZNS-Homöostase aufrechtzuerhalten, muss die BHS (1) sicherstellen, dass potenziell schädliche Substanzen nicht ins ZNS gelangen und (2) dass genügend Sauerstoff (O_2) und Nährstoffe die BHS überwinden können und Kohlenstoffdioxid (CO_2) abtransportiert werden kann. Hierfür stehen verschiedene Transportmöglichkeiten zur Verfügung. Während wasserlösliche Stoffe, die kleiner als 4nm sind, die TJ überwinden und somit parazellulär diffundieren können, benötigen alle anderen Substanzen transzelluläre Transportmechanismen. Fettlösliche Substanzen und Blutgase (O_2 und CO_2) können passiv durch die Zelle diffundieren. Während größere Moleküle aktive Transporter benötigen. Für viele Nährstoffe wie beispielsweise Kohlenhydrate, Aminosäuren und Vitamine stehen spezifische Transportsysteme zur Verfügung. Ebenso können große Proteine und Hormone über rezeptorvermittelten Transport in das ZNS gelangen (Ayloo

and Gu, 2019). Effluxpumpen aus der Familie der ATP-binding cassette transporters (ABC-Transporter) wie beispielsweise P-Glycoprotein, Multidrugresistance-associated Proteins (MRPs, ABCC1,2,4 und 5) und Breast Cancer Resistance Protein (BRCP) sichern hier, dass fettlösliche Substanzen aus der Zelle wieder ins Blut transportiert werden und nicht alle fettlöslichen Substanzen unkontrolliert ins ZNS gelangen können. Dies schützt das ZNS vor schädlichen Substanzen, sorgt aber auch dafür, dass Medikamente erschwert ins ZNS gelangen um hier ihre Wirksamkeit entfalten zu können (Kadry et al., 2020, Robey et al., 2018).

1.2.4 Molekulare Grundlagen der Entstehung von Hirnmetastasen beim Mammakarzinom

HM entstehen durch hämatogene Metastasierung. Die Metastasierungskaskade beschreibt den Verlauf der Tumorzelle vom Primarius bis hin zur Invasion und Proliferation in tumorfernen Organen (Abbildung 1.1). Der erste Schritt ist die Abspaltung der Tumorzellen über Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) vom Primarius. Hierunter versteht man die Änderung des Phänotyps von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp. Eigenschaften des mesenchymalen Phänotyps sind aufgehobene Zell-Zell-Verbindung, Aufhebung der Zellpolarität und eine verbesserte Migrations- und Invasionsfähigkeit, welches den Tumorzellen die Möglichkeit gibt sich vom Primarius zu lösen und das umliegende Gewebe zu invadieren (Zheng et al., 2022). Hierzu werden in der Zelle Transforming growth factor (TGF) β -vermittelt epitheliale Marker wie epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), Claudin und E-Cadherin herunter- und mesenchymale Marker wie N-Cadherin, Fibronectin und Vimentin hochreguliert (Zhang et al., 2013a). Weitere TGF β -vermittelte Signalwege, welche zur EMT beitragen sind extracellular-signal regulated kinase (ERK)/ mitogen-activated proteinkinase (MAPK), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt und Rho-like GTPase (Wu et al., 2020).

Anschließend folgt die Intravasation in die Blutbahn. An den jeweiligen Zielorganen kommt es zur Adhäsion der zirkulierenden Tumorzellen (CTC) an das Gefäßendothel. Hierzu sind unter anderem CXC-motif Chemokin-Rezeptor (CXCR)-4 auf den Tumorzellen, sowie CXC-motif Chemokin-Ligand (CXCL)-2 auf dem Hirnendothel zur chemotaktischen Migration, CD44 und Mucin (MUC)-1, Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, activated leucocyte cell adhesion molecule (ALCAM) und Integrine zur stärkeren Adhäsion der Tumorzellen an Hirnendothel von Relevanz (Wang et al., 2021). Zudem wurden weitere Marker wie beispielsweise die alpha-2,6-sialyltransferase (ST6GALNAC5), cyclooxygenase-2 (COX2) und heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) identifiziert, die für die Adhäsionsfähigkeit von MaCa Zellen an das Endothel der

Einleitung

zerebralen Gefäße von Bedeutung sind (Bos et al., 2009). Nach der Adhäsion erfolgt die Invasion der Tumorzellen durch das Endothel (Abbildung 1.1). In dem Schritt der Extravasation liegt die Einzigartigkeit der Hirnmetastasierung (Bryan et al., 2021). Um ins ZNS zu gelangen, müssen die Tumorzellen die Fähigkeit besitzen die hochselektive, semipermeable BHS zu überwinden.

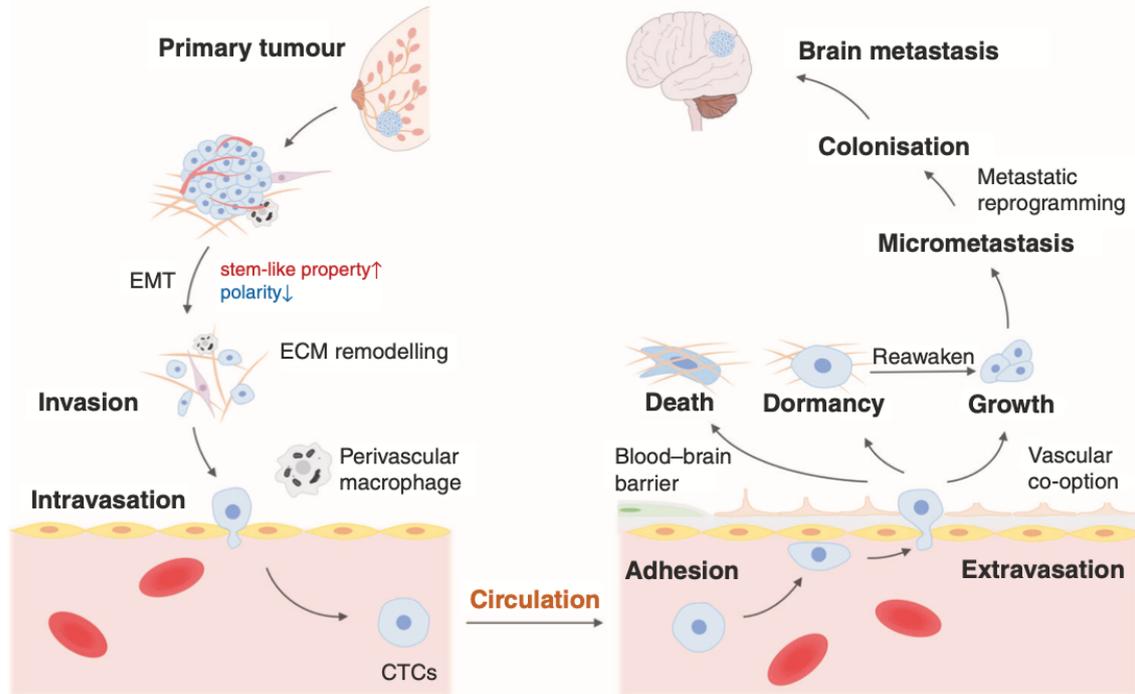


Abbildung 1.1 Entstehung von HM beim Mammakarzinom

Tumorzellen spalten sich vom Primarius über EMT ab. Über Invasion der Extrazellulärmatrix (ECM) kommt es zur Intravasation lokaler Blutgefäße. Die CTCs adhäreren am Gefäßendothel des ZNS und gelangen über Extravasation ins Gewebe. Hier formen sie Mikrometastasen und können proliferieren. (Wang et al., 2021)

Nachdem die Tumorzellen im Zielorgan angekommen sind, müssen sie sich an das Microenvironment des neuen Gewebes anpassen, um hier überleben und proliferieren zu können. Hierzu gehört auch die Anpassung an die metabolischen Verhältnisse im ZNS. Das Gehirn hat den höchsten Glucose-Umsatz im menschlichen Körper (Mergenthaler et al., 2013). Es zeigte sich, dass das Gewebe von HM eine erhöhte glykolytische Aktivität aufweist im Vergleich zu Skelett- und Lungenmetastasen (Wang et al., 2020). Die Aktivierung von Signalwegen, welche die Glycolyse fördern, ist somit eventuell ein möglicher Mechanismus der HM sich an die neue Umgebung anzupassen (Zhang et al., 2011). Durch Gap Junctions zwischen Astrozyten und Tumorzellen wird die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und TNF- β in den Tumorzellen angeregt. Diese aktivieren wiederum über signal transducer and activator of

transcription (STAT)-1- und NF- κ B Signalwege, welche das Tumorwachstum fördern (Chen et al., 2016). Zudem ist es wichtig für die Tumorzellen die zytotoxischen Effekte der aktivierten Mikroglia, dem angeborenen Immunsystem des ZNS, zu umgehen. Hierzu wird vermutlich ein Phänotypen-Switch von M1 (Tumorsuppressiver Effekt) zu M2 (Tumorpromotor Effekt) durch die Tumorzellen induziert (Thind and Wilson, 2016). Über den epidermal growth factor receptor (EGFR)- Signalweg wird das Tumorzellüberleben und die Invasionsfähigkeit der Tumorzellen ebenfalls gefördert (Sirkisoon et al., 2016). Sartorius et al. (2016) zeigen einen Zusammenhang zwischen der Expression von ER auf Astrozyten und der Freisetzung von Zytokinen, welche den EGFR-Signalweg stimulieren. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von HM bei jungen Brustkrebs Patientinnen hin. HER2 gehört ebenfalls zur EGFR-Familie. Die Transmembran-Tyrosinkinase aktiviert zahlreiche Signalwege, unter anderem STAT3, Ras/ MAPK und PI3K/Akt, welches zur Inaktivierung der Apoptose und zur gesteigerten Proliferation führt (Sirkisoon et al., 2016). Ein weiteres relevantes Protein ist die Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), welche den PI3K/Akt-Signalweg inhibiert. Eine PTEN loss-of-function Mutation wurde vermehrt in Tumorgewebe von MaCa HM gefunden (Gonzalez-Angulo et al., 2011). Fan et al. (2011) zeigt einen Zusammenhang zwischen der Interaktion zwischen Her2, β 4-Integrin und der verstärkten Produktion von VEGF. Dieses sorgt neben der Förderung von Angiogenese zusätzlich zur Reduktion der Integrität der BHS und erleichtert damit die Extravasation der CTCs ins ZNS (Giancotti, 2007).

1.3 Smurf1

1.3.1 Aufbau und grundlegende Funktionen

Suppressor of Mothers against Decapentaplegic (Smad)-specific E3-Ubiquitin Protein Ligase (Smurf1) ist eine Homologous to E6AP C-Terminus (HECT)-E3-Ubiquitin Ligase, welche zur Familie der Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 4 (NEDD4)-Ubiquitin Ligasen gehört. Sie besteht aus einer N-terminalen C2-, zwei WW und einer C-terminalen HECT-Domäne. (Zhu et al., 1999) Smurf1 wird konstant, über alle Zyklusphasen hinweg, im Nukleus und im Zytoplasma exprimiert und ist vor allem in den Lamellopodien, Filopodien und an fokalen Adhäsionen lokalisiert (Huang, 2010). Als E3-Ligase gehört Smurf1 zum Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation und beschreibt den Prozess, bei dem Proteine mit Ubiquitin (Ub) markiert werden. Unterschieden werden muss zwischen Poly- und Monoubiquitinierung. Während Polyubiquitinierung die Proteine für den proteasomalen Abbau durch das 26S-Proteasom markiert, sorgt eine Monoubiquitinierung für eine

Einleitung

Aktivitätsänderung des entsprechenden Substrats. Neben der Aktivierung kann dies zur Lokalisationsänderung des Substrates in der Zelle führen. (Hoeller and Dikic, 2009, Sasaki et al., 2011)

Dies ist relevant, um die Homöostase in der Zelle und den reibungslosen Ablauf vieler Signalwege gewährleisten zu können. Veränderungen im UPS können zur Entstehung von Malignomen und neurodegenerativen Erkrankungen führen (Momtaz et al., 2020, Zhang et al., 2020). Als E3-Ligase katalysiert Smurf1 die Verbindung zwischen dem durch das E2-Enzym transportierte Ub und dem Substrat (Abbildung 1.2).

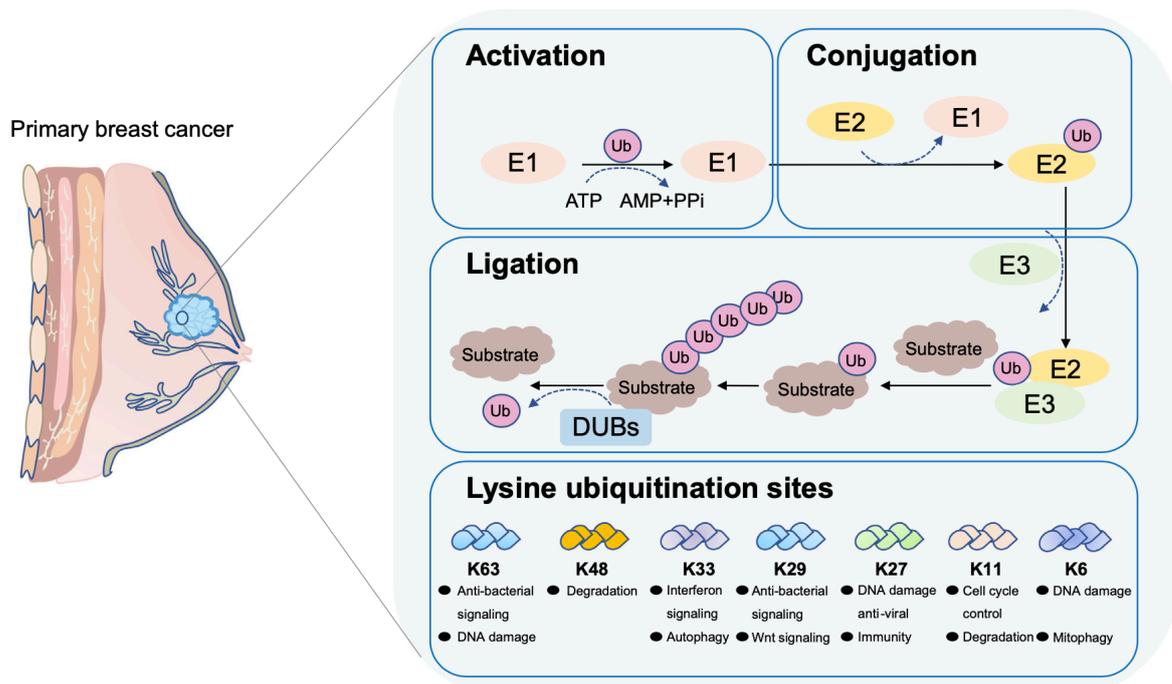


Abbildung 1.2 Ubiquitin-Proteasom-System: Ablauf der Anlagerung von Ubiquitin an das Substrat. (Han et al., 2023)

Abbildung 1.2 zeigt die Funktionsweise des UPS. Ub wird durch E1-Enzyme aktiviert, durch E2-Enzyme konjugiert und anschließend durch E3-Ligasen an den Lysin-Rest (K) des entsprechenden Substrats ligiert. Die E3-Ligasen sind verantwortlich für die Substratspezifität. Ub kann von den Substraten durch Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) wieder abgespalten werden. Die Aktivität der Zielproteine ist entsprechend abhängig von einem Gleichgewicht aus E3-Ligasen, wie beispielsweise Smurf1 und DUBs (Han et al., 2023, Wilkinson, 1987).

Je nach Substrat können E3-Ligasen im Allgemeinen und Smurf1 im Speziellen sowohl als Tumorpromotor, als auch als Tumorsuppressor wirken (Hoeller and Dikic, 2009). Smurf1 hat viele Substrate, daher sollen im Folgenden vor allem solche erwähnt werden, die einen Einfluss auf die Schritte der Karzinogenese, sowie die Entstehung von Metastasen haben.

1.3.2 Smurf1 in verschiedenen biologischen Prozessen

Entdeckt wurde Smurf1 als Regulator des TGF β /Bone morphogenetic Protein (BMP)-Signalwegs (Zhu et al., 1999). Der TGF β -Signalweg reguliert eine Vielzahl an biologischen Prozessen wie Zellwachstum und -differenzierung (Huang, 2010). Zudem hemmt TGF β die Proliferation epithelialer Zellen, während die Proliferation von Fibroblasten gefördert wird (Chen and Matesic, 2007). Durch TGF β beziehungsweise BMP wird der TGF β -Rezeptor II/BMP-Rezeptor II aktiviert und bildet mit dem TGF β /BMP-Rezeptor I ein Heterodimer. Die regulatorischen (R)-Smads2 und 3 bei Aktivierung durch TGF β bzw. R-Smads 1,5 und 8 bei Aktivierung durch BMP werden phosphoryliert und bilden zusammen mit dem Co-Smad4 einen Komplex, welcher in den Nucleus transloziert und hier die Transkription unterschiedlicher Gene initiiert (Colak and Ten Dijke, 2017). In Abhängigkeit dieser Gene kann die Tumorgenese gefördert oder gehemmt werden. Inhibitorische (I)-Smads 6 und 7 hemmen die Signalkaskade. Smad7 dient zudem als Adapter für den Smurf1-assoziierten proteasomalen Abbau des TGF β -Rezeptors I.

Smurf1 hat einen negativen regulatorischen Einfluss auf den TGF β Signalweg über den Abbau der Smads und des BMP/ TGF β -Rezeptor I (Izzi and Attisano, 2006, Zhu et al., 1999). Auch über andere Proteine des TGF β /BMP-Signalwegs wie beispielsweise Runt-related Transcription factor (RunX)-2/3, Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase (MEKK)-2 und TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor (TRAF)4 hat Smurf1 einen Einfluss auf das Zellwachstum und -differenzierung (Zhang et al., 2013b, Zhao et al., 2003, Yamashita et al., 2005).

Wang et al. (2003) zeigten durch Inhibition von Smurf1 eine reduzierte Zellmigration. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die Ubiquitinierung von Ras homolog gene family member A (RhoA). RhoA ist verantwortlich für die Zellpolarität und Motilität und ist vor allem in den Zellprotrusionen lokalisiert. Zur Ubiquitinierung von RhoA wird Smurf1 durch die Proteinkinase C Zeta (PKCz) in die Protrusionen rekrutiert, wo es mit Par6, welches durch die Aktivierung des TGF β -Signalwegs zuvor phosphoryliert wird, einen Komplex eingeht und RhoA abbaut. Dies führt zur Ablösung der Aktin-Filamente von den TJ und resultiert in TGF β -abhängiger EMT (Ozdamar et al., 2005). Die Degradation von RhoA durch Smurf1 wird erhöht durch Cerebral cavernous malformation 2 (CCM2), welches in der Endothelmembran lokalisiert ist. Dies scheint eine Relevanz für den räumlich-zeitlich gerichteten Abbau von RhoA zu haben (Croese et al., 2009). Ein weiteres Protein, welches zur Stabilisierung fokaler Adhäsionen führt ist Talin head. Es wirkt, indem es Integrine aktiviert und an Aktin bindet. Die Degradation durch Smurf1 hat die Auflösung dieser Adhäsionen zur Folge (Huang et al., 2009).

Einleitung

Durch die Degradation von MyD88 und STAT1 hat Smurf1 einen inhibitorischen und damit antiinflammatorischen Effekt auf das Toll-like Receptor (TLR)-und Interferon (IFN) γ -Signaling (Lee et al., 2011). Über die Ubiquitinierung von Prickle Planar Cell Polarity Protein 1 (Prickle1) hat Smurf1 zusätzlich eine verstärkende Wirkung auf den Wnt-Signalweg (Narimatsu et al., 2009).

Smurf1 nimmt durch seine Interaktionspartner einen wichtigen Stellenwert in der Regulation der Homöostase der Zelle ein. Einer adäquaten Regulation der Smurf1-Aktivität kommt daher eine große Bedeutung zu. Unterschieden wird hier zwischen Proteinen, welche die Smurf1 Ligaseaktivität erhöhen und denen die Smurf1 inhibieren.

Casein kinase 2 interacting Protein-1 (CKIP-1) und cdc20 homolog 1(Cdh1) erhöhen die Smurf1 vermittelte Polyubiquitinierung von Smad1/5, MEKK2 und RhoA (Lu et al., 2008, Ingham et al., 2004). Li et al. (2016a) zeigten, dass Akt1 und Akt2 über Phosphorylierung zu einer Stabilisierung von Smurf1 und dadurch zu einer verlängerten Halbwertszeit führen. Inhibiert wird Smurf1 unter anderem von Synaptopodin und LIM mineralization protein-1 (LMP-1) (Magnifico et al., 2003, Katz et al., 2002). Zusätzlich kann Smurf1 auch durch E3 Ligasen ubiquitiniert und abgebaut werden. Dazu gehört sowohl Smurf1 selbst als auch Skp1-Cullin1-F-box protein-Roc1 (SCF^{FBXL15}) und Smurf2. Eine erhöhte intermolekulare Autoinhibition wurde bei CKIP-1 und Cdh-Aktivierung beobachtet (Fukunaga et al., 2008). Smurf1 besitzt auch regulatorische Funktionen unabhängig von seiner E3-Ligase-Aktivität. So verhindert es beispielsweise die Autoubiquitinierung von mouse double minute (MDM) 2, einem Onkoprotein, durch eine Stabilisierung der Komplexbildung zwischen MDM2 und MDMX. Dies wiederum führt zu einem vermehrten Abbau des Tumorsuppressors p53 und damit der Blockierung von Apoptose durch Smurf1 (Nie et al., 2010).

Disabled ovarian carcinoma (DOC)-2/disabled homolog (DAB)2 interactive protein (DAB2IP) wirkt als Tumorsuppressor unter anderem sowohl über den PI3K/Akt- als auch über Ras-Raf-ERK und Apoptosis signal-regulating kinase (ASK1)- c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)-Signalweg (Liu et al., 2016).

Über die Regulation von DAB2IP führt Smurf1 zu einer gesteigerten Proliferation und Migration in der Glioblastom (GB)-Zelllinie T98G und der MaCa-Zelllinie MCF-7 vermutlich über eine Regulation des Ras-MAPK und NF-KB-Signalwegs (Li et al., 2016a).

Die Arbeitsgruppe (AG) um Tao et al. (2017) zeigte, dass die Expression von DAB2IP nach Smurf1-Knockdown in Magenkarzinom (MC)-Zelllinien anstieg, während eine Smurf1-Überexpression die Konzentration reduzierte.

1.3.3 Smurf1 als Tumorpromotor verschiedener Tumore

Eine Überexpression von Smurf1 wurde bereits im Kolon- (KRC), Pankreas (PC)- und klarzelligem Nierenzellkarzinom (kNCC) festgestellt (Kwei et al., 2011, Xie et al., 2014). Im GB, im MC und im kNCC konnte eine Korrelation zwischen Smurf1 und der Schwere der Erkrankung festgestellt werden, zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Smurf1-Expression und einem verminderten Chemotherapie-Ansprechen. (Xia et al., 2020a)

Ein Knockdown von Smurf1 in MC-Zellen führte zu einer Reduktion in Proliferation, Migration und Invasion *in vitro* und eine Hemmung des Tumorwachstums und der Entstehung von Lebermetastasen *in vivo* (Tao et al., 2017).

Smurf1 ist über die Ubiquitinierung von Kisspeptin-1 (KISS-1) und der daraus resultierenden Aktivierung des NF-KB-Signalwegs an der Progression des Schilddrüsenkarzinoms beteiligt (Yan et al., 2018).

Es zeigte sich zudem, dass in mehreren Tumorentitäten die Expression von Smurf1 mit der Tumorgroße, der vaskulären Invasion, der Entstehung von Lymphknoten und Fernmetastasen, einem fortgeschrittenen TNM-Stadium und einem verringerten Gesamtüberleben einhergeht (Chang et al., 2018, Ke et al., 2017, Lu et al., 2019, Tao et al., 2017).

Wang et al zeigte eine reduzierte Zellmigration und Invasion bei Smurf1-Knockdown in den Ovarialkarzinom Zelllinien SK-OV-2 und OVCAR-3 (Wang et al., 2014a) und Kwei et al eine erhöhte Invasivität bei Smurf1-Amplifikation im PC *in vitro* und *in vivo* (Kwei et al., 2011).

Eine Analyse aus immunhistochemischen Färbungen zeigte eine Korrelation zwischen der Smurf1 Expression und dem World Health Organisation (WHO)-Grad von GB. (Chang et al., 2018) Zudem zeigt sich in Untersuchungen von Xia et al eine Überexpression von Smurf1 in Gewebe von GB im Vergleich zu gesundem Hirngewebe. Hier zeigte sich bei Patienten mit PTEN wildtype (wt) ein vermindertes Gesamtüberleben in der Smurf1^{hi} - im Vergleich zur Smurf1^{low}-Kohorte. Bei Patienten mit PTEN-Mutation konnte dieser Unterschied nicht gezeigt werden. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die Anwesenheit von PTEN eine Rolle in der Funktion von Smurf1 spielt. Xia et al. (2020b) zeigte zudem eine verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Smurf1^{hi}-Kohorte. Weitergehend wurde der Einfluss von Smurf1 auf die Sensitivität der GB-Zellen auf den mammalian target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitor Rapamycin untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Resistenz der Tumorzellen gegenüber Rapamycin bei Smurf1-Überexpression und eine erhöhte Sensitivität bei Smurf1-Knockdown.

Bortezomib (Velcade®) ist ein Proteasom-Inhibitor, welcher unter anderem zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt wird. Dieser blockiert EMT über den TNF/Smurf1/PTEN/Akt/mTOR-Signalweg (Zhou et al., 2019). Wang et al. (2014b) zeigten, dass Bortezomib die Entstehung von Knochenmetastasen über EMT-Blockade durch Smurf1-Inhibition beim Prostatakarzinom hemmt.

1.3.4 Smurf1 im Mammakarzinom

Die Rolle von Smurf1 auf die Progression des Mammakarzinoms wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Hierbei konnte Fukunaga et al. (2008) bestätigen, dass ein Smurf1-Knockdown in der MaCa-Zelllinie MDA-MB-231 zu einer erhöhten Induktion des TGF β -Signalwegs und zu einer verstärkten Expression der Zielgene führt. Ebenso zeigte die AG eine verminderte Migration nach Smurf1-Knockdown. Untersucht wurde ergänzend der Einfluss von Smurf2 auf Smurf1. Hierbei wurde deutlich, dass Smurf1 durch die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Smurf2 abgebaut wird. Ein Smurf2-Knockdown hatte folglich eine erhöhte Smurf1-Konzentration zur Folge. Im Mausmodell zeigte sich zudem ein erhöhtes Auftreten von Knochenmetastasen bei Smurf2-Knockdown. Ein Smurf1-Knockdown hatte allerdings keinen Einfluss auf die Entstehung von Knochenmetastasen *in vivo* (Fukunaga et al., 2008).

EGF und sein Rezeptor sind im MaCa häufig überexprimiert und mit einer erhöhten Inzidenz von Fernmetastasen assoziiert. Kwon et al. (2013) zeigte, dass EGF die Smurf1-Expression in den MaCa-Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und MDA-MB-468 signifikant auf mRNA und Proteinebene erhöht. Die AG wies ebenfalls einen positiven Einfluss von Smurf1 auf die Migrationsfähigkeit der MaCa-Zellen über RhoA-Degradation nach und konnte damit die Ergebnisse von Fukunaga et al bestätigen. Weitergehend konnte gezeigt werden, dass Smurf1 zusätzlich durch mitogen-aktivierte Kinase (MEK)1, extracellular regulated kinase (ERK)1/2 und Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine EGF oder MEK1-vermittelte Steigerung der Smurf1-Expression zu einer erhöhten Migration und Invasion im MaCa *in vitro* führt, während EGFR-Inhibitoren zu einer reduzierten Bildung von Knochen- und HM *in vivo* führen (Kwon et al., 2013, Nie et al., 2012).

Die Expression von Smurf1 wird durch Staphylococcal nuclease domain-containing 1 (SND1) verstärkt. Eine erhöhte SND1 Expression ist assoziiert mit einem erhöhten Auftreten von Fernmetastasen sowie über die Interaktion mit astrocyte-elevated-gene 1 (AEG1) mit einem erhöhten Auftreten von Lungenmetastasen beim MaCa (Blanco et al., 2011). Über immunhistochemische Färbungen an normalem Brustgewebe und MaCa-Gewebe konnten Yu et al nachweisen, dass SND1 vermehrt im MaCa exprimiert wird. Über

Einleitung

Invasionsassays mit MDA-MB-231 MaCa-Zellen zeigte sich zudem eine erhöhte Invasionsfähigkeit der Zellen mit SND1-Überexpression. Die AG zeigte zudem einen Zusammenhang zwischen dem SND1-Proteinlevel, der Smurf1-Expression und der RhoA Degradation, was darauf hinweist, dass SND1 Smurf1-vermittelt einen Einfluss auf den Abbau von RhoA hat. Dies führt zu einer Veränderung des F-Aktin-Zytoskeletts und damit zu einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit von MaCa-Zellen (Yu et al., 2015).

Östrogen induziert die Smurf1-Expression. Yang et al zeigt, dass Smurf1 den ER im Zytoplasma von MaCa-Zellen stabilisiert, dadurch die Aktivität des ER α -Signalweg erhöht und Zellproliferation fördert. *In vivo* ließ sich ein verlangsamtes Tumorwachstum bei Smurf1-Knockdown beobachten (Yang et al., 2018).

Die Zell-Zell-Kontakte zwischen Epithel und Endothelzellen werden gebildet über TJ und AJ (siehe 2.2.4 Blut-Hirn-Schranke). Für die Stabilität der AJ spielt p120 Catenin eine wichtige Rolle. Dissoziiert dieses vom Cadherin-Catenin-Komplex kommt es zur Endozytose der Cadherine und zur Unterbrechung der AJ. P120-Catenin ist ein Substrat von Smurf1 welches, während TGF β -induzierter EMT, über Monoubiquitinierung gezielt markiert wird. Das Resultat ist eine veränderte Interaktion zwischen p120 Catenin und E-Cadherin und darauffolgend die Dissoziation der AJ. ERK1/2 wird ebenfalls durch TGF β induziert und phosphoryliert p120 Catenin dadurch wird die Interaktion zwischen Smurf1 und p120-catenin gefördert. Sowohl die Hemmung der Phosphorylierung als auch die Hemmung der Monoubiquitinierung sorgte *in vivo* für ein vermindertes Auftreten von Lungenmetastasen beim MaCa in der Maus. Zudem zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem Phosphorylierungslevel von p120-catenin und der Malignität des MaCa durch ein vermehrtes Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Wu et al., 2020).

Durch seine zahlreichen Interaktionspartnern ist Smurf1 an einer Vielzahl von Zellprozessen beteiligt. Hierzu zählen neben der Proliferation auch die DNA-Reparatur, Zellzyklus-Progression, Erhalt der genomischen Stabilität, Zelldifferenzierung und Metastasierung. Der Einfluss auf die BHS und damit die Entstehung und Progression von HM im MaCa ist bisher noch nicht bekannt und soll im Folgenden untersucht werden.

1.4 Projektrelevante Vorarbeiten der AG Oliveira-Ferrer

Als Grundlage für die Entwicklung des hier beschriebenen Projektes wurden aus einem Kollektiv von 194 umfassend charakterisierten primären Mammakarzinomen aus der Klinik für Gynäkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, mit Expressionsdaten (Microarray-Analysen-Affymetrix) in einem Screening-Ansatz alle Gene im Hinblick auf ihre Assoziation zur Hirnmetastasierung analysiert. Hierbei konnte die AG in der Gruppe der Patientinnen mit HM durch t-Test Analysen 24 Gene identifizieren, deren mRNA-Level im

Einleitung

Vergleich zur Kontrollgruppe ohne HM signifikant erhöht war. Eines dieser gefundenen Gene ist Smurf1 (Oliveira-Ferrer, unpublizierte Daten).

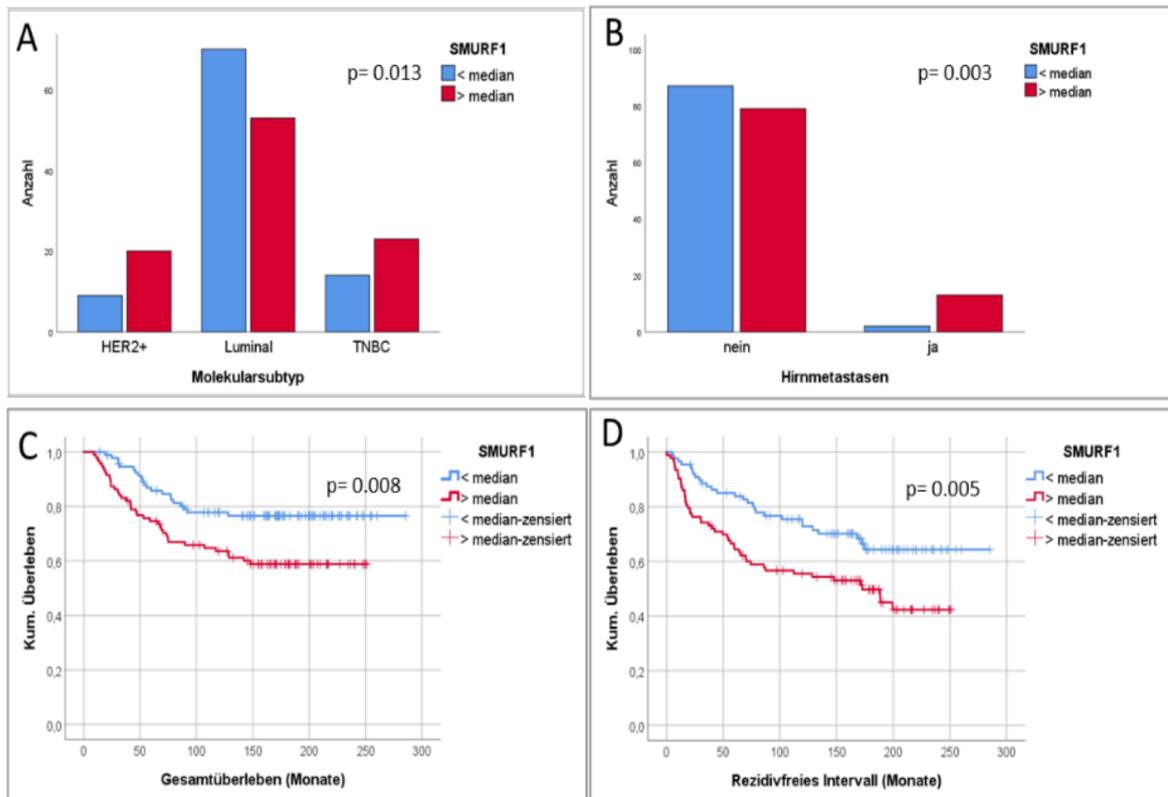


Abbildung 1.3 Korrelation von Smurf1 mit der Progression des MaCa ex vivo

In Abbildung 1.3A zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Smurf1 mRNA-Level und dem molekularen Subtyp. Die AG konnte zeigen, dass HER2-positive und TN-MaCa eine höhere Smurf1-Expression aufweisen, während luminal (HR-positive) MaCa häufiger eine geringere Smurf1-Expression vorweisen. In Abbildung 1.3B ist gezeigt, dass Smurf1 in den Tumoren von Patientinnen die HM entwickelt haben signifikant höher ist, als in solchen die keine HM im Krankheitsverlauf entwickelt haben. Abbildung 1.3C+D zeigen eine signifikante Korrelation zwischen einem erhöhten Smurf1-mRNA-Level und einem kürzeren Gesamtüberleben und einem kürzeren Rezidivfreien-Intervall.

1.5 Ziel der Arbeit

In einer Zeit, in der die molekulargenetische Onkologie und Präzisionsmedizin eine immer wichtigere Rolle einnimmt, ist es wichtig neue prognostische und prädikative Marker zu etablieren. Noch immer gibt es kaum Biomarker und wenig zielgerichtete therapeutische Möglichkeiten für Patientinnen mit HM bei MaCa. Für die Entwicklung neuer Therapien ist es wichtig herauszufinden, wie Tumorzellen die BHS überwinden und sich im ZNS

Einleitung

absiedeln und proliferieren können. Smurf1 ist ein Protein, welches in vielen tumorspezifischen Signalwegen involviert ist. Durch die in Vorversuchen gezeigte Korrelation zwischen der Smurf1-Expression und dem Anteil an Patientinnen mit HM stellt es ein vielversprechendes Ziel für weitere Untersuchungen dar. Die vorliegende Arbeit soll mittels statischer Adhäsions- und dynamischer Invasionsassays den Einfluss von Smurf1 auf die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 am und durch primäre Hirnendothelzellen (hBMECs) untersuchen. Hierbei soll ein Beitrag dazu geleistet werden, die Ausbildung von zerebralen Metastasen bei TN und HER2-positiven MaCa besser zu verstehen und das molekulargenetische Profil von Mammakarzinomen zu erweitern. Eine gezielte Modulation von Smurf1 könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von HM haben und damit einen Grundstein für Entwicklung neuer therapeutischer oder diagnostischer Optionen in der Behandlung von Brustkrebspatientinnen darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Herkunft
Acrylamid/bis-Acrylamid Lösung 40%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium Persulfate (APS)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien USA
Antikörper Diluent	Dako, Agilent Technologies, Kalifornien, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Blotting Papier	Macherey- Nagel, Düren, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CozyHi™ prestained protein ladder	highQu GmbH, Kraichtal, Deutschland
Chloramphenicol 34 mg/ml in 100% EtOH	Im Labor bereits vorhanden, Firma nicht nachvollziehbar
Difco™ Agar Nobel	ThermoFisher Scientific, Karlsbad, Kalifornien, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol, 70%	Chemsolute, Th.Geyer, Renningen, Deutschland
Ethanol absolut	Chemsolute, Th.Geyer, Renningen, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Eukitt® Schnelltrocknendes Mounting Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Formaldehyd Lösung 37%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol 87 % (BP, Ph. Eur.)	AppliChem, Darmstadt, Germany
Goat Normalserum, S-1000	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Hämatoxylin nach Mayer	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol p.a.	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA

Material und Methoden

Milchpulver	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Mounting Medium für Fluorescence mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumdesoxycholat	AppliChem, ITW Reagents, Chicago, Illinois, USA.
Nonidet® P- 40 Substitute	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Phosphatase-Inhibitor (50x)	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
Protease-Inhibitor (100x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
S.O.C Medium	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trizma® base (Tris)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypanblau Lösung 0,4%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween ® 20	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
UltraPure™ Agarose	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Xylol	Chemsolute, Th.Geyer, Renningen, Deutschland

Tabelle 2.2 Kits

Beschreibung	Hersteller
CellTracker™ Green CMFDA	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
CellTracker™ Red CMTPIX	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
Diaminoenzidine (DAB) Peroxidase Substrat (SK-4100)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Elite (Pk-6100)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

Material und Methoden

OneShot™ TOP10, Chemically competent cells	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
Lipofectamine® 2000 Reagent	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
ORA™ qPCR Green ROX H Mix	highQu GmbH, Kraichtal, Germany
Pierce® BCA Protein Assay, Reagent A & B	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Kalifornien, USA
QIAGEN PCR Purification	Qiagen, Kalifornien, USA
qScriber™ cDNA Synthese Kit	highQu GmbH, Kraichtal, Germany
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Kalifornien, USA
Röntgenentwickler Unimatic-F	Calbe Chemie, Calbe (Saale), Deutschland
Röntgenfixierer Unimatic-F	Calbe Chemie, Calbe (Saale), Deutschland
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
Westar Nova 2.0 Chemiluminescent Substrate for Western Blotting	Cyanagen Srl, Bologna, Italy

Tabelle 2.3 Besondere Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cell Culture Inserts, Transparent PET Membrane, 24-Well 8.0 µm pore size	BD Falcon, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen etc.) wurden von folgenden Firmen käuflich erworben und werden nicht im Detail aufgelistet.

- Greiner BioOne (Frickenhausen, Deutschland)
- Becton & Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
- Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
- Falcon (B&D, Heidelberg, Deutschland)
- Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 2.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pLenti-c-myc-DDK-P2A-Puro	Lentivektor mit C-terminalem c-MYC-DDK Tag und P2A-Puro	Käuflich erworben bei OriGene (PS100092)
pLenti-c-myc-DDK-P2A-Puro-Smurf1	Lenti ORF Klon Smurf1, Transkript Variante 2, Myc-Tagged Vektor: pLenti-c-myc-DDK-P2A-Puro	Käuflich erworben bei OriGene (RC219536L3)
pGFP-c-shLenti-Smurf1 (A-D)	Lentiviraler Vektor für shRNA-Expression gegen Smurf1, Selektionsmarker: Puromycin	Käuflich erworben bei OriGene (TL301488)
pGFP-c-shLenti-scramble	Lentiviraler Vektor zur shRNA Negativ-Kontrolle, Selektionsmarker: Puromycin	
pMD2.G	VSV-G Lentiviraler Envelope-Vektor	AG Windhorst, UKE, Hamburg, Deutschland
psPAX2	Lentiviraler Verpackungsvektor der 2. Generation	AG Windhorst, UKE, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.5 shRNA Sequenzen

shRNA	Sequenz
A	GAACGACATCACGCCTGTACTGGACCACA
B	ATGAATCACCAGTGCCAACTCAAGGAGCC
C	TTCTGGCAAGCGGTGGAGACGTTTCGATGA
D	GTCATTGCCGCATCGAAGTGTCCAGAGAA

Tabelle 2.6 Primer

Primer	Sequenz Forward Primer (5'-3')	Sequenz Reverse Primer (5'-3')
GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	TGCTGTAGCCAAATTCGTTG
Smurf1	GCTTTGCAAGGTTCTACAGGC (21)	GCTGTCAGCAGCTTCTCGTA (20)

Tabelle 2.7 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller	Methode
β-Actin	sc-47778, Lot:G0213, Mouse IgG 2a	SantaCruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA	WB
Smurf1	Ab57573, Lot: 1D7, Mouse IgG	Abcam, Cambridge, UK	WB
Smurf1	HPA055245, Lot: #R73473	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	IHC
Anti-Mouse	1030-05, #E2518Z929, goat-anti-mouse IgG, Human ads-HRP, genutzt als Sekundär-AK für Beta-Aktin und Smurf1	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA	WB
Anti-Rabbit	Sc-2357, #A0318 Mouse Anti-Rabbit, IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA	WB
Biotinylated Rabbit IgG	Sc-2027 Lot #E259, Isotypkontrolle	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA	IHC
Biotinylated Anti-Rabbit IgG	BA-1000, Goat Anti-Rabbit IgG AK (H+L), Lot ZA024	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA	IHC

Tabelle 2.8 Medium und Zellkultur-Zusätze

Beschreibung	Hersteller
Accumax- Cell Aggregate Dissociation Medium	eBioscience, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
Attachment Factor	CellSystems, Kirkland, Washington, USA
Complete Classic Medium mit Serum und CultureBoost	CellSystems, Kirkland, Washington, USA
DMEM (1x) + GlutaMAX™-I	GIBCO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture; PBS (-/-)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Material und Methoden

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture; PBS (+/+)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EBM®-2, Endothelial Cell Basal Medium-2	Lonza, Basel, Switzerland
Endothelial Cell Basal Medium MV + Supplement Pack (FCS-25, ECGS/H, hEGF-5, HC-500)	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
McCoy's 5A Medium (1X), Modified L-Glutamine	GIBCO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
Heat Inactivated FBS, Fetal Bovine Serum	GIBCO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
0.05 % Trypsin-EDTA (1x)	GIBCO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA
OPTI-MEM® I (1X)	GIBCO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA

Tabelle 2.9 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
MDA-MB-231	HTB-26, humane Zelllinie eines Adenokarzinoms der Brust, gewonnen aus einer 51-jährigen Frau kaukasischer Herkunft. ER und PR negativ, mesenchymal.	ATCC, Rockville, USA
SKBR3	HTB-30, humane epitheliale Zelllinie eines Adenokarzinoms der Brust, gewonnen aus einem Pleuraerguss einer 43-Jährigen, weißen, Frau kaukasischer Herkunft HER2-Amplifikation	ATCC, Rockville, USA
hBMEC	ACBRI376 Primäre, humane, mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns. Isoliert aus normalem, gesunden Spendergewebe	CellSystems, Kirkland, Washington, USA
HEK293T	CRL-1573, humane Nierenzelllinie, isoliert aus Embryo, epithelial	ATCC, Rockville, USA

Tabelle 2.10 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzungen	Konzentrationen
Anodenpuffer (10x)	Trizma® Basis Auffüllen bis 1l mit Aqua dest. pH 8,9	200 mM
10% Ammoniumpersulfatlösung (APS)	Ammoniumpersulfat Auffüllen bis 10 ml mit Aqua dest. Aliquotieren und bei -20°C lagern	1 g (10% (w/v))
Blocking-Reagent (10x)	Reagenz wird unter Hitze in Maleinsäurepuffer bis zu einer Endkonzentration von 10% (w/v) aufgelöst. pH 7,5	10 % (w/v)
Citratpuffer Stock-Solution (10x)	$C_6H_8O_7 \times H_2O$ bis zu 1 Liter mit Aqua dest. Auffüllen (pH 6.0)	100 mM
Kathodenpuffer (10x)	Trizma® Basis Tricin Auffüllen bis 1l mit Aqua dest. pH 8,25	1M 1M
3,7% Phosphat-gepuffertes Formalin	Formaldehydlösung 37% 0,2 M Na-Phosphat-Puffer Aqua dest. pH 7,2-7,4	10 % (v/v) 50 % (v/v) 40 % (v/v)
3x Gelpuffer mit SDS	Trizma® Basis Auffüllen bis 500 ml mit Aqua dest. pH 8,45 Vor Benutzung 15 mL 10% SDS hinzufügen	300 mM
LB-Medium	LB-Medium (Luria/Miller) Auffüllen bis 1l mit Aqua dest. Autoklavieren	25 g

Material und Methoden

LB-Agar-Chloramphenicol-Platten	LB-Medium Agar-Agar Auffüllen bis 500ml mit Aqua dest. Autoklavieren	12,5 g (25 g/l) 7,5 g (15 g/l)
Natrium-Phosphat-Puffer (0.2 M)	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O (pH 7,2-7,4)	160 mM 20 mM
PCsb2-Gel Denaturierungspuffer	Sucrose 0,5 M Trispuffer 10% SDS Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	0,29 M 0,05 M 4 % 0.01% 1 M
RLT Lysepuffer	β-Mercaptoethanol in RLT Puffer	1% (v/v)
RIPA Puffer (-/-)	Trizma® Basis NaCl Nonidet® P- 40 Substitute Natriumdesoxycholate EDTA pH 7.4	65 mM 154 mM 1 % (v/v) 1 % (v/v) 1 mM
RIPA Puffer (+/+)	Trizma® Basis NaCl Nonidet® P- 40 Substitute Natriumdesoxycholate EDTA pH 7.4 Proteaseinhibitor Phosphataseinhibitor	65 mM 154 mM 1 % (v/v) 1 % (v/v) 1 mM 1x 1x
10% SDS	Sodium dodecyl sulfate sodium salt Auffüllen bis 100 ml mit Aqua dest.	10g (10% (w/v))
TBS (10x)	Trizma® Basis NaCl Auffüllen bis 1l mit Aqua dest. pH 7,6	0,2 M 1,37 M

Material und Methoden

0,05% TBS-T	10x TBS 10% Tween 20 Auffüllen bis 1l mit Aqua dest.	100 ml 0,05%
Transferpuffer (10x)	Trizma® Basis Glycin Auffüllen bis 1l mit Aqua dest.	1 M 1,93 M
10% Tween-20	Tween-20 Auffüllen bis 50 ml mit Aqua dest.	5 g (10% (w/v))

Tabelle 2.11 Geräte

Gerät	Beschreibung	Herkunft
Absorptionsreader	Sunrise™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Blottingkammer	Bio-Rad Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Densitometer	GS-800 kalibriertes Densitometer	Bio-Rad, München, Deutschland
Entwickler	Type 94621206 200/208/230-240 V SN 9878	AGFA-HEALTHCARE N.V.
Elektrophorese	Hofer™ SE600 Series, Vertikales Elektrophorese System	Hofer, Inc., Holliston, USA
Fluoreszenzmikroskop	Keyence, BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizplatte	HT200	Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland
Inkubator	Heraeus®HERAcell®	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrozentrifuge	Biofuge Fresco™	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop	Diaphot 300 Phase Contrast Invertiertes Mikroskop	Nikon, Chiyoda, Tokio, Japan

Material und Methoden

Mikrowelle	Sharp R-941STW	Sharp, Sakat, Osaka, Japan
Ofen	TDO60	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
qRT-PCR	StepOnePlus™ Real-Time	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Schüttelinkubator	Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Sterile Bench	Heraeus® HERAsafe®	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wasserbad	GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Wackelschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1. OR	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zelllinien MDA-MB-231 und HEK293T wurden in DMEM-Medium plus 10% (v/v) FCS kultiviert, während die Zelllinie SKBR-3 in McCoy's 5A Medium + 10% (v/v) FCS kultiviert wurde. Die primären Hirn-Endothelzellen (hBMEC) wurden gehalten in *Complete Classic Medium with Serum and Culture Boost* in mit *Attachment factors* beschichteten Flaschen. Die primären Lungenendothelzellen (hPMEC) wurden in *Endothelial Cell Basal Medium MV* kultiviert, welches mit den oben aufgelisteten Zusätzen angereichert wurde. Das Zellwachstum wurde alle 1-2 Tage dokumentiert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% in neue Zellkulturflaschen passagiert. Hierzu wurde zunächst das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen dann mit PBS (-/-) gewaschen und anschließend die adhären Zellen mit 0,05% Trypsin-EDTA (1x) oder Accumax gelöst. Dies erfolgte für 3-5 Minuten bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an Medium gestoppt, die Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 min bei 1.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit dem entsprechenden Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zur Passagierung der hBMEC wird zudem, vor Rückführung der Zellen in die Flasche, diese zunächst mit *Attachment Factors* beschichtet.

2.2.1.2 Zellzahleinstellung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Nach der Resuspension der Zellen werden 25 µl der Suspension mit 25 µl 0,04% Trypanblau (1:1) vermischt und mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Es werden vier große Quadranten gezählt und mit der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der großen Quadranten}} * 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \\ * 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Nach Zentrifugation der trypsinisierten Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1.1) werden diese in 1 ml kaltem FCS/10% (v/v) DMSO pro Kryoröhrchen resuspendiert und über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Die Zellen werden direkt und so schnell wie möglich aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut und in 5 ml des der Zelllinie entsprechenden Mediums überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 1.200 rpm, RT) wird der Überstand entfernt und das Zellpellet in einem angemessenen Volumen Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am Folgetag erfolgt ein Wechsel des Mediums.

2.2.1.5 Protein Isolation von Zellen

Die Zellen wurden entweder in einer 6-Well-Platte oder in einer T25 Zellkulturflasche unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS (-/-) gewaschen und anschließend eine entsprechende Menge an RIPA ++ hinzugefügt (250 µl für eine T25, 100 µl pro Well für eine 6-Well). Die mit RIPA++ beschichteten Zellen wurden anschließend auf Eis gestellt und mit einem Zellschaber gekratzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation, ebenfalls auf Eis mit zusätzlichem vortexen der Zell-RIPA-Suspension alle 10 Minuten. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.1.6 Herstellung von RLT-Lysaten für RNA-Isolation von Zellen

Zur Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen werden zunächst RLT-Lysate hergestellt. Für den Ablauf der RNA-Isolation siehe Abschnitt 3.2.2.1 *RNA-Isolation aus RLT-Lysaten*. Wie auch bei der Herstellung von Proteinlysaten werden die entsprechenden Zellen unter Standardbedingungen in einer 6-Well-Platte oder T25 kultiviert bis zu einer Konfluenz von 80%. Unter Zugabe von 300 µl RLT-β-ME wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Flasche gelöst und in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt. Das RLT-Lysat wird 1 min gevortext und dann bis zur weiteren RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

2.2.1.7 Statischer Adhäsionsassay

Um die Adhäsionsfähigkeit der untersuchten Tumorzellen auf Hirn- und Lungenendothel zu analysieren, wurden statische Adhäsionsassays durchgeführt. Hierzu wurden die Tumorzellen bis zu einer angemessenen Konfluenz kultiviert und mit dem CellTracker™ Red CMTPX markiert. Zeitgleich wurden in einer mit *Attachment Factors* beschichteten schwarzen 96-Well-Platte pro Well $2,5 \times 10^4$ hBMECs ausgesät. Nach 48h wurde davon ausgegangen, dass ein lückenloser Zellrasen besteht. An Tag 3 wurden 5×10^4 Tumorzellen+CMTPX auf die Endothelzellen gegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Wells werden mehrfach mit PBS (+/+) gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu lösen. Die Fluoreszenz wurde mithilfe eines Fluoreszenz Readers in der angegebenen Wellenlänge gemessen.

2.2.1.8 Transwell Invasionsassay

Auf mit *Attachment Factors* beschichtete Transwell-Inserts mit 8 µm Porengröße für eine 24-Well-Platte wurden zunächst 5×10^4 hBMECs ausgesät und bis zum Erhalt einer durchgehenden Konfluenz bis zu 48 Stunden bei 37°C inkubiert. 1×10^4 Tumorzellen wurden mit CellTracker™ Red CMTPX oder CellTracker™ Green CMFDA markiert und konnten anschließend für 48 Stunden durch die Membran migrieren. Nach 48 Stunden wurden die nicht migrierten Zellen mittels PBS (+/+) von der Membran gewaschen und zusätzlich mit einem Wattestäbchen entfernt. Die auf die Unterseite invadierten Zellen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 3,7% Formaldehydlösung fixiert und nochmals mit PBS (+/+) gewaschen. Anschließend wurden die Membranen aus den Inserts gelöst und auf einem Objektträger mit *Mounting Medium for Fluoreszenz with DAPI* fixiert. Die Objektträger wurden für 2 Stunden in Dunkelheit getrocknet. Abschließend wurde die Menge der invadierten Zellen mit einem Fluoreszenz Mikroskop, BZ II viewer/analyzer Software und Hybrid cell count tool bestimmt. Jeder Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation aus RLT-Lysaten

Die RNA wurde aus den zuvor hergestellten RLT-Lysaten (siehe Abschnitt 3.2.1.6) mit Hilfe des RNeasy® Mini-Kit nach Vorgaben des zugehörigen Protokolls isoliert. Hierzu wurde das Lysat auf Eis aufgetaut, 1 min über vortexen homogenisiert und anschließend mit gleicher Menge 70% EtOH auf die beigefügte Säule übertragen. Die folgenden Wasch- und Eluierungsschritte wurden unverändert vom beigelegten Protokoll übernommen und durchgeführt. Das endgültige Eluat wurde mit 40 µl H₂O erstellt und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

RNA wurde in komplementäre cDNA transkribiert unter Nutzung des qScriber™ cDNA Synthesis Kit von highQu. Hierbei wurde jeweils 1 µg RNA umgeschrieben unter Berücksichtigung des folgenden Protokolls. Die RNA-Konzentration wurde zuvor photometrisch bestimmt. Das Programm der cDNA-Synthese wurde in einem Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 2.12 MasterMix cDNA-Synthese

Bestandteil	Volumen (µl)
5x Reaction Mix	4
Enzyme Blend 20x	1
Nuklease-freies Wasser	5
RNA-Probe + Nuklease-freies Wasser	10
Totales Volumen	20

Tabelle 2.13 Programm zur cDNA-Synthese

Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
10	25
30	50
5	85
∞	4

2.2.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die RNA-Expression wurde mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Hierzu wurde das Kit ORA™ qPCR Green ROX H Mix von highQu verwendet. Die verwendeten Primer-Paare können in Abschnitt 3.1.5 Primer nachvollzogen werden. Alle Werte wurden auf GAPDH normiert und der fold change der Expression mittels der $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet. Zur Analyse wurde die zuvor hergestellte cDNA aus Zelllinien in einer Konzentration von 1 µg/µl verwendet. Die weiteren Bestandteile des Probenansatzes können aus der untenstehenden Tabelle abgelesen werden. Alle Proben wurden als Doppelbestimmungen aufgetragen mit einem zusätzlichen Ansatz mit sterilem Wasser als Negativkontrolle. Das zuvor geschriebene Programm (siehe unten) wurde in dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System durchgeführt und mit einer gleichnamigen Software analysiert.

Tabelle 2.14 MasterMix qPCR

Bestandteil	Menge
Forward-Primer	0,4 µl (10 pmol/µl)
Reverse-Primer	0,4 µl (10 pmol/µl)
Green ROX High Mix (2x)	10 µl
Steriles Wasser	8,2 µl
cDNA	1 µl (1µg/µl)

Tabelle 2.15 qPCR-Programm

Stage	Zeit (Sec)	Temperatur (°C)
Holding Stage	30	95
Cycling Stage, 40 cycles	5	95
	30	60
Melt Curve Stage	10	95
	60	65
	1	97

2.2.2.4 Produktion von Zelllinien mit Smurf1-Überexpression und Smurf1-Knockdown

2.2.2.4.1 Amplifizierung der Plasmide

Die Amplifizierung der Plasmide wurde mit jedem der bei ORIGENE käuflich erworbenen Plasmide durchgeführt, hierzu gehören sowohl die Plasmide für die Erstellung einer Überexpression als auch die shRNA-enthaltenden Plasmide (Tabelle 2.4 Plasmide).

Transformation in E.Coli

Die Plasmide wurden käuflich bei Origene erworben und anschließend in TOP10 E.coli transformiert und somit vervielfältigt. Hierzu wurden jeweils 50 µl E.Coli auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid/Klon (1-10 ng) beimpft. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurde der sogenannte Hitzeschock durchgeführt, indem die Bakterien für 45 Sekunden in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C gehalten und anschließend für 2 min auf Eis überführt wurden. Zusätzlich wurde pro Bakterienkultur 500 µl SOC-Medium hinzugefügt. Nachfolgend wurden die Bakterien 1 Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator bei einer Geschwindigkeit von 200 rpm inkubiert. Hierbei ist zu beachten, dass der Deckel mit durchlöcherterem Parafilm ersetzt werden muss. Die Bakterien werden anschließend auf Agar-Chloramphenicol-Platten (34 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert. Nach Nutzung können die Platten luftdicht verschlossen bei 4°C gelagert werden.

Vor- und Hauptkulturen

Zur Vermehrung der Plasmid-enthaltenden Bakterien werden Bakterienkulturen angelegt. Hierzu werden von der Agarplatte 4 Bakterienkolonien mithilfe einer Pipettenspitze (100 µl) gepickt und für 6-8 Stunden in 1 ml LB-Medium plus Chloramphenicol (1:1000) im Schüttelinkubator (200 rpm, 37°C) inkubiert. Zur Herstellung der Hauptkultur werden nun 500 µl der Bakterien Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium plus

Material und Methoden

Chloramphenicol (1:1000) überführt und erneut für 14-16 Stunden im Schüttelinkubator (200 rpm, 37°C) inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte am nächsten Tag mittels des QIAGEN® Plasmid Midi Kits und erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Zuletzt wurden die Konzentrationen bestimmt und die Plasmide bei -20°C eingefroren.

2.2.2.4.2 Lentivirale Transduktion

Um die Lentiviren zu produzieren, werden zunächst die zuvor amplifizierten lentiviralen Plasmide (siehe Tabelle 2.4 Plasmide) sowie die Struktur- und Verpackungsplasmide (psPAX.2 und pMD2.G) in HEK293T Zellen mittels Transfektion eingebracht. Hierbei werden zunächst 4×10^6 HEK293T Zellen kultiviert und an Tag 1 in einer 10cm Kulturschale ausgebracht. Pro Virusart, also pro lentivirales Plasmid, wird 1 Zellkulturschale verwendet. Die hier verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.4 Plasmide aufgelistet. Für die Überexpression wurde ein lentivirales Plasmid mit kodierender Smurf1-Sequenz und ein lentivirales Plasmid ohne kodierende Sequenz als Kontrolle verwendet. Für den Knockdown wurden vier lentivirale Plasmide mit spezifischen shRNA-Sequenzen (siehe Tabelle 2.5 shRNA Sequenzen) verwendet, sowie ein lentivirales Plasmid ohne Smurf1-spezifische shRNA Sequenz (scramble).

Am folgenden Tag wird die eigentliche Transfektion durchgeführt. Hierzu wird zunächst Transfektions-Mix A angesetzt und 5 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wird Transfektions-Mix B angesetzt.

Transfektions-Mix A	Transfektions-Mix B
250 µl OPTI-MEM® I (1x)	250 µl OPTI-MEM® I (1x)
750 ng psPAX.2	5 µl Lipofectamine® 2000
250 ng pMD2.G	
1 µg Lentivirales Plasmid	

Anschließend werden 255 µl von Transfektions-Mix B zu Transfektions-Mix A pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Die HEK293T Zellen werden mit PBS (+/+) gewaschen, 5 ml OPTI-MEM® I (1X) und der Transfektions-Cocktail hinzugeben und 6 h bei 37°C inkubiert. Nach 6 h werden nochmals 5 ml DMEM-Medium + 10% FCS (v/v) hinzugegeben und die Zellen über Nacht weiter bei 37°C gehalten. Die Tumorzellen werden in einer 6-Well-Platte ausgesät, so dass sie am Folgetag eine Konfluenz von etwa 70% aufweisen. Nach 24 und 48 h werden, die von den HEK293T Zellen produzierten, im Überstand enthaltenden, Viruspartikel auf die Zielzellen gegeben. Hierzu wird der Überstand mit einer 10 ml Spritze von den Zellen entfernt und gefiltert (0,45 µm). Das Medium der Zielzellen wird entfernt, die Zellen mit PBS (-/-) gewaschen und anschließend 1 ml Standardmedium (der Tumorzelllinie entsprechend) auf die Zellen gegeben. Hinzu kommen 2 ml der Viruspartikel. Pro Virusart

Material und Methoden

wurde ein Well transfiziert. Der übrige Virusüberstand wird aliquotiert und bei -80°C gelagert. 72 h nach der letzten Zugabe an Viren auf die Tumorzellen wird die Selektion gestartet. Da die verwendeten Plasmide eine Puromycin-Resistenz aufweisen konnte eine Selektion mit Puromycin durchgeführt werden. Hierzu wurde das entsprechende Medium mit einer Zelllinien-spezifischen Konzentration versetzt (SKBR-3: $1,0\ \mu\text{g/ml}$; MDA-MB-231: $0,5\ \mu\text{g/ml}$) und die Zellen so lange in diesem Medium kultiviert bis die un-transfizierte Selektionskontrolle komplett abgestorben ist. Hierbei betrug die durchschnittliche Selektionsdauer 7 Tage. Der Erfolg der Transduktion wurde anschließend auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen.

Tabelle 2.16 Stabil transfizierte Zelllinien

Smurf1-Überexpression	Smurf1-Knockdown
SKBR3 leer	SKBR3 scr
SKBR3-Smurf1 ^{hi}	SKBR3-Smurf1 ^{lowA} , SKBR3-Smurf1 ^{lowB} , SKBR3-Smurf1 ^{lowD}
MDA-MB-231 leer	MDA-MB-231 scr
MDA-MB-231-Smurf1 ^{hi}	MDA-MB-231-Smurf1 ^{lowA} , MDA-MB-231-Smurf1 ^{lowB} , MDA-MB-231-Smurf1 ^{lowD}

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 BCA-Proteinbestimmung

Die Proteinmenge aus den zuvor gewonnenen RIPA-Lysaten (siehe Abschnitt 3.2.1.5) wurde mittels der BCA-Methode bestimmt. Die zu bestimmenden Lysate wurden hierbei zunächst 1:5 mit $0,5\ \text{M}$ Tris-HCl verdünnt. Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin (BSA) $2000\ \mu\text{g/ml}$ Stammlösung verwendet. Unter Verdünnung mit RIPA (-/-) und $0,5\ \text{M}$ Tris-HCl wurde eine Standardreihe erstellt (siehe unten) von derer jeweils $25\ \mu\text{l}$ zur Messung in eine 96-Well Platte pipettiert wurde. Ebenfalls wurden $25\ \mu\text{l}$ der verdünnten Proben in die 96-Well Platte pipettiert. $200\ \mu\text{l}$ der BCA-Arbeitslösung (Lösung A:Lösung B 50:1 Verhältnis) wurden zu jeder Probe hinzugefügt. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmung analysiert. Nach einer Inkubation für 60 min bei 37°C wurde die Platte photometrisch bei einer Wellenlänge von $540\ \text{nm}$ gemessen und mit Magellan V6.6 Software (Tecan Trading AG) ausgewertet.

Tabelle 2.17 Herstellung der Standardreihe

Eppi	BSA Konzentration (µg/ml)	Volume BSA (µl)	RIPA Puffer (µl)	0.5 M Tris/HCl (µl)
A	1600	400 aus Stammlösung	100	0
B	1000	500 aus Stammlösung	200	300
C	800	200 aus A	40	160
D	500	500 aus B	100	400
E	250	500 aus D	100	400
F	125	500 aus E	100	400
G	62,5	500 aus F	100	400
H	31,25	500 aus G	100	400
Blank	-	-	20	80

2.2.3.2 Western Blot

Elektrophorese

Die Proteine wurden mittels vertikaler Elektrophorese aufgetrennt und abhängig von ihrer Größe separiert. Hierzu wurden Polyacrylamid Gele benutzt. Die Gele teilten sich in ein Sammelgel (5%) und ein Trenngel (10%). Die Konzentration des Trenngels ist abhängig von der Proteingröße. Die Herstellung der Gele erfolgte nach folgender Zusammensetzung: siehe Tabelle 3.17

Zur Auftrennung wurden 20 µg Protein benutzt, welche mit RIPA-Puffer auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt wurden. Die Lösung wurde dann 1:1 mit PCsb2-Gel Denaturierungspuffer vermengt, für 5 min bei 95°C im Thermocycler denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zur Größenkontrolle wurde *CozyHi prestained protein ladder* als Marker verwendet. Die durchschnittliche Dauer des Gellaufes betrug 18 Stunden bei 58 V mit 1x Kathodenpuffer und 1x Anodenpuffer.

Tabelle 2.18 Zusammensetzung der Gele

Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
87% Glycerin (8g)	Aqua dest (11,9 ml)
Aqua dest. (17 ml)	3x Gelpuffer mit SDS (4,7 ml)
3x Gelpuffer mit SDS (20 ml)	40% AA/BAA (2,3 ml)
40% AA/BAA (15ml)	APS 10% (225 µl)
APS 10% (300 µl)	TEMED (25 µl)
TEMED (30 µl)	

Blotting

Nach Abschluss der Elektrophorese werden die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Hierzu wird das Gel vorsichtig von den Glasplatten der Elektrophorese getrennt und gemeinsam mit Filterpapier und der in Methanol aktivierten Membran verpackt. Das Blotting erfolgte für 2:10 h bei 400 mA in einer mit Transferpuffer gefüllten Blottingkammer.

Detektion

Anschließend erfolgte die Blockierung der Membran, abhängig vom verwendeten Antikörper (AK) entweder in 5% Milchpulver/TBS-T oder in 100% Blocking Reagenz (Roche). Der primäre Antikörper wurde entweder über Nacht bei 4°C inkubiert oder für 1h bei Raumtemperatur. Die spezifischen AK- Protokolle sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Nachfolgend wurde die Membran 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen und der zugehörige Sekundär-AK in einer Verdünnung von 1:8000 hinzugegeben für 1h auf dem Wackelschüttler bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang (4x10 min) mit TBS-T wurden 10 ml Chemielumineszenz Westar Nova 2.0 (1:1; 5 ml Lösung A + 5 ml Lösung B) für 5 min hinzugegeben und die Membran anschließend mit der Entwicklermaschine von AGFA-HEALTHCARE N.V. detektiert. Die benutzten und unbenutzten Membranen werden eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Immunohistochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zellen in Agar

Zur Herstellung von Zellen in Agar wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% in einer T175 Zellkulturflasche wachsen gelassen. Nachdem die Zellen mit 20 ml PBS (+/+) gewaschen wurden, wurden weitere 20 ml PBS (+/+) dazu genutzt, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu kratzen. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden fixiert mit 3,7%

Phosphat-gepufferter Formalinlösung und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml PBS (+/+) und erneute Zentrifugation für jeweils 5 Minuten bei 1.200 rpm und Raumtemperatur. Die Zellen wurden abschließend in 1 ml PBS (+/+) gelöst und bei 4°C zwischengelagert. Zum Einbetten der Zellen in Agarose wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1.200 rpm, RT) und das Pellet in 200 µl 2% flüssigem Difco™ Agar Nobel gelöst. Die Einbettung in Paraffin erfolgte nach in 3.2.4.2 beschriebenen Prozedere.

2.2.4.2 Einbetten in Paraffin und Herstellung von Schnitten

Zum Einbetten der Zellen in Paraffin wurden diese erneut in 3,7% Phosphatgepuffertem Formalin eingebettet und anschließend über den *automatischen Gewebeaufbereiter* des Instituts für Anatomie (UKE) dehydriert. Nach der Dehydratation erfolgte die Inkubation in flüssigem Paraffin über eine Ausgießvorrichtung (Institut für Anatomie, UKE) zweimal für 5 Stunden bei 63°C. Die in Paraffin eingebetteten Zellen wurden anschließend bei 63°C in Metalformen übertragen und abgekühlt. Die in Paraffin eingebetteten Zellen in Agar wurden mithilfe eines Mikrotoms mit einer Dicke von 4 µm prepariert und auf Objektträger übertragen. Die Fixierung erfolgte über Nacht im Ofen bei 37°C.

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemische Färbung auf Smurf1 erfolgt über zwei Tage. Tag 1: Nachdem die Schnitte für 1 Stunde im 60°C Wärmeschrank gelagert wurden erfolgte die Entparaffinierung für zweimal 10 Minuten in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, Leitungswasser) für je zweimal 5 Minuten. Die folgende Demaskierung der Antigene wurde erreicht, indem die Schnitte zweimal 7 Minuten mit Citrat-Puffer in der Mikrowelle inkubiert und anschließend für zweimal 5 Minuten mit Leitungswasser gespült wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert und erneut zweimal 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Danach erfolgte dreimal für 5 Minuten eine Spülung mit TBS (pH 7,6). Als nächster Schritt wurden die Schnitte 30 Minuten mit Goat-Normalserum 1:10 in TBS blockiert. Der Primär-Antikörper (AK) (Tabelle 2.7 Antikörper) wurde parallel mit der Isotypkontrolle über nach bei 4°C inkubiert. Tag 2: Am kommenden Tag wurden die Schnitte zunächst 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal 5 Minuten mit TBS-T und einmal 5 Minuten mit TBS auf dem Schüttler gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Sekundär AK in 10 ml TBS hinzugegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschgang mit zweimal 5 Minuten TBS-T, gefolgt von 10 Minuten TBS. Unmittelbar darauf folgt die Inkubation für 30 Minuten mit Elite-Reagenz und nach Ablauf der Zeit eine erneute Waschung wie oben bereits beschrieben. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 6 Minuten in Peroxidase-Substrat Dilution (DAB-Peroxidase. Substrat-Kit) und eine erneute

Material und Methoden

Waschung in Leitungswasser. In der nächsten Phase wurden die Schnitte für 5 Minuten in Hämatotoxylin inkubiert und unter fließendem Wasser gespült. Abschließend wurden die Schnitte jeweils zweimal 5 Minuten in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert (80%, 90%, 100% und Xylol) und mit Eukitt eingedeckt.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Statistics 27 für MAC iOS (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Alle Versuche wurden mittels t-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Hierbei galt * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$. Angegeben ist der Mittelwert +/- Standardfehler (SEM). Der SEM wird berechnet aus der Standardabweichung geteilt durch die Wurzel der Stichprobenanzahl.

Die Abbildungen wurden mithilfe von GraphPad, Version Prism 7 erstellt (San Diego, CA, USA)

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der E3-Ubiquitin-Ligase Smurf1 auf die Entstehung von HM beim MaCa in einem *in vitro* Modell zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde im ersten experimentellen Teil eine triple-negative (TN) und eine HER2-positive Smurf1-Knockdown Zelllinie, sowie eine TN- und HER2-positive Smurf1-Überexpressions Zelllinie etabliert. Um im Anschluss den Einfluss des Smurf1-Levels zu untersuchen, wurden diese im zweiten experimentellen Teil funktionell bezüglich ihres Adhäsions- und Invasionsverhalten durch die BHS untersucht. Beide Teile sind im Folgenden dargestellt.

3.1 Auswahl der Brustkrebszelllinien anhand des Smurf1-mRNA Levels

Um die für die Fragestellung relevanten Zelllinien zu identifizieren, wurde zunächst eine qPCR (Material und Methoden 3.2.2.3) mit cDNA von verschiedenen MaCa-Zelllinien unterschiedlichen molekularen Subtyps durchgeführt (Abbildung 3.1A). In Abbildung 3.1B zeigt sich eine Zuordnung der jeweiligen Zelllinien in Abhängigkeit der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie des HER2-Expressionslevels. Hierbei sind die Zelllinien mit einem TN-Rezeptorprofil pink und die Zelllinien mit einem HER2-positiven Rezeptorprofil grün dargestellt. Über alle molekularen Subtypen hinweg zeigte sich eine heterogene Expressionsstärke von Smurf1 mRNA.

Vorab angefertigte, bisher unpublizierte, Microarray-Daten aus einem Kollektiv von 194 primären Mammakarzinomen zeigten ein erhöhtes Smurf1 mRNA-Level in den Tumoren, welche im Verlauf HM entwickelt haben. Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem molekularen Subtyp und dem Smurf1-mRNA-Level. Hierbei zeigten HER2-positive und TN-Tumoren eine höhere Smurf1-mRNA-Expression als HR-positive Tumoren. Zusätzlich korrelierte die Smurf1-Expression mit einem kürzeren Rezidivfreien- und Gesamtüberleben. (Oliveira-Ferrer, unpublizierte Daten). Es wurde für die Etablierung der Smurf1 Überexpression und des Knockdowns (KD) eine HER2-positive und eine TN-Zelllinie ausgewählt, um diese Daten *in vitro* zu bestätigen.

Um den relativen Smurf1 Unterschied im Vergleich zu HR-positiven Tumoren, welche eine geringere Inzidenz von HM haben, darzustellen wurde das Smurf1-mRNA-Level im Verhältnis zur HR-positiven Zelllinie MCF-7 gewertet, welche als Vergleichswert gleich eins gesetzt wurde. In Abbildung 3.1A zeigte sich hierbei eine sichtbare Tendenz eines erhöhten relativen Smurf1-mRNA Levels, welche allerdings mit $p=0,08$ (Standardfehler (SEM) 0,06) für die MDA-MB-231 und $p=0,1$ (SEM 0,2) für die SKBR-3 keine Signifikanz erreichten. Interessanterweise zeigten die Gehirn- und Knochenspezifischen Zelllinien MDA-MB-231

Ergebnisse

Br ($p=0,014$, SEM 0,055) und MDA-MB-231 Sa ($p=0,057$, SEM 0,097) eine in der Tendenz verringerte Smurf1-mRNA-Expression.

In Zusammenschau der im Labor vorhandenen Zelllinien, der Literatur und der Ergebnisse der qPCR entschieden wir uns für die Auswahl der TN-Zelllinie MDA-MB-231 wt und der HER2-positiven Zelllinie SKBR3.

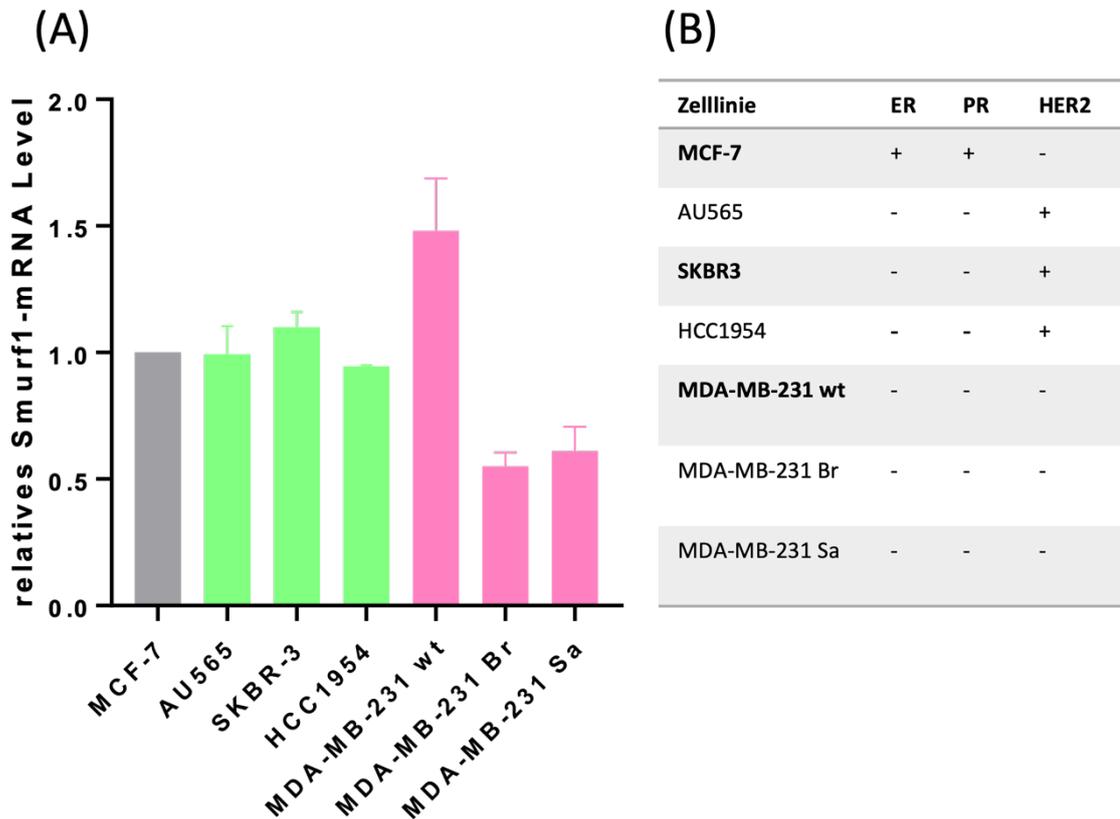


Abbildung 3.1 Charakterisierung der Smurf1-Expression in Brustkrebszelllinien mit unterschiedlichem molekularem Rezeptorprofil

(A): qPCR der MaCa-Zelllinien MCF-7, AU565, SKBR-3, HCC 1954, MDA-MB-231 wt, MDA-MB-231 Br, MDA-MB-231 Sa. Gezeigt wird die Heterogenität des relativen Smurf1 mRNA-Level in Abhängigkeit des molekularen Subtyps. MCF-7 wird hierbei als Referenzwert gleich eins gesetzt und die anderen Zelllinien gegen diesen Vergleichswert verrechnet. Gezeigt sind der Mittelwert und der Standardfehler. Mit Ausnahme der Zelllinien SKBR3 und HCC1954, die in $n = 2$ unabhängigen Versuchen getestet wurden, sind für jede Zelllinie die Ergebnisse aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen gezeigt. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Berechnung herangezogen wurde der Standardfehler, welcher nach in 2.2.5 Statistik beschriebener Formel berechnet wurde. (B) Expression von ER, PR und HER2 auf den ausgewählten Zelllinien. MCF-7: HR-positiv Subtyp; HCC1954, AU565 und SKBR-3: HER2-positiver Subtyp (grün); MDA-MB-231 wt, -Br, -Sa: TN (basal-like) Subtyp (pink) (Subik et al., 2010, Gazdar et al., 1998).

3.2 Knockdown und Überexpression von Smurf1

Um den Einfluss des Expressionslevels von Smurf1 in MaCa-Zellen auf die Adhäsionsfähigkeit, Invasivität und Migration über die BHS zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell mit stabilem Smurf1-KD und stabiler Smurf1-Überexpression in den Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 wt mithilfe lentiviraler Transduktion etabliert.

3.2.1 Etablierung von Zelllinien mit stabilem Smurf1 Knockdown und Bestätigung mit qPCR und Western Blot

Über RNA-Interferenz mittels einer shRNA sollte das Smurf1-Level in den Tumorzellen reprimiert werden. (Material und Methoden 2.2.2.4) Da sich die käuflich erworbenen shRNAs in ihrer Effektivität unterscheiden können, führten wir die Transfektion der Tumorzellen mit vier verschiedenen shRNAs durch (Tabelle 2.5 shRNA Sequenzen). Von den vier shRNAs überlebten lediglich die Zellen mit shRNAs A, B und D die Selektionskontrolle.

Abbildung 3.2 zeigt den Transduktionserfolg der Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 auf RNA- und Proteinebene. Die neu etablierten Zelllinien SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} zeigen eine signifikante Reduktion der Smurf1 mRNA Expression um ca. 70% (SKBR3-Smurf1^{lowA}, p= 0,0008, SEM 0,06) und 60% (SKBR3-Smurf1^{lowD}, p=0,0006, SEM 0,06) in Bezug zur Vergleichszelllinie SKBR3-scr (Abbildung 3.2A). Dies entspricht einer Smurf1 Restexpression von 30-40%. Der scramble der jeweiligen Zelllinie repräsentiert das Smurf1-mRNA-Level vor der Transduktion und soll ausschließen, dass veränderte Zelleigenschaften auf die Durchführung der Transduktion und nicht auf das veränderte Expressionslevel zurückzuführen sind. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls mit einem lentiviralen Plasmid, welches keine shRNA enthält, behandelt, so dass ein unverändertes Smurf1-Level erreicht werden konnte.

Die TN-Zelllinien MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} zeigen einen relativen KD auf 50% (MDA-MB-231-Smurf1^{lowA}, p<0,0001, SEM 0,005) und 55% (MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} p=0,0006, SEM 0,045) Restexpression im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB-231-scr =1.

Das Smurf1-Expressionslevel auf Proteinebene wurde durch Westernblot (WB) Analysen gezeigt (Abbildung 3.2 B,C). Es lässt sich deutlich ein reduziertes Smurf1-Proteinlevel in den Zelllinien SKBR-Smurf1^{lowA}, SKBR-Smurf1^{lowB} und SKBR-Smurf1^{lowD} darstellen.

Die Densitometrische Quantifizierung (Abbildung 3.2C) zeigt das Smurf1-Level in Bezug zur Vergleichszelllinie SKBR3-scr (=1). Hierbei zeigt sich eine Reduktion des Smurf1-Proteinlevels in SKBR3-Smurf1^{lowA} um ca. 40%, in SKBR3-Smurf1^{lowB} um 20% und in

Ergebnisse

SKBR3-Smurf1^{lowD} um ca. 50%. In den folgenden funktionellen Untersuchungen wurde sich auf die Zelllinien SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} beschränkt.

Auch in den Zelllinien MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} konnte der KD auf Proteinebene bestätigt werden. Die densitometrische Messung zeigt eine Reduktion des Smurf1-Proteinlevels auf 60% (MDA-MB-231-Smurf1^{lowA}) und 70% (MDA-MB-231-Smurf1^{lowD}) im Vergleich zur Referenzzelllinie MDA-MB-231-scr = 1. (Abbildung 3.2B, C)

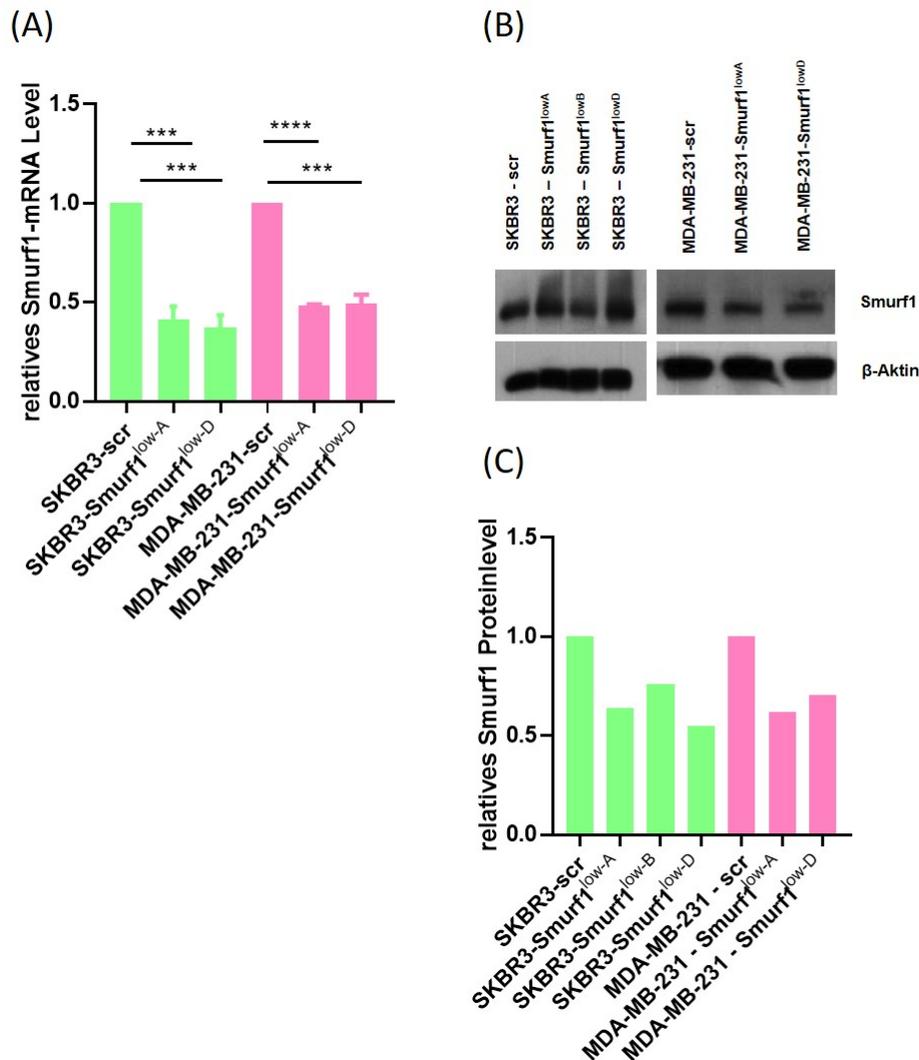


Abbildung 3.2 Kontrolle des Transduktionserfolgs mittels qPCR und Western Blot

(A) Quantifizierung des relativen mRNA-Expressionslevels von Smurf1 in den Zelllinien SKBR3-scr, SKBR3-Smurf1^{lowA}, SKBR3-Smurf1^{lowD}, MDA-MB-231-scr, MDA-MB-231-Smurf1^{lowA}, MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} mittels qPCR. Die Werte wurden gegen das entsprechende GAPDH-Level normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und der Standardfehler. Mit Ausnahme der Zelllinien MDA-MB-231-scr, -Smurf1^{lowA} und -Smurf1^{lowD}, die in n = 2 unabhängigen Versuchen getestet wurden, sind für jede Zelllinie die Ergebnisse aus n = 3 unabhängigen Versuchen gezeigt. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. * p<0,05 ** p<0,005 *** p<0,001 **** p<0,0001 **(B)** Die WB Analyse der Proteinlysate (20µg) der Zelllinien SKBR3-scr, SKBR3-Smurf1^{lowA}, SKBR3-Smurf1^{lowD}, MDA-MB-231-scr, MDA-MB-231-Smurf1^{lowA}, MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} zeigt das Smurf1-Level auf Proteinebene (AK ab57573). β-Aktin (AK sc-47778) wurde als Ladekontrolle verwendet. Smurf1 hat 86kDa und β-Aktin 48 kDa. **(C)** Quantifizierung des relativen Smurf1-Proteinlevels der SKBR3- und MDA-MB-231 Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3-scr und MDA-MB-231-scr = 1).

Ergebnisse

Zur zusätzlichen Darstellung des Smurf1-Levels wurde eine immunhistochemische Färbung der Zellen in Agar repräsentativ durch die Zelllinien SKBR3-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231^{lowA}, sowie den zugehörigen scramble-Zelllinien etabliert. Abbildung 3.3 zeigt die immunhistochemische Färbung von Smurf1 in 40-facher Vergrößerung. Erkennbar ist ein deutlich reduziertes Färbeverhalten in den KD-Zelllinien im Vergleich zum scramble.

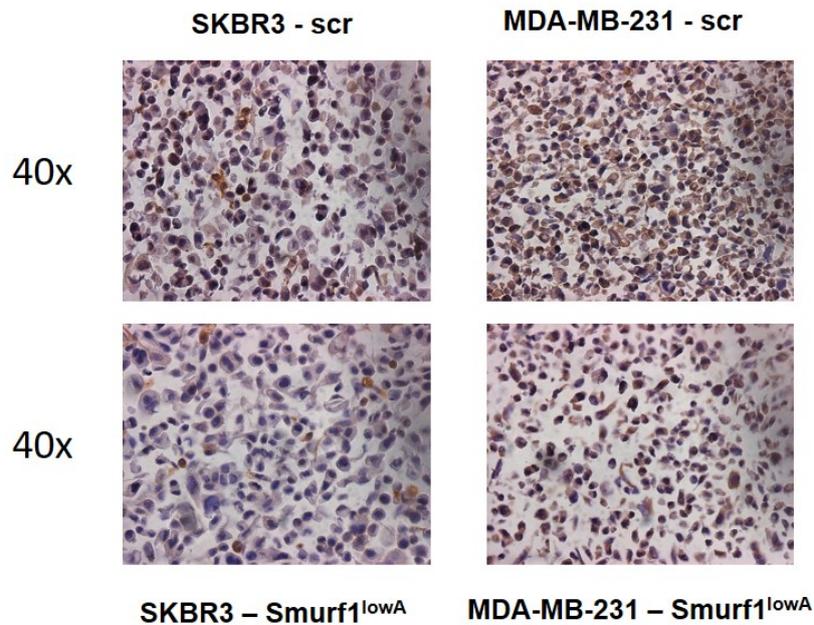


Abbildung 3.3 Immunhistochemischer Nachweis des Smurf1-Knockdowns in SKBR3 und MDA-MB-231

Immunhistochemische Färbung der SKBR3- und MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} (*unten*)-Zellen in Agar im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle SKBR3-scr und MDA-MB-231-scr (*oben*) auf Smurf1 (Firma Sigma #HPA055245). Vergrößerung 40x.

Nach erfolgreichem Abschluss der Transfektion wurden die Zelllinien SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD}, sowie MDA-Smurf1^{lowA} und MDA-Smurf1^{lowD} für die funktionellen Analysen ausgewählt.

3.2.2 Etablierung von Zelllinien mit stabiler Smurf1 Überexpression und Bestätigung mit qPCR und WB Analysen

Um im *in vitro* Modell mögliche Einflüsse auf die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen auf Smurf1 zurückführen zu können wurde in vergleichbarer Methodik (Material und Methoden 2.2.2.4) zum oben beschriebenen KD in den Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 wt eine Smurf1-Überexpression mittels lentiviraler Transduktion induziert.

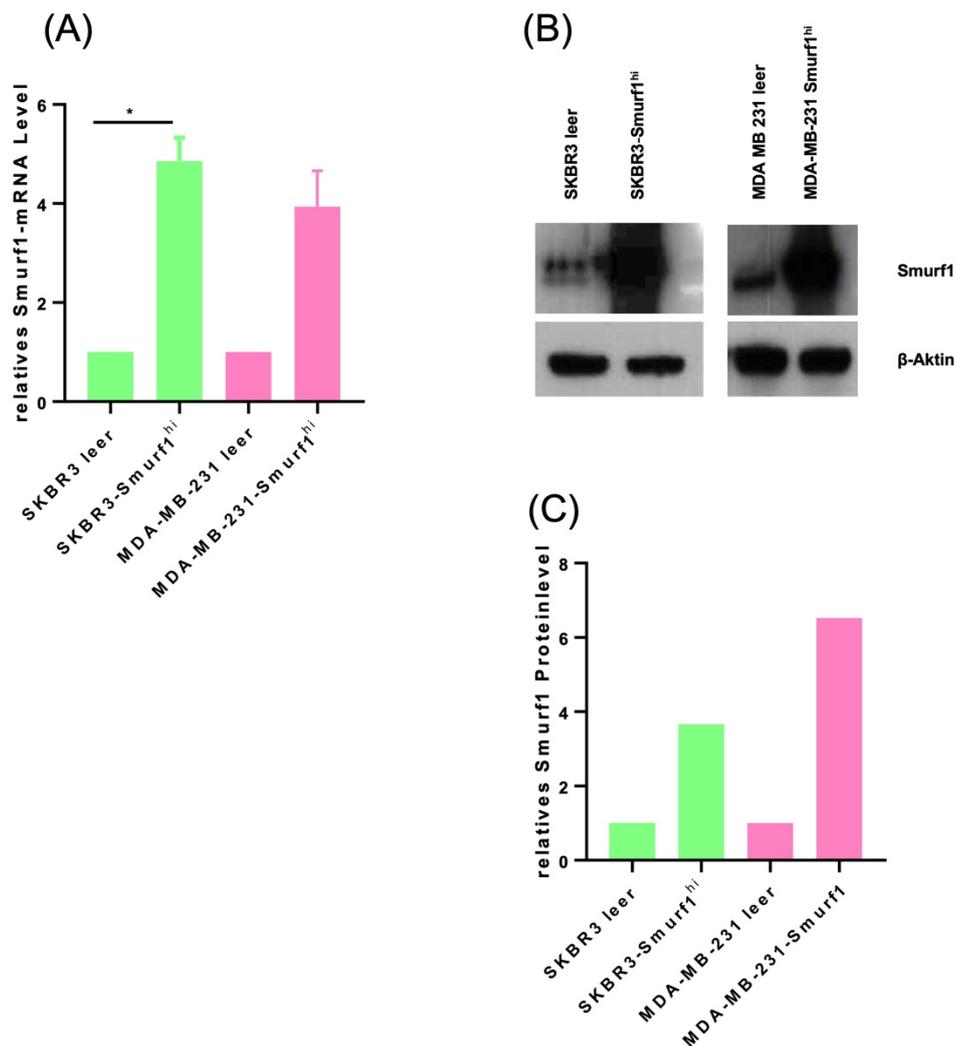


Abbildung 3.4 Kontrolle des Transduktionserfolgs mittels qPCR und Western Blot

(A) Quantifizierung des relativen mRNA-Expressionslevels von Smurf1 in den Zelllinien SKBR3 leer, SKBR3-Smurf1^{hi}, MDA-MB-231 leer und MDA-MB-231-Smurf1^{hi} mittels qPCR. Die Werte wurden gegen das entsprechende GAPDH-Level normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und der Standardfehler. Für jede Zelllinie sind die Ergebnisse aus n = 2 unabhängigen Versuchen gezeigt. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. * p<0,05 ** p<0,005 *** p<0,001 **** p<0,0001 **(B)** Die WB-Analyse der Proteinlysate (20µg) der Zelllinien SKBR3 leer, SKBR3-Smurf1^{hi}, MDA-MB-231 leer und MDA-MB-231-Smurf1^{hi} zeigt das Smurf1-Level auf Proteinebene (AK ab57573). β-Aktin (AK sc-47778) wurde als Ladekontrolle verwendet. Smurf1 hat 86kDa und β-Aktin 48 kDa. **(C)** Quantifizierung des relativen Smurf1-Proteinlevels der SKBR3- und MDA-MB-231 Zellen mit Smurf1-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3 leer und MDA-MB-231 leer = 1).

Abbildung 3.4 Kontrolle des Transduktionserfolgs mittels qPCR und Western Blot zeigt die erfolgreiche Überexpression von Smurf1 im Vergleich zum Leervektor auf mRNA und Proteinebene in den Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 wt. Beim Leervektor handelt es sich um das Plasmid pLenti-c-myc-DDK-P2A-Puro, welches ebenfalls zur Transduktion der Smurf1-cDNA verwendet wurde. Er wurde in den folgenden Experimenten zum Vergleich herangezogen, um auszuschließen, dass sich die Zellmodalitäten aufgrund der Transduktionsbehandlung verändert haben. Die Messung der Smurf1-mRNA mittels qPCR

Ergebnisse

zeigt eine 4,5-fache Steigerung des Smurf1-Levels in der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{hi} im Vergleich zur Kontrollzelllinie SKBR3 leer = 1 ($p=0,0148$, SEM 0,475). Abbildung 3.4B zeigt deutlich die gesteigerte Smurf1-Expression auf Proteinebene. In der densitometrischen Bestimmung zeigt sich eine 4,5-fache Steigerung der Smurf1 Proteinmenge, im Vergleich zu SKBR3 leer.

Auch für die TN-Zelllinie MDA-MB-231 wt konnte eine Zelllinie mit Smurf1-Überexpression erfolgreich etabliert werden. In der qPCR zeigte sich ein 3,5-fach gesteigertes Smurf1-mRNA-Level in der Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{hi} im Vergleich zur Kontrollzelllinie MDA-MB-231 leer ($p=0,0559$, SEM 0,725), bei einem hohen Standardfehler, ließ sich hier keine signifikante Steigerung erreichen. Auf Proteinebene zeigte sich in den anschließenden WB-Analysen eine sichtbar erhöhte Proteinmenge. Die densitometrischen Berechnungen verifizierten dies und zeigten ein 6-fach gesteigertes Smurf1-Proteinlevel im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB-231 leer (Abbildung 3.4C).

In Abbildung 3.5 ist die immunhistochemische Färbung auf Smurf1 an Zellen in Agar erkennbar. Bei 40-facher Vergrößerung zeigt sich eine deutliche Zunahme des Färbeverhaltens in der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{hi} (*unten links*) im Vergleich zur Zelllinie SKBR3 leer (*oben links*). Auch in der Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{hi} (*unten rechts*) ist eine vermehrte Färbung im direkten Vergleich zum MDA-MB-231 leer erkennbar (*oben rechts*).

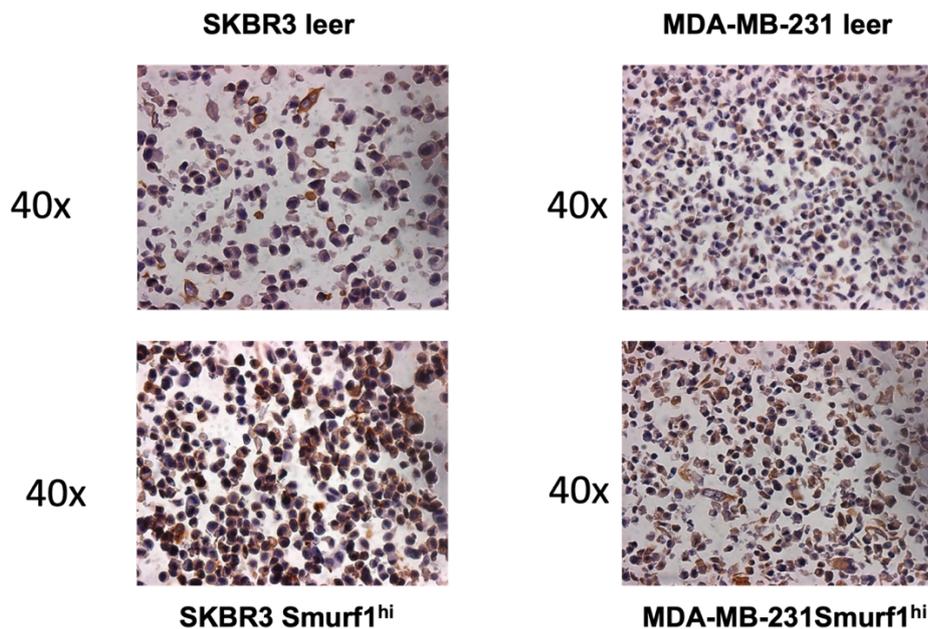


Abbildung 3.5 Immunhistochemische Darstellung der Smurf1-Überexpression

Immunhistochemische Färbung der SKBR3- und MDA-MB-231-Smurf1^{hi} (*unten*)-Zellen in Agar im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle SKBR3 leer und MDA-MB-231 leer (*oben*) auf Smurf1 (Firma Sigma #HPA055245). Vergrößerung 40x.

3.3 Adhäsion der SKBR3-Smurf1 KD und SKBR3-Smurf1^{hi} Zelllinien an hBMECs

Wie in Abschnitt 1.2.4 beschrieben, ist ein wichtiger Teilprozess der Entstehung von HM die Adhäsion der Tumorzellen aus dem Blutstrom an die BHS. Die Expression des HER2-Moleküls stellt einen zusätzlichen Risikofaktor für eine frühe zerebrale Metastasierung dar (Heitz et al., 2011) und unpublizierte Voruntersuchungen unserer AG zeigten ein erhöhtes Smurf1-mRNA-Level, bei Patientinnen mit HER2-positivem und TN MaCa.

Nachdem eine stabile lentivirale Transduktion der HER2-positiven Zelllinie SKBR3 erreicht wurde, wurde die Adhäsionsfähigkeit dieser modifizierten Zelllinien an das Endothel der BHS und damit der Einfluss von Smurf1 untersucht. Um die BHS zu repräsentieren wurden primäre Hirnendothelzellen (human brain microvascular endothelial cells, im folgenden hBMEC) kultiviert und in Transwells zu einem lückenlosen Zellrasen wachsen gelassen. Die Adhäsionsfähigkeit wurde mithilfe von statischen Adhäsionsassays bestimmt. Hierzu wurde die Anzahl der nach 24 Stunden adhärenen Tumorzellen mittels Fluoreszenz bestimmt.

3.3.1 Knockdown von Smurf1 in SKBR3 zeigt keinen Einfluss auf die Adhäsion an hBMEC

Abbildung 3.6 zeigt die relative Adhäsion der Tumorzellen an hBMECs in Abhängigkeit des Smurf1-Levels im Vergleich zum SKBR3-scr = 1. Die Versuche wurden mit den Zelllinien SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} dreifach unabhängig voneinander durchgeführt und der Mittelwert gebildet (Abbildung 3.6A). Interessanterweise zeigte sich ein leichter Effekt in der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{lowA} ($p=0,023$, SEM 0,038), nicht aber in der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{lowD} ($p= 0,319$, SEM 0,127). Nach 24 Stunden adhärten 25% weniger Zellen mit einem Smurf1-KD (SKBR3-Smurf1^{lowA}) im Vergleich zum scramble.

Bei Betrachtung der Einzelversuche untereinander fiel auf, dass diese besonders in der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{lowD} in ihren Ergebnissen mit einem Standardfehler von 0,127 stark variierten (Abbildung 3.6B). Während der zweite Versuch eine um 40% reduzierte Adhäsionsfähigkeit zeigte, ist diese im dritten Versuch sogar um 10% gesteigert. Trotz des signifikanten Ergebnisses der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{lowA} ist in der Betrachtung beider KD-Klone kein signifikanter Effekt eines reduzierten Smurf1-Levels auf die HER2-positive Zelllinie SKBR3 nachweisbar.

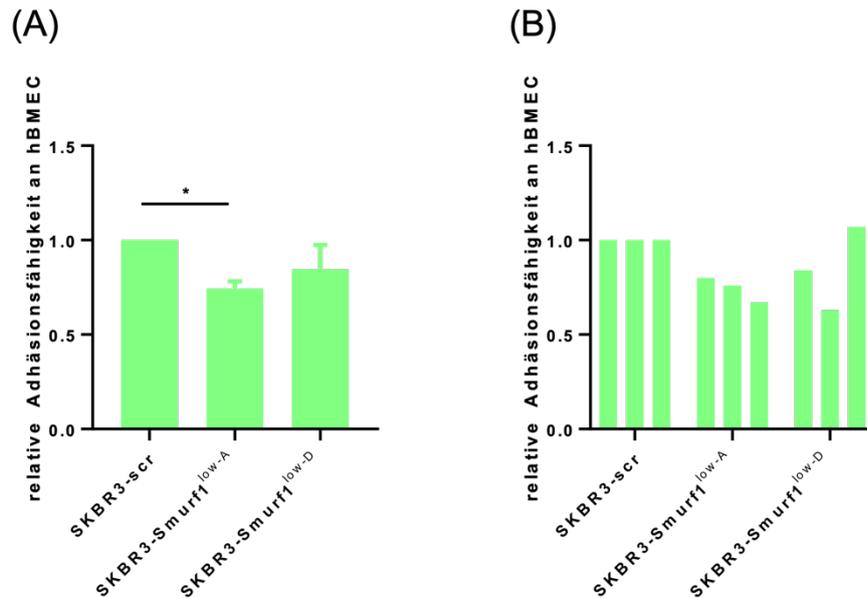


Abbildung 3.6 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in SKBR3-KD Zelllinien

Die Adhäsion der Tumorzellen SKBR3-scr, SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} an primären Hirnendothelzellen (hBMEC) wurden unter statischen Bedingungen geprüft. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Messung wurde der CellTracker™ Red CMTPIX verwendet **(A)** Gezeigt ist die relative Menge (in Bezug zur Vergleichszelllinie SKBR3-scr = 1) an hBMEC adhärierenden Tumorzellen SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD}. Für jede Zelllinie sind der Mittelwert mit Standardfehler aus n = 3 unabhängigen Versuchen gezeigt. * p<0,05 **(B)** Darstellung des Adhäsionsverhaltens der Tumorzellen SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} in Bezug zur Vergleichszelllinie SKBR3-scr =1 in den drei Einzelversuchen. Gezeigt ist der Mittelwert aus der in jedem Versuch erfolgten Dreifachbestimmung.

3.3.2 Überexpression von Smurf1 in SKBR3 zeigt keinen Einfluss auf die Adhäsion an Hirnendothel

Im nächsten Schritt wurde die Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen mit einer erhöhten Smurf1-Expression getestet (SKBR3-Smurf1^{hi}). Wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt, weist die Zelllinie SKBR3-Smurf1^{hi} eine 4,5-fach höhere Smurf1-Expression als die Vergleichszelllinie SKBR3 leer.

Die vier unabhängig voneinander durchgeführten Einzelversuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert und der Standardfehler. (Abbildung 3.7A)

Entgegen unserer Erwartungen zeigte sich in den Einzelversuchen ein sehr heterogenes Bild mit divergenten Ergebnissen (Abbildung 3.7B). Während die Hälfte der Versuche nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine um 50-70% gesteigerte Adhäsion an hBMEC aufwiesen, zeigte die andere Hälfte eine um bis zu 50% reduzierte Adhäsion, welches unter den Adhäsionswerten des Smurf1-KD liegt.

Ergebnisse

In der statistischen Auswertung bei einem SEM von 0,279 und einem p-Wert von 0,699 konnte demnach keine verstärkte Adhäsion der SKBR3-Smurf1^{hi} an hBMEC gesehen werden (Abbildung 3.7A).

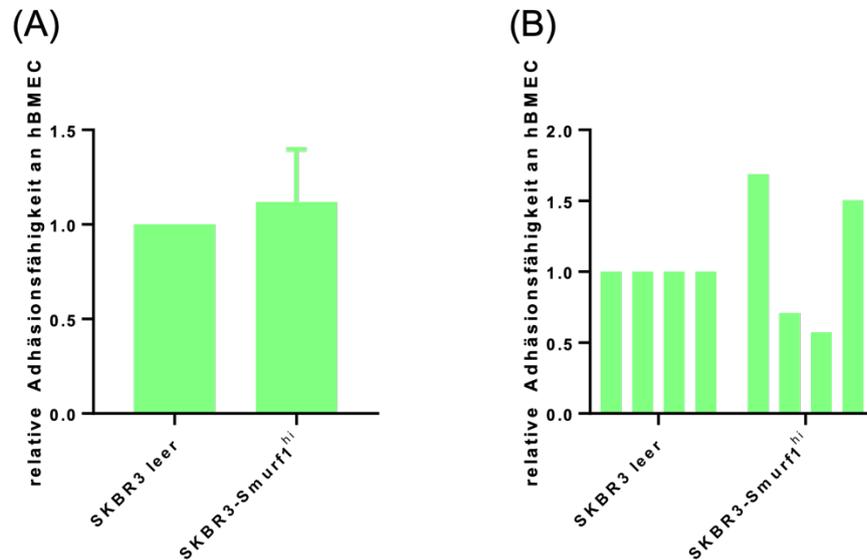


Abbildung 3.7 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in SKBR3-Smurf1^{hi}

Die Adhäsion der Tumorzellen SKBR3 leer und SKBR3-Smurf1^{hi} an primäre Hirnendothelzellen (hBMEC) wurde unter statischen Bedingungen geprüft. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Messung wurde der CellTracker™ Red CMTPX verwendet (A) Adhäsionsverhalten der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{hi} in Bezug auf die zugehörige Vergleichszelllinie SKBR3 leer = 1 an hBMEC. Gezeigt sind der Mittelwert und Standardfehler (SEM=0,28, berechnet nach in X.X.X beschriebener Formel) von n=4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. (B) Darstellung des Adhäsionsverhaltens von SKBR3-Smurf1^{hi} in Bezug auf SKBR3 leer = 1 in vier unabhängigen Einzelversuchen. Gezeigt ist der Mittelwert der in jedem Versuch durchgeführten Dreifachbestimmung.

3.4 Adhäsion der MDA-MB-231-KD und MDA-MB-231-Smurf1^{hi} Zelllinien an hBMECs

Unter allen molekularen Subtypen des Mammakarzinoms hat das TN-MaCa die schlechteste Prognose. Es ist assoziiert mit einem verringerten Gesamtüberleben, einer frühen Fernmetastasierung und dem verstärkten Auftreten von HM (Heitz et al., 2009). Zudem zeigten die bereits beschriebenen Microarray-Daten eine signifikante Korrelation zwischen einem TN-Subtyp und einem erhöhten Smurf1-mRNA-Level. Im folgenden soll der Einfluss der Smurf1-Expression auf das Adhäsionsverhalten von TN-Tumorzellen (MDA-MB-231) untersucht werden.

3.4.1 Knockdown von Smurf1 in MDA-MB-231 zeigt keinen Einfluss auf die Adhäsion an das Hirnendothel

Um den Einfluss von Smurf1 auf die Adhäsion der TN Tumorzellen an die BHS zu untersuchen wurde der statische Adhäsionsassay (Material und Methoden 2.2.1.7) ebenfalls mit den Zelllinien MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} durchgeführt. Die Versuche wurden fünffach unabhängig voneinander durchgeführt und der Mittelwert gebildet (Abbildung 3.8A). Die Ergebnisse wurden in Bezug zur Kontrollzelllinie MDA-MB-231-scr gewertet.

In Abbildung 3.8A ist eine tendenzielle Verringerung der Zelladhäsion an hBMECs um 12 % bei MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und 8 % bei MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} zu erkennen. Bei Betrachtung der Einzelversuche (Abbildung 3.8B) zeigt sich allerdings erneut eine hohe Varianz. Hier präsentierten sich die Versuche 3 und 4 mit einer kaum veränderten bis leicht erhöhten Adhäsionsfähigkeit von 1-3%. In Zusammenschau war die Tendenz zur geringeren Adhäsion dadurch nicht statistisch signifikant (MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} p=0,116, SEM 0,06 bei n=5; MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} p=0,162, SEM 0,046 bei n=5).

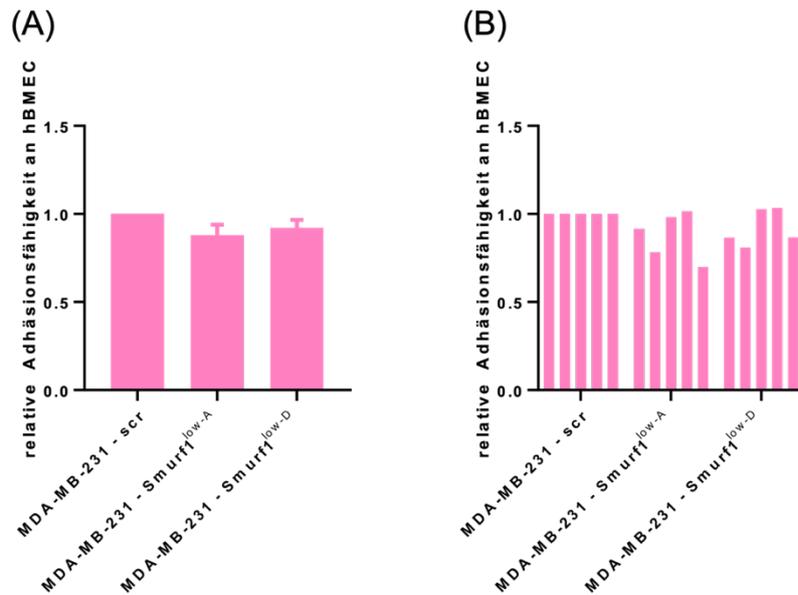


Abbildung 3.8 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in MDA-MB-231-KD Zelllinien

Die Adhäsion der Tumorzellen MDA-MB-231-scr, MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} an primäre Hirndothelzellen (hBMEC) wurde unter statischen Bedingungen geprüft. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Messung wurde der CellTracker™ Red CMTPIX verwendet **(A)** Gezeigt ist die relative Menge (in Bezug zur Vergleichszelllinie MDA-MB-231-scr = 1) an hBMEC adhärierenden Tumorzellen MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD}. Für jede Zelllinie sind der Mittelwert mit Standardfehler aus n = 5 unabhängigen Versuchen gezeigt. **(B)** Darstellung des Adhäsionsverhaltens der Tumorzellen MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} in Bezug zur Vergleichszelllinie MDA-MB-231-scr = 1 in den fünf Einzelversuchen. Gezeigt ist der Mittelwert aus der in jedem Versuch erfolgten Dreifachbestimmung.

3.4.2 Überexpression von Smurf1 in MDA-MB-231 zeigt einen Einfluss auf die Adhäsion an Hirndothel

Zur Einordnung der in den vorherigen Versuchen gesehenen Effekte, wiederholten wir den Adhäsionsassay mit der Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{hi}. Hierbei soll der Einfluss einer erhöhten Smurf1-Expression auf das Adhäsionsverhalten der TN-Tumorzellen an hBMEC dargestellt werden. Die Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{hi} weist ein auf Proteinebene 6-fach erhöhtes Smurf1-Level auf (Ergebnisse 3.2.2).

In Abbildung 3.9A sieht man eine signifikant erhöhte Adhäsion der Smurf1 überexprimierenden Tumorzellen ($p=0,038$, SEM 0,09). Nach 24 Stunden Inkubationszeit adhärten knapp 30% mehr Tumorzellen mit einer erhöhten Smurf1-Expression. Abbildung 3.9B zeigt die Aufschlüsselung in die drei Einzelversuche. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

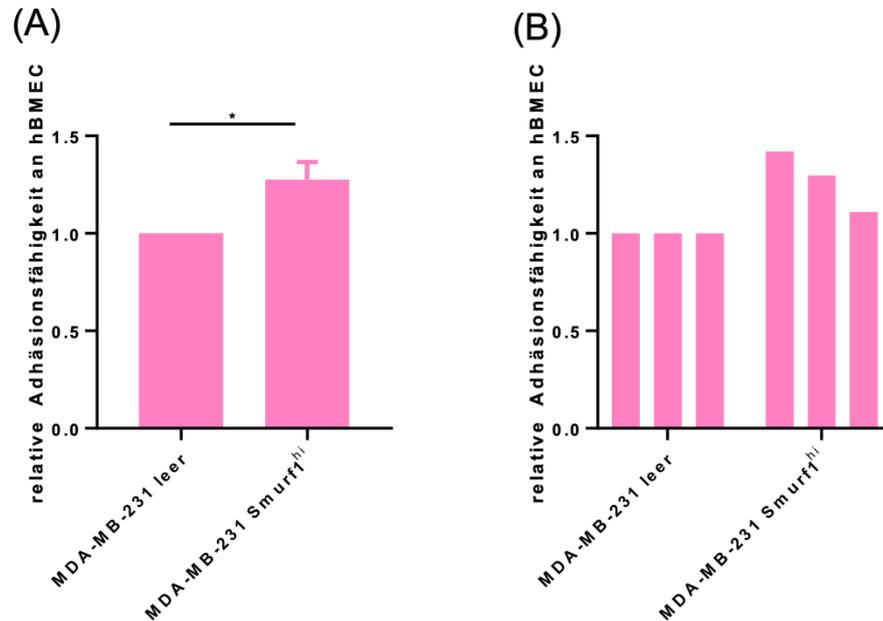


Abbildung 3.9 Adhäsionsverhalten an hBMEC in Abhängigkeit der Smurf1-Expression in MDA-MB-231-Smurf1^{hi} Zelllinien

Die Adhäsion der Tumorzellen MDA-MB-231 leer und MDA-MB-231-Smurf1^{hi} an primäre Hirndendothelzellen (hBMEC) wurden unter statischen Bedingungen geprüft. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Messung wurde der CellTracker™ Red CMTPX verwendet (A) Adhäsionsverhalten der Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{hi} ($p=0,038$) in Bezug auf die zugehörige Vergleichszelllinie MDA-MB-231 leer = 1 an hBMEC. Gezeigt sind der Mittelwert und Standardfehler von $n=3$ unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. * $p<0,05$ (B) Darstellung des Adhäsionsverhaltens von MDA-MB-231-Smurf1^{hi} in Bezug auf MDA-MB-231 leer = 1 in drei unabhängigen Einzelversuchen. Gezeigt ist der Mittelwert der in jedem Versuch durchgeführten Dreifachbestimmung.

3.5 Die Rolle von Smurf1 in der Invasion HER2-positiver und TN-Tumorzellen durch das Hirndendothel

Während des Prozesses der Hirnmetastasierung durchlaufen die Tumorzellen verschiedene Teilschritte (Abbildung 1.1). Nachdem sie an dem Gefäßendothel der zerebralen Gefäße adhären, benötigen sie die Fähigkeit die Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellen zu lockern, um durch das Endothel gelangen zu können. Dieser Schritt der Metastasierungskaskade wird als Invasion bezeichnet. Um die Invasion durch Hirndendothel *in vitro* darzustellen wurde ein bereits in unserem Labor etabliertes Modell der BHS verwendet (Material und Methoden 2.2.1.8).

3.5.1 Smurf1 KD und Überexpression in SKBR3 zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Invasion durch Hirnendothel

Die Zählung der durch die hBMEC Monolayer invadierten Tumorzellen erfolgte nach 48 Stunden. Abbildung 3.10A zeigt die relative Invasionsfähigkeit der Zelllinien SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} in Bezug zum SKBR3-scr, welcher als Vergleichswert gleich eins gesetzt wurde. Sowohl SKBR3-Smurf1^{lowA} ($p= 0,002$, SEM 0,115), als auch SKBR3-Smurf1^{lowD} ($p= 0,028$, SEM 0,129) zeigen eine signifikante Reduktion des Invasionsverhaltens. Dies entspricht einer relativen Invasion von 55% im Vergleich zum SKBR3-scr (100%). Abbildung 3.10B zeigt repräsentative Ausschnitte der Invasionsmembran in vierfacher Vergrößerung. Sichtbar sind die Fluoreszenz markierten Tumorzellen, welche nach 48 Stunden die hBMEC Monolayer auf der kollagenbeschichteten Membran mit Mikroporen, durchwandern konnten. Hierbei sieht man eine deutlich geringere Invasion in den beiden KD-Klonen (*mitte, unten*) im Vergleich zum scramble (*oben*)

Aufbauend auf den vorherigen Analysen untersuchten wir im nächsten Schritt den Einfluss eines erhöhten Smurf1-Expressionslevels auf die Invasivität von HER2-positiven MaCa-Zellen anhand der Zelllinien SKBR3-Smurf1^{hi} und SKBR3 leer.

Abbildung 3.10C zeigt die relative Invasionsfähigkeit der Tumorzellen mit Smurf1-Überexpression in Bezug zur Vergleichszelllinie SKBR3 leer. Zu Erkennen ist eine signifikante Steigerung der Invasivität um 45% ($p=0,007$, SEM 0,08) bei einer Smurf1-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene um das 4,5-fache des Ausgangswerts. Abbildung 3.10D verdeutlicht die Zunahme an invadierten Tumorzellen der Zelllinie SKBR3-Smurf1^{hi} (*unten*) im Gegensatz zur Zelllinie SKBR3 leer (*oben*) nach 48 Stunden.

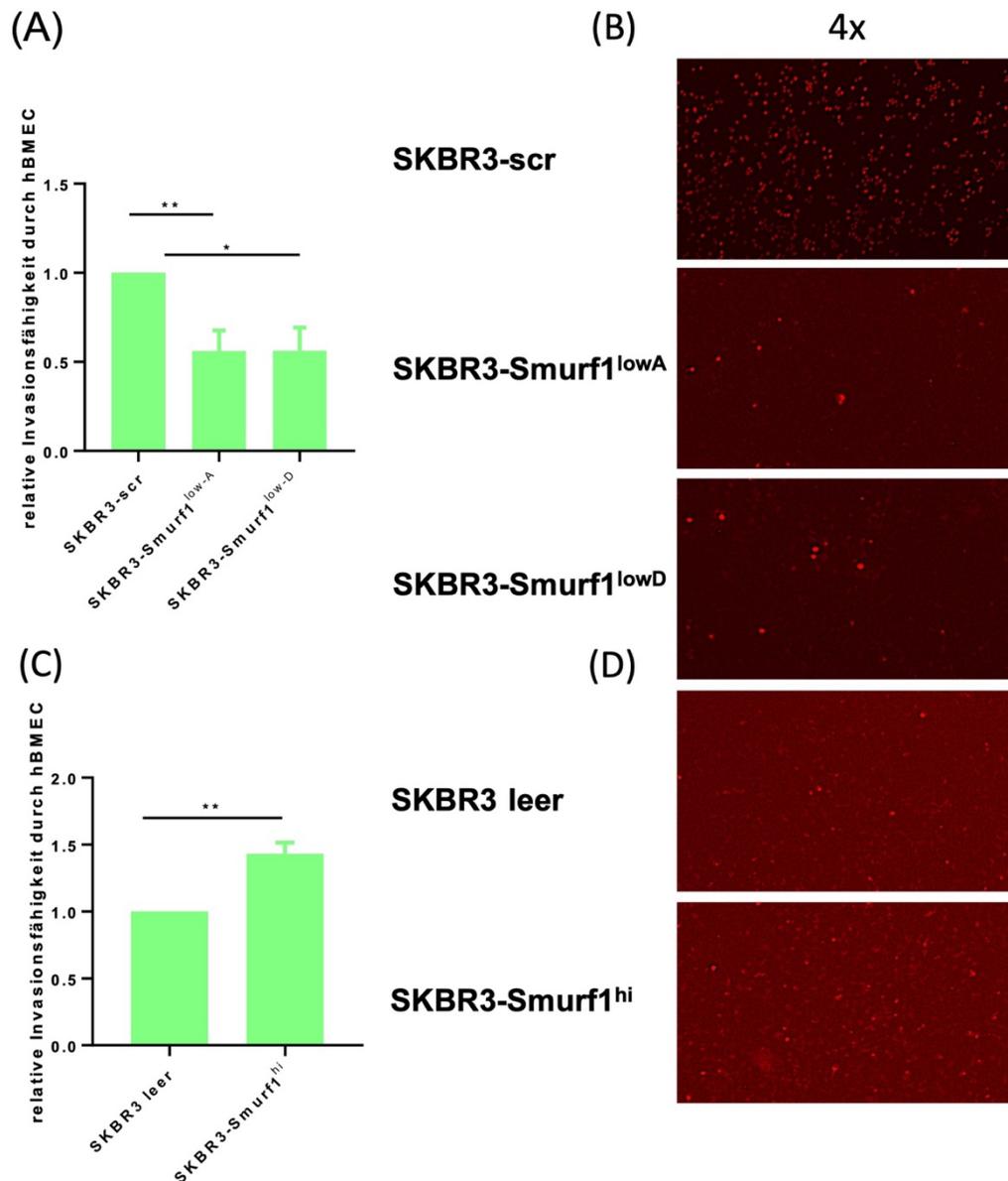


Abbildung 3.10 Invasionsverhalten von SKBR3 durch hBMEC

(A) Relative Invasion der mit CellTracker™ Red CMTPIX markierten SKBR3-Smurf1^{lowA} (p=0,002) und SKBR3-Smurf1^{lowD} (p=0,028) durch eine hBMEC Monolayer in Bezug auf SKBR3-scr =1 in Abhängigkeit des Smurf1-Expressionslevels. Zur Darstellung wurde der Standardfehler berechnet. n=3 * p<0,05, ** p<0,005 **(B)** Repräsentative Ausschnitte der Invasionsmembran nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Membran wird durch ein Fluoreszenz Mikroskop in 4-facher Vergrößerung betrachtet und anschließend mit BZ II viewer/analyzer Software und Hybrid cell count tool analysiert. **(C)** Relative Invasion der mit CellTracker™ Red CMTPIX getrackten SKBR3-Smurf1^{hi} (p=0,007) durch eine hBMEC Monolayer in Bezug auf SKBR3 leer. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, welche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. * p<0,05, ** p<0,005 **(D)** Repräsentative Ausschnitte der Invasionsmembran nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Membran wird durch ein Fluoreszenz Mikroskop in 4-facher Vergrößerung betrachtet und anschließend mit BZ II viewer/analyzer Software und Hybrid cell count tool analysiert.

3.5.2 Knockdown und Überexpression von Smurf1 in MDA-MB-231 beeinflussen die Invasion durch Hirnendothel

Die nachfolgenden Experimente zeigen den Einfluss der Smurf1-Expression auf die Invasivität der TN Zelllinie MDA-MB-231. Hierzu wurde der oben beschriebene Invasionsassay mit den Zelllinien MDA-MB-231-Smurf1^{lowA}, MDA-MB-231-Smurf1^{lowD}, MDA-MB-231-scr, MDA-MB-231-Smurf1^{hi} und MDA-MB-231 leer durchgeführt.

Abbildung 3.11A zeigt die relative Invasionsfähigkeit der Zelllinien MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} im Verhältnis zur Vergleichszelllinie MDA-MB-231-scr. Betrachtet man den Graphen, so ist eine in der Tendenz deutlich reduzierte relative Invasivität der Smurf1-depletierten Zellen erkennbar. Interessanterweise ließ sich nur in MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} eine statistisch signifikante Reduktion um 40% erzielen (p=0,048, SEM 0,08). In den Tumorzellen MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} ist ein Einfluss auf die Invasivität durch hBMEC erkennbar. Mit einem p-Wert von 0,052 konnte hier allerdings keine Signifikanz erreicht werden. In der dargestellten Abbildung 3.11B wird der Invasionseffekt noch einmal bildlich dargestellt. Zu erkennen ist hier eine deutlich reduzierte Anzahl an invadierten Tumorzellen bei einem Smurf1-KD (*mitte und unten*) im Vergleich zum scramble (*oben*).

Abschließend galt es den Einfluss von Smurf1 auf die Invasivität von TN MaCa-Zellen zu verifizieren. Hierzu wurde der Versuch mit den Zelllinien MDA-MB-231-Smurf1^{hi} und MDA-MB-231 leer wiederholt. In Abbildung 3.11C ist die quantitative Auswertung der Invasionsassays dargestellt. Hierbei wurde der Mittelwert aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen berechnet und mit der Zelllinie MDA-MB-231 leer ins Verhältnis gesetzt. Zu erkennen ist eine in der Tendenz erhöhte Invasivität der Tumorzellen mit Smurf1-Überexpression um knapp 40%. Eine detaillierte Betrachtung der Einzelversuche zeigt divergente Ergebnisse, wobei ein Versuch sogar eine reduzierte Invasivität aufweist. In der statistischen Auswertung ergibt sich mit einem SEM von 0,28 ein p-Wert von 0,3. Abbildung 3.11D zeigt repräsentative Ausschnitte der Invasionsmembran nach Migration der Smurf1 überexprimierten Tumorzellen (*oben*) und der Vergleichszelllinie MDA-MB-231 leer (*unten*).

Insgesamt lassen die Ergebnisse einen Zusammenhang der Invasionsfähigkeit von MaCa-Zellen mit dem Expressionslevel der E3-Ubiquitin-Ligase Smurf1 erkennen.

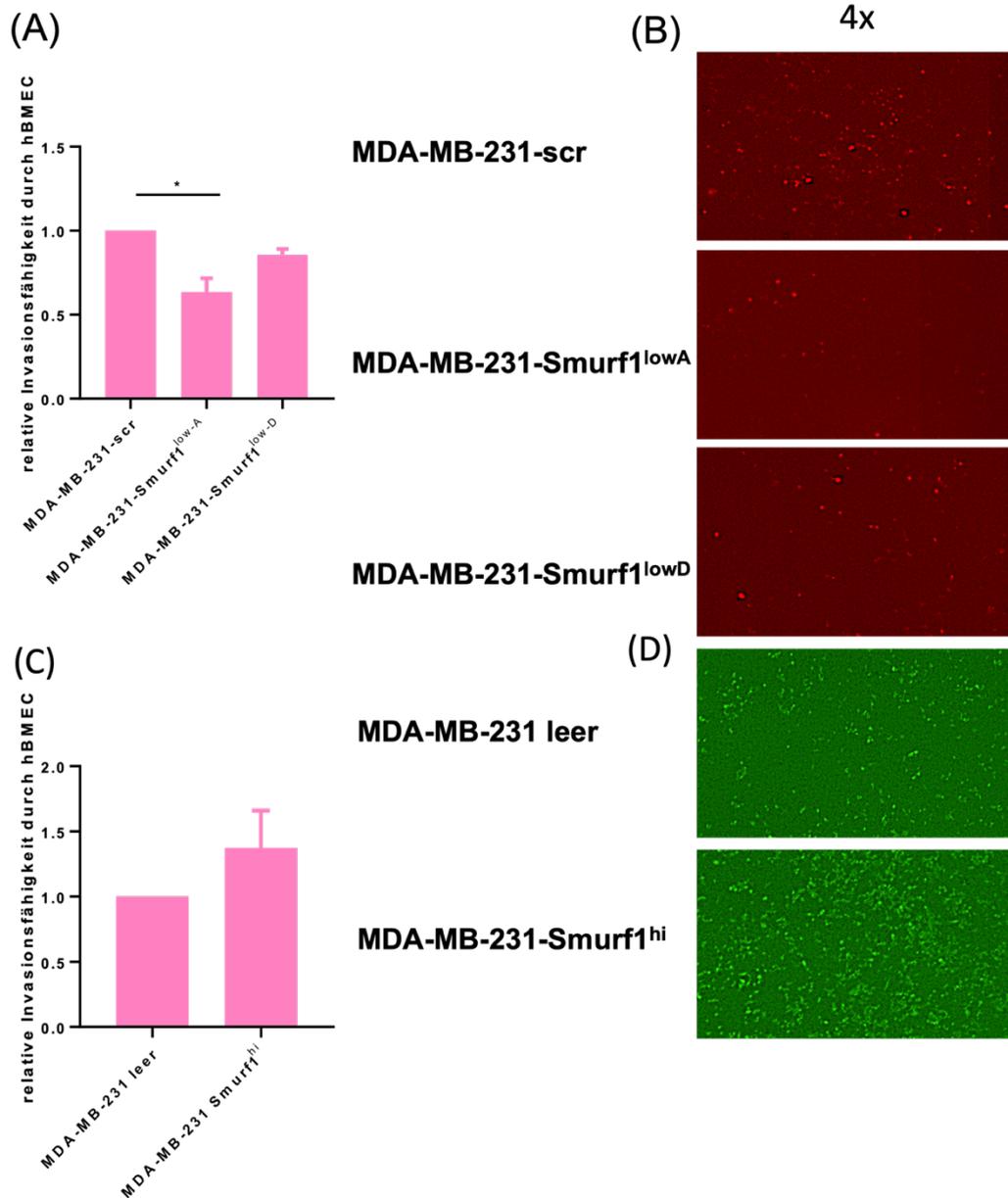


Abbildung 3.11 Invasionsverhalten von MDA-MB-231 durch hBMEC

(A) Relative Invasion der mit CellTracker™ Red CMTPIX markierten MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} (p=0,048) und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} (p=0,052) durch eine hBMEC Monolayer in Bezug auf MDA-MB-231-scr=1 in Abhängigkeit des Smurf1-Expressionslevels. Zur Darstellung wurde der Standardfehler berechnet. n=4 * p<0,05, ** p<0,005 **(B)** Repräsentative Ausschnitte der Invasionsmembran nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Membran wird durch ein Fluoreszenz Mikroskop in 4-facher Vergrößerung betrachtet und anschließend mit BZ II viewer/analyzer Software und Hybrid cell count tool analysiert. **(C)** Relative Invasion der mit CellTracker™ Green CMFDA getrackten MDA-MB-231-Smurf1^{hi} durch eine hBMEC Monolayer in Bezug auf MDA-MB-231-leer. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, welche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. **(D)** Repräsentative Ausschnitte der Invasionsmembran nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Membran wird durch ein Fluoreszenz Mikroskop in 4-facher Vergrößerung betrachtet und anschließend mit BZ II viewer/analyzer Software und Hybrid cell count tool analysiert.

4 Diskussion

HM beim metastasiertem MaCa stellen Behandler noch immer vor eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung. Ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen in der Entstehung von HM wird benötigt, um die Patientinnen bestmöglich behandeln zu können. Zerebrale Endothelzellen stellen die wichtigste Zellgruppe der BHS dar. Sie sind verantwortlich für die Selektivität und Integrität der BHS und sorgen dafür, dass Medikamente und Tumorzellen diese nicht ungehindert überqueren können. Welche molekularen Mechanismen in MaCa-Zellen benötigt werden um die BHS überwinden und HM bilden zu können bleibt weiterhin nicht vollständig geklärt. Die Ubiquitin-E3-Ligase Smurf1 wurde schon in zahlreichen Publikationen mit verschiedenen Prozessen in der Tumorgenese in Verbindung gebracht (Einleitung 1.3 Smurf1). Durch die Stabilisierung der p53 abbauenden E3-Ligase MDM2 hat Smurf1 beispielsweise einen hemmenden Einfluss auf Apoptose (Nie et al., 2010), über den Abbau von PTEN einen aktivierenden Einfluss auf den PI3K/mTOR/Akt-Signalweg und dadurch eine Verstärkung der Zellproliferation zur Folge und über die Ubiquitinierung und Degradation von RUNX2 und TRAF4 fördert Smurf1 Zellwachstum und -differenzierung (Zhang et al., 2013b, Yamashita et al., 2005, Xia et al., 2020b).

Welche Rolle Smurf1 in der Kommunikation von Tumorzellen mit der BHS und damit in der Entstehung von HM und der Progression des MaCa einnimmt wurde bisher nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von Smurf1 auf die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit von MaCa-Zellen an hBMECs.

4.1 Der Einfluss von Smurf1 auf die Adhäsionsfähigkeit von MaCa Zellen an hBMECs

Teil der Metastasierungskaskade (Abbildung 1.1) ist die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel des Zielorgans. Im Falle von HM dem Hirnendothel und damit dem Hauptbestandteil der BHS. Hierfür spielt die Interaktion zwischen der Tumorzelle und dem Endothel eine zentrale Rolle. Wie genau Tumorzellen an der BHS adhären ist noch nicht abschließend geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde Smurf1 als ein für die Adhäsionsfähigkeit potenziell relevantes Protein untersucht. Hierzu wurden statische Adhäsionsassays mit den zuvor stabil transfizierten Zelllinien durchgeführt. Für jede Ausgangszelllinie (1) SKBR3 wt und (2) MDA-MB-231 wt wurden jeweils zwei Smurf1-KD- und eine Smurf1-Überexpressionszelllinie etabliert. Die entsprechenden Smurf1-

Diskussion

Expressionen wurden in qPCR und WB bestätigt (Abbildungen 4-7). Bei Betrachtung der HER2-positiven KD-Zelllinien SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} ließ sich zwar eine geringe Tendenz zu einer verminderten Adhäsion an hBMEC in Bezug zur Vergleichszelllinie SKBR3-scr erkennen, diese erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Die im Anschluss durchgeführten Analysen der HER2-positiven Zelllinie mit einer Smurf1-Überexpression erreichten ebenfalls keine Signifikanz. Hier zeigte sich in der Gesamtauswertung das zu erwartende inverse Verhalten mit einer erhöhten Adhäsion. Bei einem sehr hohen Standardfehler von SEM 0,679 lag in den Einzelversuchen eine hohe Varianz vor. Hierbei lässt sich schlussfolgern, dass Smurf1 keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit HER2-positiver MaCa-Zellen an hBMEC hat.

Vergleichbare Ergebnisse ließen sich in den Versuchen mit der TN-KD-Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} und MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} erkennen. Hier zeigte sich ebenfalls eine nicht signifikante Reduktion der adhärenzenden Tumorzellen, im Vergleich zum scramble. Eine Smurf1-Überexpression in der TN-Zelllinie führte zu einer signifikanten Steigerung ($p=0,038$) der relativen Adhäsion an hbMECs. Insgesamt zeigt sich hier, dass eine erhöhte Smurf1-Expression zu einer erhöhten Adhäsion TN-MaCa-Zellen an der BHS führt, wobei eine Smurf1-Reduktion nicht in einer verminderten Adhäsion der Zellen resultiert. Es sollte hervorgehoben werden, dass die experimentellen Ergebnisse beträchtliche Schwankungen unter den Einzelversuchen aufwiesen und folglich einer Überprüfung durch umfassendere Versuchsreihen unterzogen werden sollten.

Bisher gibt es keine AG, welche den Einfluss der E3-Ubiquitin-Ligase Smurf1 auf die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen an Endothel untersucht hat. Smurf1 ist, als intrazelluläres Protein und Teil des UPS, in seiner Wirkung auf die Zelle abhängig von seinen Substraten. Um zu prüfen, ob eine Steigerung der Versuchszahl die Ergebnisse validieren und die beobachteten Tendenzen signifikant hervortreten lassen könnte, ist es angebracht, einen detaillierten Blick auf die Interaktionspartner von Smurf1 und deren Funktion in der Adhäsion von Tumorzellen an Hirnendothel zu werfen.

Ein wichtiger Schritt der Adhäsion ist der Signalweg zwischen aktivierten Integrinen und dem Zytoskelett der Tumorzelle. Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle, welche Laminin, Kollagen und Fibronectin binden. Gebildet werden sie aus einer α - und einer β -Proteinkette. Integrine haben keine eigenständigen Kinasen, so dass sie zur Weiterleitung ihrer Signale auf intrazelluläre Kinasen wie SRC family kinase (SFKs) und focal adhesion kinases (FAKs) angewiesen sind. Aktivierte Signalwege umfassen unter anderem den PI3K/Akt- und den MEK/PKB/Akt-Signalweg (Liu et al., 2023a). Signalwege in denen Smurf1 eine relevante Rolle einnimmt. So bewirkt beispielsweise Akt eine Stabilisierung des Smurf1-Proteinlevels mit einer Erhöhung der Smurf1 Halbwertszeit (Adamo et al., 2011). Zudem sorgt Smurf1 für eine konstitutive Aktivierung des PI3K/mTOR/Akt-

Diskussion

Signalwegs über den Abbau von PTEN (Xia et al., 2020b, Hosonaga et al., 2020). Das Gleichgewicht an Integrinen wird durch E3-Ubiquitin-Ligasen gewährleistet. Bisher untersuchte Ubiquitin-Ligasen sind Cullin-RING Ligase 5 (CRL5) und Synovolin-1 (SYNV1). Das Integrine in der Adhäsionsfähigkeit von MaCa-Zellen an Hirnendothel eine Rolle spielen untersuchte die AG um Fan et al. (2011). Hier wurde der Einfluss von $\alpha 6/\beta 4$ -Integrin über HER2-mediierte VEGF-Ausschüttung auf die Adhäsion von MaCa-Zellen an die mikrovaskuläre Maus-Hirnendothelzelllinie bEnd3 analysiert. Die AG beschreibt eine Zunahme der Adhäsion über eine gesteigerte VEGF-Expression durch $\beta 4$ -Integrin.

Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass Smurf1 einen direkten Einfluss auf Integrine hat. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um einen direkten Zusammenhang zwischen verschiedenen Integrinen und Smurf1 herzustellen. In diesem Kontext stellt sich die Frage, welche Substrate von Smurf1 Teil des aktivierten Signalwegs sind und welchen Einfluss deren Ubiquitinierung und Degradation auf die Aktivierung der Zelladhäsion hat.

Die Expression des $\alpha 5$ -Integrins wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor RUNX2 gefördert (Li et al., 2016b, Liu et al., 2023a). RUNX2 ist ein direktes Substrat von Smurf1 und ist maßgeblich für osteoblastische Differenzierung zuständig (Miyazono et al., 2004, Zhao et al., 2003). Überträgt man dies nun auf den Prozess der Zelladhäsion, so bedeutet eine Amplifizierung von Smurf1 eine Reduktion von RUNX2 und damit eventuell eine reduzierte Expression bestimmter Integrine, mit der Folge einer reduzierten Adhäsion der entsprechenden Zellen. Wichtig ist hier zu erwähnen, dass Li et al. (2016b) lediglich das auf in den Knochen metastasierenden MaCa-Zellen exprimierte $\alpha 5$ -Integrin analysiert haben. Der Einfluss von RUNX2 auf andere Integrin-Subtypen kann variieren. Diese Überlegungen könnten gegen eine Förderung der Adhäsionsfähigkeit durch Smurf1 sprechen. Die experimentelle Bestätigung dieses Zusammenhangs würde darauf hindeuten, dass Smurf1 zu einer reduzierten Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen führt.

Damit Integrine an ihre Liganden binden können, müssen sie aktiviert werden. Talin und Kindlin-1/-2 sind Integrin-Aktivatoren, welche durch Smurf1 ubiquitiniert und anschließend degradiert werden. Talin gehört zum Integrin-assoziierten Adhäsionskomplex. Es interagiert sowohl mit β -Integrin als auch mit F-Aktin und stellt damit eine Verbindung zwischen dem Zell-Zell-Kontakt und dem Zytoskelett dar. Die Aktivierung von Talin erfolgt durch die Dissoziation der Talin head (Talin-H) von der Talin Rod Domäne. Talin-H aktiviert die Integrine von intrazellulär. Talin wirkt über Mechanosensitivität. In Abhängigkeit des mechanischen Stresses der Zelle werden RhoGTPasen aktiviert und rekrutiert (Rahikainen et al., 2019). Die AG zeigte, dass bei ausschließlicher Expression der Talin-H Zelladhäsion gefördert wird und ein hemmender Effekt auf die Zellpolarisation und Zellmigration entsteht. Talin-H ist ein Substrat von Smurf1. Smurf1 polyubiquitiniert und degradiert Talin-H und führt dadurch zu einer reduzierten Zelladhäsion in Chinese Hamster

Diskussion

Ovary (CHO-K1) Zellen (Huang et al., 2009). Gehemmt wird dies durch CDK5, welche durch Phosphorylierung von Talin die Interaktion mit Smurf1 verhindert kann. Die AG zeigte zudem, dass ein Abbau durch Smurf1 erst nach Talin-Aktivierung beziehungsweise der Aufspaltung in Talin-H und Rod erfolgen kann. Dies könnte darauf hinweisen, dass Smurf1 eine wichtige Rolle in dem zeitlich-gerichteten Abbau von Talin und damit der zeitlich-gerichteten Auflösung fokaler Adhäsionen spielt (Huang et al., 2009).

Die AG um Wei et al. (2017) untersuchte ebenfalls den Einfluss von Smurf1 auf die beiden Integrin-aktivierenden Proteine Kindlin-2 und Talin-H. Hierbei zeigte sich entgegen den Ergebnissen von Huang et al. kein Einfluss auf die Aktivität von Talin-H durch Smurf1. Allerdings konnte ein signifikanter reziproker Einfluss von Smurf1 auf Kindlin-2 und die Aktivität von β 4-Integrin beobachtet werden. Smurf1 inhibiert die Integrin-Aktivität in den Zelllinien HeLa, MCF7 und MDA-MB-231 *in vitro*, indem es mit Kindlin-2 interagiert und seinen Abbau fördert. Diese Ergebnisse konnten *in vivo* bestätigt werden. Die Smurf1-vermittelte Ubiquitinierung und Degradation von Kindlin-2 führte in CHO-Zellen zu einer Inhibierung von α 1b/ β 3 Integrin und in Fibroblasten zu einer Inhibierung von β 1-Integrin. Analysen von Darmkrebsgewebe mehrerer Patienten zeigten zudem eine wechselseitige Korrelation zwischen dem Kindlin-2 Proteinlevel zum Smurf1-Level, welches eine Smurf1-vermittelten Abbau von Kindlin-2 *in vivo* wahrscheinlich macht. Wei et al. (2017) zeigte zudem eine erhöhte Integrin-Aktivität in Smurf1-KD Zelllinien. Hierbei zeigte sich allerdings kein verändertes Proteinlevel von β 4-Integrin, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Smurf1 β 4-Integrin nicht direkt abbaut, sondern die Aktivitätsänderung Kindlin-2 vermittelt stattfindet. In den Zell-ECM-Adhäsionsassays der AG zeigte eine Smurf1-Überexpression eine reduzierte Adhäsion und einen negativen Effekt auf die Integrität fokaler Adhäsionen. Fasst man nun die Ergebnisse von Huang et al. (2009), Wei et al. (2017) zusammen, so lässt sich auch hier ein negativer Effekt von Smurf1 auf die Adhäsion schlussfolgern. Ein verstärkter Abbau der Integrin-Aktivatoren Talin-H und Kindlin-2 hätte folglich eine reduzierte Integrin-Aktivierung und dementsprechend eine reduzierte Zelladhäsion zur Folge. Theodosiou et al. (2016) untersuchten die Aktivierung von Integrinen in Fibroblasten und konnten ebenfalls bestätigen, dass Kindlin-2 und Talin notwendig sind, um Integrine zu aktivieren und damit für die Adhäsion von Fibroblasten an die ECM. Dies spricht dafür, dass bei Wiederholung der Versuche mit einer erhöhten Versuchsanzahl möglicherweise gegensätzliche Ergebnisse zu erwarten wären. Allerdings ist es relevant zu erwähnen, dass die durchgeführten Analysen nicht an hBMEC oder anderen Hirnendothelien durchgeführt wurden. Die relevanten Integrine können hierbei von den untersuchten abweichen und zu einem anderen Ergebnis führen (Wei et al., 2017, Huang et al., 2009, Theodosiou et al., 2016).

Diskussion

Weitere an der Zelladhäsion beteiligte Interaktionspartner von Smurf1 sind RhoA, Rac1 und Cdc42. Figueira et al. (2021) untersuchte anhand der murinen MaCa-Zelllinie 4T1 die Bildung von HM beim MaCa *in vitro* und *in vivo*. Hierbei zeigte die AG, dass das Gleichgewicht zwischen Rac1 und RhoA maßgeblich für die räumlich-zeitliche Koordination der Bildung von Protrusionen, der Auflösung fokaler Adhäsionen und der Bildung von Lamellopodien und damit der Adhäsion der Tumorzelle ist. Während der initialen Zelladhäsion kommt es zur Inhibierung von RhoA, während Rac1 und Cdc42 aktiviert vorliegen. Dies führt zu einer reduzierten Kontraktilität und einer erhöhten Aktin-vermittelten Protrusion. Die Aktivierung von Rac1 erfolgt unter anderem über Integrine. Ist die Metastase bereits im Hirnparenchym etabliert, ändert sich das Gleichgewicht zwischen RhoA und Rac1. Es kommt zu einer verstärkten RhoA-Aktivierung und einem Abbau von Rac1 und Cdc42 (Stoletov et al., 2010). Um ein Gleichgewicht gewährleisten zu können können sich die GTPasen Rac1 und RhoA gegenseitig über unterschiedliche Signalwege beeinflussen. Die Aktivierung von RhoA erfolgt unter anderem über β 3-Integrin, dessen Expression wiederum durch Cdc42 und Rac1 stimuliert wird. Die Expression von β 1-Integrin ist zudem assoziiert mit einer erhöhten Invasion von MaCa-Zellen (Reymond et al., 2013). Weiterhin kann RhoA die Konzentration von Rac1 begrenzen, indem es die GTPase über Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK) antagonisiert. Integrin-medierte Adhäsion kann zudem Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie beispielsweise den EGFR-Rezeptor in einer Liganden-unabhängigen Art aktivieren (Moro et al., 2002). Dies resultiert in einer Aktivierung von Rac1 über PI3K. Da Smurf1 den PI3K/mTOR/Akt-Signalweg ebenfalls aktiviert, ist es möglich, dass so durch Smurf1 ebenfalls eine Erhöhung der Rac1 Aktivität erzielt werden kann. Zudem wird über die Ubiquitinierung von TRAF4 ebenfalls eine Rac1 Aktivierung vermittelt (Wang et al., 2013). Eine Aktivierung des EGF-Rezeptors hat zudem eine vermehrte Produktion von ERK1/2 zur Folge, welche wiederum die Aktivität von Smurf1 steigert (Kwon et al., 2013). Der zeitlich gerichtete Abbau von RhoA und Rac1 spielt eine zentrale Rolle in der Zellmotilität und der Adhäsion von Tumorzellen (Huveneers and Danen, 2009, Sahai et al., 2007). RhoA ist während der Extravasation und Migration reduziert und steigt, wenn sich die Metastase lokalisiert hat und wächst (Figueira et al., 2021). Smurf1 wird zum führenden Zellpol über den Cdc42-aktivierten Komplex aus Par6 und aPKC rekrutiert. Hier erfolgt die räumlich-gerichtete Ubiquitinierung von RhoA. Sahai et al. (2007) zeigte an MDA-MB-231 MaCa-Zellen, dass das gesamte RhoA-Proteinlevel der Zelle konstant ist und lediglich die RhoA-Aktivität in den Lamellopodien durch Smurf1 reduziert wird. Eine Smurf1-Überexpression hätte folglich eine reduzierte RhoA-Aktivität und ein erhöhtes Rac1-, Cdc42- Proteinlevel zur Folge und würde so zu einer Stärkung der initialen Adhäsion führen. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Smurf1 auf die Adhäsion der HER2-positiven Zellen. Allerdings

konnte eine signifikant gesteigerte Adhäsion der Smurf1 überexprimierten TN-Zellen beobachtet werden, was auf den gerichteten Abbau von RhoA und die Erhöhung der Rac1-Aktivität zurückgeführt werden kann. Die genaue Ursache für den fehlenden Einfluss auf die HER2-positive Zelllinie kann anhand der vorhandenen Literatur nicht abschließend geklärt werden.

TRAF4 ist ein Protein, welches in MaCa-Zellen an Zell-Zell-Kontakten und fokalen Adhäsionen lokalisiert ist (Zhang et al., 2013b). Zhang et al untersuchten den Einfluss von TRAF4 und TGF- β auf die Entstehung von Metastasen im MaCa. Hierbei beschrieben sie unter anderem eine erhöhte TRAF4-Konzentration in den TN MDA-MB-231 Zellen, im Vergleich zur nicht-invasiven MaCa-Zelllinie MCF-7. Zellen mit einer TRAF4-Defizienz zeigten zudem eine erhöhte Zelladhäsion mit reduzierter Migrationsfähigkeit. Wang et al. (2013) zeigten ebenfalls, dass TRAF4 Zellmigration über Rac1 fördert. Smurf1 monoubiquitiniert TRAF4 und rekrutiert es damit zu den Zell-Zell-Kontakten. Hierdurch wird vermutlich die zeitlich-räumlich gerichtete Aktivierung von Rac1 unterstützt und die initiale Zelladhäsion gefördert.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die Literatur sowohl Hinweise auf adhäsionsfördernde als auch auf adhäsionshemmende Interaktionspartner von Smurf1 ergibt. Wir konnten zeigen, dass der Einfluss von Smurf1 in HER2-positiven und TN-MaCa-Zellen an hBMEC einer großen Varianz unterlegen ist. Langfristig kann überlegt werden, ob die Konfluenz der Zellen in der Zellkultur einen Einfluss auf die Smurf1-Aktivität und damit auch auf die Adhäsion der Zellen an hBMEC hat. Dies würde bedeuten, dass je nach Anzahl der Zellkontakte unterschiedliche Signalwege aktiviert oder gehemmt werden würden. Zudem ist es wichtig abschließend zu erwähnen, dass keine der gefundenen Projekte die Adhäsion an Hirnendothel untersuchten und so ein direkter Vergleich der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich ist.

4.2 Der Einfluss von Smurf1 auf die Invasionsfähigkeit von MaCa Zellen durch hBMECs

Die Invasion stellt den zentralen Schritt der Extravasation und damit der Entstehung von HM dar. Während der Invasion müssen die Tumorzellen durch das hochselektive, nicht-fenestrierte Endothel der BHS gelangen. Die genauen Mechanismen sind hierbei noch nicht abschließend geklärt. Anhand eines BHS-Modells wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Smurf1 in der Invasion von MaCa-Zellen durch die BHS analysiert. Um die BHS zu repräsentieren wurden primäre Hirnendothelzellen (hBMECs) auf einer Membran mit 8 μ m Poren ausgesät. Anschließend wurden in unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen die MaCa-Zellen mit Smurf1-KD/ Smurf1-Überexpression hinzugegeben und die

Diskussion

Anzahl an Tumorzellen bestimmt, welche nach 48 Stunden durch die hBMEC hindurch wandern konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Smurf1 die relative Invasionsfähigkeit von HER2-positiven und eingeschränkt auch TN-MaCa-Zellen durch hBMEC fördert. Betrachtet man die HER2-positiven Zelllinien so wiesen SKBR3-Smurf1^{lowA} und SKBR3-Smurf1^{lowD} eine signifikant reduzierte Invasion durch hBMEC auf. Nach 48h invadierten 45% weniger Tumorzellen mit Smurf1-KD. Eine Wiederholung der Versuche mit der Smurf1-amplifizierten Zelllinie SKBR3-Smurf1^{hi} zeigten eine um 45% gesteigerte Invasion im Vergleich zum Leervektor. Daraus lässt sich folgern, dass Smurf1 die Invasivität HER2-positiver MaCa-Zellen durch hBMEC erhöht. Bei Betrachtung der TN-Zelllinien mit Smurf1-KD fällt auf, dass lediglich in der Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{lowA} eine signifikante Reduktion um 40% erreicht werden konnte ($p=0,048$). Die Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{lowD} zeigte eine Reduktion um 20% welche allerdings mit $p=0,052$ keine Signifikanz erreichte. Auch in den Versuchen mit der Smurf1-amplifizierten TN-Zelllinie MDA-MB-231-Smurf1^{hi} konnte keine signifikant gesteigerte Invasion ($p=0,3$ bei SEM 0,28) gesehen werden. Daraus lässt sich schließen, dass Smurf1 in TN-MaCa eine eingeschränkte Rolle in der Invasion durch hBMEC einnimmt. Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob durch eine Erhöhung der Versuchszahl eine Verifizierung der Ergebnisse, insbesondere bei den TN-Zelllinien, möglich ist, oder ob sich der beobachtete Effekt von Smurf1 mit zunehmender Versuchszahl graduell verringert.

Eine erhöhte Invasivität von MaCa-Zellen durch Smurf1 wurde bereits von Kwon et al. (2013) beschrieben. Die AG untersuchte die Rolle von Smurf1 in EGF-induzierter Migration und Invasion von MDA-MB-231 Zellen. Hierbei zeigten sie, dass die Smurf1 Expression durch EGF und ERK1/2 gesteigert wird und die gesteigerte Smurf1 Expression mit einer erhöhten Invasion einhergeht. Hierbei bestätigten sie die Ergebnisse von Fukunaga et al. (2008), welche ein paar Jahre zuvor bereits eine erhöhte Zellmigration von MaCa-Zellen mit einem erhöhten Smurf1 Proteinlevel *in vitro* und ein vermehrtes Auftreten von Knochenmetastasen *in vivo* aufzeigen konnten. Kwon et al. (2013) zeigte zudem, dass die erhöhte Invasion durch die Degradation von RhoA ausgelöst wird. Die durchgeführten Invasionsassays wurden ebenfalls in einem Transwell-Modell mit einer Porengröße von 8 μm durchgeführt. Zur Darstellung der Basalmembran, welche durch die Invasion überwunden werden sollte, wurden die Membranen mit Matrigel überzogen. *In vivo* zeigte die AG zudem weniger HM und Knochenmetastasen nach Behandlung mit einem EGFR-Inhibitor.

Die funktionale Bedeutung von EGFR in der Entstehung von HM wurde bereits von Sirkisoon et al. (2016) zusammengefasst. Hierbei wurde gezeigt, dass EGFR vermehrt auf HER2-positiven und TN MaCa exprimiert wird. Da die Smurf1-Aktivität durch EGF und

ERK1/2 verstärkt wird (Kwon et al., 2013), könnte eine vermehrte Expression des EGFR auf Zellen zu einer verstärkten Smurf1 Aktivierung und im nächsten Schritt zu einer verstärkten Smurf1 Expression auf TN und HER2-positiven MaCa-Zellen führen. Hinzu kommt, dass der EGFR auch Liganden-unabhängig über Integrine aktiviert werden kann (Moro et al., 2002) und so durch Zell-Zell-Kontakt im Rahmen der Adhäsion der MaCa-Zellen zu einer Smurf1 Aktivierung und verstärkten Expression führen könnte. Durch die EGFR-assoziierte Aktivierung des PI3K/mTOR/Akt-Signalwegs wird Akt erhöht, welches Smurf1 stabilisiert (Balz et al., 2012). Zur EGFR-Familie gehört neben EGFR selbst auch HER2 (Akiyama et al., 1986), welches ebenso PI3K aktiviert und die Akt-Konzentration erhöht. Dies könnte eine Begründung für den stärkeren Effekt von Smurf1 auf die Invasion der HER2-positiven Zelllinie SKBR3 sein. Ergänzend konnte die AG von Nie et al. (2012) eine Korrelation zwischen der EGFR-Expression und der Entstehung von MaCa HM *in vitro* und *in vivo* herstellen. Wichtig zu erwähnen ist hier, dass die durchgeführten Invasionsassays mit der Brain-seeking Zelllinie MDA-MB-231 Br aber ohne Hirnendothelzellen durchgeführt wurden. Über WB-Analysen bestätigten sie zudem eine Erhöhung des phosphorylierten Akts. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine erhöhte EGFR-Expression über Akt zu einer Verlängerung der HWZ von Smurf1 führt (Li et al., 2016a). Protrusive Zelleigenschaften wie beispielsweise die Bildung von Lamellopodien, werden durch eine Reorganisation des Zytoskeletts vermittelt. Eine erhöhte Zellmotilität ist relevant für die Migration von Tumorzellen (Fazakas et al., 2011). Hierzu benötigt die Zelle eine lokalisierte Erhöhung der Rac1 Aktivität, ebenso wie eine reduzierte Signalweiterleitung des Rho/ROCK-Signalwegs (Sahai et al., 2007). Der gerichtete Abbau von RhoA und die primäre Lokalisation von Smurf1 in den Lamellopodien stützen die hier präsentierten Ergebnisse zusätzlich (Wang et al., 2003).

Eine Smurf1-assoziierte erhöhte Invasivität wurde ebenfalls bei anderen Tumorentitäten beschrieben (Kwei et al., 2011, Fan et al., 2019, Tao et al., 2017). Ke et al. (2017) untersuchten den Einfluss von Smurf1 auf das Zellwachstum und die Metastasierungsfähigkeit der kNCC-Zelllinien 769P und OSRC-2. Hierbei beschrieb die AG ein reduziertes Invasionsverhalten der Smurf1-KD Zelllinie und eine verstärkte Invasion bei Smurf1 Amplifikation im Transwell-Invasionsassay. Eine erhöhte Smurf1 Expression ist mit einer erhöhten Aktivität von PI3K-Akt und einer verminderten Aktivität von DAB2IP assoziiert (Fan et al., 2019, Ke et al., 2017, Tao et al., 2017). Die Degradation von DAB2IP durch Smurf1 ist mit einer erhöhten Zellmigration verbunden (Fan et al., 2019, Li et al., 2016a). Tao et al. (2017) zeigten, dass Smurf1 einen positiven Einfluss auf Zellproliferation und Zellmobilität *in vitro* und *in vivo* hat, indem es den Tumorsuppressor DAB2IP ubiquitiniert und degradiert. Hierbei konnten die Ergebnisse von Fan et al. (2019) welche

Diskussion

einer erhöhte Invasivität von Ovarialkarzinom-Zelllinien durch Smurf1-vermittelte Degradation von DAB2IP bestätigt werden.

Auch im Schilddrüsenkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen der Smurf1 Expression und der Invasivität des Tumors hergestellt werden. In Matrigel-beschichteten Invasionsassays stieg die Anzahl invadierender Tumorzellen nach Smurf1 Überexpression signifikant an (Yan et al., 2018). KISS-1 ist ein Tumorsuppressorprotein, welches einen hemmenden Einfluss auf die Metastasierung von Haut- und Brustkrebs hat (Cvetković et al., 2013). Über Ubiquitinierung wird es in den Zelllinien SW579 und TPC-1 durch Smurf1 markiert und abgebaut. Über eine Reduktion von KISS-1 führt Smurf1 damit vermutlich zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Yan et al., 2018). KISS-1 inhibiert zudem die TNF- α induzierte Zellmigration. Ein Abbau von KISS-1 hat somit eine Förderung der Zellmigration in MaCa-Zellen zur Folge (Cho et al., 2009). Im Gewebe von invasiven MaCa wurde ein KISS-1 Verlust nachgewiesen (Blake et al., 2017). Dies korreliert mit einer erhöhten Smurf1 Expression im Gewebe von invasiven MaCa.

Ein weiteres Substrat von Smurf1 ist PTEN. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine PTEN-Amplifikation in MaCa-Zellen zu einer reduzierten Migration und Invasion führte (Xia et al., 2020b). PTEN ist ein Inhibitor des PI3K/mTOR/Akt-Signalwegs (Hohensee et al., 2016). Eine Smurf1 Überexpression resultiert folglich über PTEN-Degradation in einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs. Dies stützt die von uns beobachtete erhöhte Invasion Smurf1 amplifizierter Tumorzellen durch hBMEC. Die AG um Hohensee et al konnte zudem eine Reduktion der VEGF-Expression bei MaCa-Zellen mit PTEN-Überexpression zeigen. Fan et al. (2011) beschrieb VEGF als einen Driver für HM. Eine durch Smurf1 reduzierte PTEN-Expression könnte somit über VEGF zu einer vermehrten Invasion durch hBMEC führen und den Einfluss von Smurf1 auf die Entstehung von HM unterstützen.

Viele Projekte konnten eine erhöhte Invasivität durch Smurf1 in verschiedenen Tumorentitäten nachweisen. Informationen über die Mechanismen der Zellinvasion über die BHS bleiben weiterhin limitiert. Wir konnten zeigen, dass Smurf1 zu einer erhöhten Invasivität HER2-positiver MaCa-Zellen durch hBMEC führt. In TN MaCa scheint sich auch ein Effekt abzuzeichnen, welcher durch eine erhöhte Anzahl an Versuchen weiter analysiert werden muss.

4.3 Limitationen der Methoden

Um den Einfluss von Smurf1 auf die Progression des MaCa und der Entstehung von HM zu untersuchen wurden verschiedene Methoden angewendet. Hierbei ist es wichtig die benutzten Methoden zu diskutieren, um die Interpretation der Ergebnisse zu präzisieren und potenzielle Einflüsse auf die Aussagekraft der Ergebnisse zu berücksichtigen. Die Experimente wurden nach standardisierten Protokollen unter möglichst konstanten Bedingungen durchgeführt.

Zur Etablierung von Smurf1-KD und Überexpressionszelllinien wurden die Tumorzellen mithilfe von Lentiviren transduziert. (Methoden 2.2.2.4.2 Lentivirale Transduktion). Der Smurf1 KD wurde über das Einbringen von shRNA in die Tumorzellen erreicht. Hierbei bindet die shRNA an die Smurf1-mRNA und blockiert die Translation, wodurch eine vorübergehende Reduktion der Smurf1-Expression erreicht werden konnte. Wichtig ist hier zu beachten, dass es sich bei einem KD mit shRNA lediglich um eine Reduktion des Smurf1-mRNA- und Proteinlevels handelt, während bei einem Knockout beispielsweise anhand der Clustered, Regularly Interspaced Palindromic Repeat Associated Proteins (CRISPR)/Cas-Methode das komplette Gen ausgeschaltet wird. Im Vergleich zum Knockdown mit small interfering RNA (siRNA) zeigt der KD mit shRNA jedoch eine kontinuierliche Expression und höhere Potenz (McAnuff et al., 2007). Wichtig ist auch, dass shRNA sogenannte off-target Effekte auslösen kann. Hierunter versteht man Effekte auf die Zelle, die unabhängig vom intendierten Zielgen ausgelöst werden (Goel and Ploski, 2022). Hasegawa et al. (2017) beschrieben beispielsweise einen Effekt auf spannungsabhängige Ionenkanäle im Hippocampus der Maus nach Behandlung mit Luciferase-shRNA. Zudem wurde nachgewiesen, dass shRNA *in vivo* zu einer Veränderung der neuronalen Funktion und Synapsenbildung führt. Dies muss besonders dann beachtet werden, wenn die hier gezeigten Ergebnisse *in vivo* bestätigt werden sollen, um auszuschließen das der betrachtete zerebrale Effekt nicht auf Smurf1, sondern auf die shRNA zurückzuführen ist. Hierzu könnte statt einem KD eine Smurf1-Knockout-Zelllinie etabliert werden, welche sowohl den Vorteil hätte, dass keine Smurf1-Restaktivität vorliegt und dass keine shRNA in der Zelle exprimiert wird. Um zu analysieren, ob der auf die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit gesehene negative Einfluss der Smurf1-KD-Zelllinien auf den KD mit shRNA zurückzuführen ist, müssten die Versuche mit anderen Methoden des KD wiederholt werden. Da die Ergebnisse der Smurf1-Überexpressions-Zelllinie in den meisten Fällen die zu erwartenden inversen Resultate aufwiesen, stellt sich dies als unwahrscheinlich dar. Günther et al. (2017) beschrieb zudem den Einfluss der shRNA nur in *in vivo* Versuchen und keinen Einfluss in *in vitro* Experimenten. Ein weiterer wichtiger Punkt, der bei der Bewertung der erhobenen Ergebnisse relevant ist, ist die Variabilität der

Diskussion

KD-Effizienz bzw. der Effizienz der Überexpression in den einzelnen Tumorzellen. Es wurde darauf geachtet die Zellen bei einer Konfluenz von 80% zu lösen, allerdings ist es nicht auszuschließen, dass einzelne Zellen bereits Zell-Zell-Kontakte untereinander eingegangen sind, was wiederum einen Einfluss auf die Expression von Smurf1 haben und das Ergebnis des KD bzw. der Überexpression verändern könnte.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von Smurf1 auf die Adhäsionsfähigkeit von MaCa-Zellen an der BHS untersucht. Hierzu wurden statische Adhäsionsassays durchgeführt. Um die BHS zu repräsentieren, wurde eine Monolayer aus der primären Hirnendothelzellen (hBMEC) ausgesät an welcher die Anzahl an adhärierenden Tumorzellen nach 24 Stunden über Fluoreszenz gemessen wurde. Der Vorteile des hier verwendeten BHS-Modells liegt in den verwendeten Zellen. Viele BHS-Modelle basieren auf Epithelzellen (bspw Madin-Darby canine Kidney = MDCK oder nicht-zerebralen Endothelzellen wie HUVEC (human umbilical endothelial cells)) (Hellinger et al., 2012). Diese können sich jedoch im Sinne ihrer Proteinexpression und ihrem Durchmesser von zerebralen Endothelzellen unterscheiden.

Es ist wichtig zu betrachten, dass in dem hier verwendeten Modell allerdings lediglich Endothelzellen benutzt wurden. Für die Integrität und Funktion der BHS sind allerdings weitere Zelltypen wie Astrozyten und Perizyten relevant (Einleitung 2.2.4 Blut-Hirn-Schranke). Alternative BHS-Modelle verwenden Ko- oder Tripelkulturen, welche den *in vivo* Bedingungen der BHS näher entsprechen. Zudem können durch Mediensupplemente wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Glukokortikoide die Eigenschaften der BHS weiter den *in vivo* Bedingungen angepasst werden (Vastag and Keseru, 2009, Engelbertz et al., 2000). Bei der Bewertung der durchgeführten Adhäsions- und Invasionsanalysen ist diese Einschränkung mit einzubeziehen.

Eine weitere relevante Einschränkung des verwendeten Adhäsionsassays besteht in den statischen Versuchsbedingungen. Die Adhäsion von Tumorzellen an der BHS *in vivo* ist den dynamischen Bedingungen des Blutkreislaufes unterlegen, welche in statischen Assays nicht abgebildet werden. Zudem werden der geringe Gefäßdurchmesser und die Strömungsgeschwindigkeit nicht abgebildet, welche einen relevanten Einfluss auf die Adhäsion und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten ausübt. Große Standardfehler von bis zu SEM=0,28 zeigen zudem die Heterogenität der Ergebnisse und limitieren dadurch die Aussagekraft.

Zur Evaluation des Einflusses von Smurf1 auf die Invasionsfähigkeit von MaCa durch hBMEC wurde ein dynamischer Transwell-Invasionsassay verwendet (Methoden 3.2.1.2). Hierzu wurde auf einer Membran mit 8µm Poren eine hBMEC Monolayer ausgesät und anschließend eine fest definierte Anzahl Tumorzellen ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Anzahl an migrierten Tumorzellen auf der Membranrückseite ausgewertet. Zur

Untersuchung der Invasionsfähigkeit durch die BHS ist es relevant, dass das verwendete Modell eine hohe Stabilität und Integrität aufweist. Für die Integrität der BHS spielen neben den Endothelzellen auch Perizyten und Astrozyten eine wichtige Rolle, welche in dem hier verwendeten Modell nicht mit kultiviert wurden. Hieraus ergibt sich eine eingeschränkte Übertragbarkeit der Experimente von *in vitro* zu *in vivo*. Zudem fokussiert sich das gewählte Modell auf die Zellmigration durch hBMEC, während die Invasion *in vivo* lokale Wechselwirkungen, Matrixdegradation und Angiogenese miteinschließt. Um die Integrität der BHS beziehungsweise der hBMEC Monolayer zu bestimmen kann der Transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) bestimmt werden. Während dieser *in vivo* um die $2000 \Omega/\text{cm}^2$ beträgt (Crone and Olesen, 1982) konnte in Zelllinien lediglich ein TEER von $150\text{-}200 \Omega/\text{cm}^2$ gemessen werden (Deli et al., 2005). Um sicherzustellen, dass die hBMEC eine Monolayer ausbilden wurde dies vor jedem Assay kontrolliert. Trotzdem kann nicht endgültig sichergestellt werden, dass die Integrität der Monolayer über die Versuche hinweg reproduzierbar ist.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen eine erste Einschätzung des Einflusses von Smurf1 auf die Progression des MaCa und der Entstehung von HM liefern. Da lediglich die Adhäsion und Invasion unter *in vitro* Bedingungen betrachtet wurde ist eine kausale Schlussfolgerung nur eingeschränkt möglich und weitere Versuche und Analysen bezüglich der Rolle von Smurf1 im MaCa notwendig.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Smurf1 ist ein Enzym, welches an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt ist und mit der Aggressivität und Invasivität vieler Tumorentitäten in Verbindung gebracht wurde. Die vorliegende Arbeit hat den Einfluss von Smurf1 auf das Adhäsions- und Invasionsverhalten von MaCa-Zellen durch hBMEC untersucht und sollte damit die Rolle von Smurf1 in der Progression von HM beim MaCa analysieren. Unsere Erkenntnisse legen nahe, dass Smurf1 einen bedeutenden Einfluss auf die Invasivität von HER2-positiven MaCa-Zellen durch hBMEC ausübt. Die Auswirkungen von Smurf1 auf das Invasionsverhalten von TN MaCa-Zellen durch hBMEC müssen in umfangreicheren Versuchsreihen auf ihre statistische Signifikanz überprüft werden. Darüber hinaus zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass Smurf1 keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von HER2-positiven und TN MaCa-Zellen an hBMEC hat.

Anschließend an die dargestellten *in vitro* Analysen könnten in *in vivo* Untersuchungen der tatsächliche Einfluss einer erhöhten Smurf1 Expression auf die Entwicklung von HM untersucht werden. Hierbei könnte die Smurf1-Expression von

Primarius und HM in der Maus verglichen werden. Dies könnte aufzeigen, ob das Smurf1-Level sich über den Prozess der Hirnmetastasierung verändert. Durch die *in vitro* Analysen konnten lediglich einzelne Aspekte der Metastasierungskaskade beleuchtet werden. Ein relevanter Aspekt der Entstehung von HM ist die Veränderung des neuen Microenvironments nach Extravasation. Bisher gibt es keine Untersuchungen, die den Einfluss von Smurf1 auf die Anpassung der HM analysieren, allerdings Hinweise, dass Smurf1 an dem Wachstum von HM beteiligt sein könnte. Ein Substrat von Smurf1, welches bereits in verschiedenen Untersuchungen mit der Entstehung und der Progression von HM in Verbindung gebracht wurde ist PTEN (Hohensee et al., 2016). Zhang et al. (2015) zeigte, dass MaCa-Zellen, nachdem sie ins Gehirn metastasiert sind ihre PTEN-Expression verlieren. IHC-Analysen zeigten eine reduzierte PTEN-Expression der HM im Vergleich zu Primärtumoren. Auch Hosonaga et al. (2020) konnten einen PTEN-Verlust in 70% der HM von MaCa zeigen. PTEN ist ein Tumorsuppressorprotein, welches den PI3K/Akt-Signalweg inhibiert und dadurch zu einer verminderten Zellproliferation führt. Ein PTEN-Verlust führt zu einer dauerhaften Aktivierung des Signalwegs und damit einer verstärkten Zellproliferation. Zudem wurde eine verstärkte Aktivierung des NF-KB Signalwegs durch den Verlust von PTEN gezeigt (Zhang et al., 2015). Der Smurf1-assoziierte Abbau von PTEN resultiert zudem in einer Progression von GB und ein Smurf1-Knockdown in einer erhöhten Sensitivität der GB-Zellen für den mTOR-Inhibitoren Rapamycin (Xia et al., 2020b). Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine reduzierte Smurf1-Expression den PTEN-Verlust verhindert und folglich ein Smurf1-Inhibitor einen klinischen Einfluss auf die Progression von HM haben könnte.

Ein weiterer Hinweis, dass Smurf1 eine Rolle in der Progression von HM durch Anpassung der Metastasen an das Microenvironment haben könnte, liegt in der Kommunikation zwischen Astrozyten und Tumorzellen. Astrozyten und Tumorzellen kommunizieren über Gap Junctions. Hierbei kommt es zu einer Erhöhung von TNF-alpha, welches wiederum eine Steigerung der Smurf1-Ligaseaktivität zur Folge hat (Chen et al., 2016, Lee et al., 2013).

Wir konnten zeigen, dass Smurf1 die Invasionsfähigkeit von HER2-positiven und in geringem Maße auch von TN MaCa-Zellen steigert. Durch welche Interaktionspartner dies geschieht ist allerdings noch nicht ausreichend verstanden. Bryan et al. (2021) hat die an Entstehung von HM beim MaCa beteiligten Proteine zusammengefasst. Weitere Experimente könnten den Einfluss von Smurf1 auf die Produktion dieser Proteine wie beispielsweise VEGF, CXCR4, COX-2 oder dem an der Hirnmetastasierung beteiligtem Integrin Beta4 untersuchen, um den Prozess der Extravasation durch die Blut-Hirn-Schranke weiter spezifizieren zu können.

Diskussion

Ein besseres Verständnis über die Beteiligung von Smurf1 in der Entstehung und Progression von HM beim MaCa kann eine große Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer oder diagnostischer Strategien haben, für die die hier dargestellten Ergebnisse eine Grundlage bieten. Es werden weitere Untersuchungen benötigt, um den Einfluss einer medikamentösen Hemmung von Smurf1 auf die Invasivität des MaCa und die Entstehung von HM zu überprüfen. Bei der Betrachtung von Smurf1 als therapeutischen Target gilt es zu beachten, dass Smurf1 an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt ist. Untersuchungen müssen dementsprechend auch Veränderungen gesunder Zellen miteinschließen, um mögliche ungewollte Nebeneffekte frühzeitig ausschließen zu können. Bisherige Versuche zeigen, dass die phänotypischen Veränderungen in Smurf1-Knockout Mäusen nicht mit den zahlreichen Substraten und deren Funktionen in den Signalwegen korrelieren. So zeigten Mäuse mit einer Smurf1 Deletion lediglich eine altersabhängige Erhöhung der Knochenmasse mit einer normalen embryonalen Entwicklung (Yamashita et al., 2005, Cao and Zhang, 2013). Ein Grund hierfür kann die Übereinstimmung einiger Substrate zwischen Smurf1 und Smurf2 sein, es ist möglich, dass der Smurf1-Verlust durch Smurf2 abgefangen wird. Hiefür spricht auch, dass Smurf1 und Smurf2 Deletion zu schwerwiegenden Neuralrohrdefekten führten (Narimatsu et al., 2009). Die Übernahme der physiologischen Funktionen von Smurf1 durch Smurf2 hätte zudem den zusätzlichen Vorteil, dass es sich bei Smurf2 um einen Tumorsuppressor handelt (Blank et al., 2012), welcher einen zusätzlich Anti-Tumor-Effekt mit sich bringen könnte.

Ein neuer Weg der onkologischen Therapien ist die zielgerichtete Proteindegradation durch niedermolekulare Substanzen: PROTACs (proteolysis targeting chimeras). Hierunter versteht man Moleküle, welche E3-Ligasen rekrutieren und dadurch zielgerichtet Proteine abbauen können (Liu et al., 2023b). Der Vorteil hierbei ist, dass spezifisch überexprimierte intrazelluläre Proteine anvisiert werden können, welche bisher medikamentös nicht erreicht wurden. Durch die spezifische Bindung von E3-Ligasen, könnte dies zu einer räumlich-zeitlich gerichteten Degradation bestimmter Proteine führen. Am Beispiel von Smurf1 könnte dies zu einem zeitlich gerichteten Abbau von beispielsweise Rac1 führen und damit die initiale Zelladhäsion an Hirnendothel hemmen und möglicherweise so die Entstehung von HM verhindern. Smurf1 ist eine der E3-Ubiquitin-Ligasen, die in zukünftigen Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit als PROTAC genutzt zu werden analysiert wird und besonders durch seine Interaktion mit EGFR ein vielversprechendes Ziel ausmacht (Liu et al., 2023b). Vier PROTACs befinden sich bereits in klinischer Testung, unter anderem im metastasierten ER positiven/HER2 negativen MaCa als Monotherapie oder in Kombination mit dem CDK4/6 Inhibitoren Palbociclib. (NCT04072952).

Diskussion

Smurf1 ist ein komplexes Protein mit großem Einfluss auf eine Vielzahl von Signalwegen. Seine Funktionen und Interaktionspartner im Detail zu verstehen kann ein Schritt in die Entwicklung prognostischer Marker in der Diagnostik vieler Tumorentitäten und in der Entwicklung neuer therapeutischer Targets darstellen. Um die abschließende Rolle von Smurf1 in der Progression des Mammakarzinoms und der Entstehung von Hirnmetastasen zu klären, sind weitere Projekte notwendig.

5 Zusammenfassung

Im Laufe ihres Lebens erkrankt eine von acht Frauen an Brustkrebs. Das Mammakarzinom kann anhand des molekularen Expressionsmuster von Östrogen- und Progesteronrezeptor und HER2/neu in mehrere molekulare Subtypen unterteilt werden. Unterschieden wird zwischen (1) Hormonrezeptor (ER/PR) – positiven (2) HER2-positiven und (3) Triple-negativen Mammakarzinomen. Diese Subtypen unterscheiden sich unter anderem in dem Auftreten von Fernmetastasen und damit ihrer Prognose. Das Mammakarzinom metastasiert früh hämatogen in Knochen, Lunge, Leber und Gehirn.

10-16% aller Patientinnen entwickeln im Laufe ihrer Krebserkrankung Hirnmetastasen. Dies stellt nicht nur eine deutliche Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patientinnen dar, Betroffene haben ein deutlich reduziertes Gesamtüberleben mit einer 1-Jahres Überlebenschance von lediglich 20%. Trotz umfangreicher Forschung gibt es noch immer kaum Biomarker und wenig zielgerichtete therapeutische Möglichkeiten für die Patientinnen. Für die Entwicklung neuer Therapien ist es wichtig zu verstehen, wie Tumorzellen die hochselektive Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Smurf1 ist als HECT-E3-Ubiquitin-Ligase Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Eine Smurf1 Überexpression wurde bereits in mehreren Tumorentitäten wie beispielsweise Kolon- und Pankreaskarzinomen beschrieben. Die AG Oliveira-Ferrer konnte in Microarray-Analysen eine Korrelation zwischen dem Smurf1-mRNA-Level und einem reduzierten Gesamtüberleben, sowie ein höheres Smurf1-mRNA-Level in Patientinnen mit HM nachweisen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss von Smurf1 auf die Entstehung von Hirnmetastasen im Mammakarzinom untersucht. Hierzu wurde die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit einer HER2-positiven und einer Triple-negativen Mammakarzinomzelllinie mit Smurf1 Knockdown und Smurf1 Überexpression an primären Hirndothelzellen (hBMEC) analysiert. Eine Veränderung der Smurf1-Expression führte zu keiner signifikanten Veränderung des Adhäsionsverhaltens in HER2-positiven und Triple-negativen Zellen. Eine Erhöhung der Invasivität von Triple-negativen Mammakarzinomzellen erwies sich ebenfalls als nicht signifikant. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass Smurf1 die Invasivität HER2-positiver Mammakarzinomzellen erhöht. Eine Wiederholung der Versuche an weiteren Zelllinien des jeweiligen molekularen Subtyps könnte zu einer zusätzlichen Validierung der Ergebnisse führen. Zudem ist eine Bestätigung besonders der positiven Befunde *in vivo* notwendig.

Die Verwendung von E3-Ubiquitin-Ligasen steht mittlerweile immer mehr im Mittelpunkt der Entwicklung neuer Therapien. Die sogenannten PROTACs bedienen sich dem zellulären System der proteasomalen Degradation, um zielgerichtet karzinogene Proteine abzubauen.

Zusammenfassung

Dies könnte eine Möglichkeit sein, Smurf1 beim fortgeschrittenen HER2-positiven Mammakarzinom als therapeutisches Ziel zu nutzen und die Entstehung von Hirnmetastasen verhindern zu können.

6 Summary

One of eight women will develop breast cancer in her lifetime. Breast cancer can be classified into several molecular subtypes based on the molecular expression pattern of estrogen and progesterone receptors and HER2. A distinction is made between (1) hormone receptor (ER/PR) positive, (2) HER2-positive and (3) triple-negative breast cancer. These subtypes differ in the incidence of metastases and thus their prognosis. Breast cancer metastasizes early hematogenously to the bone, lung, liver and brain. Up to 16% of all breast cancer patients develop brain metastasis. Brain metastasis not only has a significant impact on patients' quality of life, but those affected have a significantly reduced overall survival with a 1-year survival probability of just 20%. Despite extensive research, there are still hardly any prognostic biomarkers and few targeted therapeutic options for patients. For the development of new therapies, it is important to understand how tumor cells can cross the highly selective blood-brain barrier.

Smurf1, a HECT E3 ubiquitin ligase, is part of the ubiquitin-proteasome system. Smurf1 overexpression has already been described in several tumor entities such as colon and pancreatic adenocarcinomas.

In this study, the influence of Smurf1 on the development of breast cancer brain metastases was investigated for the first time. To understand the role of Smurf1, the adhesion and invasion capacity of a HER2-positive and a triple-negative breast carcinoma cell line with Smurf1 knockdown and Smurf1 overexpression on primary brain endothelial cells (hBMEC) was analyzed. Interestingly, a change in Smurf1 expression did not lead to a significant change in adhesion to hBMEC in both HER2-positive and triple-negative cells. Furthermore, a significant increase in the invasiveness of triple-negative breast cancer cells could not be detected. The present study shows for the first time that Smurf1 increases the ability of HER2-positive breast cancer cells to invade hBMEC and therefore the blood-brain barrier. To evaluate the results, it is necessary to repeat the experiments with other HER2-positive and TN-cell lines and to confirm the positive results *in vivo*.

E3 ubiquitin ligases are more and more the center of attention in the development of new therapeutic strategies. The so-called PROTACs use an E3 ligase of the cancer cell to degrade targeted pro-oncogenic proteins. This could be a promising way of using Smurf1 as a therapeutic target in advanced HER2-positive breast cancer and preventing the development of brain metastases.

7 Literaturverzeichnis

- ACHROL, A. S., RENNERT, R. C., ANDERS, C., SOFFIETTI, R., AHLUWALIA, M. S., NAYAK, L., PETERS, S., ARVOLD, N. D., HARSH, G. R., STEEG, P. S. & CHANG, S. D. 2019. Brain metastases. *Nature Reviews Disease Primers*, 5, 5.
- ADAMO, B., DEAL, A. M., BURROWS, E., GERADTS, J., HAMILTON, E., BLACKWELL, K. L., LIVASY, C., FRITCHIE, K., PRAT, A., HARRELL, J. C., EWEND, M. G., CAREY, L. A., MILLER, C. R. & ANDERS, C. K. 2011. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in breast cancer brain metastases. *Breast Cancer Res*, 13, R125.
- AKIYAMA, T., SUDO, C., OGAWARA, H., TOYOSHIMA, K. & YAMAMOTO, T. 1986. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 232, 1644-6.
- ALBIGES, L., ANDRÉ, F., BALLEYGUIER, C., GOMEZ-ABUIN, G., CHOMPRET, A. & DELALOGUE, S. 2005. Spectrum of breast cancer metastasis in BRCA1 mutation carriers: highly increased incidence of brain metastases. *Ann Oncol*, 16, 1846-7.
- ARMULIK, A., GENOVÉ, G., MÄE, M., NISANCIOGLU, M. H., WALLGARD, E., NIAUDET, C., HE, L., NORLIN, J., LINDBLOM, P., STRITTMATTER, K., JOHANSSON, B. R. & BETSHOLTZ, C. 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468, 557-61.
- AYLOO, S. & GU, C. 2019. Transcytosis at the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol*, 57, 32-38.
- BALDA, M. S. & MATTER, K. 2009. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788, 761-767.
- BALZ, L. M., BARTKOWIAK, K., ANDREAS, A., PANTEL, K., NIGGEMANN, B., ZÄNKER, K. S., BRANDT, B. H. & DITTMAR, T. 2012. The interplay of HER2/HER3/PI3K and EGFR/HER2/PLC- γ 1 signalling in breast cancer cell migration and dissemination. *J Pathol*, 227, 234-44.
- BARZAMAN, K., KARAMI, J., ZAREI, Z., HOSSEINZADEH, A., KAZEMI, M. H., MORADIKALBOLANDI, S., SAFARI, E. & FARAHMAND, L. 2020. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*, 84, 106535.
- BLAKE, A., DRAGAN, M. & TIRONA, R. G. 2017. G protein-coupled KISS1 receptor is overexpressed in triple negative breast cancer and promotes drug resistance. *Sci Rep*, 7, 46525.
- BLANCO, M. A., ALEČKOVIĆ, M., HUA, Y., LI, T., WEI, Y., XU, Z., CRISTEA, I. M. & KANG, Y. 2011. Identification of staphylococcal nuclease domain-containing 1 (SND1) as a Metadherin-interacting protein with metastasis-promoting functions. *J Biol Chem*, 286, 19982-92.
- BLANK, M., TANG, Y., YAMASHITA, M., BURKETT, S. S., CHENG, S. Y. & ZHANG, Y. E. 2012. A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20. *Nature Medicine*, 18, 227-234.
- BOS, P. D., ZHANG, X. H., NADAL, C., SHU, W., GOMIS, R. R., NGUYEN, D. X., MINN, A. J., VAN DE VIJVER, M. J., GERALD, W. L., FOEKENS, J. A. & MASSAGUÉ, J. 2009. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, 459, 1005-9.
- BRYAN, S., WITZEL, I., BORGMANN, K. & OLIVEIRA-FERRER, L. 2021. Molecular Mechanisms Associated with Brain Metastases in HER2-Positive and Triple Negative Breast Cancers. *Cancers (Basel)*, 13.

- CAO, Y. & ZHANG, L. 2013. A Smurf1 tale: function and regulation of an ubiquitin ligase in multiple cellular networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 2305-2317.
- CARDOSO, F., COSTA, A., NORTON, L., SENKUS, E., AAPRO, M., ANDRÉ, F., BARRIOS, C. H., BERGH, J., BIGANZOLI, L., BLACKWELL, K. L., CARDOSO, M. J., CUFER, T., EL SAGHIR, N., FALLOWFIELD, L., FENECH, D., FRANCIS, P., GELMON, K., GIORDANO, S. H., GLIGOROV, J., GOLDBIRSCHE, A., HARBECK, N., HOUSSAMI, N., HUDIS, C., KAUFMAN, B., KROP, I., KYRIAKIDES, S., LIN, U. N., MAYER, M., MERJAVER, S. D., NORDSTRÖM, E. B., PAGANI, O., PARTRIDGE, A., PENNAULT-LLOORCA, F., PICCART, M. J., RUGO, H., SLEDGE, G., THOMSEN, C., VAN'T VEER, L., VOROBIOF, D., VRIELING, C., WEST, N., XU, B. & WINER, E. 2014. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2)[†]. *Annals of Oncology*, 25, 1871-1888.
- CHANG, H., ZHANG, J., MIAO, Z., DING, Y., XU, X., ZHAO, X., XU, P., WANG, Q. & LIN, Y. 2018. Suppression of the Smurf1 Expression Inhibits Tumor Progression in Gliomas. *Cell Mol Neurobiol*, 38, 421-430.
- CHEN, C. & MATESIC, L. E. 2007. The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 26, 587-604.
- CHEN, Q., BOIRE, A., JIN, X., VALIENTE, M., ER, E. E., LOPEZ-SOTO, A., JACOB, L., PATWA, R., SHAH, H., XU, K., CROSS, J. R. & MASSAGUÉ, J. 2016. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*, 533, 493-498.
- CHO, S. G., LI, D., STAFFORD, L. J., LUO, J., RODRIGUEZ-VILLANUEVA, M., WANG, Y. & LIU, M. 2009. KiSS1 suppresses TNF α -induced breast cancer cell invasion via an inhibition of RhoA-mediated NF- κ B activation. *J Cell Biochem*, 107, 1139-49.
- COLAK, S. & TEN DIJKE, P. 2017. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends Cancer*, 3, 56-71.
- CRONE, C. & OLESEN, S. P. 1982. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*, 241, 49-55.
- CROSE, L. E. S., HILDER, T. L., SCIAKY, N. & JOHNSON, G. L. 2009. Cerebral cavernous malformation 2 protein promotes smad ubiquitin regulatory factor 1-mediated RhoA degradation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 284, 13301-13305.
- CSERNI, G., CHMIELIK, E., CSERNI, B. & TOT, T. 2018. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch*, 472, 697-703.
- CVETKOVIĆ, D., BABWAH, A. V. & BHATTACHARYA, M. 2013. Kisspeptin/KISS1R System in Breast Cancer. *J Cancer*, 4, 653-61.
- DANEMAN, R. & PRAT, A. 2015. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a020412.
- DELI, M. A., ABRAHÁM, C. S., KATAOKA, Y. & NIWA, M. 2005. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*, 25, 59-127.
- DITSCH, N., UNTCH, M., KOLBERG-LIEDTKE, C., JACKISCH, C., KRUG, D., FRIEDRICH, M., JANNI, W., MÜLLER, V., ALBERT, U. S., BANYS-PALUCHOWSKI, M., BAUERFEIND, I., BLOHMER, J. U., BUDACH, W., DALL, P., DIEL, I., FALLENBERG, E. M., FASCHING, P. A., FEHM, T., GERBER, B., GLUZ, O., HANF, V., HARBECK, N., HEIL, J., HUOBER, J., KREIPE, H. H., KÜHN, T., KÜMMEL, S., LOIBL, S., LÜFTNER, D., LUX, M., MAASS, N., MOEBUS, V., MUNDHENKE, C., PARK-SIMON, T. W., REIMER, T., RHIEM, K., RODY, A., SCHMIDT, M., SCHNEEWEISS, A., SOLBACH, C., SOLOMAYER, E. F., STICKELER, E., THOMSEN, C., WITZEL, I., WÖCKEL, A. & THILL, M. 2020. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer: Update 2020. *Breast Care (Basel)*, 15, 294-309.

- EHRlich, P. 1885. *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie*, A. Hirschwald.
- EMENS, L. A. & DAVIDSON, N. E. 2003. The follow-up of breast cancer. *Seminars in Oncology*, 30, 338-348.
- ENGELBERTZ, C., KORTE, D., NITZ, T., FRANKE, H., HASELBACH, M., GALLA, H. & GALLA, H.-J. 2000. *The development of in vitro models for the blood-brain and blood-CSF barriers*, Marcel Dekker, New York.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K. & PENZKOFER, A. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018.
- FAN, J., CAI, B., ZENG, M., HAO, Y., GIANCOTTI, F. G. & FU, B. M. 2011. Integrin β 4 signaling promotes mammary tumor cell adhesion to brain microvascular endothelium by inducing ErbB2-mediated secretion of VEGF. *Ann Biomed Eng*, 39, 2223-2241.
- FAN, X., WANG, Y., FAN, J. & CHEN, R. 2019. Deletion of SMURF 1 represses ovarian cancer invasion and EMT by modulating the DAB2IP/AKT/Skp2 feedback loop. *J Cell Biochem*, 120, 10643-10651.
- FAZAKAS, C., WILHELM, I., NAGYOSZI, P., FARKAS, A. E., HASKÓ, J., MOLNÁR, J., BAUER, H., BAUER, H. C., AYAYDIN, F., DUNG, N. T., SIKLÓS, L. & KRIZBAI, I. A. 2011. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One*, 6, e20758.
- FIGUEIRA, I., GALEGO, S., CUSTÓDIO-SANTOS, T., VICENTE, R., MOLNÁR, K., HASKÓ, J., MALHÓ, R., VIDEIRA, M., WILHELM, I., KRIZBAI, I. & BRITO, M. A. 2021. Picturing Breast Cancer Brain Metastasis Development to Unravel Molecular Players and Cellular Crosstalk. *Cancers (Basel)*, 13.
- FUKUNAGA, E., INOUE, Y., KOMIYA, S., HORIGUCHI, K., GOTO, K., SAITOH, M., MIYAZAWA, K., KOINUMA, D., HANYU, A. & IMAMURA, T. 2008. Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 35660-35667.
- GAZDAR, A. F., KURVARI, V., VIRMANI, A., GOLLAHON, L., SAKAGUCHI, M., WESTERFIELD, M., KODAGODA, D., STASNY, V., CUNNINGHAM, H. T., WISTUBA, II, TOMLINSON, G., TONK, V., ASHFAQ, R., LEITCH, A. M., MINNA, J. D. & SHAY, J. W. 1998. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer*, 78, 766-74.
- GIANCOTTI, F. G. 2007. Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 506-11.
- GOEL, K. & PLOSKI, J. E. 2022. RISC- γ Business: Limitations of Short Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing in the Brain and a Discussion of CRISPR/Cas-Based Alternatives. *Front Mol Neurosci*, 15, 914430.
- GOLDHIRSCH, A., WOOD, W. C., COATES, A. S., GELBER, R. D., THÜRLIMANN, B. & SENN, H. J. 2011. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*, 22, 1736-47.
- GOLDMANN, E. E. 1913. Vitalfärbung am Zentralnervensystem: Beitrag zur Physiopathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute. (*No Title*).
- GONZALEZ-ANGULO, A. M., FERRER-LOZANO, J., STEMKE-HALE, K., SAHIN, A., LIU, S., BARRERA, J. A., BURGUES, O., LLUCH, A. M., CHEN, H., HORTOBAGYI, G. N., MILLS,

- G. B. & MERIC-BERNSTAM, F. 2011. PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 10, 1093-101.
- GÜNTHER, A., LUCZAK, V., ABEL, T. & BAUMANN, A. 2017. Caspase-3 and GFAP as early markers for apoptosis and astrogliosis in shRNA-induced hippocampal cytotoxicity. *J Exp Biol*, 220, 1400-1404.
- HAN, D., WANG, L., JIANG, S. & YANG, Q. 2023. The ubiquitin–proteasome system in breast cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 29, 599-621.
- HASEGAWA, Y., MAO, W., SAHA, S., GUNNER, G., KOLPAKOVA, J., MARTIN, G. E. & FUTAI, K. 2017. Luciferase shRNA Presents off-Target Effects on Voltage-Gated Ion Channels in Mouse Hippocampal Pyramidal Neurons. *eneuro*, 4, ENEURO.0186-17.2017.
- HEITZ, F., HARTEP, P., LUECK, H. J., FISSLER-ECKHOFF, A., LORENZ-SALEHI, F., SCHEIL-BERTRAM, S., TRAUT, A. & DU BOIS, A. 2009. Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer*, 45, 2792-8.
- HEITZ, F., ROCHON, J., HARTEP, P., LUECK, H. J., FISSELER-ECKHOFF, A., BARINOFF, J., TRAUT, A., LORENZ-SALEHI, F. & DU BOIS, A. 2011. Cerebral metastases in metastatic breast cancer: disease-specific risk factors and survival. *Ann Oncol*, 22, 1571-1581.
- HELLINGER, E., VESZELKA, S., TÓTH, A. E., WALTER, F., KITTEL, A., BAKK, M. L., TIHANYI, K., HÁDA, V., NAKAGAWA, S., DUY, T. D., NIWA, M., DELI, M. A. & VASTAG, M. 2012. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm*, 82, 340-51.
- HOELLER, D. & DIKIC, I. 2009. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*, 458, 438-44.
- HOHENSEE, I., CHUANG, H.-N., GROTTKE, A., WERNER, S., SCHULTE, A., HORN, S., LAMSZUS, K., BARTKOWIAK, K., WITZEL, I., WESTPHAL, M., MATSCHKE, J., GLATZEL, M., JÜCKER, M., PUKROP, T., PANTEL, K. & WIKMAN, H. 2016. PTEN mediates the cross talk between breast and glial cells in brain metastases leading to rapid disease progression. *Oncotarget*, 8.
- HOSONAGA, M., SAYA, H. & ARIMA, Y. 2020. Molecular and cellular mechanisms underlying brain metastasis of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 39, 711-720.
- HUANG, C. 2010. Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr*, 4, 10-8.
- HUANG, C., RAJFUR, Z., YOUSEFI, N., CHEN, Z., JACOBSON, K. & GINSBERG, M. H. 2009. Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nature cell biology*, 11, 624-630.
- HUVENEERS, S. & DANEN, E. H. 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, 122, 1059-69.
- INGHAM, R. J., GISH, G. & PAWSON, T. 2004. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*, 23, 1972-1984.
- IZZI, L. & ATTISANO, L. 2006. Ubiquitin-dependent regulation of TGFbeta signaling in cancer. *Neoplasia*, 8, 677-88.
- KADRY, H., NOORANI, B. & CUCULLO, L. 2020. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS*, 17, 69.

- KATZ, M., SHTIEGMAN, K., TAL-OR, P., YAKIR, L., MOSESSON, Y., HARARI, D., MACHLUF, Y., ASAO, H., JOVIN, T., SUGAMURA, K. & YARDEN, Y. 2002. Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic*, 3, 740-51.
- KE, M., MO, L., LI, W., ZHANG, X., LI, F. & YU, H. 2017. Ubiquitin ligase SMURF1 functions as a prognostic marker and promotes growth and metastasis of clear cell renal cell carcinoma. *FEBS Open Bio*, 7, 577-586.
- KLOS, K. J. & O'NEILL, B. P. 2004. Brain metastases. *Neurologist*, 10, 31-46.
- KORCZYN, A. D. 2015. Vascular parkinsonism--characteristics, pathogenesis and treatment. *Nat Rev Neurol*, 11, 319-26.
- KWEI, K. A., SHAIN, A. H., BAIR, R., MONTGOMERY, K., KARIKARI, C. A., VAN DE RIJN, M., HIDALGO, M., MAITRA, A., BASHYAM, M. D. & POLLACK, J. R. 2011. SMURF1 Amplification Promotes Invasiveness in Pancreatic Cancer. *PLOS ONE*, 6, e23924.
- KWON, A., LEE, H. L., WOO, K. M., RYOO, H. M. & BAEK, J. H. 2013. SMURF1 plays a role in EGF-induced breast cancer cell migration and invasion. *Mol Cells*, 36, 548-55.
- LEE, H. L., YI, T., BAEK, K., KWON, A., HWANG, H. R., QADIR, A. S., PARK, H. J., WOO, K. M., RYOO, H. M., KIM, G. S. & BAEK, J. H. 2013. Tumor necrosis factor- α enhances the transcription of Smad ubiquitination regulatory factor 1 in an activating protein-1- and Runx2-dependent manner. *J Cell Physiol*, 228, 1076-86.
- LEE, Y. S., PARK, J. S., KIM, J. H., JUNG, S. M., LEE, J. Y., KIM, S. J. & PARK, S. H. 2011. Smad6-specific recruitment of Smurf E3 ligases mediates TGF- β 1-induced degradation of MyD88 in TLR4 signalling. *Nat Commun*, 2, 460.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF). 2021. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4., AWMF Registernummer: 032-045OL* [Online]. Available: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 23.11.2023) [Accessed].
- LEONE, J. P. & LEONE, B. A. 2015. Breast cancer brain metastases: the last frontier. *Exp Hematol Oncol*, 4, 33.
- LI, X., DAI, X., WAN, L., INUZUKA, H., SUN, L. & NORTH, B. J. 2016a. Smurf1 regulation of DAB2IP controls cell proliferation and migration. *Oncotarget*, 7, 26057.
- LI, X. Q., LU, J. T., TAN, C. C., WANG, Q. S. & FENG, Y. M. 2016b. RUNX2 promotes breast cancer bone metastasis by increasing integrin α 5-mediated colonization. *Cancer Lett*, 380, 78-86.
- LIM, E. & LIN, N. U. 2014. Updates on the management of breast cancer brain metastases. *Oncology (Williston Park)*, 28, 572-8.
- LIN, N. U., BELLON, J. R. & WINER, E. P. 2004. CNS metastases in breast cancer. *J Clin Oncol*, 22, 3608-17.
- LIU, F., WU, Q., DONG, Z. & LIU, K. 2023a. Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, 247, 108458.
- LIU, L., XU, C., HSIEH, J. T., GONG, J. & XIE, D. 2016. DAB2IP in cancer. *Oncotarget*, 7, 3766-76.
- LIU, Y., YANG, J., WANG, T., LUO, M., CHEN, Y., CHEN, C., RONAI, Z. E., ZHOU, Y., RUPPIN, E. & HAN, L. 2023b. Expanding PROTACtable genome universe of E3 ligases. *Nature Communications*, 14, 6509.

- LU, K., YIN, X., WENG, T., XI, S., LI, L., XING, G., CHENG, X., YANG, X., ZHANG, L. & HE, F. 2008. Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1. *Nat Cell Biol*, 10, 994-1002.
- LU, L., WU, M., LU, Y., ZHAO, Z., LIU, T., FU, W. & LI, W. 2019. MicroRNA-424 regulates cisplatin resistance of gastric cancer by targeting SMURF1 based on GEO database and primary validation in human gastric cancer tissues. *Onco Targets Ther*, 12, 7623-7636.
- MAGNIFICO, A., ETTEBERG, S., YANG, C., MARIANO, J., TIWARI, S., FANG, S., LIPKOWITZ, S. & WEISSMAN, A. M. 2003. WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem*, 278, 43169-77.
- MCANUFF, M. A., RETTIG, G. R. & RICE, K. G. 2007. Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo. *J Pharm Sci*, 96, 2922-30.
- MERGENTHALER, P., LINDAUER, U., DIENEL, G. A. & MEISEL, A. 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci*, 36, 587-97.
- MIYAZONO, K., MAEDA, S. & IMAMURA, T. 2004. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and Runx proteins. *Oncogene*, 23, 4232-4237.
- MOMTAZ, S., MEMARIANI, Z., EL-SENDUNY, F. F., SANADGOL, N., GOLAB, F., KATEBI, M., ABDOLGHAFARI, A. H., FARZAEI, M. H. & ABDOLLAHI, M. 2020. Targeting ubiquitin-proteasome pathway by natural products: Novel therapeutic strategy for treatment of neurodegenerative diseases. *Frontiers in Physiology*, 11.
- MORO, L., DOLCE, L., CABODI, S., BERGATTO, E., BOERI ERBA, E., SMERIGLIO, M., TURCO, E., RETTA, S. F., GIUFFRIDA, M. G., VENTURINO, M., GODOVAC-ZIMMERMANN, J., CONTI, A., SCHAEFER, E., BEGUINOT, L., TACCHETTI, C., GAGGINI, P., SILENGO, L., TARONE, G. & DEFILIPPI, P. 2002. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem*, 277, 9405-14.
- MORROW, M., SCHNITT, S. J. & NORTON, L. 2015. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 12, 227-38.
- MÜLLER, V., LAAKMANN, E., GROTTKE, A., RIECKE, K. & WITZEL, I. 2018. Cerebral metastasis in breast cancer. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 15, 213-218.
- NARIMATSU, M., BOSE, R., PYE, M., ZHANG, L., MILLER, B., CHING, P., SAKUMA, R., LUGA, V., RONCARI, L., ATTISANO, L. & WRANA, J. L. 2009. Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. *Cell*, 137, 295-307.
- NIE, F., YANG, J., WEN, S., AN, Y. L., DING, J., JU, S. H., ZHAO, Z., CHEN, H. J., PENG, X. G., WONG, S. T., ZHAO, H. & TENG, G. J. 2012. Involvement of epidermal growth factor receptor overexpression in the promotion of breast cancer brain metastasis. *Cancer*, 118, 5198-209.
- NIE, J., XIE, P., LIU, L., XING, G., CHANG, Z., YIN, Y., TIAN, C., HE, F. & ZHANG, L. 2010. Smad ubiquitylation regulatory factor 1/2 (Smurf1/2) promotes p53 degradation by stabilizing the E3 ligase MDM2. *J Biol Chem*, 285, 22818-30.
- OGAWA, K., YOSHII, Y., NISHIMAKI, T., TAMAKI, N., MIYAGUNI, T., TSUCHIDA, Y., KAMADA, Y., TOITA, T., KAKINOHANA, Y., TAMAKI, W., IRAHA, S., ADACHI, G., HYODO, A. & MURAYAMA, S. 2008. Treatment and prognosis of brain metastases from breast cancer. *J Neurooncol*, 86, 231-8.

- OZDAMAR, B., BOSE, R., BARRIOS-RODILES, M., WANG, H.-R., ZHANG, Y. & WRANA, J. L. 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, 307, 1603-1609.
- PESTALOZZI, B. C., ZAHRIEH, D., PRICE, K. N., HOLMBERG, S. B., LINDTNER, J., COLLINS, J., CRIVELLARI, D., FEY, M. F., MURRAY, E., PAGANI, O., SIMONCINI, E., CASTIGLIONE-GERTSCH, M., GELBER, R. D., COATES, A. S. & GOLDBIRSCHE, A. 2006. Identifying breast cancer patients at risk for Central Nervous System (CNS) metastases in trials of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG). *Ann Oncol*, 17, 935-44.
- QIU, J., XUE, X., HU, C., XU, H., KOU, D., LI, R. & LI, M. 2016. Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis in Triple-Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer*, 7, 167-173.
- RAHIKAINEN, R., ÖHMAN, T., TURKKI, P., VARJOSALO, M. & HYTÖNEN, V. P. 2019. Talin-mediated force transmission and talin rod domain unfolding independently regulate adhesion signaling. *Journal of cell science*, 132, jcs226514.
- REYMOND, N., D'ÁGUA, B. B. & RIDLEY, A. J. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*, 13, 858-70.
- ROBEY, R. W., PLUCHINO, K. M., HALL, M. D., FOJO, A. T., BATES, S. E. & GOTTESMAN, M. M. 2018. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer*, 18, 452-464.
- SAHAI, E., GARCIA-MEDINA, R., POUYSSÉGUR, J. & VIAL, E. 2007. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *The Journal of cell biology*, 176, 35-42.
- SANGLIER, T., SHIM, J., LAMARRE, N., PEÑA-MURILLO, C., ANTAO, V. & MONTEMURRO, F. 2023. Trastuzumab emtansine vs lapatinib and capecitabine in HER2-positive metastatic breast cancer brain metastases: A real-world study. *The Breast*, 69, 441-450.
- SARTORIUS, C. A., HANNA, C. T., GRIL, B., CRUZ, H., SERKOVA, N. J., HUBER, K. M., KABOS, P., SCHEDIN, T. B., BORGES, V. F., STEEG, P. S. & CITTELLY, D. M. 2016. Estrogen promotes the brain metastatic colonization of triple negative breast cancer cells via an astrocyte-mediated paracrine mechanism. *Oncogene*, 35, 2881-92.
- SASAKI, A. T., CARRACEDO, A., LOCASALE, J. W., ANASTASIOU, D., TAKEUCHI, K., KAHOU, E. R., HAVIV, S., ASARA, J. M., PANDOLFI, P. P. & CANTLEY, L. C. 2011. Ubiquitination of K-Ras enhances activation and facilitates binding to select downstream effectors. *Sci Signal*, 4, ra13.
- SIRKISOON, S. R., CARPENTER, R. L., RIMKUS, T., MILLER, L., METHENY-BARLOW, L. & LO, H. W. 2016. EGFR and HER2 signaling in breast cancer brain metastasis. *Front Biosci (Elite Ed)*, 8, 245-63.
- SOHN, Y. M., HAN, K. & SEO, M. 2016. Immunohistochemical Subtypes of Breast Cancer: Correlation with Clinicopathological and Radiological Factors. *Iran J Radiol*, 13, e31386.
- SONG, Y., BARRY, W. T., SEAH, D. S., TUNG, N. M., GARBER, J. E. & LIN, N. U. 2020. Patterns of recurrence and metastasis in BRCA1/BRCA2-associated breast cancers. *Cancer*, 126, 271-280.
- SONI, A., REN, Z., HAMEED, O., CHANDA, D., MORGAN, C. J., SIEGAL, G. P. & WEI, S. 2015. Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases. *Am J Clin Pathol*, 143, 471-8.

- STOLETOV, K., KATO, H., ZARDOUZIAN, E., KELBER, J., YANG, J., SHATTIL, S. & KLEMKE, R. 2010. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci*, 123, 2332-41.
- SUBIK, K., LEE, J. F., BAXTER, L., STRZEPEK, T., COSTELLO, D., CROWLEY, P., XING, L., HUNG, M. C., BONFIGLIO, T., HICKS, D. G. & TANG, P. 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*, 4, 35-41.
- SUN, Y. S., ZHAO, Z., YANG, Z. N., XU, F., LU, H. J., ZHU, Z. Y., SHI, W., JIANG, J., YAO, P. P. & ZHU, H. P. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 13, 1387-1397.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- TAO, Y., SUN, C., ZHANG, T. & SONG, Y. 2017. SMURF1 promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 38, 1806-1814.
- THEODOSIOU, M., WIDMAIER, M., BÖTTCHER, R. T., ROGNONI, E., VEELDERS, M., BHARADWAJ, M., LAMBACHER, A., AUSTEN, K., MÜLLER, D. J. & ZENT, R. 2016. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife*, 5, e10130.
- THIND, A. & WILSON, C. 2016. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles*, 5, 31292.
- VASTAG, M. & KESERU, G. M. 2009. Current in vitro and in silico models of blood-brain barrier penetration: a practical view. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12, 115-24.
- WANG, H.-R., ZHANG, Y., OZDAMAR, B., OGUNJIMI, A. A., ALEXANDROVA, E., THOMSEN, G. H. & WRANA, J. L. 2003. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science*, 302, 1775-1779.
- WANG, L., ZHANG, S. & WANG, X. 2020. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. *Front Oncol*, 10, 602416.
- WANG, W., REN, F., WU, Q., JIANG, D., LI, H., PENG, Z., WANG, J. & SHI, H. 2014a. MicroRNA-497 inhibition of ovarian cancer cell migration and invasion through targeting of SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1. *Biochemical and biophysical research communications*, 449, 432-437.
- WANG, X., JIN, C., TANG, Y., TANG, L. Y. & ZHANG, Y. E. 2013. Ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 (TRAF4) by Smad ubiquitination regulatory factor 1 (Smurf1) regulates motility of breast epithelial and cancer cells. *J Biol Chem*, 288, 21784-92.
- WANG, Y., YE, F., LIANG, Y. & YANG, Q. 2021. Breast cancer brain metastasis: insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Br J Cancer*, 125, 1056-1067.
- WANG, Z., WANG, J., LI, X., XING, L., DING, Y., SHI, P., ZHANG, Y., GUO, S., SHU, X. & SHAN, B. 2014b. Bortezomib prevents oncogenesis and bone metastasis of prostate cancer by inhibiting WWP1, Smurf1 and Smurf2. *Int J Oncol*, 45, 1469-78.
- WEI, X., WANG, X., ZHAN, J., CHEN, Y., FANG, W., ZHANG, L. & ZHANG, H. 2017. Smurf1 inhibits integrin activation by controlling Kindlin-2 ubiquitination and degradation. *J Cell Biol*, 216, 1455-1471.
- WILKINSON, K. D. 1987. Protein ubiquitination: a regulatory post-translational modification. *Anticancer Drug Des*, 2, 211-29.
- WOLBURG, H. & LIPPOLDT, A. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology*, 38, 323-337.

- WU, Q., LI, G., WEN, C., ZENG, T., FAN, Y., LIU, C., FU, G. F., XIE, C., LIN, Q., XIE, L., HUANG, L., PU, P., OUYANG, Z., CHAN, H. L., ZHAO, T. J., CHEN, X. L., FU, G. & WANG, H. R. 2020. Monoubiquitination of p120-catenin is essential for TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *Sci Adv*, 6, eaay9819.
- XIA, Q., LI, Y., HAN, D. & DONG, L. 2020a. SMURF1, a promoter of tumor cell progression? *Cancer Gene Ther.*
- XIA, Q., ZHANG, H., ZHANG, P., LI, Y., XU, M., LI, X., LI, X. & DONG, L. 2020b. Oncogenic Smurf1 promotes PTEN wild-type glioblastoma growth by mediating PTEN ubiquitylation. *Oncogene*, 39, 5902-5915.
- XIE, P., ZHANG, M., HE, S., LU, K., CHEN, Y., XING, G., LU, Y., LIU, P., LI, Y., WANG, S., CHAI, N., WU, J., DENG, H., WANG, H.-R., CAO, Y., ZHAO, F., CUI, Y., WANG, J., HE, F. & ZHANG, L. 2014. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis. *Nature Communications*, 5, 3733.
- YAMASHITA, M., YING, S. X., ZHANG, G. M., LI, C., CHENG, S. Y., DENG, C. X. & ZHANG, Y. E. 2005. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell*, 121, 101-13.
- YAN, C., SU, H., SONG, X., CAO, H., KONG, L. & CUI, W. 2018. Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1 (Smurf1) Promotes Thyroid Cancer Cell Proliferation and Migration via Ubiquitin-Dependent Degradation of Kisspeptin-1. *Cell Physiol Biochem*, 49, 2047-2059.
- YANG, H., YU, N., XU, J., DING, X., DENG, W., WU, G., LI, X., HOU, Y., LIU, Z., ZHAO, Y., XUE, M., YU, S., WANG, B., LI, X., NIU, G., WANG, H., ZHU, J. & ZHUANG, T. 2018. SMURF1 facilitates estrogen receptor α signaling in breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 37, 24.
- YAU, T., SWANTON, C., CHUA, S., SUE, A., WALSH, G., ROSTOM, A., JOHNSTON, S. R., O'BRIEN, M. E. & SMITH, I. E. 2006. Incidence, pattern and timing of brain metastases among patients with advanced breast cancer treated with trastuzumab. *Acta Oncol*, 45, 196-201.
- YU, L., LIU, X., CUI, K., DI, Y., XIN, L., SUN, X., ZHANG, W., YANG, X., WEI, M., YAO, Z. & YANG, J. 2015. SND1 Acts Downstream of TGF β 1 and Upstream of Smurf1 to Promote Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res*, 75, 1275-86.
- ZHANG, C., LIN, M., WU, R., WANG, X., YANG, B., LEVINE, A. J., HU, W. & FENG, Z. 2011. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 16259-64.
- ZHANG, L., RIDGWAY, L. D., WETZEL, M. D., NGO, J., YIN, W., KUMAR, D., GOODMAN, J. C., GROVES, M. D. & MARCHETTI, D. 2013a. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med*, 5, 180ra48.
- ZHANG, L., ZHANG, S., YAO, J., LOWERY, F. J., ZHANG, Q., HUANG, W. C., LI, P., LI, M., WANG, X., ZHANG, C., WANG, H., ELLIS, K., CHEERATHODI, M., MCCARTY, J. H., PALMIERI, D., SAUNUS, J., LAKHANI, S., HUANG, S., SAHIN, A. A., ALDAPE, K. D., STEEG, P. S. & YU, D. 2015. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*, 527, 100-104.
- ZHANG, L., ZHOU, F., GARCÍA DE VINUESA, A., DE KRUIJF, ESTHER M., MESKER, WILMA E., HUI, L., DRABSCH, Y., LI, Y., BAUER, A., ROUSSEAU, A., SHEPPARD, K.-A., MICKANIN, C., KUPPEN, PETER J. K., LU, CHRIS X. & TEN DIJKE, P. 2013b. TRAF4 Promotes TGF- β Receptor Signaling and Drives Breast Cancer Metastasis. *Molecular Cell*, 51, 559-572.

- ZHANG, X., LINDER, S. & BAZZARO, M. 2020. Drug development targeting the ubiquitin–proteasome system (UPS) for the treatment of human cancers. *Cancers*, 12, 902.
- ZHAO, M., QIAO, M., OYAJOBI, B. O., MUNDY, G. R. & CHEN, D. 2003. E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, 278, 27939-44.
- ZHAO, Z., NELSON, A. R., BETSHOLTZ, C. & ZLOKOVIC, B. V. 2015. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*, 163, 1064-1078.
- ZHENG, J., SHI, Z., YANG, P., ZHAO, Y., TANG, W., YE, S., XUAN, Z., CHEN, C., SHAO, C., WU, Q. & SUN, H. 2022. ERK-Smurf1-RhoA signaling is critical for TGFβ-driven EMT and tumor metastasis. *Life Sci Alliance*, 5.
- ZHOU, J., CHENG, H., WANG, Z., CHEN, H., SUO, C., ZHANG, H., ZHANG, J., YANG, Y., GENG, L., GU, M. & TAN, R. 2019. Bortezomib attenuates renal interstitial fibrosis in kidney transplantation via regulating the EMT induced by TNF-α-Smurf1-Akt-mTOR-P70S6K pathway. *J Cell Mol Med*, 23, 5390-5402.
- ZHU, H., KAVSAK, P., ABDOLLAH, S., WRANA, J. L. & THOMSEN, G. H. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400, 687-693.
- ZLOKOVIC, B. V. 2008. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*, 57, 178-201.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein Dank meiner Doktormutter und Betreuerin Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer für die großartige Unterstützung und Betreuung vor, während und nach meiner Zeit im gynäkologischen Forschungslabor. Ich bin sehr dankbar für die Erfahrung und für jeden Ratschlag. Danke, dass du immer an meiner Seite standest und mir durch die Lab Meetings und Vortragsmöglichkeiten die Chance gegeben hast auch über mein eigenes Projekt hinaus zu Lernen und sowohl meine experimentellen Fähigkeiten als auch mein wissenschaftliches Denken auszubauen und zu stärken.

Ein großer Dank geht ebenso an die Direktoren der Klinik für Gynäkologie Prof. Dr. Barbara Schmalfeldt und den stellvertretenden Klinikdirektor Prof. Dr. Volkmar Müller für die Möglichkeit in ihrer Klinik meine Doktorarbeit absolvieren zu können und für den finanziellen Support.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitenden des gynäkologischen Forschungslabors bedanken. Danke an Dr. Karen Legler, Dr. Yi Ding, Maila Roßberg und Kathrin Möller für die schöne Arbeitsatmosphäre und die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, besonders in Zeiten von Abstandsregeln und Maskenpflicht. Ein ganz besonderer Dank geht hierbei an Dr. Fabienne Hamester. Danke für deine konstante Unterstützung und Betreuung. Danke für die Einarbeitung in viele Methoden, die gemeinsamen Wochenenden an der Bench und den emotionalen Support bei kontaminierten Zellen und missglückten Versuchen. Danke für viele Stunden Korrekturlesen und Mut machen. Ein großes Dankeschön möchte ich an Kathrin Eylmann richten. Danke, dass du mir den Einstieg ins Labor so leicht gemacht hast. Danke für deine Unterstützung bei zahlreichen Versuchen. Ob frustrierend oder erfolgreich warst du immer an meiner Seite. Danke für lange Gespräche, viel Lachen und dein immer offenes Ohr.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Schumacher und den Mitarbeitenden des Instituts für Anatomie und experimentelle Morphology für die Unterstützung bei immunhistochemischen Färbungen und der Herstellung der Paraffin-Präparate.

Danksagung

Ich möchte mich zudem bei der deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Mildred-Scheel-Doktorandenprogramms und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Austauschs bedanken.

Ein riesengroßes, schwer in Worte zu fassendes, Dankeschön gilt zudem Leon Cords. Neben vielen frustrierenden Stunden des Korrekturlesens möchte ich mich vor allem für die emotionale Unterstützung während der Doktorarbeit und darüber hinaus bedanken. Danke, dass ich immer auf dich zählen kann, du nur manchmal die Augen verdrehst und im schlimmsten Fall immer ein Glas ÄN/2 und eine Portion Kartoffelsalat zur Hand hast.

Abschließend geht mein Dank an meinen Partner, meine Familie und Freunde welche mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben und an meine Mutter, Celia Artzenroth, ohne die ich nicht die Person wäre, die ich heute bin.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: