

**Die Rolle des β_1 -Integrins und dessen Wechselwirkung mit den
Rezeptortyrosinkinasen EGFR und DDR1 bei der
kollagenvermittelten Chemoresistenz in den
Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Fabian Baltes

aus

Bad Neuenahr-Ahrweiler

Bonn, Dezember 2025

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Gerd Bendas

Gutachterin: PD Dr. Anke Schiedel

Tag der Promotion: 11.05.2026

Erscheinungsjahr: 2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
2. Theorie	5
2.1. Mammakarzinome.....	5
2.1.1. Klassifizierung und Histologie der Mammakarzinome.....	5
2.1.2. Therapie des Mammakarzinoms	7
2.1.3. Limitierungen und Herausforderungen der Therapie.....	9
2.2. Chemoresistenz.....	10
2.2.1. Resistenzgenese	10
2.2.2. Chemoresistenz-Mechanismen (MDR)	11
2.2.3. Environment-mediated drug resistance.....	13
2.3. Tumormikroumgebung.....	14
2.3.1. Extrazelluläre Strukturproteine	16
2.3.2. Matrix-Rigidität und Modellierung.....	17
2.4. Adhäsionsrezeptoren (CAMs)	18
2.4.1. Integrine – Funktion, Struktur und Aufbau	18
2.4.2. Integrin $\alpha_2\beta_1$	21
2.4.3. Integrin $\alpha_6\beta_4$	22
2.4.4. Integrinsignalkaskade	22
2.4.5. Discoidin Domain Rezeptoren (DDR)	25
2.5. Onkogene Signalkaskaden	29
2.5.1. MAPK	29
2.5.2. PI3K/AKT/mTOR	30
2.5.3. Wechselwirkung zwischen Integrinen und RTKs (DDR1 und EGFR).....	31
2.5.4. Regulationsmechanismen der Mikroumgebung auf onkogene Signalkaskaden.....	32
2.6. Reduktion der Wirkstoffkonzentration	35
2.6.1. ABC-Transporter	36
2.6.2. Einfluss der Mikroumgebung auf die Wirkstoffverfügbarkeit.....	38
2.7. Stammzellcharakter durch Epitheliale-Mesenchymale-Transition	39
2.7.1. Grundlagen der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT)	39

2.7.2.	Einfluss der Mikroumgebung auf die EMT	40
2.8.	Mögliche Angriffspunkte innerhalb der EM-DR	41
2.8.1.	Integrin β_1	42
2.8.2.	Onkogene Signalkaskaden über Rezeptortyrosinkinasen	44
2.8.3.	DDR1	46
3.	Zielsetzung der Arbeit	47
4.	Material	48
4.1.	Zelllinien	48
4.1.1.	Mammakarzinomzelllinien	48
4.1.2.	Effluxtransporter überexprimierende Modelzelllinien	49
4.2.	Antikörper	50
4.2.1.	Primäre Antikörper	50
4.2.2.	Sekundäre Antikörper	51
4.3.	Inhibitoren	51
4.4.	Stimulantien.....	52
4.5.	Kits	52
4.6.	Hergestellte Reagenzien	53
4.6.1.	Zellkultur.....	53
4.6.2.	Stamm- und Arbeitslösungen	54
4.6.3.	Western Blot.....	55
4.6.4.	Antikörperverdünnungen Western Blot.....	56
4.7.	Verbrauchsmaterialien	57
4.8.	Software	60
5.	Methoden	61
5.1.	Zellkultur.....	61
5.1.1.	Passagierung	61
5.1.2.	Coating.....	62
5.1.3.	Kryokonservierung	62
5.1.4.	Zellzählung.....	62
5.1.5.	Lentiviraler shRNA basierter <i>knockdown</i> der Integrin β_1 -Untereinheit	63
5.2.	Zytotoxizitätsmessung	65
5.2.1.	Messgrundlage des MTT assay	65
5.2.2.	Durchführung des eindimensionalen MTT assay	66
5.2.3.	Durchführung des zwei-/dreidimensionalen MTT assays.....	67

5.2.4.	Auswertung	68
5.2.5.	Charakterisierung des Kombinationseffekts	69
5.2.6.	ATP-Bestimmung	73
5.3.	Proteinanalytik	73
5.3.1.	Zellyse	73
5.3.2.	Proteinquantifikation via BCA	74
5.3.3.	SDS-PAGE	75
5.3.4.	Western Blot	76
5.3.5.	Membran-Stripping	77
5.3.6.	Proteome Profiler array	77
5.4.	Durchflusszytometrie	78
5.4.1.	Durchflusszytometrie extrazellulärer Strukturen	79
5.4.2.	Charakterisierung der Apoptose durch Annexin V/PI	80
5.5.	Bestimmung der intrazellulären Zytostatika-Akkumulation	81
5.5.1.	Doxorubicin- und Mitoxantron-Bestimmung über Durchflusszytometrie	81
5.5.2.	Doxorubicin und Mitoxantron Bestimmung über Fluoreszenzreader	81
5.5.3.	(Cis-)Platin Bestimmung durch Atomabsorptionsspektrometrie	82
5.6.	Untersuchungen der ABC-Transporter	83
5.6.1.	Calcein AM	84
5.6.2.	Pheophorbid A	86
5.7.	Messung funktioneller Zelleigenschaften	87
5.7.1.	Adhäsionsassay	87
5.7.2.	Mikroskopie	87
5.8.	EGF-ELISA	88
5.9.	mRNA-Analytik	89
5.10.	Statistik	89
6.	Ergebnisse und Diskussion	90
6.1.	Die Chemosensitivität von Mammakarzinomen durch EZM	90
6.1.1.	Simulierung der EZM in vitro	90
6.1.2.	EZM-Proteine wie COL1 und FN erhöhen die Chemoresistenz	91
6.1.3.	Metabolische Aktivität	97
6.2.	Die intrazelluläre Konzentration der Zytostatika	98
6.2.1.	Cisplatin	98
6.2.2.	Doxorubicin und Mitoxantron	99

6.3.	ABC-Transporter-Aktivität durch die EZM	102
6.3.1.	Aktivität der ABC-Transporter.....	102
6.3.2.	Proteinexpression.....	104
6.3.3.	mRNA-Analytik	105
6.4.	Einfluss der Integrine auf die matrixvermittelte Chemoresistenz	106
6.4.1.	Analyse der Integrinstrukturen.....	106
6.4.2.	Einfluss der Integrine auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen	107
6.4.3.	Einfluss der Integrinaktivierung auf die Chemoresistenz.....	108
6.4.4.	Regulation der Integrine	109
6.4.5.	Sterische Blockade von ITGB1 durch den Antikörper P5D2.....	111
6.4.6.	Modulation der Heparansulfatproteoglykane	115
6.5.	Etablierung und Charakterisierung von ITGB1-kd Mutanten	116
6.5.1.	ITGB1- <i>knockdown</i> durch lentivirale shRNA-Insertion.....	116
6.5.2.	Funktionelle Untersuchungen der ITGB1-kd-Zelllinien.....	118
6.5.3.	Zusammenfassung der Charakterisierung der ITGB1-kd-Zelllinien	123
6.6.	Signalkaskaden und Proteom unter COL1- und ITGB1-Modulation.....	124
6.6.1.	Screening des Phosphoproteoms	124
6.6.2.	Betrachtung der MAPK-Signalkaskade.....	129
6.6.3.	Status der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT)	136
6.6.4.	Das Adhäsom bei ITGB1- <i>knockdown</i>	139
6.6.5.	Rolle des Discoidin Domain Receptors 1 (DDR1)	143
6.6.6.	Rolle des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR)	149
6.7.	Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung	152
6.7.1.	Screening von Kinaseinhibitoren für einen Kombinationsansatz.....	152
6.7.2.	MAPK-Inhibition zur Chemosensitivierung.....	157
6.7.3.	MAPK-Abhängigkeit der ABC-Transporter	164
6.7.4.	CREB-Inhibition zur Chemosensitivierung.....	167
6.7.5.	EGFR-Inhibition zur Chemosensitivierung	168
6.7.6.	DDR1-Inhibition zur Chemosensitivierung.....	173
6.7.7.	Tripel-Kombination.....	179
7.	Zusammenfassung.....	181
8.	Ausblick.....	186
9.	Anhang.....	187
9.1.	Referenzen	187

9.2.	Abbildungsverzeichnis	214
9.3.	Tabellenverzeichnis.....	220
9.4.	Wissenschaftliche Beiträge.....	221
9.5.	Konferenzbeiträge	222

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, welche Bestandteil von Produktbezeichnungen, Rechtsformen und Gesellschaften sind, sowie allgemein bekannte Abkürzungen werden hierbei nicht berücksichtigt. Weiterhin gelten chemische Abkürzungen, griechische Zahlen und römische Ziffern sowie im internationalen Einheitensystem festgelegte Dezimalpräfixe als Voraussetzung. Englische und lateinische Begriffe werden kursiv dargestellt.

A

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADMIDAS	benachbarte Metallionen-abhängige Bindungsstelle
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ASR	Altersstandardisierte Rate

B

BCA	<i>Bicinchinonic acid</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein (auch: ABCG2)</i>
RAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
BRCA1/2	Brustkrebsgen 1/2
BSA	Bovines Serumalbumin

C

CSC	<i>Cancer stem cell, Krebsstammzelle</i>
CAM	Cell adhesion molecule
CAM-DR	<i>cellular adhesion mediated drug resistance</i>

CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CDDP	Diammindichloridoplatin(II) /Cisplatin
COL1	Kollagen Typ 1
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CTR	Kontrolle
CTR1	Kupfertransporter 1
D	
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DDR1/2	Discoidin Domain-Rezeptor 1/2
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxorubicin
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
E	
EZM	Extrazellulärmatix
EC ₅₀	mittlere effektive Wirkstoffkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMDR	<i>environment-mediated drug resistance</i>
EMT	<i>epithelial to mesenchymal transition</i>
ER	Östrogenrezeptor
ERK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
F	
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>

Abkürzungsverzeichnis

FKS	Fötale Kälberserum Albumin
FL	Filter
FSC	Vorwärtsstreulicht

G

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSH	Glutathion

H

HDI	<i>Human Development Index</i>
HER-2	Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HRE	<i>Hypoxia-response element</i>

I

ITGA2	Integrin $\alpha 2$
ITGB1	Integrin $\beta 1$
I.E.	Internationale Einheit
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IgG	Immunglobulin G
IL6	Interleukin 6
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

J

JAK	Januskinase
JNK	<i>stress-activated protein kinase</i>

K

kd	<i>knockdown</i>
----	------------------

M

MRP1	Multidrug Resistance protein 1 (auch: ABCC1)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDR1	p-Glykoprotein (<i>multi drug resistance</i>)
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MET	<i>mesenchymal to endothelial transition</i>
MIDAS	Metallionen-abhängige Bindungsstelle
MIR	<i>Mortality to Incidence Ratio</i>
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MOI	Multiplizität der Infektion
MRD	<i>minimal residual disease</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MX	Mitoxantron

N

NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NSCLC	<i>Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non-small cell lung carcinoma)</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

P

P-Gp	<i>P-Glykoprotein (auch: ABCB1)</i>
p130CAS	<i>Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1</i>
p38	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
p53	Tumorsuppressor p53
PBS	<i>Phosphate Bufferd Saline</i>
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PKD1	3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1
PgR	Progesteronrezeptor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen

Abkürzungsverzeichnis

PINCH	<i>particular interesting new cysteine-histidine rich protein</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R

RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RF	<i>Resistance factor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROCK	<i>Rho-associated kinase</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase

S

sc	<i>scrambled control</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator
SEM	Standardfehler
SFK	Src-Familie
SFM-DR	<i>solubale factor mediated drug resistance</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNAIL	<i>Zinc finger protein SNAI1</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
Src	Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
SSC	<i>Seitwärtsstreulicht</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>

X

T

TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with tween20</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

U

UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UV	Ultraviolett

W

WHO	<i>World Health Organisation</i>
Wnt	<i>wingless-related integration site</i>
wt	<i>wildtype</i>

Y

YAP	<i>Yes-associated protein</i>
-----	-------------------------------

1. Einleitung

Krebs bezeichnet eine maligne, d.h. invasive und metastasierende Neoplasie. Sie ist global betrachtet die zweithäufigste krankheitsassoziierte Todesursache nach den kardiovaskulären Erkrankungen. In Industrienationen treten Todesfälle durch Krebserkrankungen mittlerweile sogar als häufigster Grund auf [1]. Brustkrebs ist dabei mit einer globalen, altersadjustierten Inzidenz von 47,8 (2020) die häufigste Krebsart bei Frauen und macht damit 24,5% aller Krebsinzidenzen bei Frauen sowie 15,5% der krebsbezogenen Todesfälle von Frauen aus. Bei Männern tritt das Mammakarzinom mit einer hundertfach geringeren Wahrscheinlichkeit auf. Trotz des geringen Auftretens bei Männern ist Brustkrebs sogar auf beide Geschlechter bezogen mit insgesamt 11,7% die weltweit häufigste Krebsart (vgl. **Abb. 1.1** [2, 3]).

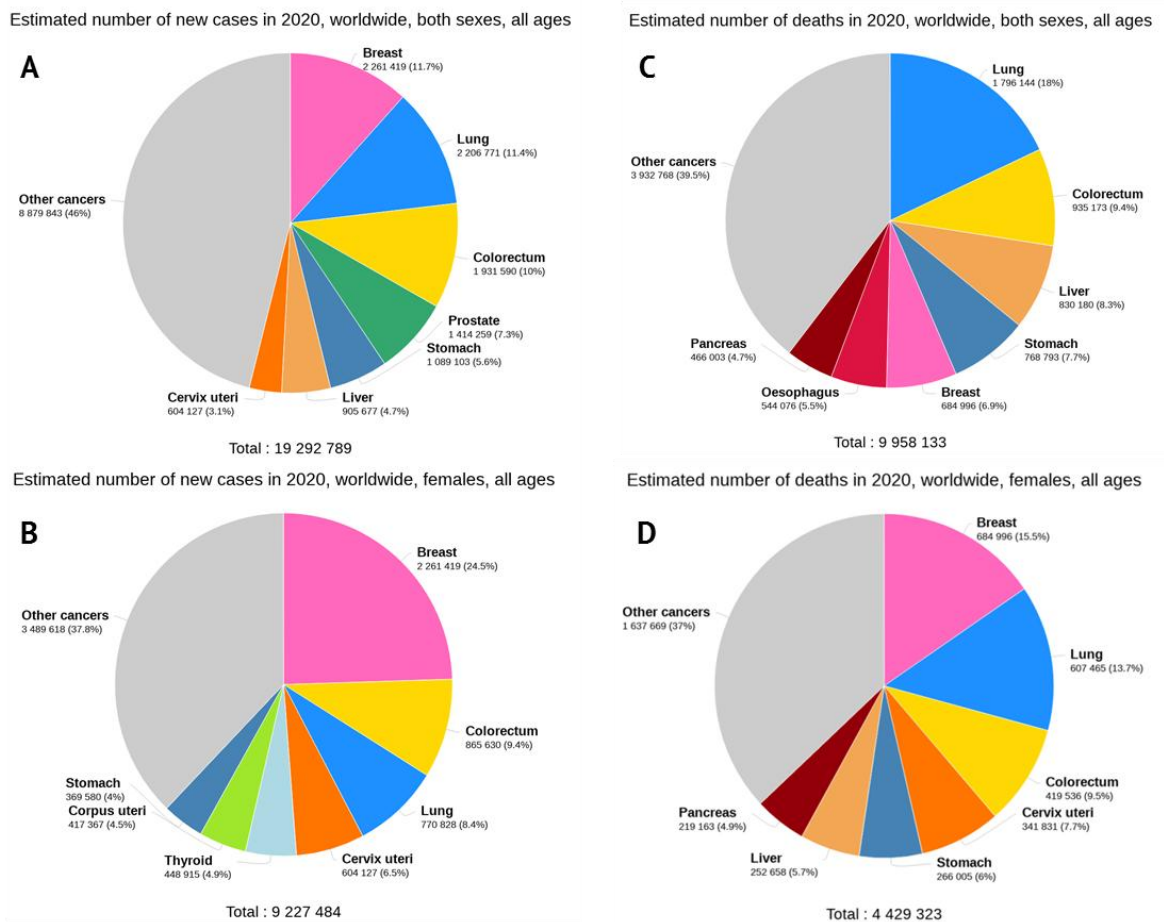


Abb. 1.1 Darstellung der Inzidenz (**A, B**) und der Mortalität (**C, D**) der häufigsten Krebsarten in Bezug auf beide Geschlechter (**A, C**) und auf Frauen (**B, D**) im Jahr 2020 auf Basis der Daten von GLOBOCAN 2020 [2].

Die vier häufigsten Krebsarten sind in absteigender Inzidenz Brust-, Lungen-, Kolorektal- und Prostatakrebs. Kolorektalkarzinome umfassen dabei als Sammelbegriff alle malignen Erkrankungen des Kolons, Rektums und Anus. Auffällig dabei ist, dass zwei der vier Krebsarten geschlechtsspezifisch bzw. durch Sexualhormone stimuliert werden können.

Die globale Inzidenz variiert zwischen den verschiedenen Ländern. Deutschland liegt mit 82,2 deutlich oberhalb des globalen Durchschnitts [2]. Generell ist die Inzidenz global betrachtet abhängig vom *Human Development Index* (**Abb. 1.2A**). Je höher der Index und somit entwickelter ein Land ist, desto höher ist die Inzidenz innerhalb der Bevölkerung. Das mag sicherlich an soziokulturellen Gründen und einer erhöhten Lebenserwartung, aber auch an den besser ausgebauten medizinischen Vorsorgeuntersuchungen liegen. Bei recht konstanter Sterblichkeit sinkt somit die MIR (*Mortality to Incidence Ratio*) mit steigendem *human development index* (**Abb. 1.2B**). Eine ähnliche Entwicklung spiegelt sich in Bezug auf die Historie der weltweiten Krebs-Inzidenz/Mortalität wider. In den Jahren 1955-2015 nahm die Inzidenz deutlich zu, während die Mortalität stetig reduziert werden konnte. [2]

Als Prognose für das Jahr 2040 wird eine Entwicklung der Inzidenz von Brustkrebs um 40,8% von 2,26 Millionen auf 3,19 Millionen, sowie eine Steigerung der Todesfälle um 51,9% von 0,685 Millionen auf 1,040 Millionen [2] angenommen. Damit sind an die Diagnostik und Therapie des Brustkrebses nicht nur qualitative Herausforderungen der Wirksamkeit gerichtet, sondern auch quantitative, ökonomische und gesundheitspolitische Aufgaben.

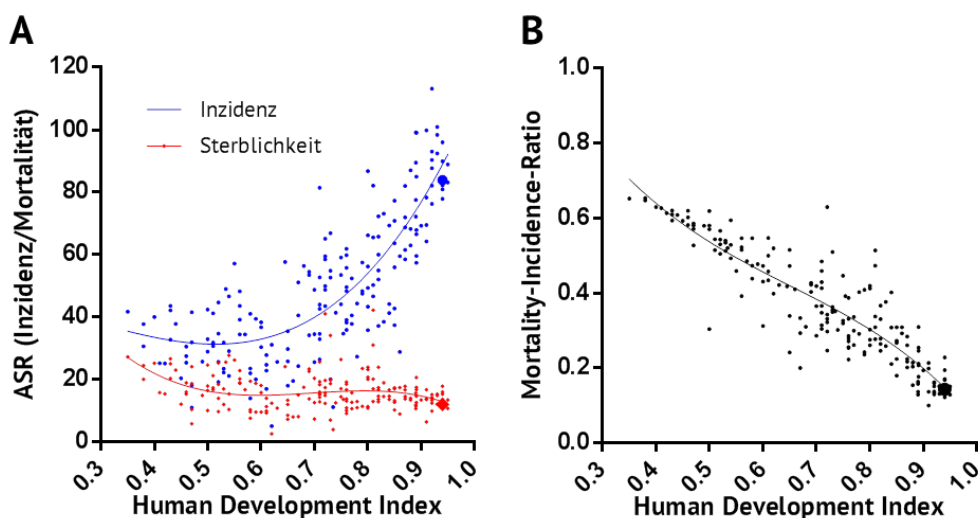


Abb. 1.2 Die globale Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen im Jahr 2020 auf Basis von GLOBOCAN 2020 Daten, bezogen auf den *Human Development Index* (A) sowie die resultierende MIR (B) [2].

Therapeutisch wird beim Mammakarzinom auf die drei klassischen Säulen der allgemeinen Krebstherapie zurückgegriffen:

- Chirurgie
- Radiotherapie
- Chemotherapie

In den letzten Jahren wurde die Therapie um die Immuntherapie als vierte Säule erweitert. Dabei binden hochspezifische Antikörper an Immunrezeptoren, sodass Krebszellen vom eigenen Immunsystem als körperfremd identifiziert und bekämpft werden. Diese Therapie weist bei Ansprechen einerseits die beste Verträglichkeit und andererseits kaum Resistenzbildungen auf. Selten kann es zu zum Teil schweren Nebenwirkungen kommen aufgrund der Interferenz mit dem Immunsystem. Die Therapie kann allerdings nur bei der Expression von bestimmten Immunmarkern wie PD-L1 auf den Krebszellen erfolgen.

Die Entwicklung der *small molecules* hat in den letzten Jahren einige innovative Therapiestrategien hervorgebracht. Während die klassischen Zytostatika unspezifisch und dabei insbesondere die im Vergleich zu physiologischen Zellen stärker proliferierenden Krebszellen sowie als Nebenwirkung Zellen der Haarfollikel oder Schleimhäute angreifen, entwickelten sich in den letzten zwei Jahrzehnten spezifische Wirkstoffe, die besondere Zielstrukturen von Krebszellen z.B. Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) im Sinne eines *drug targeting* angreifen (**Abb. 1.3**). Vor der Gabe solcher spezifischen Wirkstoffe findet meist eine molekulardiagnostische Biopsie des malignen Gewebes statt.

Für eine solche Pharmakotherapie von Mammakarzinomen werden die Biopsien entsprechend ihrer deregulierten Proliferationseigenschaften und vorhandenen Rezeptoren eingeteilt. Dabei kann eine Pharmakotherapie einerseits durch Blockade dieser Proliferationswege insbesondere über die Blockade des Wachstumsrezeptors HER-2 durch die Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab oder die RTK-Inhibitoren Lapatinib oder Tucatinib erreicht werden. Andererseits werden Östrogenrezeptoren als Proliferationstreiber mittels des selektiven Estrogen-Rezeptor Modulators (SERM) Tamoxifen inhibiert. Tamoxifen wird in der Historie der Brustkrebsbehandlung eine besondere Rolle zugeschrieben, da es in den 1970er Jahren als erste nicht-toxische, zielgerichtete Substanz von der FDA zugelassen wurde [4].

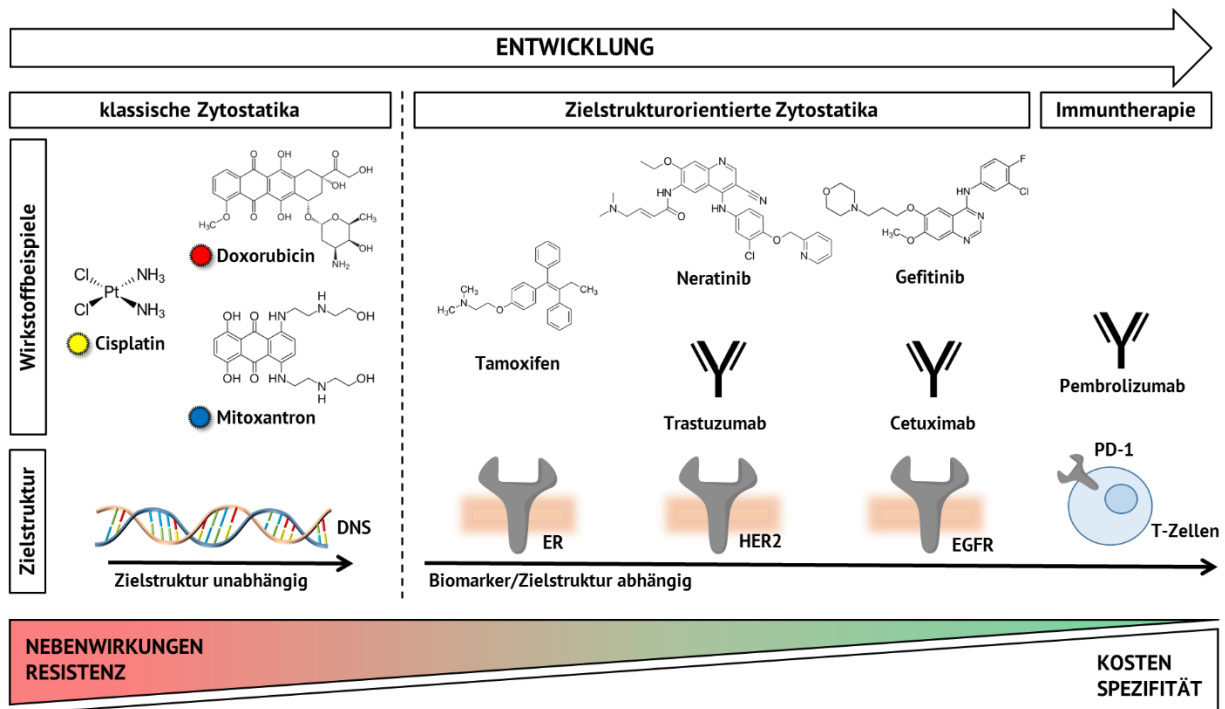


Abb. 1.3 Die Entwicklung der Krebsmedikamente, schematisiert für die Therapie des Mammakarzinoms. Zunächst bestand die Krebstherapie aus klassischen Zytostatika, die mit der DNS unspezifisch reagieren und dadurch ein hohes Nebenwirkungs- und Resistenzpotential liefern. Mit dem molekularen Verständnis der Krebszellen wurden spezifische Zielstrukturen entdeckt, die sich therapeutisch unter einer deutlich geringeren Resistenzgefahr antagonisieren ließen und zu deutlich weniger UAWs führten. Diese neuen Wirkstoffe sind durch die komplexeren (Bio-)Synthesen durch höheren Forschungsaufwand und damit erhöhte Kosten gekennzeichnet.

Trotz dieser weitläufigen Behandlungsmöglichkeiten kommt es häufig zu einem Nicht-Ansprechen auf diese Therapien, oder es treten oftmals bei primär ausgeheilten Patientinnen Rezidive auf, sodass es nach einem anfänglichen Therapieerfolg zu einem Rückfall kommen kann. Diese Rezidive können oft auf eine gebildete Resistenz einzelner Tumorzellen gegen die Zytostatika zurückgeführt werden. Die Resistenzmechanismen sind vielseitig und können daher gegen verschiedenste Wirkstoffe und deren Derivate gerichtet sein, sowie Kreuzresistenzen bilden [5].

Der Grund für die Resistenzentwicklung liegt meist in *survival-pathways* der Zellen, die unter dem Selektionsdruck der Zytostatika aktiviert werden. Die Resistenz kann aber auch auf einer Interaktion der Tumorzelle mit ihrer Umgebung, dem *microenvironment* basieren oder dadurch katalysiert werden. Die Bedeutung dieser *environment-mediated drug resistance* (EM-DR) für die Therapie des Mammakarzinoms soll in dieser Arbeit untersucht werden.

2. Theorie

2.1. Mammakarzinome

2.1.1. Klassifizierung und Histologie der Mammakarzinome

Bei Auftreten von Mammakarzinomen liegt in ca. 30% aller Fälle eine familiäre Vorbelastung vor [6]. Von den betroffenen Frauen besitzen 25% eine Keimbahnmutation in den Genen BRCA1 und BRCA2. BRCA-positive Frauen erkranken im Schnitt 20 Jahre früher und haben ein lebenslanges Risiko von 60%, an einem Mammakarzinom und 16-55% an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [7]. Weitere Risikogene sind CHEK2 (moderat) und PALB2 (wie BRCA).

Sollte bei der Brustkrebsvorsorge durch das Mammographie-Screening Programm (MSP) oder Selbstabtastung ein Verdacht entstehen, kann dieser histologisch abgesichert werden. Dabei ist die Früherkennungsmethodik wichtig und Gegenstand vieler Studien zur Optimierung der Diagnostik. Dabei stellt Kollagen im Brustgewebe d.h. eine hohe mammographische Dichte einen Risikofaktor von ca. 1,3 dar [8–13]. Bei nachgewiesener Malignität wird über die Bestimmung von Estrogen-, Progesteron- und *human epidermal growth factor receptor 2* (ER, PR und HER2) durch Stanzbiopsie der Subtyp festgelegt [14]. Je nach deren Expression, wird das Mammakarzinom in eine der folgenden intrinsischen Subgruppen der St. Gallen-Konsensus-Empfehlung unterteilt (**Tab. 2.1**). Zur weiteren Unterteilung kann der Proliferationsmarker Ki-67 erhoben werden. Diese Messung ist jedoch schlecht reproduzierbar und sollte in Zukunft standardisierter werden [15].

Tab. 2.1 Klassifizierung der Mammakarzinome nach St. Gallen-Konsensus-Empfehlung [16].

Subtyp	ER	PR	HER2	Ki-67
Luminal A	+	+/-	-	gering
Luminal B	+	+/-	-	hoch
HER2	-	-	+	
Triple-negativ (TNBC)	-	-	-	

Diese Stratifizierung liefert die Grundlage für therapeutische Entscheidungen. Die immunhistochemische Bewertung als ER-bzw. PR-positiv erfordert mindestens 1% positive Tumorzellkerne [17]. Dabei wird weiterhin noch ein intermediärer Bereich der geringen Expression definiert (1-9%), erst ab 10% besteht eine eindeutige Positivität. Der PR-Status ist selbst nicht entscheidend für Klassifizierung und Therapie. Wird der ER jedoch stark exprimiert und ist der Zellproliferationsmarker Ki-67 niedrig, bekräftigt die starke PR-Expression, dass ein luminaler Tumor des Typs A vorliegt [14]. Dies ist wichtig, da die Bestimmung von Ki-67 nicht standardisiert ist und Differenzierung zwischen Typ A und B nur auf Basis dieses umstrittenen Parameters erfolgen würde. Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung zwischen luminalen Phänotyp A und B stellen Multigentests dar, die die histologischen und therapeutischen Entscheidungen validieren können [14].

Es gibt mittlerweile Hinweise darauf, dass Tumore mit niedriger ER-Positivität (1-9% positive Zellen) gesondert zu betrachten sind. Verschiedene Studien haben demonstriert, dass sich ER-/PR-negative oder triple-negative Mammakarzinomen (ER-, PR- und HER2-negativ) tumorbiologisch und prognostisch näher stehen als den ER-positiven (>10% positive Tumorzellen) [16, 18, 19]. Dabei stellt der triple-negative Brustkrebs (TNBC) mit einer Prävalenz von 10-15% die Form mit der schlechtesten Prognose dar. TNBC sind meist invasiv und weisen medulläre Eigenschaften auf. Interessanterweise haben von allen TNBC-Patientinnen 8,5% eine BRCA1 und 2,7% eine BRCA2-Mutation. Umgekehrt haben die Mehrheit der BRCA-Patientinnen einen TNBC-artigen Tumor (75-80%) [20, 21].

TNBC stellt mangels weiterer zellulärer Charakteristika ein histologisch sehr heterogenes Bild dar, für das aber in den Leitlinien noch keine therapeutische Spezifizierungen abgebildet ist, der einen Ansatz für individualisierte TNBC liefern könnte [22–25]. Folgende Unterteilung bietet sich für TNBC an [26]:

- zwei basale Subtypen
- ein immunmodulatorischer Subtyp
- ein mesenchymaler Subtyp
- ein mesenchymale-Stammzellen-ähnlicher Subtyp
- ein luminaler-Androgenrezeptor-ähnlicher Subtyp

2.1.2. Therapie des Mammakarzinoms

Die Behandlung des Mammakarzinoms ist dominiert von der chirurgischen Entfernung des erkrankten Brustgewebes bis hin zur Mastektomie mit anschließender adjuvanter Strahlen- und Pharmakotherapie mittels Chemo-, Endokrin- und Antikörpertherapeutika je nach Tumorsubtyp (**Abb. 2.1**). Dabei sollten Chemotherapeutika und Strahlung sequentiell appliziert werden, um die körperliche Belastung möglichst gering zu halten [27].

Die Chemotherapie und Antikörpergabe kann alternativ schon vor der Operation neoadjuvant erfolgen. Für das Gesamtüberleben besteht kein Unterschied [28]. Allerdings kann die neoadjuvante, präoperative Verkleinerung des Tumors Teil einer brusterhaltenden Strategie sein. Dabei sollte eine Standard-Chemotherapie aus einem Taxan und einem Anthrazyklin bestehen und 18-24 Wochen andauern [29], wobei eine Alternative in Docetaxel mit Cyclophosphamid bestehen kann [30].

Beim langsam proliferierenden ER-positiven Brustkrebs (luminal A), kann eine reine endokrine Therapie postoperativ erfolgen. Bei Früherkennung kann endokrin sogar eine Operation verhindert werden. Prämenopausal wird dabei der SERM Tamoxifen und postmenopausal der Aromatasehemmer Anastrozol verabreicht [14, 31]. Wenn noch keine endokrine Therapie erfolgt ist oder es zum Fortschreiten kommt, kann postmenopausal der kompetitive ER-Antagonist Fulvestrant und bei Abwesenheit von HER2 zusätzlich der CDK-4/6-Inhibitor Palbociclib in Kombination verwendet werden [14]. Bei prämenopausaler Anwendung sollte ein LHRH-Agonist eingenommen werden. Sollte der ER-positive Tumor schnell proliferieren, oder zusätzlich HER2 ausbilden (luminal B), wird vor der endokrinen Therapie eine Chemotherapie adjuvant oder neoadjuvant durchgeführt [14].

Eine HER2-Positivität ohne ER bedingt den HER2-Typ, der mit Antikörpern wie Trastuzumab und Chemotherapie behandelt werden kann [32]. Dabei sollte ein Anthrazyklin appliziert werden und anschließend ein Taxan mit Trastuzumab folgen. Die Trastuzumabgabe wird bis zu einem Jahr weitergeführt, limitierend ist die Kardiotoxizität als UAW. Bei hohem Risiko sollte die Therapie um Pertuzumab ergänzt werden. Beide Antikörper können die Signalweiterleitung synergistisch unterdrücken. Trastuzumab blockiert die *Extracellular Domain IV* Bindungsstelle von HER2 und wirkt damit über die Blockade der Signalkaskaden, das Verhindern von Ligand-unabhängiger Dimerisierung und *antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)* [33]. Pertuzumab bindet dagegen an die *Extracellular (Dimerization)*

Domain II und unterdrückt damit die Ligand-vermittelte Heterodimerisierung v.a. von HER2-HER3 [34].

Die Therapie des TNBC stellt eine Herausforderung dar. Obwohl TNBC oft sehr schnell proliferiert und auf Zytostatika gut anspricht, ist die Überlebensrate am schlechtesten. In der aktuellen Leitlinie erfolgt keine Unterscheidung der TNBC Subtypen [14], daher bietet die o.g. Unterscheidung Potential für Therapiestrategien [35]. Im Zentrum steht die Chemotherapie, da Zielstrukturen meist fehlen. Diese wird meist um ein Platinanalogon ergänzt, das vor allem bei BRCA-Mutation die Komplettremissionsrate erhöht [36]. Weiterhin können die Patienten von dem Angiogenese-Hemmer Bevacizumab profitieren. Im Jahre 2019 wurde die Indikation des PARP-Inhibitors Olaparib auf Basis der OlympiAD Studie vom Ovarialkarzinom auf HER2-negative, BRCA-mutierte TNBC erweitert [37]. Weitere Therapieansätze beinhalten die Verwendung der Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab bei Anwesenheit von PD-L1 [38] und anti-androgene Therapie durch Enzalutamid bei Expression des Androgenrezeptors [39, 40].

Ein weiterer Aspekt ist das häufige Auftreten des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) bei TNBC [41–43]. Obwohl eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von EGFR und schlechterem Therapieverlauf bei TNBC bekannt ist [44, 45], konnten bislang keine klinischen Studien den Effekt einer EGFR-Antagonisierung belegen [46].

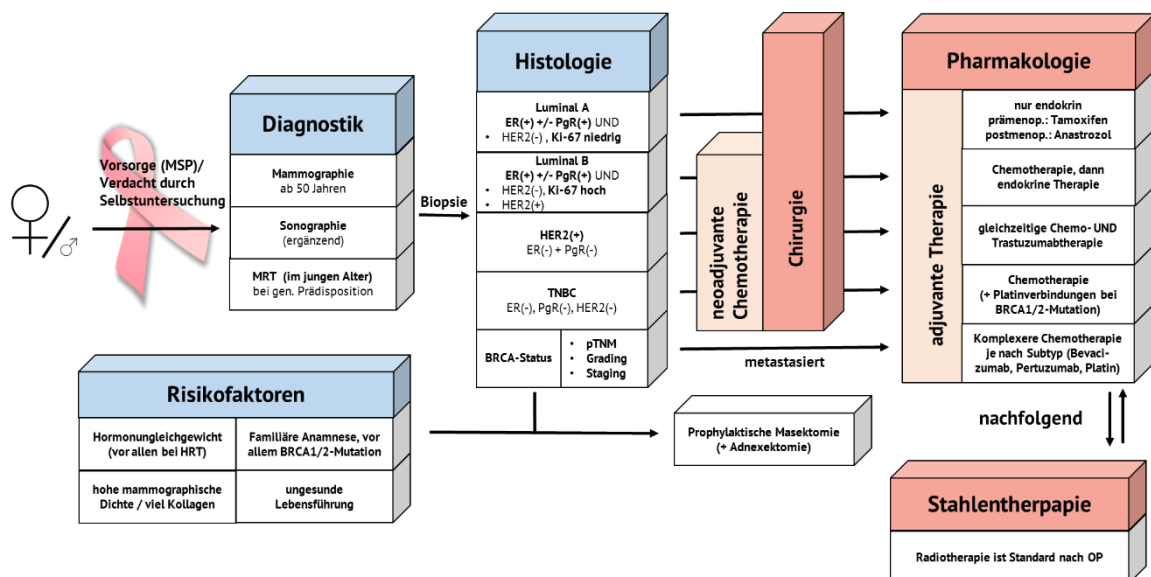


Abb. 2.1 Vereinfachtes Behandlungsschema für Brustkrebs basierend auf der aktuellen S3-Leitlinie (Jahr 2021) zur Behandlung des Mammakarzinoms [14] (selbst erstellt).

2.1.3. Limitierungen und Herausforderungen der Therapie

Während therapielimitierende UAWs, Metastasierung und Nichtansprechen einer Therapie durch eine stetige Verbesserung von Diagnostik reduziert werden können, besteht die Limitierung einer Chemotherapie weiterhin in der Entwicklung von Resistenzen. Die durch Resistenzen verursachte Sterblichkeit kann durch einen schematischen Kaplan-Meier-Plot dargestellt werden (**Abb. 2.2**). Neuere, zielgerichtete Therapien führen oft durch reduzierte Resistenzen und besserer Verträglichkeit zu einem verbesserten Gesamtüberleben. Trotzdem besteht bei jedem neuen Wirkstoff die Gefahr der Resistenzbildung, wobei die Immuntherapie einen Sonderfall darstellt, die ein Plateau der Sterblichkeit erreicht und damit ein langes Überleben ohne Resistenzbildung sichert [47].

Eine Strategie zur Reduktion von Resistenzen stellt die Kombinationstherapie dar [48]. Aufgrund des wachsenden Wissens über molekularbiologische Zusammenhänge können bekannte Arzneistoffe in geringeren Dosierungen kombiniert werden, um synergistisch einen Vorteil gegenüber bestehenden Therapien in Bezug auf Verträglichkeit, Wirksamkeit und Resistenzentwicklung zu erreichen. Selbst die bereits sehr wirksame Immuntherapie (z.B. Pembrolizumab) kann von einer Kombination mit Zytostatika wie Permetrexed bei NSCLC (KEYNOTE-021 Studie [49]), unabhängig des Tumors (KEYNOTE-407 [50], KEYNOTE-042 [51]) oder zielgerichtet mit Axitinib (KEYNOTE-426 [52]) bei Nierenkarzinom profitieren.

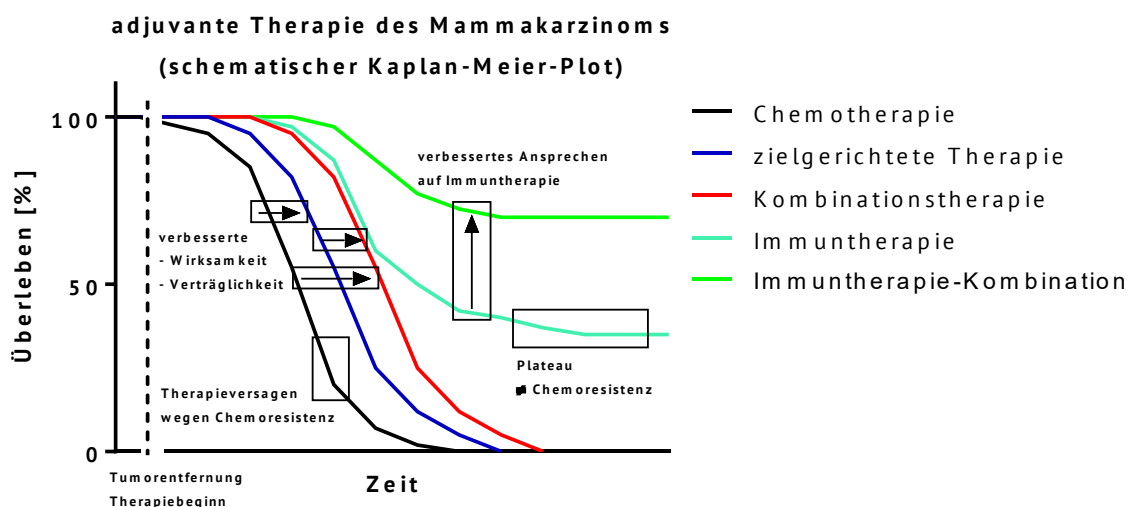


Abb. 2.2 Schematischer Kaplan-Meier-Plot zur Verdeutlichung der Vorteile von zielgerichteter und Immuntherapie, sowie deren Kombinationen (modifiziert nach [47]).

2.2. Chemoresistenz

2.2.1. Resistenzgenese

Resistenzen gegen antitumorale Behandlungen sind neben der Metastasierung die größten Herausforderung in der Krebstherapie [53]. Resistenzen können intrinsisch vorliegen, *de novo* entstehen oder bereits als erworbene Resistenz manifestiert sein ([54], **Abb. 2.3**). Dabei unterscheiden sich *de novo* und erworbene Resistenz durch die zeitliche Dimension. Die erworbene Resistenz wird durch mehrere genetische Mutationen zu einem komplexen Phänotyp erreicht, wohingegen die *de novo* Resistenz eine temporäre Form des Zellüberlebens darstellt. Der Übergang ist fließend, sodass sich epigenetische Veränderungen abhängig von Zeit und zytotoxischem Stress im Genom perpetuieren können.

Abhängig von der Art dieser äußeren Faktoren kann die *de novo* Resistenz in eine *soluble factor-mediated drug resistance* (SFM-DR), basierend auf der parakrinen Wirkung von Signalmolekülen wie bspw. Wachstumsfaktoren, und eine *cell adhesion-mediated drug resistance* (CAM-DR), basierend auf der Bindung von Zelladhäsionsmolekülen zu Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (EZM) wie Kollagen oder Fibronectin, unterteilt werden [54]. Dabei sind die Rigidität und Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix relevant. Die Abgrenzung zwischen diesen beiden Resistenzformen ist rein theoretisch, da Signalmoleküle und EZM über die Tumorzellen oder assoziierte Fibroblasten wechselwirken können. Das Zusammenspiel dieser Faktoren zur Genese einer Resistenz wird als *cell adhesion resistome* bezeichnet [55] und eine Strategie zur Prävention dieses Phänomens als „Anti-Adhäsion“ [56].

Die durch diese *de novo* Vorgänge überlebenden Zellen, die als *minimal residual disease* oder als stammzellähnliche Krebszellen (*cancer stem cells*, CSC) bezeichnet werden, können unter Selektionsdruck mutieren. Der Übergang einer temporären in eine klinisch problematische Resistenz begründet die therapeutischen Ansätze zur Unterdrückung dieser *de novo* Resistenz. Dies könnte im Falle der CAM-DR durch die Blockade von extrazellulären Ligand-Rezeptor-Interaktionen erfolgen. Innerhalb von *in vivo*- und teilweise sogar *in vitro* Modellen sind CAM-DR und SFM-DR nicht zu unterscheiden und werden zur *environment-mediated drug resistance* (EMDR) zusammengefasst. EM-DR wurde für Pharmako- und Radiotherapie beobachtet [54].

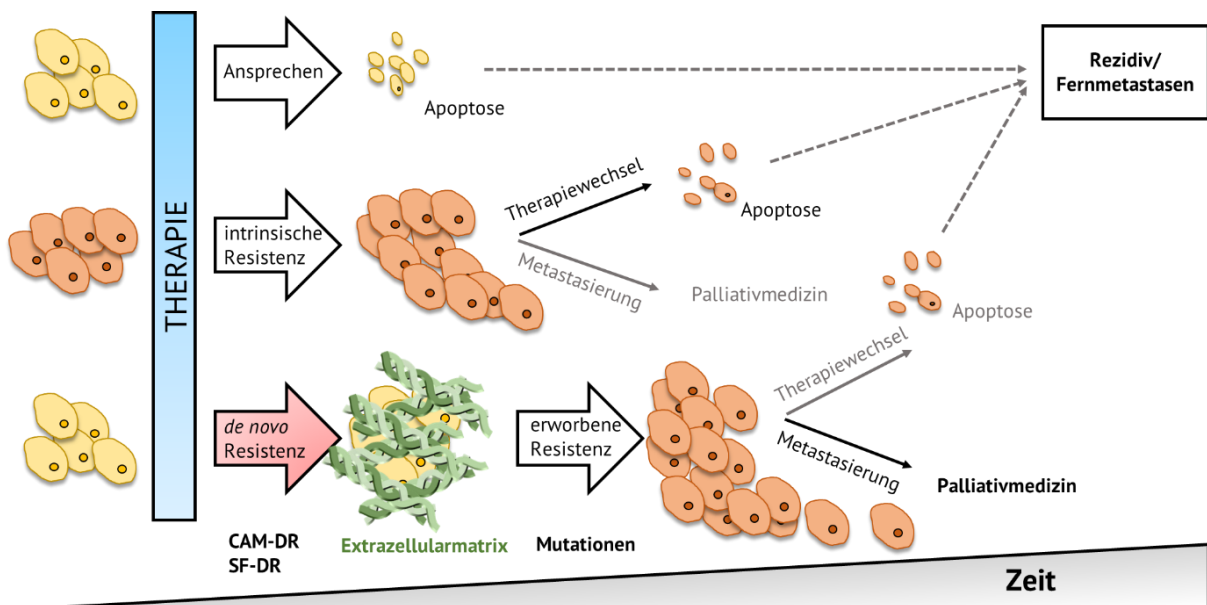


Abb. 2.3 Darstellung der Entwicklung von der *de novo* Resistenz (modifiziert nach [54]). Durch die Ausbildung von CAM-DR und SF-DR können Krebszellen durch Interaktion mit der EZM eine Chemotherapie überleben und durch den erhöhten Selektionsdruck per Mutation eine permanente Resistenz erwerben.

2.2.2. Chemoresistenz-Mechanismen (MDR)

Die Wirkung klassischer Zytostatika basiert meist auf der Interferenz mit der Replikation oder der Funktion der DNA während bei zielgerichteten Therapien die Antagonisierung einer funktionellen Zielstruktur dominiert. So bilden Zytostatika wie Cisplatin in einer den Alkylantien ähnlichen Form nach Bildung eines Aquakomplexes kovalente *inter-* und *intrastrand* Verbindungen mit den elektronenreichen N7-Atomen der Guanidinbasen der DNS [57], während Doxorubicin und Mitoxantron über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Basen interagieren ([58], **Abb. 2.4**). Gefitinib dagegen bindet spezifisch und zielgerichtet an die intrazelluläre ATP-Bindungsstelle des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und hemmt damit die Signaltransduktion der RTK [59]. Viele Tumore werden nach einer anfänglichen Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff zunehmend resistenter. Dies stellt aus klinischer Sicht eine schwerwiegende Problematik dar, da einer Resistenz nicht mit beliebig erhöhten Wirkstoffdosen durch einschränkende Nebenwirkungen begegnet werden kann. Bei Cisplatin ist die gravierende Nephrotoxizität als limitierender Faktor zu nennen [57], bei Doxorubicin dagegen die Kardiotoxizität [58], die bei Mitoxantron geringer ausgeprägt ist [60].

Die molekularen Mechanismen einer Resistenz sind vielfältig [61], richten sich gegen ein großes Spektrum von Zytostatika und werden daher durch den Begriff der *multi drug resistance* (MDR) beschrieben. Sie lassen sich unterteilen in *Pre-, On-, Post-* und *Off-Target* Resistenz ([62], **Abb. 2.4**). *Pre-Target* umfasst alle Mechanismen, die den aktiven Wirkstoff intrazellulär reduzieren. Bekannt sind neben einem veränderten Metabolismus die verminderte Expression von Influx- und vor allem die verstärkte Expressierung von Effluxpumpen. Diese *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter können mit einer breiten Substraterkennung intrazelluläre Wirkstoffspiegel auf nicht mehr effiziente Konzentrationen reduzieren. Zu den bekanntesten ABC-Transportern gehören das P-Glykoprotein (P-Gp, ABCB1), das *multi drug resistance protein* (MRP1, ABCC1) und das *breast cancer resistance protein* (BCRP, ABCG2) [63].

On-Target Resistenzen stellen bei klassischen Zytostatika z.B. die erhöhte Reparatur der DNS dar, bei zielgerichteter Therapie dagegen die Mutation der jeweiligen Zielstruktur. *Post-Target* Resistenzen umfassen Signalkaskaden und ein anti-apoptotisches *signaling*, welche kompensatorisch aktiviert werden. Diese Signalkaskaden können auch durch das Ausbilden anderer membranständiger Rezeptoren aktiviert werden (*Off-Target*).

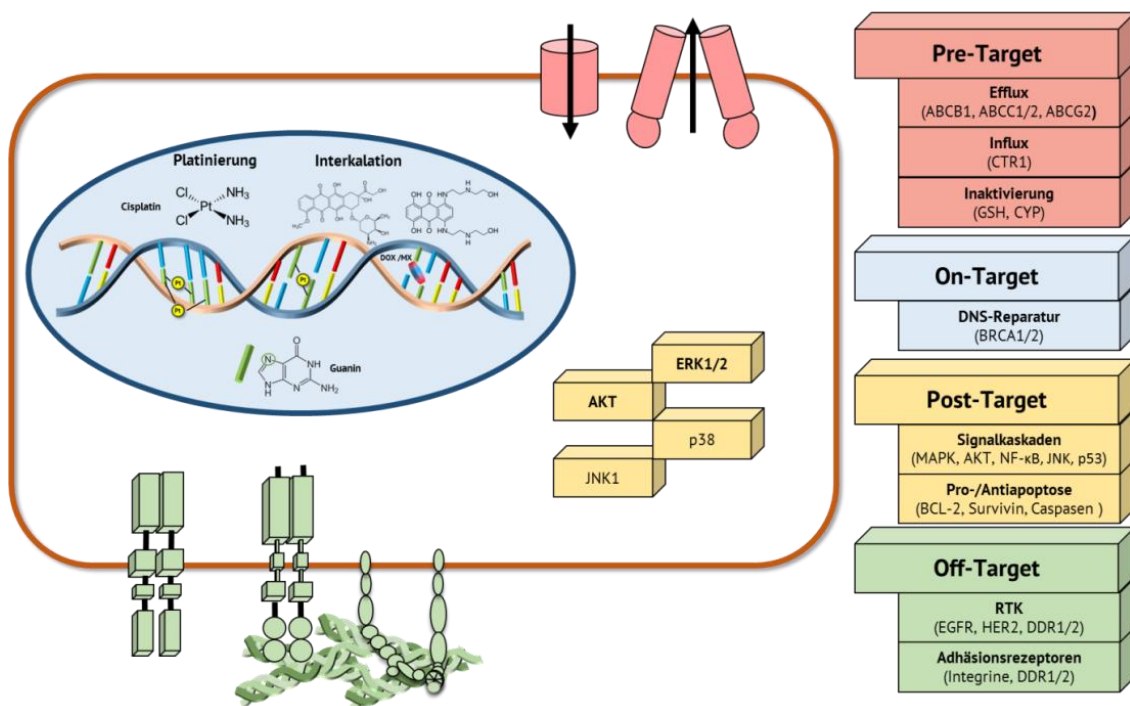


Abb. 2.4 Angriffspunkt der klassischen Zytostatika und Möglichkeiten einer Resistenzbildung unterteilt in *Pre-, On-, Post-* und *Off-Target* Resistenz. *Pre-Target* reduziert aktiv intrazelluläre Wirkstoffspiegel, *On-Target* bewirkt Veränderungen der jeweiligen Zielstruktur und *Post-Target* Mechanismen bewirken (intra)zelluläre Kompensationen, die durch andere Strukturen (*Off-Target*) begünstigt werden können.

2.2.3. Environment-mediated drug resistance

Die *multi drug resistance* entsteht meist über lange Zeiträume der Wirkstoffexposition und lässt sich durch vielfältige genetische Veränderungen von den sensitiven Tumorzellen kontrastieren [64]. Diese Veränderungen werden u.a. durch die Tumormikroumgebung und den Mechanismen zu deren Homöostase begünstigt (**Abb. 2.5** [65, 66]). Die Mikroumgebung besteht im Engeren aus der EZM, sowie den damit interagierenden (Adhäsions-)Rezeptoren der Zellen, sowie im Weiteren aus parakrinen Signalmolekülen (wie EGF) und dem Sauerstoffmilieu als löslichen Faktoren. Diese Faktoren können durch Krebs-assoziierte Fibroblasten und Krebszellen moduliert werden. So können Extrazellulärmatrix-Proteine produziert und durch verschiedenste Enzyme modelliert werden, was bspw. im Prozess der Angiogenese zur Sauerstoffversorgung der Tumore beiträgt. Diese Faktoren können drei Grundphänomene der EM-DR auslösen [66]:

- Aktivierung onkogener Signalmechanismen (Kap. 2.5)
- reduzierte Wirkstoffkonzentrationen (Kap. 2.6)
- EMT zu stammzellähnlichen, resistenteren Zelltypen (CSC) (Kap. 2.7)

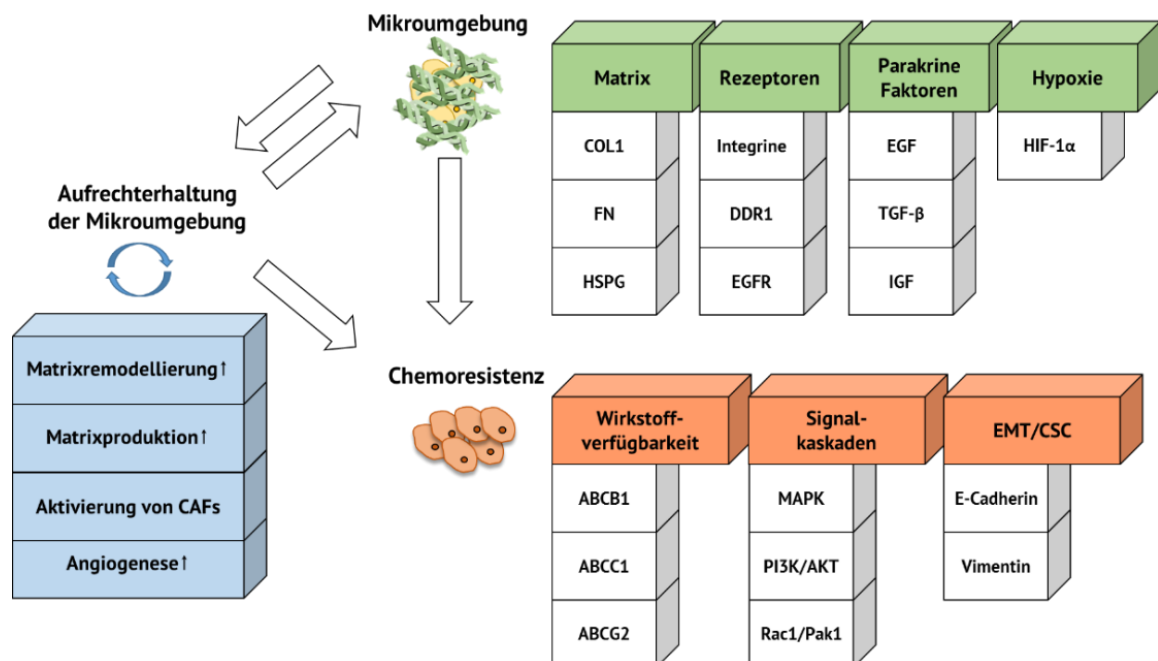


Abb. 2.5 Zellen stehen mit ihrer Mikroumgebung in einem empfindlichen und dynamischen Gleichgewicht. Die Zellen können durch Interaktion mit der Umgebung und Prozesse, die dem Aufrechterhalten dieser Mikroumgebung dienen, Chemoresistenz-Mechanismen aktivieren.

2.3. Tumormikroumgebung

Die Tumormikroumgebung ist für jede Krebsunterart und jedes Gewebe hochspezifisch und setzt sich hauptsächlich aus den EZM-Proteinen, den Krebs-assoziierten Zellen (und deren parakrinen Signalstoffen) und dem Grad der Vaskularisierung (und damit dem Sauerstoffgehalt) zusammen [66]. Bei der Entartung einer Zelle weicht diese durch unkontrollierte Proliferation vom physiologischen Zustand der Geweberegulation ab, bei der die Basalmembran durchbrochen wird ([66], **Abb. 2.6**). Dadurch werden Fibroblasten aktiviert, die wiederum vermehrt Matrixmoleküle produzieren und modellieren, sowie parakrine Signalmoleküle sezernieren. Durch diese unkontrollierte Produktion und Quervernetzung der EZM, auch Fibrose genannt, erhöht sich die Rigidität der Mikroumgebung. Über die Zellkontraktilität werden Signalkaskaden aktiviert, die via EMT einen mesenchymalen, d.h. stammzellähnlichen Zellcharakter (CSC) erzeugen. Durch schlecht ausgebildete Blutgefäße wird der im Gewebe vorhandene Sauerstoff verbraucht, wodurch Signalmoleküle, sogenannte HIFs (*hypoxia-inducible factors*) nachgeschaltete onkogene Signalkaskaden aktivieren [67]. Bestimmte Signalkaskaden wie NFκB und p53 können allerdings ohne HIFs im hypoxischen Gewebe aktiviert werden [68].

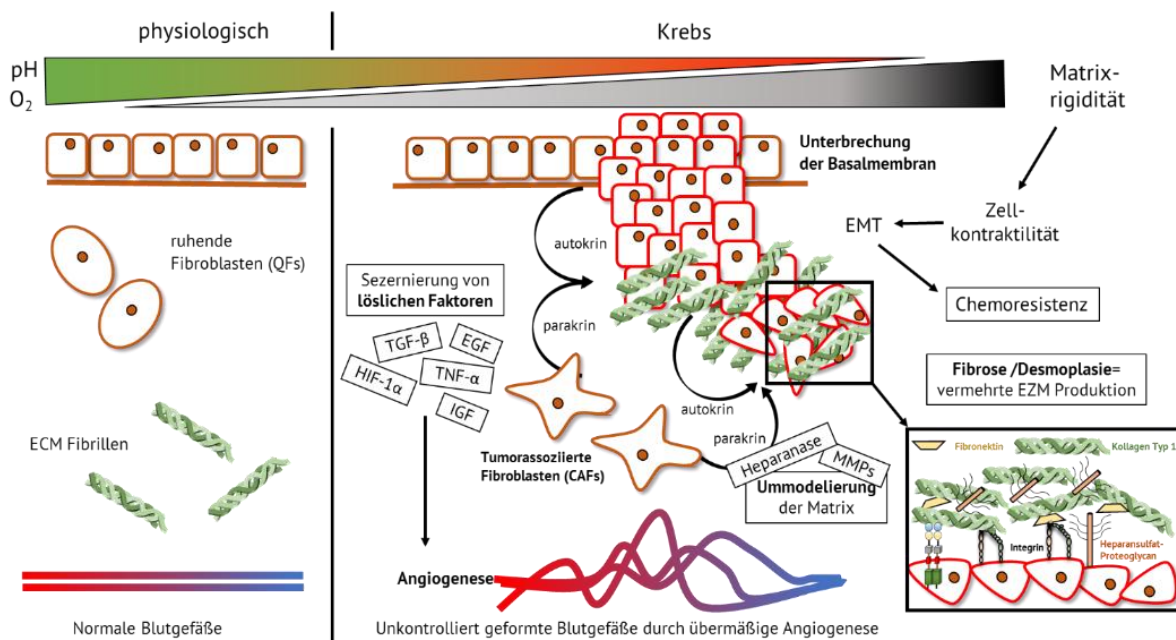


Abb. 2.6 Veränderung der Tumormikroumgebung bei Krebserkrankungen. Die Entartung von Zellen ist eng verbunden mit dem Durchbrechen der Basalmembran, der Aktivierung von Fibroblasten und den damit verbundenen sezernierten löslichen Faktoren, die wiederum eine Fibrose und verstärkte Angiogenese auslösen. Weiterhin bildet sich ein deutlich niedriger pH Wert, eine geringere Sauerstoffsättigung, sowie eine durch die Fibrose erhöhte Rigidität aus (modifiziert nach [66]).

Die Interaktion mit diesen Bestandteilen über Adhäsionsprozesse ist für die Homöostase der Zellfunktionen entscheidend [69]. Im Jahre 2000 haben Hanahan und Weinberg die sechs „hallmarks of cancer“ definiert [70], die 2011 [71] und 2022 [72] jeweils erweitert wurden (**Tab. 2.2**). Die *hallmarks* werden von *enabling characteristics* begünstigt.

Tab. 2.2 Die Entwicklung der *hallmarks of cancer* nach Hanahan und Weinberg. Bei den Erweiterungen zu den Hallmarks wurden die neuen Aspekte als „*emerging hallmark*“ oder „*enabling characteristic*“ eingeführt.

„Hallmarks of Cancer“	Jahr 2000 [70]	Jahr 2011[71] The next generation	Jahr 2022 [72] New Dimensions
Aufrechterhaltung proliferativer Signalwege (<i>Sustaining proliferative signaling</i>)	hallmark	hallmark	hallmark
Umgehen von Wachstums-Inhibitoren (<i>Evading growth suppressors</i>)	hallmark	hallmark	hallmark
Unbegrenztetes Teilungsvermögen (<i>Enabling replicative immortality</i>)	hallmark	hallmark	hallmark
Zellinvasion & Metastasierung (<i>Activating invasion and metastasis</i>)	hallmark	hallmark	hallmark
Induktion der Angiogenese (<i>Inducing or accessing vasculature</i>)	hallmark	hallmark	hallmark
Apoptose-Resistenz (<i>Resisting cell death</i>)	hallmark	hallmark	hallmark
Vermeidung der Immunantwort (<i>Avoiding immune destruction</i>)		emerging hallmark	hallmark
Deregulation des Energiestoffwechsels (<i>Deregulating cellular energetics</i>)		emerging hallmark	hallmark
Phänotypische Plastizität (<i>Unlocking phenotypic plasticity</i>)			emerging hallmark
Seneszente Zellen (<i>Senescent cells</i>)			emerging hallmark
Genomische Instabilität und Mutation (<i>Genome instability and mutation</i>)	enabling characteristic	enabling characteristic	enabling characteristic
Tumor-vorantreibende Entzündungen (<i>Tumor-promoting inflammation</i>)		enabling characteristic	enabling characteristic
Polymorphes Mikrobiom (<i>Polymorphic microbiomes</i>)			enabling characteristic
Nicht-mutationsbedingte epigenetische Umprogrammierung (<i>Nonmutational epigenetic reprogramming</i>)			enabling characteristic

Interessanterweise lassen sich alle definierten *hallmarks* durch die Tumormikroumgebung beeinflussen [73], die später 2011 explizit bei der ersten Aktualisierung der *hallmarks* mitgedacht wurde [71]. Die 2022 neu definierte „*enabling characteristic*“ der nicht-mutationsbedingten, epigenetischen Umprogrammierung lässt sich auf das dynamische Gleichgewicht der EM-DR anwenden. Hanahan selbst erwähnt in diesem Kontext die EZM-Integrin-Interaktion [72]. Die Tumormikroumgebung ist also essenziell für die Krebsentwicklung und damit ein potenzieller therapeutischer Angriffspunkt.

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen im Krebsgewebe bedingen Veränderungen in Hypoxie, Matrixzusammensetzung und -rigidität und den parakrinen Signalmolekülen, die sich gegenseitig regulieren, um onkogene Bedingungen zu schaffen. So führen Hypoxiefaktor HIF-1 α , Matrixrigidität und lösliche Faktoren zur EMT, die durch Bildung von CSC die Apoptose reduziert [74]. Bei den EMT-vermittelten Faktoren ist TGF- β relevant, während bei Überlebenssignalkaskaden EGF als Substrat von EGFR wichtig ist. Diese Kaskaden können über Matrixbindung und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. EMT und Signalkaskaden können in letzter Konsequenz wiederum über die Aktivierung von ABC-Transportern die Wirkstofflevel senken [63].

2.3.1. Extrazelluläre Strukturproteine

Die strukturgebenden Matrixproteine sind spezifisch für physiologisches Gewebe. Durch den Prozess der Fibrose können sie sich allerdings in ihrer Zusammensetzung und Quantität ändern und dadurch zelluläre onkologische Veränderungen begünstigen [75]. So ist bekannt, dass eine hohe mammographische (Kollagen-)Dichte die Entartung von Zellen um den Faktor 1,3 [12, 13] begünstigt und nach dem Entstehen des Tumors das Risiko für Chemoresistenz und Metastasierung erhöht [8]. Bergamaschi *et al.* haben einige EZM-bezogene Gene bzw. die vorhandene EZM als prognostische Marker validiert [76, 77]. Durch eine erhöhte Expressierung von Lysyloxidasen können lineare Kollagenfibrillen quervernetzt werden. Diese physikalische Modifikation bewirkt eine Steigerung der Matrixrigidität und somit einen veränderten Einfluss auf die Zellen durch Mechanorezeptor-Transduktion. Andere EZM-Strukturen wie Fibronectin haben ebenfalls Einfluss auf die Chemoresistenz und können als Zielstruktur genutzt werden [78].

Kollagene bilden den Hauptteil der EZM-Proteine von Säugetieren. Strukturell bildet Kollagen bereits während der biosynthetisch früheren Prokollagenphase Tripelhelices aus [79]. Durch Hydroxylierungen der Aminosäuren Prolin und Lysin mit Ascorbinsäure als Kofaktor sind Quervernetzungen möglich, die sich nach der Peptidase-vermittelten Überführung in die Kollagenform ausbilden [79]. Durch diese Vernetzungen gibt es verschiedene Arten von Kollagenen, die je nach molekularer Struktur andere biologische Funktionen übernehmen. Der in dieser Arbeit verwendete Typ I (COL1) bildet lange Fibrillen aus. Neben der klinisch relevanten mammographischen Dichte wurde in der *in vitro* Zellkultur Kollagen als Biomarker für einen malignen Verlauf von Brustkrebs [80] oder Prostatakrebs [81] identifiziert [79].

2.3.2. Matrix-Rigidität und Modellierung

Durch die Sezernierung und Quervernetzung von COL1 und COL4 bei der krebsvermittelten Fibrose, erhöht sich die Rigidität der Matrix. Die Rigiditätsverwerte betragen bspw. in gesundem Gewebe 6 kPa, während Gewebe mit Fibrose 12 kPa aufweisen [82]. Mechanotransduktion ist der Vorgang, bei dem biophysikalische Reize in biochemische Signale umgewandelt werden [83]. Durch diese erhöhte Rigidität sinkt die Kontraktilität und Spannung der Zellen durch das Ausbilden fokaler Adhäsionskomplexen. Diese werden durch mechanosensitive Moleküle wie Integrine vermittelt. So kann die fokale Adhäsionskinase (FAK) letztlich über eine Erhöhung der Rigidität aktiviert werden und Signale weiterleiten [84]. Die Rigidität der einzelnen Zellen kann je nach Zelltyp unterschiedlich sein [85].

Der Umbau der EZM erfolgt, teilweise durch Hypoxie begünstigt, enzymatisch bspw. durch Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) oder Heparanasen. Die MMPs können gezielt Strukturen abbauen und werden nach ihrem Substrat benannt. Für COL1 sind die Kollagenasen MMP1/8/13 relevant [86]. Die Heparanase wiederum kann Heparansulfate an Heparansulfat-Proteoglykanen abbauen und daran arretierte Wachstumsfaktoren freisetzen. So kann beispielsweise MMP-1 als COL1-degradierendes Enzym über EGFR- und MAPK-Aktivierung freigesetzt werden [87]. Auf der anderen Seite ist ein direkter Zusammenhang von HSPG mit EMT und Resistenzphänomenen bekannt, sowie der therapeutischen Möglichkeit, durch Interferenz mit diesen HSPGs diese Resistenz zu umgehen [88, 89].

2.4. Adhäsionsrezeptoren (CAMs)

Zellen interagieren mit ihrer EZM oder anderen Zellen über Adhäsionsrezeptoren (*cell adhesion molecules*, CAMs). Kollagen stellt einen integralen Bestandteil der EZM dar. Bislang sind folgende COL1-bindenden Rezeptoren bei Krebszellen bekannt [90, 91]:

- Integrine (Integrin $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ und $\alpha_{11}\beta_1$)
- Discoidin Domain Rezeptoren (DDR1 und DDR2)

Die folgenden Rezeptoren sind ebenfalls Kollagen-bindend, kommen aber nur auf Thrombozyten oder hämatopoetischen Zellen vor:

- GPVI, OSCAR, LAIR-1/2, GPR56, Mannose-Rezeptor

2.4.1. Integrine – Funktion, Struktur und Aufbau

Integrine sind transmembranäre zelluläre Rezeptoren, die als Heterodimere aus einer nicht kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit zusammengesetzt auf allen Zellen exprimiert werden. Dabei ist die α -Untereinheit verantwortlich für die spezifische Bindung zu verschiedenen extrazellulären Liganden, während die β -Untereinheit darüber hinaus die Verbindung zum Zytoskelett über Adaptorproteine wie Talin vermittelt. Integrine können durch diese Verankerung im Zytoskelett und durch aktive Einbindung in komplexe intrazelluläre Signalkaskaden vielseitige Funktionen zwischen Zelle und EZM vermitteln. Neben der Grundfunktion der Zelladhäsion werden so komplexere Vorgänge wie Migration, Proliferation, Zelldifferenzierung und Invasion ins Gewebe maßgeblich durch Integrine beeinflusst. Dabei wird im Zuge der Entartung des Brustgewebes deutlich, dass die Integrine im physiologischen Zustand die Adhäsion zur Basalmembran bewirken, über die Tumorgenese Proliferation durch Wechselwirkung mit RTKs erzeugen und danach im Zuge der Metastasierung Invasion und EMT forcieren [92]. Die Fähigkeit von Zellen, die Expression der Integrine den jeweiligen Situationen dynamisch anzupassen, trägt zum variablen Bild der Integrinfunktionen bei.

Integrine liegen in verschiedenen Konformationen vor, die verschiedene Aktivierungszustände und damit unterschiedliche Stufen der Affinität zu Liganden darstellen (**Abb. 2.7**). Das inaktive, eingeknickte Integrin kann durch exogene oder endogene Stimuli über eine intermediäre, aufgerichtete Form in eine maximal aktivierte, aufgerichtete und gespreizte Form übergehen. Diese Aktivierungshypothese wird als *switchblade* Modell bezeichnet [93]. Dies kann durch zyttoplasmatische Stimuli (*inside-out*) als auch durch extrazelluläre Ligandbindung (*outside-in*) initiiert werden. Während die klassische Ligandbindung der Integrine über die β -I- oder (sofern vorhanden) α -I-Struktur verläuft, weisen alle Integrine im Bereich der β -I-Untereinheit eine so genannte *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS), *adjacent to metal ion dependent adhesion site* (ADMIDAS) und *ligand associated metal ion binding site* (LIMBS) auf, die durch Bindung von mehrwertigen Kationen eine Aktivierung begünstigen können [93]. Während physiologisch Kationen wie Ca^{2+} je nach Konzentration einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt ausüben, wurden Mn^{2+} -Kationen als potente Superaktivatoren identifiziert [94, 95]. Aktivierte Integrine können sich zu Clustern ausbilden und damit die Avidität erhöhen, durch die eine Steigerung der Adhäsionswirkung durch fokale Adhäsionen stattfindet. Integrin-Internalisierungen sind mit EMT verbunden [96].

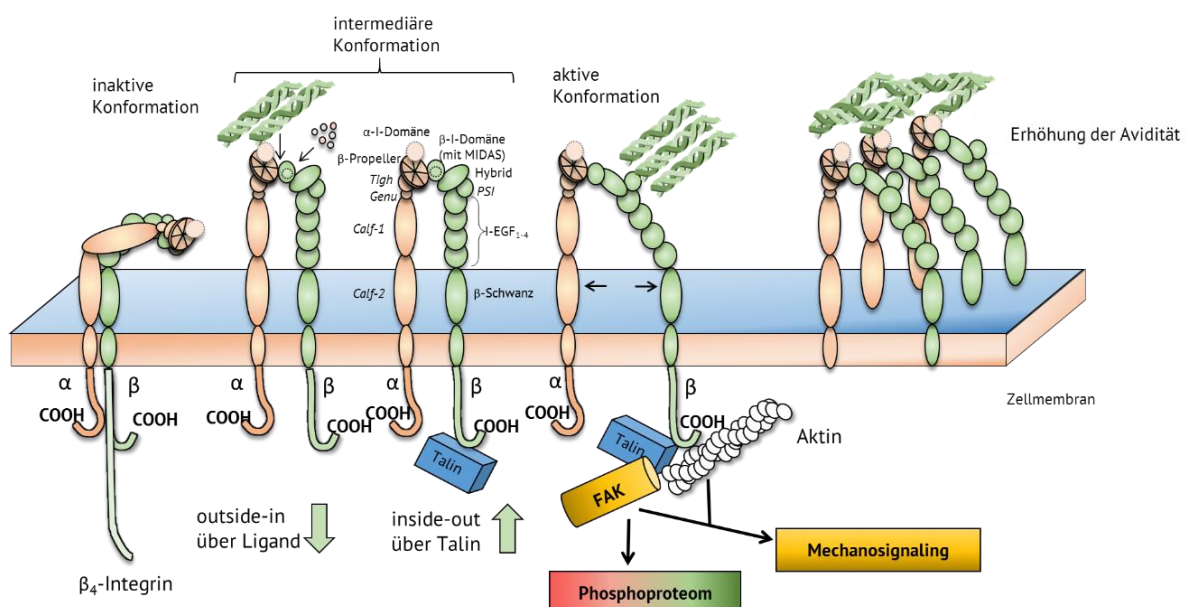


Abb. 2.7 Allgemeiner Aufbau und Konformationen der Integrine anhand des *switchblade* Modells (selbst erstellt und modifiziert nach [97]). Dabei ist die inaktive Form eines Integrins (links), in der Mitte die intermediären Konformationen und rechts der aktivierte Zustand dargestellt, bei dem eine Spreizung der α - und β -Untereinheit stattfindet. Je nachdem, ob die Aktivierung durch Signalmoleküle im extrazellulären Raum oder im Zytoplasma erfolgt, spricht man von *outside-in* oder *inside-out signaling*. Der besonders lange zyttoplasmatische Bereich von ITGB4 ist bei der inaktiven Konformation visualisiert.

Theorie

Adhäsionsrezeptoren (CAMs)

Bisher wurden 18 α - und acht β -Strukturen identifiziert, die insgesamt mindestens 24 Integrindimere bilden können ([93], **Abb. 2.8**). Neun α -Untereinheiten haben eine α -I-Domäne, die die Bindung zu den Liganden herstellen. Bei den anderen neun α -Integrinen, die diese Untereinheit nicht besitzen, wird die Bindung über die β -I-Domäne vermittelt. Das durch Kombination der verschiedenen Integrinuntereinheiten von Zelle zu Zelle variierende Integrinprofil spiegelt die unterschiedlichen Funktionen dieser Rezeptorfamilie wider. Integrine werden nach ihrem Expressionsort oder durch ihre Fähigkeiten, spezielle Liganden zu binden, eingeteilt. Bedeutend sind dabei Liganden mit der prominenten Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD), die vor allem in Bestandteilen der EZM wie Fibronektin und Vitronektin vorkommen .

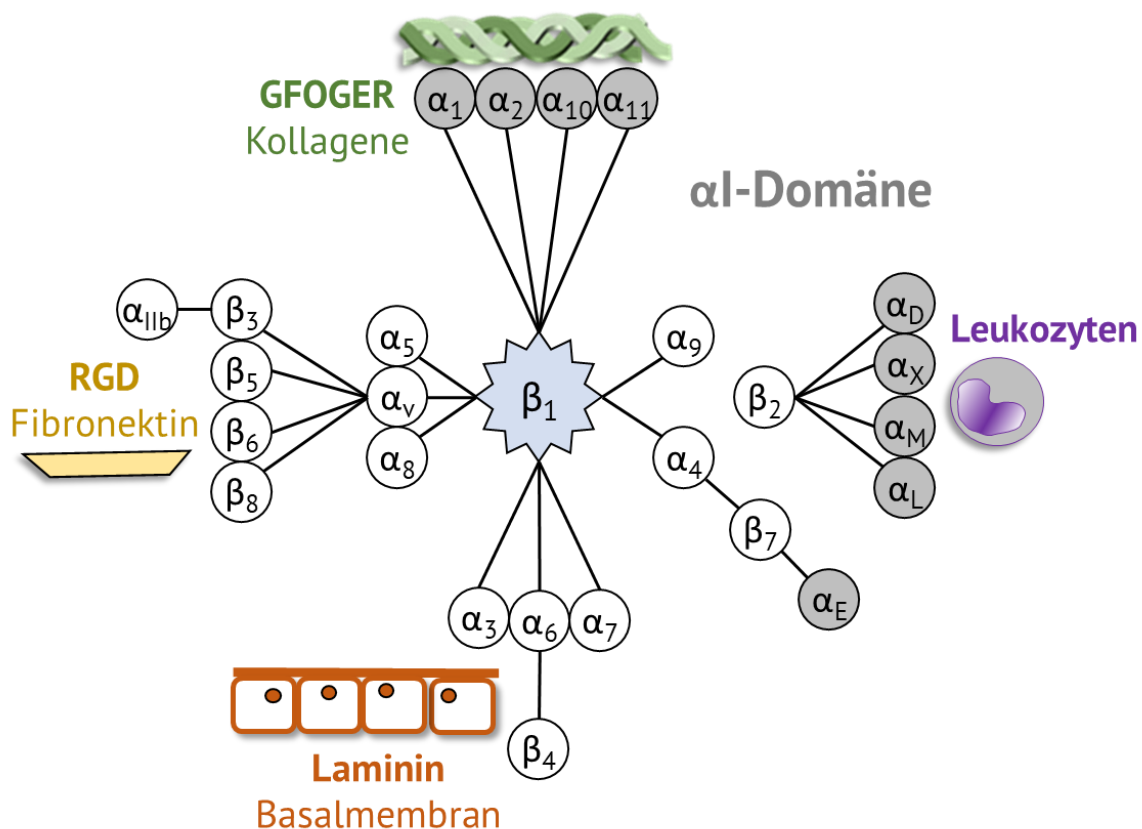


Abb. 2.8 Klassifizierung der Integrine nach ihrem Bindungsverhalten (modifiziert nach Hynes [93]). Graue α -Einheiten besitzen eine α -I-Untereinheit.

2.4.2. Integrin $\alpha_2\beta_1$

Die Kollagen-bindenden Integrine bestehen aus der β_1 -Untereinheit und einer der vier α -Untereinheiten α_1 , α_2 , α_{10} und α_{11} [90]. Die Integrine binden die Kollagen Aminosäuresequenz GFOGER [98, 99]. Von diesen vier Heterodimeren ist $\alpha_2\beta_1$ (ITGA2B1, CD49b, VLA-2) in Krebszellen dominant exprimiert [100], (**Tab. 2.3**). Im Krebsgewebe kann die ITGA2-Untereinheit entweder besonders stark exprimiert sein wie im Kolonkrebs beobachtet [101] und/oder eine besondere Mutation aufweisen. So besitzen 95% aller Brustkrebspatienten einen 1648G>A Genotyp [102]. Allerdings konnte bislang kein Zusammenhang dieser Mutation zu einem veränderten Gesamtüberleben gezogen werden [103]. Dagegen konnte insbesondere in TNBC ITGB1 durch verschiedene Studien als prognostischer Faktor für Überleben und Migration identifiziert werden [104], allerdings nicht im Kontext von Resistenzentwicklungen.

Tab. 2.3 Vorhandensein der jeweiligen ITGB1-Heterodimere, sowie des Hemidesmosoms ITGA6B4 (modifiziert nach [105]). Die COL1-bindenden Integrine sind **fett** geschrieben.

Dimer	Expression			
	Krebszellen	Gefäßzellen	Fibroblasten	Immunzellen
$\alpha_1\beta_1$	+	++	++	++
$\alpha_2\beta_1$	+++	++	++	++
$\alpha_3\beta_1$	+++	++	++	
$\alpha_4\beta_1$	+++		++	+++
$\alpha_5\beta_1$	+++	+++	++	++
$\alpha_6\beta_1$	+++	++		++
$\alpha_7\beta_1$	++			
$\alpha_8\beta_1$	+	++		
$\alpha_9\beta_1$	++	++	++	
$\alpha_{10}\beta_1$	++			
$\alpha_{11}\beta_1$			++	
$\alpha\nu\beta_1$	++	++	++	
$\alpha_6\beta_4$	+++	++		

2.4.3. Integrin $\alpha_6\beta_4$

Das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin vermittelt Zell-Zell-Kontakte über die Bindung an das Laminin der Basallamina und wird daher als Hemidesmosom bezeichnet. Die β_4 -Untereinheit stellt dabei einen Sonderfall dar. Sie besteht aus einer deutlich längeren zytoplasmatischen Domäne, die im Gegensatz zu den anderen β -Einheiten, eigene Phosphorylierungsstellen und damit den Charakter einer Rezeptortyrosinkinase besitzt. In der Morphogenese des Brustgewebes und in der Entwicklung des Mammakarzinoms ist das dynamische Gleichgewicht zwischen den Integrinuntereinheiten β_1 und β_4 höchstrelevant [106]. So kann ein Zusammenhang zwischen der Expression von $\alpha_6\beta_4$ und der Größe des Mammakarzinoms, sowie einem reduzierten Überleben festgestellt werden [107, 108]. Auch in anderen Entitäten wie Lungen- oder Pankreaskrebs korreliert die Expression von $\alpha_6\beta_4$ mit einer schlechter Prognose [109].

2.4.4. Integrinsignalkaskade

Die Signalfunktionen der Integrine sind komplex und erstrecken sich auf verschiedene Signalkaskaden. Da Integrine mit Ausnahme des β_4 Integrins keine eigene enzymatische Aktivität besitzen, werden physiologisch Adapterproteine wie die *focal adhesion kinase* (FAK/PTK2) und die *integrin linked kinase* (ILK) benötigt. Weiterhin verknüpfen diese Proteine die Integrine mit dem Aktin Zytoskelett, um so Zellform und Motilität zu beeinflussen [110]. Die Signalkaskaden der Integrine lassen sich in drei Hauptsignalwege einteilen [111], deren Aktivierung Zellproliferation und -differenzierung und Überleben bspw. über die Expression von Survivin [112] bewirken können:

- MAPK
- PI3K/AKT
- FAK-spezifisches Mechano-Signalkaskade

Dabei kann FAK alle drei Signalkaskaden direkt aktivieren, während ILK als Verbindung über den IPP-Komplex, bestehend auf Parvin PINCH und ILK, mit RTKs interagiert, die wiederum MAPK und PI3K/AKT aktivieren können. ILK aktiviert die Signalkaskaden also indirekt und wird daher als Pseudokinase bezeichnet [113]. ILK ist an die β_1 und β_5 Integrinuntereinheit gebunden [114] und besitzt sehr heterogene Funktionen in Abhängigkeit des jeweiligen

Gewebes. ILK-*knockout* Mäuse sind letal [115] und in den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 vermittelt eine CRISPR/CAS9 vermittelte Deletion von ILK eine Störung in der Adhäsionsfunktion. Gleichzeitig resultiert eine erhöhte Sensitivität gegenüber Src-Kinasen-Inhibitoren wie Bosutinib [116].

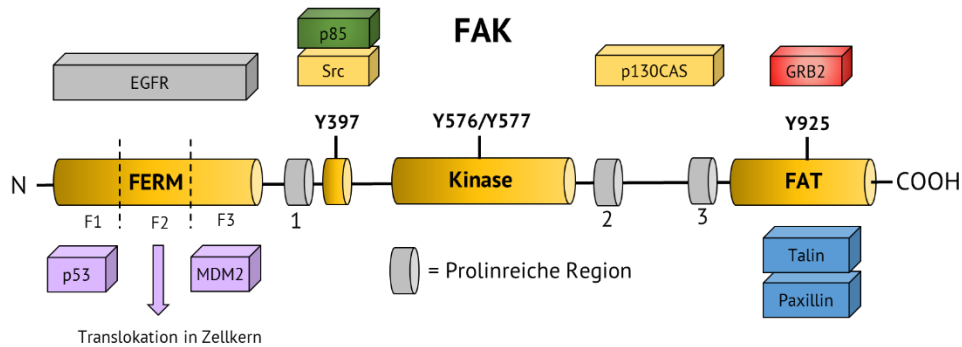


Abb. 2.9 Aufbau der fokalen Adhäsionskinase (FAK) mit Darstellungen der möglichen Interaktionen mit anderen Signalproteinen (selbst erstellt und modifiziert nach [117]).

Die FAK kann von Integrinen, RTKs, pH-Veränderungen und GPCRs aktiviert werden [118]. Sie besteht aus einer zentralen Kinasefunktion, einer N-terminalen flankierten Ezrin–Radixin–Moesin (FERM) Region zur Interaktion mit RTKs wie EGFR und einer C-terminalen *focal adhesion targeting* (FAT) Domäne als Bindeglied zu Talin und Paxillin und damit zu Integrinen und Aktinfilamenten ([118], **Abb. 2.9**).

Die initiale Aktivierung der Kinase erfolgt durch das Clustern der Integrine (meist nach Bindung an EZM) und damit der Dimerisierung der FAK über eine Autophosphorylierung von Y397, welches sich zwischen der FERM und der Kinasen-Region befindet [119–122]. Diese Phosphorylierung ist entscheidend für die Aktivierung von Src und die Bildung eines Komplexes, der wiederum Y576 und Y577 in der zentralen Kinasen-Region phosphoryliert, um damit die Aktivität der FAK weiter zu steigern. Die Expression von FAK und insbesondere aktivierten d.h. phosphorylierten FAK führte zur Blockade von Anoikis [123]. Anoikis ist die Apoptose, die durch das Herauslösen der aus der EZM provoziert wird [123]. Krebszellen können Anoikis unterdrücken und damit Metastasen bilden [123].

Diese Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung des Y925 in der FAT-Domäne, was über das Adaptorprotein GRB2 zur Bildung des GRB2-SOS-Komplexes und damit zur Aktivierung der Ras-Raf-ERK-MAPK-Signalkaskade führt (**Abb. 2.10**). Die Y397 gebundenen Src-Kinasen oder die Integrin- α -Untereinheiten können MAPK aktivieren, indem sie über *Src-family*

Theorie

Adhäsionsrezeptoren (CAMs)

kinases (SFKs) wie Fyn oder Yes das Adapterprotein ShcA aktivieren, welches wiederum GRB2 phosphoryliert. Y397 kann darüber hinaus selbst mit der p85 Untereinheit von PI3K wechselwirken und somit zusätzlich die AKT-Signaltransduktion aktivieren.

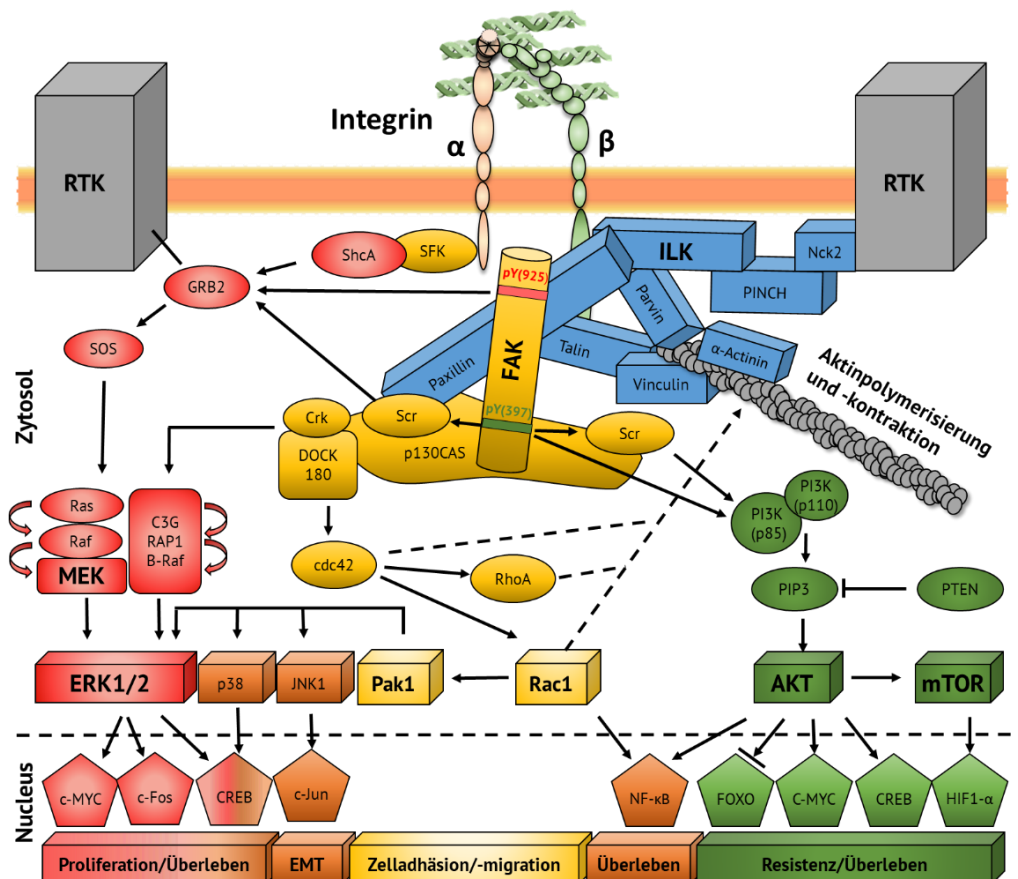


Abb. 2.10: Darstellung der Integrin-Signalkaskade und deren Wechselwirkung mit RTKs. Gelb ist das FAK-spezifische *signaling* eingefärbt, blau die Adaptermoleküle, Rot das MAPK *signaling*, Grün das PI3K/AKT *signaling*, braun sind Übergangssignalwege. Die Fünfecke symbolisieren Transkriptionsfaktoren.

Ein *knockout* von FAK führt nicht zu letalen Zuständen. Da PYK2 ein zu 45% identisches Ortholog zu FAK mit ähnlichen Interaktionsmöglichkeiten darstellt, kann PYK2 die Funktionen von FAK kompensieren [117, 118]. Über die beiden Prolin-reichen Regionen zwischen Kinasen- und FAT-Region kann FAK an p130CAS binden und damit eine Vielzahl von mechanosensitiven Signalmolekülen aktivieren. Daneben kann p130CAS mit SFKs interagieren und die beiden bereits erwähnten Signalkaskaden AKT und MAPK aktivieren. Als Teil der *Crk associated substrate* (CAS) Familie kann p130CAS als Adaptorprotein weitere Substrate binden, unter anderem Crk. Dies kann wiederum über DOCK180 die rho-GTPasen

cdc42, RhoA und Rac1 aktivieren [124]. Diese können über die Reorganisation des Aktinzytoskeletts Adhäsions- und Migrationsprozesse steuern. Über Effektorproteine wie PAK1 können weiterhin andere intrazelluläre MAPK-assoziierte Signalmoleküle wie JNK, p38 oder ERK1/2 aktiviert werden. Integrine können so über verschiedene Signalkaskaden Adhäsion, Migration, Überleben; Proliferation, Resistenz und EMT vermitteln.

FAK kann direkt mit dem Tumorsuppressor p53 interagieren [125]. Sollte durch Kontaktverlust zur EZM oder Stress FAK frei vorliegen, kann es über den F2-Bereich der FERM-Domäne in den Zellkern wandern und dort über den F1-Bereich an p53, sowie mit dem F3-Bereich die E3 Ubiquitin Ligase MDM2 binden. Diese verursacht die proteasomale Degradierung von p53 und leitet dadurch Überlebenssignale an die Zelle weiter.

2.4.5. Discoidin Domain Rezeptoren (DDR)

Bei den Discoidin Domain Rezeptoren DDR1 und DDR2 handelt es sich um transmembranäre, dimere RTKs. Dabei bilden DDR1 und DDR2 die einzige Klasse der RTKs, die nicht durch lösliche Faktoren, sondern Kollagen als Strukturprotein aktiviert werden [126, 127]. Kollagen als Ligand wurde 1997 entdeckt und die Rezeptoren damit von ihrem *orphan receptor* Status befreit [128, 129]. Analog zu den meisten RTKs besteht die Hauptfunktion in der Regulation von Migration, Invasion, Proliferation, Differenzierung/EMT und Überleben [130] und indirekt in der Modellierung der EZM durch das Beeinflussen von MMPs [130]. DDR1 ist in den Prozess der Fibrose involviert und wird bei Brustkrebs als prognostischer Marker der Progression und Metastasierung angesehen [131, 132]. Die Rolle von DDR1 und DDR2 in der Zelladhäsion wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird DDR1 eine eigene adhäsive Funktion zugeschrieben [133], andere Ergebnisse sprechen für eine indirekte, stabilisierende Wirkung auf E-Cadherin [134–136] oder die COL1-bindende Integrine $\alpha_1\beta_1$ bzw. $\alpha_2\beta_1$ [137].

DDR1 kann in fünf Splicing-Varianten (a-e) vorliegen [126], wobei DDR1a und DDR1b (**Abb. 2.11**) die häufigsten Isoformen darstellen. Die Splicing-Varianten unterscheiden sich nur zytoplasmatisch. Der extrazelluläre Bereich, bestehend aus einer Discoidin-Domäne, einer Discoidin-ähnlicher (*DS-like*) Domäne und einer extrazellulären, juxtamembranären Region (EJXM), ist bei allen DDR1-Varianten gleich. Dabei ist die extrazelluläre, N-terminale

Theorie

Adhäsionsrezeptoren (CAMs)

Discoidin-Domäne entscheidend für die Interaktion mit Kollagenen wie COL1 durch das Erkennen des Kollagen-typischen GVMGFO-Motivs (O = Hydroxyprolin) [138].

DDR1 bindet das GVMGFO-Motiv erst im dimerisierten Zustand [139]. Diese Dimerisierung erfolgt Ligand-unabhängig und stellt damit einen für RTKs untypischen Mechanismus dar [130]. Tripel-helikale, fibrilläre Kollagene wie COL1 werden von DDR1 und DDR2 gleichermaßen als Ligand erkannt [139], während nicht-fibrilläre Kollagene teilweise nur von DDR1 (z.B. COL4, COL5, COL6, COL8) gebunden werden können [140, 141]. DDR2 kann nur von fibrillären Kollagenen (COL1, COL3 COL10) aktiviert werden [140]. Dabei wurde bei DDR1 die für die Kollagenbindung relevanten Aminosäuren (Ser52, Thr57, Arg105, Lys112, Ser175) in drei von vier extrazellulären *loops* durch Mutagenese-Studien identifiziert [142]. Nach Ligandbindung wird DDR1 durch laterale Assoziation der Dimere autophosphoryliert. Diese Phosphorylierung tritt im Gegensatz zu anderen RTKs verzögert auf (Stunden) und kann bis zu mehreren Tagen bestehen [129, 143]. Dabei scheinen vor allem, ähnlich wie bei den Integrinen, Src-Kinasen eine wichtige Rolle zu spielen [144, 145]. Außerdem kommt es im Gegensatz zu anderen RTKs nicht zu Internalisierungsvorgängen.

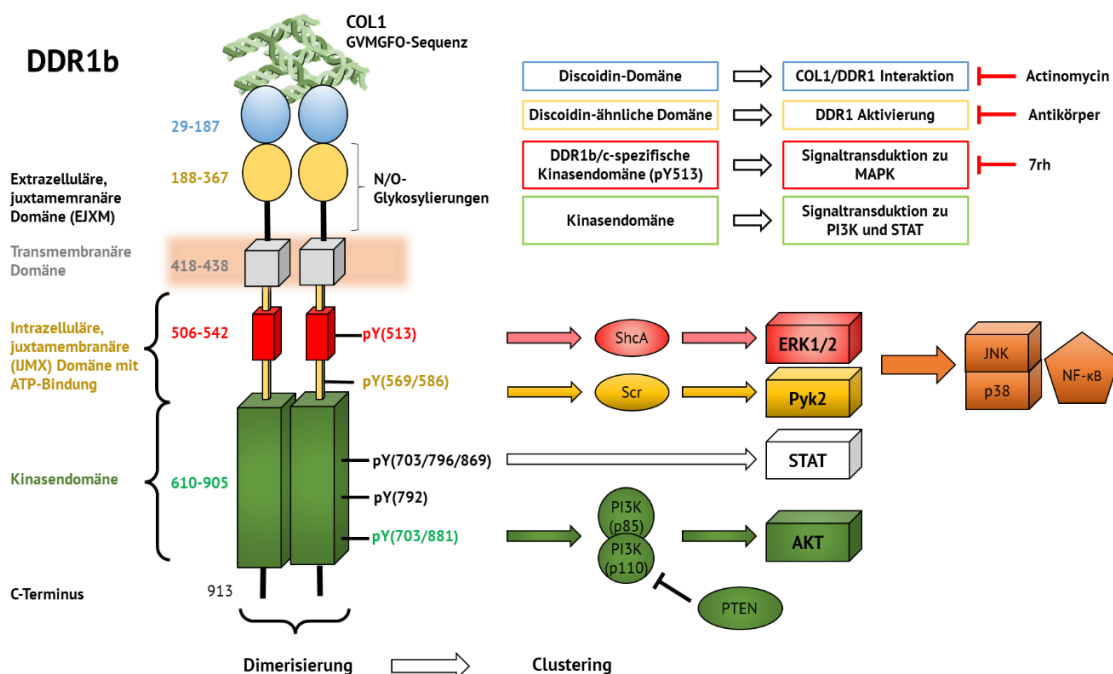


Abb. 2.11 Aufbau des Discoidin Domain Rezeptor 1 (DDR1b). Diese transmembranäre RTK besteht intrazellulär aus einer Kinase-Domäne und der IJXM-Region. Extrazellulär erstrecken sich EJXM-Regionen, DS-Domänen und *DS-like*-Domänen. Die Discoidin-Domäne bindet COL1, die Discoidin-ähnliche Domäne sorgt für die Aktivierung, während die verschiedenen Kinasefunktionen im IJXM und Kinasendomäne Signalkaskaden wie MAPK und PI3K aktivieren [146, 147]. DDR1b unterscheidet sich hier von der häufigen Variante DDR1a durch die 37 Aminosäuren in der IJXM-Region, über die die MAPK-Signalkaskade aktiviert werden kann. Abb. selbst erstellt nach [126].

Die DS-like- und EJXM-Region sind nicht direkt an der Kollagenbindung beteiligt. Insbesondere die DS-like-Region ist jedoch wichtig für die Aktivierung der Rezeptoren. So konnte ein allosterisch blockierender Antikörper, dessen Epitop in der DS-like-Region lag, die Aktivierung von DDR1 verhindern ohne die Kollagenbindung selbst zu beeinflussen [148]. Darüber hinaus konnte jeweils in DDR1 und DDR2 eine Mutation in der DS-like-Region festgestellt werden, bei der eine konstitutiv erhöhte Aktivität der Rezeptoren ausgeprägt ist (DDR1: N211Q [149]; DDR2: N213Q [126]). Weitere Differenzierungen können extrazellulär durch verschiedenste O- und N-Glykosylierungen dieser beiden extrazellulären Regionen vermittelt werden.

DDR1 und DDR2 bestehen aus einer intrazellulären juxtamembranären (IJXM) Region und einer Kinase-Domäne. Über deren Tyrosin-Phosphatierungsstellen können Signalkaskaden ausgelöst werden. Die Splicing-Varianten von DDR1 unterscheiden sich in den intrazellulären Regionen und werden in die Kinase-aktiven Rezeptoren a, b und c und die Kinase-defizienten und damit inaktiven Isoformen d und e eingeteilt. DDR2 besitzt keine Splicing-Varianten bzw. Isoformen.

Während das aktive DDR1a über die intrazellulären Phosphorylierungsstellen mit der p85-Untereinheit der PI3K (über Y659/586/703/881) sowie über mit STAT-Signalmolekülen (über Y543/547/703/796/797/869) interagieren kann, können die Rezeptoren DDR1b und DDR1c über eine weitere Kinase-Region aus 37 Aminosäuren innerhalb der IJXM-Region über Y513 das Adaptorprotein ShcA und somit GRB2 phosphorylieren und damit den MAPK-Signalweg aktivieren [130, 150]. Interessanterweise kann DDR1 über Y484 eine RasGAP binden, einen negativen Regulator von Ras und damit der MAPK-Kaskade [150]. Dies spiegelt die teilweise konträren Forschungsergebnisse der Literatur wider. DDR1c hat noch weitere sechs Aminosäuren in der Kinase-Domäne, die funktionell aber keinen Unterschied zu DDR1b machen. Eine Interaktion über die IJXM-Region mit Src und Pyk bei allen drei Varianten möglich, wodurch MAPK und AKT-Signalwege zusätzlich aktiviert werden können [145]. Zusätzlich kann in der IJXM eine Interaktion mit Nck2 erfolgen (Y484/569/586) wodurch analog zu anderen RTKs eine direkte Interaktion mit Integrinen über ILK möglich ist, was die funktionellen Wechselwirkungen zwischen den beiden Rezeptorklassen begünstigt [114].

Obwohl bereits viele Signalmoleküle wie z.B. PI3K von DDR2 identifiziert wurden [151], ist das einzig nachgewiesene Adapterprotein ShcA [152]. Dies kann mit Src wechselwirken, was eine Involvierung des MAPK nahelegt [145].

Die Regulation von DDR1 ist komplex und benötigt weitere Aufklärung. So kann DDR1 durch Stress p53-abhängig [153, 154], durch EMT-Veränderungen [155] und durch Proliferationssignale wie das MAPK-*signaling* induziert werden [153, 156, 157]. Dabei ist diese Aktivierung durch MAPK auf verschiedenen Wegen beschrieben. In T-Zellen konnte eine direkte Aktivierung von MAPK und AKT die Expression von DDR1 erhöhen [156], während in Lungenfibroblasten die Bindung von COL1 über DDR2 eine Aktivierung von ERK1/2 auslöste, die wiederum über PEA3 DDR1 hochregulierte [157]. Weiterhin konnte ein eigener positiver Feedback-Mechanismus in MCF-7 Brustkrebs- und HCT116 Kolonkrebszellen postuliert werden, indem die Expression von DDR1 durch MAPK *signaling* erhöht wurde [153].

Die Bindung zu COL1 über DDR1 ist immer von einer Wechselwirkung zwischen ITGB1 und DDR1 geprägt [158], obwohl die Rezeptoren unabhängig voneinander aktiviert werden [159]. Dabei ist es abhängig vom Krebsgewebe und dem Stadium der Entartung, ob diese Wechselwirkung kooperativ oder antagonistisch wirkt [127].

Zu anderen RTKs wie ErbB2/ErbB3 demonstriert DDR1 ein dynamisches Gleichgewicht, sowohl physiologisch in gesundem Brustgewebe als auch pathogen bei Brustkrebs [160]. Der Einfluss von DDR1 im gesunden Gewebe wird auch deutlich, da eine *knockout* Maus bei DDR1-Defizienz Probleme mit dem Brustgewebe entwickelt [161].

Die Wichtigkeit von DDR1 und DDR2 bei Karzinogenese von Brustkrebs wird durch die Eignung als prognostischer Biomarker klar, sowie als mögliche Zielstruktur zu antineoplastischer Therapie. DDR1 wird signifikant vermehrt in Brusttumorgewebe exprimiert [162]. Die Anwesenheit von DDR1 kann bei TNBC den Effekt von Immunzellen reduzieren, und *in vivo* konnten DDR1-blockierende Antikörper sogar ein Tumorwachstum reduzieren [162]. Ein Abbau von DDR1 in TNBC per MicroRNA war mit einer verringerten Proliferation und Migration korreliert [163]. Bei Mammakarzinomen und insbesondere TNBC gilt eine Deregulation von DDR1 und DDR2 als schlechte Prognose [164]. Hier war eine hohe Expression von DDR2 mit mesenchyalem Charakter bzw. dem TNBC-Status und einer schlechten Prognose korreliert.

2.5. Onkogene Signalkaskaden

2.5.1. MAPK

Die MAPK-Signalkaskade dient der Transduktion eines extrazellulären Stimulus klassischerweise über RTKs zum Zellkern und steuert dadurch Zellfunktionen wie Differenzierung, Proliferation, Metabolismus, Überleben und Genexpressionen. Neben den drei atypischen Gruppen (ERK3/4, ERK7 und NLK, [165]) werden folgende vier klassische MAPK-Familien ERK1/2, p38 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$), JNK1/2/3 und ERK5 voneinander unterschieden [166].

Jede MAP-Kinase (MAPK, Ser/Thr) besitzt vorgeschaltet eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK, Thr/Tyr) und eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK, Ser/Thr), die jeweils Phosphatreste sukzessive weitergeben (**Abb. 2.12**, in rot). Die MAPKKK werden meist durch G-Proteine der Ras/Rho-Familie (GTPasen) nach deren Aktivierung durch RTKs oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) initial phosphoryliert auf Basis von extrazellulären Stimuli [167].

Nach der Ligandbindung eines Wachstumsfaktors (z.B. EGF) durch die entsprechende RTK (z.B. EGFR) kommt es zur Autophosphorylierung der RTK und nachfolgend zur Interaktion mit einem Protein mit *Src homology 2* (SH2)-Domäne, z.B. Grb2 [168]. Diese Adaptorproteine besitzen SH3-Domänen, über die ein Komplex mit SOS gebildet werden kann. SOS ist ein *guanosine triphosphate exchange factor* (GEF), der durch Konformationsänderung einen Austausch von GDP gegen GTP innerhalb der GTPase katalysiert. Unter hydrolytischer Spaltung von GTP kann die GTPase (z.B. Ras) eine MAPKKK (z.B. A-Raf, B-Raf, Raf-1) phosphorylieren. Diese wiederum phosphoryliert eine MAPKK (z.B. MEK1/2 an Serin und Threonin), welche daraufhin MAPK aktiviert (z.B. ERK1/2 an Tyrosin und Threonin). Um die volle Aktivität der MAPK zu erreichen, muss die MAPK am Threonin- und Tyrosin-Rest in der konservierten Sequenz Thr-X-Tyr (bei ERK1/2: Thr-Glu-Tyr) phosphoryliert werden. Diese Sequenz liegt im *activation loop* in der Kinasen-Subdomäne VIII der MAPK und ist für die enzymatische Aktivität der MAPK essenziell.

Die aktivierten MAPKs können in den Zellkern wandern und dort Transkriptionsfaktoren wie Fos, Jun, CREB und Myc phosphorylieren und damit direkten Einfluss auf die Zellfunktionen ausüben. Sie können aber auch im Zytosol direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen ausführen, sodass viele Quervernetzungen zu anderen Signalkaskaden möglich sind [168].

2.5.2. PI3K/AKT/mTOR

Neben dem MAPK Signalweg ist die Aktivierung von PI3K-AKT-mTOR die wichtigste zelluläre Möglichkeit, Überlebenssignale zu vermitteln. Im Zentrum steht die Lipid-Kinase Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphorylieren kann [169]. Die PI3K wird analog des in 2.5.1 beschriebenen MAPK-Signalwegs über Stimulation von RTKs mit Wachstumsfaktoren und/oder GTPasen (z.B. Ras) aktiviert, d.h. phosphoryliert.

Die PI3K der bekanntesten Klasse IA ist ein heterodimeres Enzym, welches aus einer regulatorischen p85 und einer katalytischen p110 Untereinheit besteht [170]. PI3K bindet über die SH2-Domänen von p85 an Phosphotyrosin-Stellen von aktivierten, membranständigen RTKs und rekrutiert die katalytische p110 Untereinheit. An der Membran erlangt die nun aktive PI3K Zugang zum Edukt PIP₂ als Bestandteil der Zellmembran und katalysiert die Bildung von PIP₃ (**Abb. 2.12** grün). Das resultierende Signalmolekül PIP₃ bleibt an der Zellmembran verankert und Effektorproteine wie AKT (Proteinkinase B) mit PH-Domäne können an die Membran diffundieren und Bindungen mit PIP₃ eingehen.

AKT ist eine Ser/Thr-Kinase, welche nach Bindung zu PIP₃ initial und partiell durch PDK1 an T308 und anschließend durch z.B. PDK2 oder ILK an S473 phosphoryliert wird. Dadurch wird AKT aktiviert und löst sich von der Membran. Aktiviertes AKT phosphoryliert wiederum seine Substrat-Proteine FOXO oder mTOR und fördert damit Zellüberleben und Proliferation. Die Kinase mTOR hat wiederum zahlreiche Substrate wie S6K1.

In Tumorzellen ist PI3K häufig durch *gain of function* Mutationen von PIK3CA aktiviert [171]. Dies sind Mutationen wie H1047R, die die Interaktion von PI3K mit der Zellmembran erhöhen und die Interaktion mit Ras vereinfachen [172] oder E542K/E545K (z.B. in MCF-7 Zellen [173, 174]), die die Phosphorylierung von AKT begünstigen [175]. Zusätzlich kann die tumorsuppressive Wirkung der Phosphatase PTEN über hydrolytische Abspaltung der 3-Phosphatgruppe von PIP₃ durch *loss of function* Mutationen vermindert sein. Innerhalb einer Meta-Analyse wurde schlussgefolgert, dass PIK3CA und PTEN Platz 2 und 3 der meisten Mutationen in den Krebserkrankungen ausmacht [176]. Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 exprimieren beide den funktionierenden Wildtyp der Phosphatase PTEN [174, 177, 178].

2.5.3. Wechselwirkung zwischen Integrinen und RTKs (DDR1 und EGFR)

Wechselwirkungen zwischen den Adhäsionsrezeptoren und RTKs sind individuell je nach Zelltyp. DDR1 aktiviert analog zu Integrin $\alpha_2\beta_1$ parallele Signalwege wie MAPK [179]. Das für die Mechano-signalkaskade-involvierte p130CAS kann sowohl von der Integrin-assoziierten FAK, als auch durch Pyk2 von DDR1 aktiviert werden und damit bspw. JNK aktivieren und EMT fördern [180]. In der gleichen Mechanoaktivierung existieren Fälle, in denen sich die zelluläre Antwort der beiden Rezeptoren widerspricht. Während DDR1 zur Inhibition von Cdc42 und damit der Zellausbreitung führt [181], aktiviert Integrin $\alpha_2\beta_1$ das gleiche Molekül.

Integrine, DDR1 und die RTKs haben gemeinsamen Zugriff auf die *survival pathways* (Abb. 2.12). Die MAPK-Aktivierung erfolgt über das Adaptorprotein ShcA bzw. Grb2, während PI3K direkt an die Kinase-Regionen oder FAK bindet. An dieser Stelle sei das ITGB4 als Sonderfall erwähnt, welches durch seinen verlängerten zytoplasmatischen Teil ohne die Hilfe von FAK *downstream* ShcA/Gbr2 pY(1510/1526) oder PI3K pY(1494) rekrutieren kann [182]. Integrin und RTKs sind intrazellulär über die ILK, PINCH und Nck2 verbunden, was direkte Kompensationen induzieren und bspw. zur Entstehung von Resistenzen führen kann [183], was im Fall der Gefitinib-Resistenz in NSCLC beschrieben ist [184].

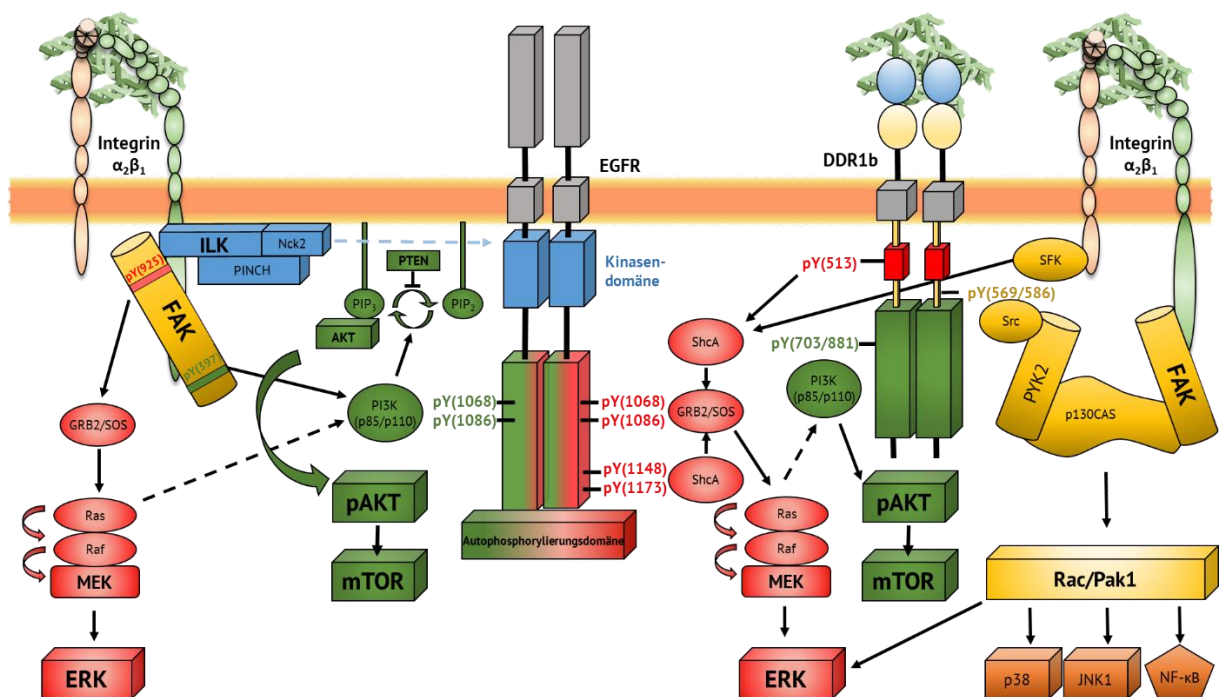


Abb. 2.12 Crosstalk zwischen RTKs (z.B. EGFR) sowie den Adhäsionsrezeptoren DDR1 und Integrin $\alpha_2\beta_1$.

2.5.4. Regulationsmechanismen der Mikroumgebung auf onkogene Signalkaskaden

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, wird die Mikroumgebung hauptsächlich bestimmt durch [66]:

- Die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix und Rigidität
- Lösliche (Wachstums-)Faktoren (autokrin oder parakrin teilweise durch CAFs)
- Die Vaskularisierung und Sauerstoffgehalt bzw. Hypoxie

Diese Bestandteile der Mikroumgebung stehen in einem dynamischen Gleichgewicht ([66], **Abb. 2.13**). Entartete Zellen können sich unter Beteiligung von Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs) ihre Mikroumgebung selbst auf- und umbauen. Diese Umbauprozesse sind von positiven Rückkopplungsmechanismen geprägt, die es pharmakologisch zu inhibieren gilt.

EZM-Proteine aktivieren die Rezeptorklassen der Integrine und DDRs und damit deren verbundenen Signalwege PI3K/AKT/mTOR und MAPK. In Abhängigkeit des zellulären Rezeptorprofils haben EZM-Proteine unterschiedliche Effekte. COL1 bewirkt in Brustkrebs neben ERK1/2 [185] auch JNK und c-Jun [186] Aktivierung. Neben den EZM-Proteinen besteht die Möglichkeit der Zell-Zell-Interaktion über die Basallamina (Laminin-1) und Integrin $\alpha_6\beta_4$ und der damit verbundenen Aktivierung von NF-KB [187]. Durch die Aktivierung der Signalkaskaden sowohl in Krebszellen und Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs) kann es wiederum zur verstärkten Bildung von EZM-Proteinen oder deren vermehrten Umbau (z.B. durch MMPs oder Heparanase) kommen. Diese Prozess wird als Fibrose bezeichnet [188].

Die Quantität und Quervernetzung spielen wiederum eine Rolle für die Rigidität der Matrix. Diese ist über die mechanosensitiven Signale mit Apoptose und Überleben korreliert. PI3K wird durch fokale Adhäsionskomplexe ausgelöst und durch erhöhte Matrixrigidität aktiviert. Dies geschieht über die erhöhte Expression von miR-18a und der damit verbundenen negativen Regulation von PTEN, was zu einer Aktivierung von PI3K führt [189]. FAK reagiert mechanosensitiv und kann, begünstigt durch den Integrin-EGFR- und Rho/ROCK/myosin-*crosstalk*, die MAPK Signalkaskade aktivieren [190]. wobei auch inhibitorische Effekte von FAK beschrieben sind [191]. ROCK (RhoA-activated kinase) kann das Zellüberleben über die Zellzyklus-assoziierten Proteine cyclin-dependent kinase 2 und cyclin E, sowie über MAPK verbessern [192]. Im Gegensatz dazu kann ROCK die PI3K jedoch über die Aktivierung von

PTEN negativ beeinflussen und neben der Aktivierung von Caspasen als apoptotisches Signal fungieren [192]. Neben dem vermehrten Überleben durch Fibrose auf Basis der Signalkaskaden kann die physikalischen Barrierefunktion des durch Fibrose gebildeten Gewebes Zellen direkt gegen Wirkstoffe abschirmen und damit eine Resistenz durch verminderte Wirkstoffpenetration erreichen.

Die erhöhten Dichte der EZM durch Fibrose führt neben der erhöhten Rigidität zu einem partiellen Sauerstoffmangel der von der vermehrten Matrix umschlossenen Zellen. Diese daraus resultierenden hypoxischen Bedingungen können verschiedenste zelluläre Effekte aktivieren. Die meisten hypoxischen Signalkaskaden basieren auf dem Transkriptionsfaktor HIF-1 α . Physiologisch liegt HIF-1 α an einem von zwei Prolin-Resten durch die HIF-Prolylhydroxylase hydroxyliert vor. Diese Hydroxylierung führt zu einer Ubiquitinylierung durch die von-Hippel-Lindau- Ubiquitin-Ligase (VHL) und damit zu einem proteasomalen Abbau. Die Hydroxylase benötigt Sauerstoff als Co-Faktor und kann ihre physiologische Funktion bei Sauerstoffmangel nicht wahrnehmen. HIF-1 α wird folglich nicht abgebaut und kann in den Zellkern wandern. Dort bildet es ein Heterodimer mit HIF-1 β , welches am *hypoxia-response element* (HRE) in der Promoter-Region vieler Gene bindet und so vielseitige Überlebensmechanismen initiieren. So kann über eine verstärkte Expression der Hexokinase vermehrt Glykolyse stattfinden, wodurch der pH-Wert reduziert wird, was die Wirkstoffverfügbarkeit im Gewebe reduziert. Eine vermehrte Expression von Snail, Zeb1 und Twist sorgt für EMT-Vorgänge, die wiederum Effluxpumpen wie P-gp induzieren, welche teilweise selbst durch HIF-1 α verstärkt exprimiert werden. Anti-apoptotische Moleküle wie Survivin werden durch HIF-1 α gebildet [193], pro-apoptotische Moleküle wie BAX, BID und die Aktivität von Caspasen reduziert [194]. NF- κ B wird über HIF-1 α aktiviert, wobei wiederum die Expression von HIF-1 α abhängig ist von NF- κ B, AKT und MAPK [195]. Hypoxische Bedingungen erzeugen wiederum durch eine positive Rückkopplung eine Produktion von EZM-Substraten und die Bildung von MMPs und LOX, die Quervernetzungen im Gewebe begünstigen und Signalkaskaden aktivieren [196].

Viele der parakrinen (Wachstums-) Faktoren wie EGF, IGF oder TGF- β beeinflussen onkogene Signalwegen direkt, die mit einer Chemoresistenz positiv korreliert sind. Daher sind die zugrundeliegenden Hauptmechanismen PI3K/AKT und MAPK ähnlich ineinander verwoben

und damit allenfalls artifiziell voneinander zu differenzieren. Viele der Signalkaskaden führen in ihrer Konsequenz wiederum zu einer vermehrten Ausschüttung von parakrinen Faktoren im Sinne einer positiven Verstärkung. Dies kann autokrin und parakrin durch Krebszellen oder Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) erfolgen. Darüber hinaus ist STAT3 ein bekannter proliferationsfördernder, pro-angiogenetischer und anti-apoptotischer Transkriptionsfaktor, der neben verschiedenen Interleukinen (IL-6, IL-10) auch von dem MAPK Signalweg infolge von Aktivierung bspw. über die Bindung von EGF und EGFR aktiviert werden kann [197]. Neben STAT3 und MAPK kann EGF über EGFR den AKT Signalweg aktivieren. Um einen *switch* zwischen den Signalwegen zu verhindern und sie gleichermaßen zu bekämpfen, zielt man therapeutisch nicht auf einen dieser Wege, sondern versucht mittels EGFR-Inhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib eine duale pan-Inhibition dieser beiden Signalwege zu erzeugen [48].

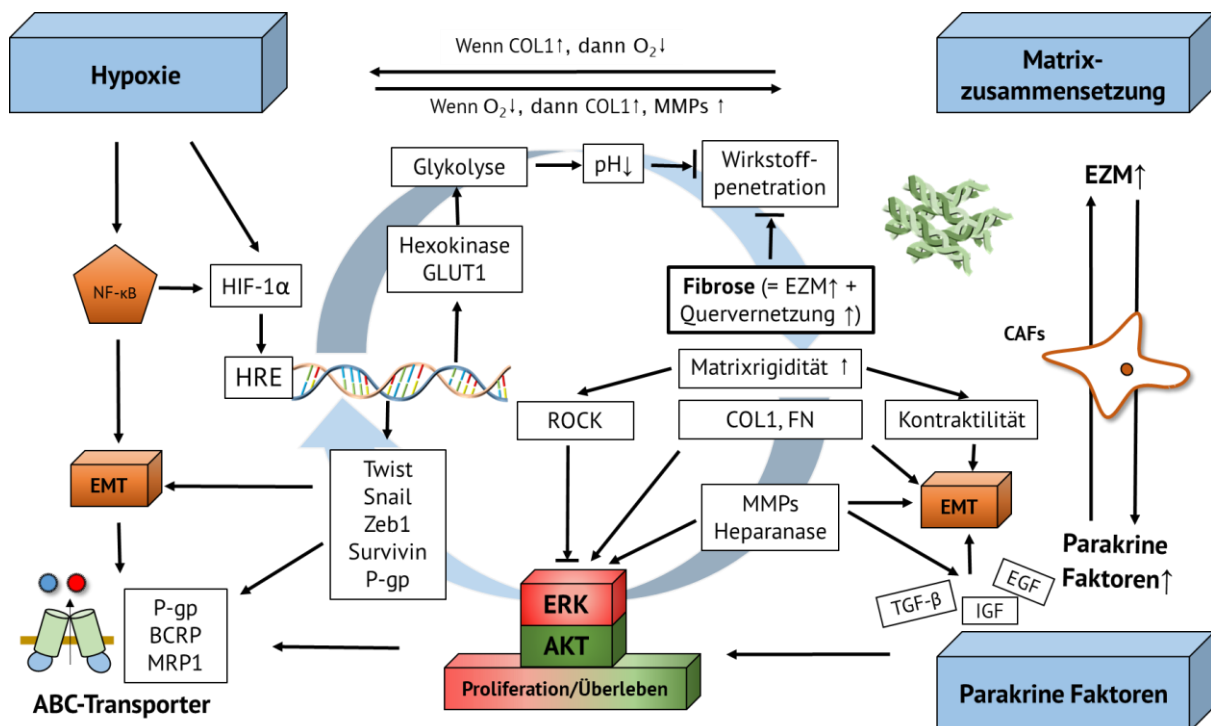


Abb. 2.13 Zusammenhang zwischen der EZM und Chemoresistenz-Mechanismen (selbst erstellt und modifiziert nach [66]). Hypoxie, Matrixzusammensetzung und parakrine Faktoren stehen in einem dynamischen Gleichgewicht, teilweise unter der Beteiligung von krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs). Diese Prozesse begünstigen den Prozess einer vermehrten Ausbildung von EZM (Fibrose) und damit zu vermehrten onkogenen Überlebensprozessen wie ERK/AKT-Aktivierung oder EMT und daraus basierend Resistenzmechanismen wie die Expression von Effluxpumpen wie die ABC-Transportproteine.

2.6. Reduktion der Wirkstoffkonzentration

Zellen können die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration und damit deren Wirkung aktiv durch die Regulation von EZM, abbauenden Enzymen oder Influx- und Efflux-Transportproteinen reduzieren [66]. Aus der Blutbahn können Wirkstoffe ins Gewebe und damit in die Krebszellen diffundieren ([66], **Abb. 2.14**). Dies kann einerseits durch passive Diffusion lipophiler Moleküle über die Zellmembran oder aktiv über Influxproteine geschehen. So kann Cisplatin als lipophiler Komplex die Lipiddoppelschicht entweder direkt überwinden, es ist aber auch Substrat des Influx-Transporters CTR1. Diese initiale Aufnahme kann durch hypoxischen Bedingungen und EZM erschwert sein. Sauerstoffmangel führt zu einer Reduktion des pH-Wertes und damit der Protonierung schwacher Basen. Die damit einhergehende positive Ladung von Wirkstoffen kann zu einer stärkeren Wechselwirkung mit negativ geladenen EZM-Proteinen, wie polysulfatierten Heparansulfaten führen und diese vor Zelleintritt binden. Durch die verstärkte Hydrophilie der positiv geladenen Wirkstoffmoleküle wird zusätzlich die passive Diffusion über die Zellmembran erschwert. Für Mitoxantron wurde eine solche Wirkungsreduktion bereits demonstriert [198]. Hypoxische Bedingungen können allerdings auch über das HIF-1 α *signaling* direkt den Efflux per ABC-Transporter (Kap. 2.6.1) aktivieren.

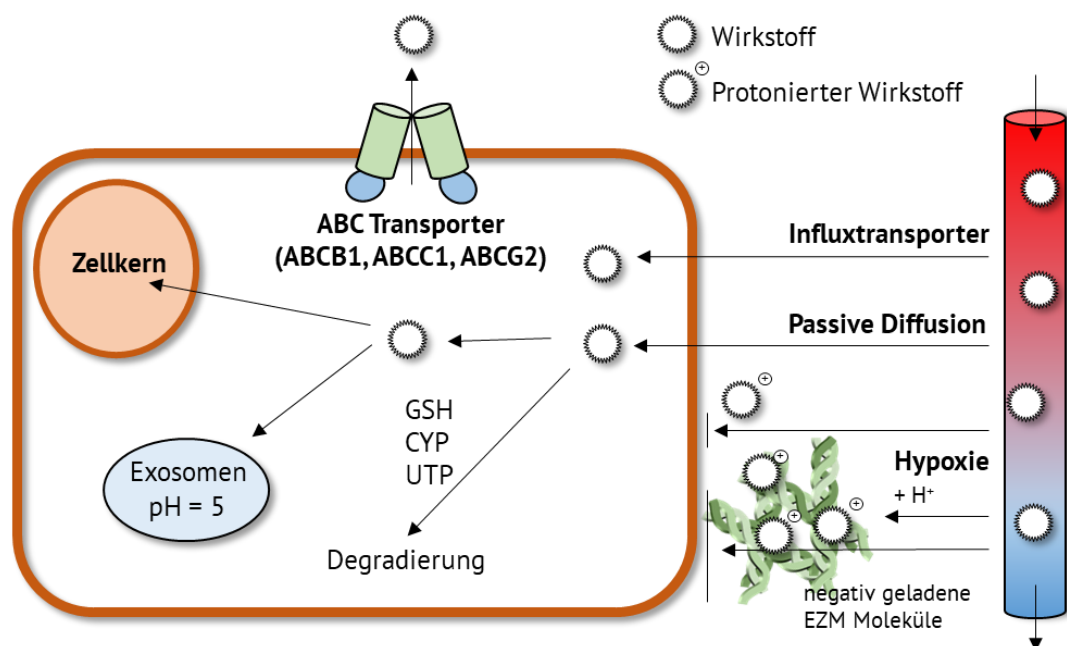


Abb. 2.14 Übersicht zur Verteilung von Wirkstoffen innerhalb der Zellen und Mechanismen zur Reduktion von Wirkstoffkonzentrationen innerhalb der Zellen (selbst erstellt und modifiziert nach [66]).

Intrazelluläre Substrate können durch Enzyme wie CYP metabolisiert oder durch Transferasen an GSH gekoppelt und inaktiviert werden. So wird Cisplatin durch die Glutathion-S-transferase mit GSH gekoppelt und als Substrat des ABC-Transporters MRP2 erkannt. Die Wirkstoffe können sich in sauren Endosomen anreichern und inaktiviert werden, da z.B. Zytostatika ihre Wirkung im Nucleus oder Zytoplasma entfalten.

2.6.1. ABC-Transporter

ABC-Transporter stellen eine Gruppe von transmembranären Effluxpumpen dar [199]. Neben physiologischen Funktionen sind ABC-Transporter an der Entstehung von Therapieresistenzen beteiligt, da sie die intrazelluläre Konzentration eines Pharmakons (z.B. Zytostatikum) effektiv vermindern. Der Transport dieser Moleküle erfolgt aktiv, d.h. unter ATP-Hydrolyse gegen einen Konzentrationsgradienten. Die Proteine weisen mehrere lipophile Transmembran-Domänen (TMD) und intrazelluläre, hydrophile Nukleotid-Binde-Domänen (NBD) auf (Abb. 2.15a). Das Substrat bindet an den Transporter in seiner zytosolisch geöffneten Konformation. Durch Bindung von zwei ATP-Molekülen an die zwei NBDs kommt es zu einer strukturellen Änderung des Transporters in eine extrazellulär geöffnete Konformation, die das Substrat in den extrazellulären Bereich überführt. Durch Hydrolyse der ATP-Moleküle wechselt der ABC-Transporter wieder in seine nach innen geöffnete Form.

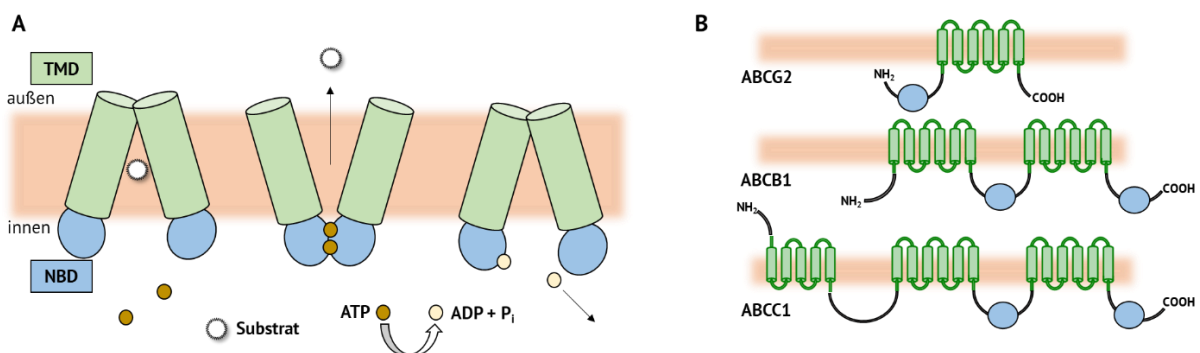


Abb. 2.15 Mechanismus und Aufbau von ABC-Transportern. **A)** Der Efflux-Mechanismus erfolgt durch Wechsel von einer nach innen geöffneten Konformation in eine nach außen geöffnete Form unter ATP-Hydrolyse. **B)** Aufbau der drei für diese Arbeit wichtigen ABC-Transporter ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP-1) und ABCG2 (BCRP). TMD = Transmembranäre Domäne, NBD = Nukleotid-Binde-Domäne (selbst erstellt und modifiziert nach [199]).

Der pharmazeutisch wichtigsten Vertreter dieser Gruppe – das P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1) gilt als Vermittler der *multi-drug resistance* (MDR). Besondere Relevanz für die Krebstherapie bergen aber noch die ABC-Transporter MRP1 (ABCC1) und BCRP (ABCG2). Alle drei Transporter unterscheiden sich deutlich in ihrer Struktur (**Abb. 2.15b**). P-gp weist 12 TMDs und MRP1 17 TMDs mit jeweils 2 NBDs auf. BCRP besteht aus nur sechs TMDs mit einer NBD [200] und muss zur Transporterfunktion ein Homodimer aus mindestens zwei BCRP-Moleküle bilden.

Die strukturellen Differenzen bewirken unterschiedliche Affinitäten zu den Substraten, sodass P-gp überwiegend neutrale und positiv geladene hydrophobe Substanzen erkennt, MRP1 anionische (Glutathion-) Konjugate ausschleust und BCRP Mitoxantron und hydrophobe, amphiphile Substanzen transportiert [200]. Dabei kann ein Molekül meist von mehreren, sich gegenseitig kompensierenden ABC-Transportern erkannt werden. Dies stellt eine Herausforderung für eine pharmakologische Therapie dar.

ABC-Transporter können neben einer direkten Interaktion mit modulierenden Substraten auch beeinflusst werden durch ([63], **Abb. 2.16**):

- Regulation der Proteinexpression über Transkription, Translation oder Degradierung
- Lokalisierung der Transporter in der Membran (*trafficking*) und Abbau
- Posttranslationale Modifikationen durch Phosphorylierungen und Proteine

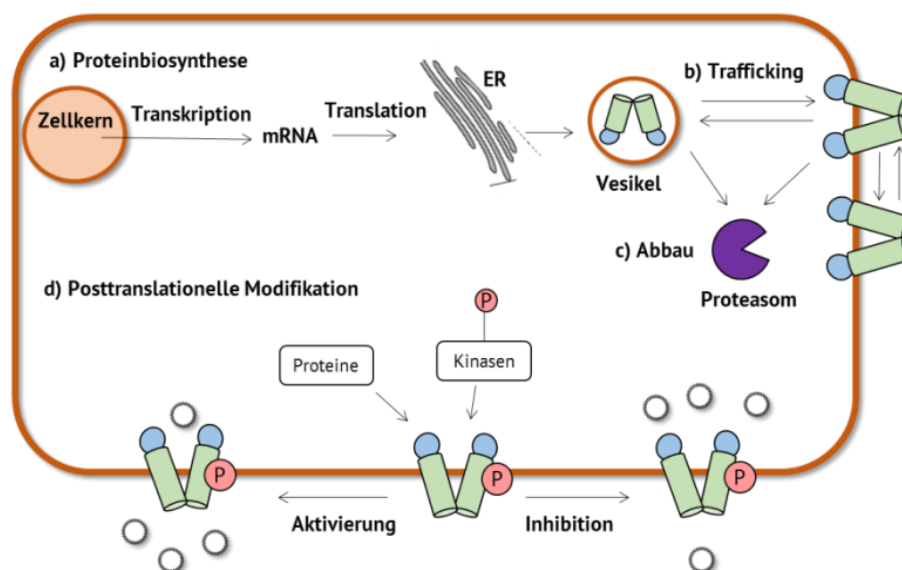


Abb. 2.16 Proteinbiosynthese, *trafficking*, Abbau und posttranslationale Modifikationen von ABC-Transportern (selbst erstellt und modifiziert nach [63]).

2.6.2. Einfluss der Mikroumgebung auf die Wirkstoffverfügbarkeit

Hypoxische Bedingungen sorgen über die Bildung von HIF-1 α für eine Aktivierung der HRE-Region vieler Gene und damit unter anderem für eine vermehrte Exprimierung von Hexokinase und GLUT1 [66]. Eine solche HRE-Region wurde auch in der Promoter-Region von P-gp entdeckt. Hypoxie kann also eine direkte Aktivierung von P-gp bewirken, was bislang in Kolorektalkarzinomen [147], Prostatakarzinom-Sphäroiden [201] und in Brustkrebszellen [202] untersucht wurden. Weiterhin wird die Wirkung der Zytostatika durch Hypoxie abgeschwächt, da hypoxische Zellen weniger proliferieren, wodurch der Effekt von Zytostatika abgeschwächt wird, deren Wirkung auf der Zellteilung basiert [203].

Die EZM-Bestandteile fungieren unter anderem als physikalische Barriere, daher ist die qualitative Zusammensetzung entscheidend. So wurde bei der Diffusion von Immunglobulin G eine sterische Hinderung durch Kollagen festgestellt, die durch Zugabe von Kollagenasen reduziert wurden [204]. Lovitt *et al.* haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass Brustkrebszellen in einer physiologischen 3D-Matrix eine Wirkstoffreduktion aufweisen, während sich dieser Effekt in einem artifiziellen Hydrogels nicht auftrat [205].

Ein direkter Einfluss der Rigidität auf die Wirkstoffverfügbarkeit ist unerforscht, aber wahrscheinlich, da die Rigidität über die Signalkaskaden wie PI3K/AKT, wnt und MAPK [206, 207] auch eine Wirkung auf die Expression von ABC-Transportern entfalten kann [208, 209].

In den hämatopoetischen Zelllinien Jurkat und HSB2 [210] sowie T-cell acute lymphoblastic leukemia- Zellen (T-ALL) [211] konnte eine COL1-vermittelte Hochregulierung des ABC-Transporters MRP1 über MAPK nachgewiesen werden. In soliden und leukämischen Tumoren konnte die MAPK-Abhängigkeit von BCRP [212], MRP1 [213] oder P-gp [214], sowie in geringerem Umfang die AKT-Abhängigkeit demonstriert werden [215–217]. Dabei kann die Wirkung über direkte Protein-Interaktionen (z.B. ERK1/2) und Phosphorylierungen geschehen, oder über die Involvierung von Transkriptionsfaktoren wie Myc [218].

Darüber hinaus ist die ABC-Transporter-Aktivität abhängig von der Zellorganisation, z.B. durch fokale Adhäsionen oder das Zytoskelett. So ist MRP1 bspw. abhängig von der Organisation von Aktin [210, 219].

2.7. Stammzellcharakter durch Epitheliale-Mesenchymale-Transition

2.7.1. Grundlagen der Epitheliale-Mesenchymalen-Transition (EMT)

Zellen können dynamisch zwischen einem epithelialen und einem mesenchymalen, stammzellähnlichen Zustand alternieren, wodurch sich Zellen äußeren Umständen anpassen können. Dieser Übergang wird Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) genannt. Die EMT kann in drei Unterarten eingeteilt werden, von denen Typ 2 mit Fibrose und Typ 3 mit Malignität, Invasion und Metastasenbildung assoziiert ist [220, 221]. Um den Zustand einer Zelle zu charakterisieren, existieren EMT-Marker [222]. Im epithelialen Zustand dominieren Zell-Zell-Interaktionen durch E-Cadherin und ITGB4 (Abb. 2.17). Mesenchymale Zellen zeichnen sich dagegen durch Proteine wie ITGB1, Vimentin und durch die Produktion von EZM-Molekülen (z.B. COL1) aus, um Kontakt zur EZM aufbauen. DDR1 (epithelial) und DDR2 (mesenchymal) werden als EMT Marker diskutiert ([91, 223]. Weiterhin sind mesenchymale Zellen durch eine verstärkte Expression von ABC-Transportern gekennzeichnet [224]. So wurde der mesenchymale Marker Snail in MCF-7 mit P-gp [225] und BCRP [226] korreliert. Besonders im Brustgewebe werden mesenchymale Eigenschaften mit einer schlechten Prognose assoziiert [227–229], im basalen bzw. TNBC Subtyp treten diese Eigenschaften gehäuft mit KRAS-Mutationen auf [228]. EMT ist eine Grundvoraussetzung für das Auftreten von *homing* und *minimal residual disease* [230, 231] aufgrund des resultierenden Stammzellphänotyps.

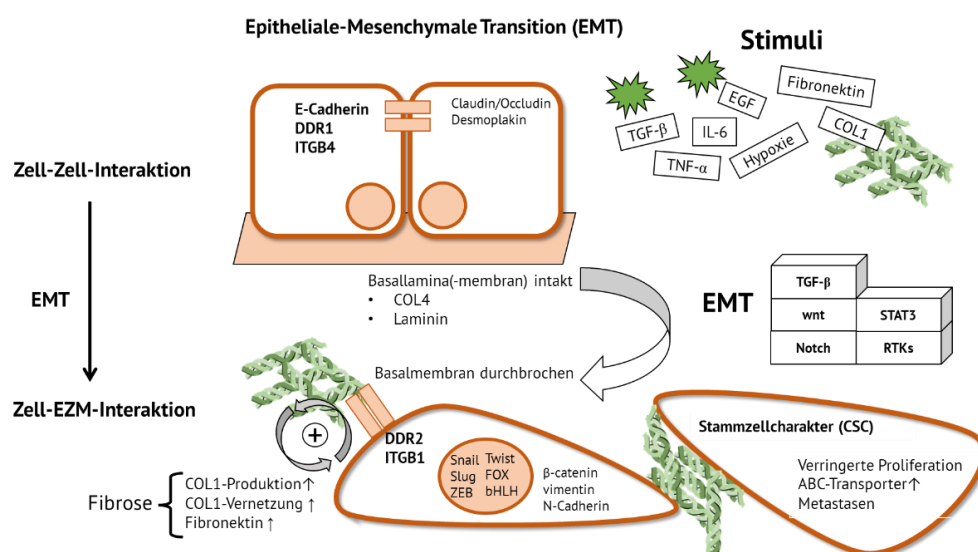


Abb. 2.17 Übersicht zur Epitheliale – Mesenchymalen Transition (selbst erstellt und modifiziert nach [66, 232]).

2.7.2. Einfluss der Mikroumgebung auf die EMT

Viele der für die EMT wichtigen Proteine wie ZEB1-1, Snail, Slug und Twist besitzen eine HRE-Region und werden daher von HIF-1 α beeinflusst [66]. Dabei können diese Proteine EMT und überlebensfördernde Signale auslösen. Hypoxische Bedingungen können die EZM durch die Expression von Enzymen (z.B. PLOD2) verändern, was wiederum die EMT begünstigt [233].

Die Interaktion von Zellen mit ihrer EZM über Integrine und andere CAMs führt meist zu einer EMT. Epitheliale Zellen in gesundem Gewebe haben Kontakt zur Basalmembran und weniger zum COL1- bzw. FN-haltigen Stroma. Erst bei der Entartung verliert die Membran ihre Integrität und es kommt zur Interaktion mit COL1 und FN und damit zur onkogenen EMT [233]. COL1 kann bspw. in Ovarial- und Prostatakarzinomen durch eine Hochregulierung von Snail und Slug, sowie Reduktion von E-Cadherin eine EMT erzeugen [234]. Dabei beruht die E-Cadherin Herabregulation wahrscheinlich auf einer Interaktion mit $\alpha_1\beta_2$ Integrinen und dadurch β -Catenin in den Nucleus transloziert. E-Cadherin kann durch MMPs abgebaut werden, welche wiederum ein Fragment sE-Cad freisetzen, welches EMT begünstigt [235]. Eine rigide Matrix kann weiterhin Twist in Brustkrebs erhöhen [236] oder über Rac1b Snail verstärken [237].

EMT kann durch verschiedene parakrine Wachstumsfaktoren und Zytokine verursacht werden. Exemplarisch seien hier die Mediatoren TGF- β , EGF, IL-6 und IL-8 genannt [238, 239]. TGF- β kann von Tumorzellen oder CAFs sezerniert werden und andere Zellen somit zur EMT bringen. Außerdem kann TGF- β CAFs aktivieren, die wiederum mehr TGF- β sezernieren. Das weitere *signaling* von TGF- β umfasst eine Vielzahl von Kaskaden, z.B. PI3K/AKT, MAPK oder Rho GTPase. EGF kann neben der klassischen Aktivierung von RTKs auch die Endozytose von E-Cadherin und die vermehrte Expression von Snail und Twist bewirken [240].

Mesenchymale, stammzellartige Krebszellen (CSCs) weisen eine höhere Aktivität von ABC-Transportern [241] auf. Daher gilt bspw. BCRP als ein EMT-Marker [242, 243]. Da an anderer Stelle eine MAPK-Abhängigkeit von ABC-Transportern beschrieben wurde, passt dies kohärent ins Bild der MAPK vermittelten EMT.

2.8. Mögliche Angriffspunkte innerhalb der EM-DR

Auf Basis des dynamischen Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Faktoren der Tumormikroumgebung können folgende möglichen Angriffspunkte festgehalten werden:

- Fibrose (vermehrtes COL1, FN)
- Adhäsionsrezeptoren (ITGA1B1/ITGA2B1 mit FAK/ILK, DDR1/DDR2)
- Rezeptortyrosinkinasen (EGFR, DDR1/DDR2)
- Onkogene Signalkaskaden (MAPK, AKT)
- ABC-Transporter
- EMT (CSC-Phänotyp verhindern)

Dabei stellt die Fibrose das bisher am wenigsten forschte *target* dar, bei dem nur vereinzelt *in vivo* Daten vorliegen [244]. Eine Inhibition der COL1-Biosynthese und deren modulierende Enzyme wie Lysyloxidase (LOX) führte bereits in einem Brustkrebs-Mausmodell zu einem reduzierten Tumorwachstum und einer geringeren COL-Quervernetzung bzw. Rigidität [83]. Hierbei wird beim Menschen *in vivo* möglicherweise systemische Nebenwirkungen limitierend sein. Eine Degradierung von COL1 ist denkbar über das Dosieren von z.B. MMPs. Hier wurde Frauen mit Uterusmyomen gezielt eine Collagenase zum Abbau von COL1 und COL3 in den gutartigen Tumor injiziert [245] Dieser Kollagen-Abbau führte zu einer Reduktion von Matrixrigidität, Zellproliferation und Hippo/YAP-Signalkaskade.

Die Studienlage der direkten Inhibition von ABC-Transportern wird hier nicht dargelegt, da eine Überlegenheit der ABC-Transporter-Modulatoren aufgrund von Nebenwirkungen bisher nicht in klinischen Studien gezeigt worden ist. Dies lässt sich nicht auf das fehlende Potential dieser Arzneistoffgruppe, sondern vielmehr auf das Studiendesign zurückführen, in deren Zuge selten der Transporter-Status der Patient*Innen erhoben wurde [246, 247]. Durch den Trend zur personalisierten Medizin kann in Zukunft verstärkt mit der Erhebung solcher Daten gerechnet werden. Dies ist insbesondere wichtig, da die Fähigkeit zur direkten Inhibition von ABC-Transportern oft als Nebeneffekt von *small molecules* auftritt. Auch die posttranslationalen Modifikationen der ABC-Proteine können durch verschiedenste Inhibitoren beeinflusst werden. Eine Hemmung der EMT wird meist parallel zu Hemmung von onkogenen Signalkaskaden erzeugt [248] und soll hier nicht explizit adressiert werden.

2.8.1. Integrin β_1

Integrine als Angriffspunkt zur Therapie verschiedenster Krankheiten werden bereits lange diskutiert. Trotz Einsatz in Immun- und Entzündungsprozessen (z.B. Natalizumab gegen Multiple Sklerose) konnte bislang noch kein Integrinantagonist als antineoplastischer Wirkstoff etabliert werden [105, 249–251]. Trotzdem kann die Interferenz vor allem mit dem zentralen ITGB1, welches die größte Integrin-Familie mit 12 der 18 möglichen α -Untereinheiten bildet, als therapeutisches Zielstruktur angesehen werden [252]. Oft und besonders in Brustkrebs ist ITGB1 überexprimiert [253]. ITGB1 kann daher als prognostischer Faktor betrachtet werden, da dessen Expression mit einem geringeren Überleben bei invasivem Brustkrebs korreliert [254]. Dabei scheint dies nach einer aktuellen Meta-Analyse gewebeabhängig zu sein, da diese Korrelation nur bei Brust und Lunge in Bezug auf das Gesamtüberleben und bei Brust und Pankreas auf das *disease free survival* und nicht beispielsweise bei Melanomzellen gegeben ist [255]. In Brustkrebs korrelieren die Expression der β_1 -Integrine mit der Metastasierung [255].

In vivo Versuche mit transgenen Mäusen konnten für Brustkrebszellen darstellen, dass eine Verringerung des ITGB1 zu einem verringerten Tumorwachstum und zu reduzierten Metastasen führt [256, 257]. Interessanterweise kann diese Erkenntnis nicht auf Prostatakarzinomzellen *in vivo* übertragen werden, die stattdessen eine erhöhte Progression der Tumore entwickeln [258]. Ein *knockout* des α_2 -Integrins führte zu keinem Effekt auf das Tumorwachstum von Brustkrebszellen, jedoch zu einer höheren Letalität durch erhöhte Metastasenbildung [259]. *In vitro* führte eine Blockade des ITGB1 zu einer Abnahme der Malignität in Ovarialkarzinomzellen [260], sowie zur Apoptose und verringertem Wachstum in 3D-Kulturen von Brustkrebszellen [261]

Insgesamt belegt die Forschungs- und Studienlage in den meisten Fällen eine Korrelation zwischen erhöhter ITGB1-Expression und einer aggressiveren Krebserkrankung. Allerdings bietet eine direkte Interaktion durch pharmakologische oder gentechnische Veränderung des ITGB1 ein sehr heterogenes Bild, bei welchem sich der Therapieansatz positiv oder negativ auf die Tumorzellen und damit das Gesamtüberleben auswirken kann.

Ein interessanter Ansatz ist dagegen, die Kombination mit einer (klassischen) zytostatischen Therapie auszunutzen und durch synergistische Effekte durch gezielte Modulation des Integrin-Signalwegs [262].

Der Einfluss von ITGB1 auf die Resistenz gegenüber einer Chemotherapie gilt als bekannt [263–271]. Dabei wurden entsprechende Beobachtungen unabhängig von Entität und eingesetztem Zytostatikum gemacht. So konnten in soliden Tumoren wie Brustkrebs ITGB1-abhängige Sensitivierungen gegen Paclitaxel [264] oder Tamoxifen [271] untersucht werden, wogegen die meisten Tumore hämatopoetischer Natur waren [269]. Die Vielseitigkeit der Effekte beweist die Wichtigkeit von ITGB1, allerdings lässt sich kein allgemeiner Mechanismus postulieren, worunter die Planung klinischer Studien leidet [105].

Innerhalb der Integrin-Signalkaskade ist FAK als Kinasefunktion der nicht-enzymatischen Integrine Zielstruktur und Teil der Forschung. Die mRNA-Level von FAK sind in Ovarialkarzinom um 37% [272] und invasiven Mammakarzinom um 26% [273] erhöht, was mit der erhöhten ITGB1-Expression korreliert. Transgene Mausexperimente haben einen Zusammenhang zwischen einer verringerten FAK-Expression und einer reduzierten Tumorstadium und einer Metastasenbildung festgestellt [274–276].

Die Anwendung von FAK-Inhibitoren ist vielversprechend und führte bereits zu ersten klinischen Studien [277–279]. Dabei demonstriert insbesondere ein dualer FAK/Pyk2-Inhibitor PF-562,271 deutliche antitumorale Eigenschaften *in vivo* [280]. Die Verwendung von FAK-Inhibitor VS-4718 und Paclitaxel/Cisplatin in Kombination führte in Ovarialkarzinomzellen zu einer Sensitivierung [281].

Eine neuere Studie u.a. in MDA-MB-231 Zellen verwendete die Kombination des Checkpoint-Inhibitors Atezolizumab mit dem FAK Inhibitor PF573,228 in TNBC [282], da es eine positive Korrelation zwischen PD-L1-mRNA und FAK-mRNA gab. Die Verwendung des Checkpoint-Inhibitors sorgte bereits für eine Verringerung der Phosphorylierung von pFAK(Y397), aber die Kombination mit dem Inhibitor reduzierte sowohl Motilität und Invasivität drastisch.

Die ILK als zweite Integrin-gebundene Kinase ist aber insbesondere als Bindeglied zu RTKs als therapeutisches Ziel interessant und wird in Kapitel 2.8.2 genauer beschrieben.

2.8.2. Onkogene Signalkaskaden über Rezeptortyrosinkinasen

Die Interaktion von Integrinen mit RTKs stellt innerhalb des Integrin-*signalings* einen besonders vielversprechenden Ansatz dar [266]. In dieser Arbeit wird auf die Interaktion zwischen EGFR und ITGB1 fokussiert, da EGFR in MDA-MB-231-Zellen sicher nachgewiesen werden kann. Der EGFR besitzt für die Therapie von NSCLC die höchste Relevanz. Demnach besteht die größte mechanistische Aufklärung im Krankheitsbild des Lungenkrebses.

In NSCLC kann eine Gefitinib-Resistenz mit einer erhöhten Expression von ITGB1 korreliert werden [184], unabhängig davon, ob eine T790M-EGFR-Mutation vorliegt. Eine Deletion des ITGB1 in A549 sorgte für eine geringere Aktivierung von EGFR mit reduzierter Proliferation und erhöhter Sensitivität zu Cisplatin und Gefitinib *in vitro* und *in vivo* [263]. Interessanterweise war trotz mangelnder Aktivierung die Gesamtmenge von EGFR an der Zelloberfläche erhöht. In einer anderen Studie konnte ein ähnlicher Effekt durch simultane Inhibition von EGFR und ITGB1 zu einer der Monohemmung überlegenen Radiosensitivierung in HNSCC Zellen gefunden werden [283]. In NSCLC wurde das ITGB1/Src/AKT *signaling* als Grund für die Gefitinib- [284] und Erlotinib-Resistenz [285] erkannt. Interessanterweise waren dort die Integrin β_1 , α_2 , α_5 und Src, sowie die grundsätzlichen Adhäsionsfähigkeiten erhöht. Durch den *knockout* von ITGB1 wurde die Sensitivität wiederhergestellt. Patienten, die Erlotinib oder Gefitinib erhielten, zeigten deutliche Erhöhungen der genannten Proteine.

Die Studien zu Brustkrebs postulieren ähnliche Mechanismen und postulieren wie in NSCLC einen ITGB1/RTK-Aktivierungskomplex allerdings nur in Bezug auf HER2 [286]. Weiterführende Studien zur Interaktion von ITGB1 und EGFR in Brustkrebs und deren therapeutische Nutzbarkeit werden benötigt.

Dagegen ist die Interaktion von Integrin $\alpha_6\beta_4$ mit EGFR bekannt. EGFR begünstigt die Phosphorylierung der intrazellulären Signal-Domäne von IGTB4, an welcher sich Signalmoleküle anlagern können [287, 288], was die Tumorprogression begünstigt [289]. Umgekehrt kann ITGB4 die Aktivierung von EGFR, besonders im Brustgewebe begünstigen [290].

Bei der Wechselwirkung zwischen RTK wie EGFR und dem Integrin ist außerdem die ans Integrin gebundenen ILK beteiligt, die über PINCH und Nck2 (**Abb. 2.12**) an die RTK bindet

[291]. Eine hohe Expression von ILK ist wie ITGB1 mit verstärkter Tumoraggressivität von Brustkrebs verbunden [292]. ILK kann selbst in Signal-Prozesse involviert sein, wie z.B. PI3K-AKT in Brustkrebs [293] oder ERK1/2 in Magenkrebs [294]. In Erlotinib-insensitiven Hepatokarzinomzellen konnte dargelegt werden, dass die Inaktivierung von ILK eine deutliche Sensitivierung *in vitro* und *in vivo* erreicht [295]. A549 Lungenkarzinomzellen können durch die Inaktivierung von ILK mittels RNA gegenüber Cisplatin sensitiviert werden [296]. In der Gemcitabin-resistenten Variante dieser Zelllinie konnte eine erhöhte ILK-Expression gemessen werden [297]. Durch *knockdown* von ILK konnte nicht nur die Gemcitabin-Resistenz verringert werden, auch die Überexpression der Efflux-Pumpe MRP1 wurde reduziert [297].

Die Aktivierung von RTKs führt zwangsläufig zur Aktivierung einer oder mehrerer Überlebenskaskaden. MAPK-Signalkaskaden sind ein vielversprechender Ansatzpunkt für Chemosensitivierungen [168] und können dabei durch normale physiologische Vorgänge aktiviert werden, aber auch durch aktivierende Mutationen von Proteinen wie KRAS und BRAF. Die Proteine sind vor allem der Melanoma [298], seltener in Brustkrebs mutiert (z.B. in MDA-MB-231 [299]). Dennoch ist EGFR und das MAPK *signaling* besonders bei TNBC als theoretischer, potentieller Angriffspunkt beschrieben [300–302], aufgrund deren verstärkter Expression und Aktivierung trotz mangelnder Mutation [303, 304]. Klinische Studien haben den MAPK-Inhibitoren bislang allerdings keinen Zusatznutzen bei TNBC bescheinigt.

MAP-Kinasen phosphorylieren in letzter Konsequenz einige Transkriptionsfaktoren, von denen bspw. Myc und CREB besonders interessant sind. Myc ist in beispielsweise in der Regulation von ABC-Transportern involviert [218], welche direkt über ERK1/2 beeinflusst werden kann [63]. CREB stellt als Protein eine umstrittene Zielstruktur dar, über dessen Eigenschaften diskutiert wird, sodass der therapeutische Nutzen unklar ist [305, 306].

2.8.3. DDR1

Während in den letzten Jahren vermehrt die physiologischen Funktionen von DDR1 und (DDR2) sowie deren Signalkaskaden untersucht und teilweise aufgeklärt wurden, ist der Einfluss auf Chemoresistenz bislang wenig beschrieben und kein allgemeiner Mechanismus postuliert [307]. Nichtsdestotrotz sind die bisherigen Erkenntnisse vielversprechend, z.B. in Melanom [308], Brustkrebs [223], Lungen- [309] und Ovarialkarzinom [310].

Im Brustgewebe lässt die Expression von DDR1 eine Rolle der RTK in der Tumorprogression vermuten. Vor allem das erhöhte Brustkrebsrisiko bei vermehrtem Aufkommen von Kollagen (hohe mammographische Dichte) ist in Bezug auf die Aktivierung von DDR1 durch COL1 zu betrachten. So wurde bei Brustkrebszellen eine Chemoresistenz-Entwicklung durch Induktion von COX-2 über die Involvierung der NF- κ B-Signalkaskade festgestellt [154].

Im Ovarialkarzinom konnte eine Cisplatinresistenz und -exposition mit einer phänomenologischen Erhöhung von DDR1 korreliert werden, obwohl keine mechanistische Funktion postuliert werden konnte [310]. Eine ähnliche Erhöhung wurde in KRAS-mutierten Lungenkarzinomzellen unter einer Cisplatintherapie festgestellt, bei der die gleichzeitige DDR1-Inhibition zu einem synergistischen Effekt führte [309].

In Melanomzellen korreliert eine erhöhte DDR1-Expression mit einer BRAF-Mutation. Diese Zellen konnten durch einen DDR1-Inhibitor DDR1-IN-1 *in vitro*, *ex vivo* und in Xenografts signifikant in ihrer Proliferation gestört werden [311]. Die pharmakologische Inhibition und genetische Entfernung von DDR1 und DDR2 konnte in Melanomzellen eine matrixvermittelte Resistenz gegen BRAF-Inhibition überwinden [312].

Bislang wurden nur wenige selektive DDR1-Inhibitoren synthetisiert. Interessanterweise besitzen viele klassische Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib, Nilotinib und Dasatinib unselektiv die Eigenschaft, DDR1 und DDR2 zu inhibieren. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Vergangenheit in der Therapie mit RTKIs die Inhibition von DDR1 einen nicht als solchen identifizierten positiven Nebeneffekt darstellte [313].

Die Rolle von DDR1 in Sensitivierungsstrategien und Resistenzüberwindungen benötigt weitere Aufklärung. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten.

3. Zielsetzung der Arbeit

Intrinsische und *de novo* Chemoresistenz sind mit Ausnahme der Immuntherapie ein universelles Problem einer jeden pharmakologischen-onkologischen Behandlung. Dabei hat sich in Studien besonders bei hämatopoetischen Zellen die Interaktion mit Komponenten der Extrazellulärmatrix als zentral für das Auftreten von (resistenten) Rezidiven erwiesen. Obwohl Veränderungen in der Struktur der EZM wie Fibrosen oder hohe mammographische Dichte mit einem höheren Risiko für Brustkrebs korrelieren, fehlt es an Studien, die diese *de novo* Resistenz *in vitro* abbilden. In den meisten Fällen wird auf bestehende, durch Inkubation mit Zytostatika artifiziell hervorgerufene, manifeste Resistenzen zurückgegriffen, die im klinischen Bild, wenn überhaupt, erst nach einer durchgeführten Zytostatika-Behandlung auftreten. Isolierte Resistenzen sind aufgrund verschiedenster Therapieschemata unwahrscheinlich. Für eine mögliche Behandlung des Patienten ist es umso wichtiger, allgemeine Mechanismen für das Auftreten von Resistenzen zu definieren, die in Abhängigkeit der individuellen Faktoren wie der EZM auftreten können. Dabei könnten die Matrixkomponenten und Adhäsionsrezeptoren als prognostischer Faktor für diese Mechanismen dienen. Damit könnte das Auftreten von Resistenzen und damit Rezidiven verhindert werden.

Um die Entstehung dieser matrixvermittelten *de novo* Resistenz abzubilden, ist das Ziel der Arbeit in folgende Fragestellungen gegliedert:

1. Führt die Interaktion von Brustkrebszellen mit EZM-Proteinen zu einer Veränderung der Sensitivität gegenüber Zytostatika?
2. Auf welchen Mechanismen bzw. phänomenologischen Grundlagen basiert diese Veränderung?
3. Über welche Rezeptoren und Signalkaskaden werden diese Mechanismen gesteuert?
4. Lassen sich diese Rezeptoren und Signalkaskaden adressieren / modulieren, um die Zellen zu sensitivieren?

4. Material

4.1. Zelllinien

4.1.1. Mammakarzinomzelllinien

In dieser Arbeit wurden die beiden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 untersucht, die sich in ihrer Morphologie und ihrem Proteom unterscheiden (**Tab. 4.1**).

MCF-7 stellen nicht-invasive, schwach metastasierende Mammakarzinomzellen des luminalen Gewebetyps mit epithelialem Charakter dar. Sie sind ER-positiv und sind damit eine Modellzelllinie für hormonabhängigen Brustkrebs. Bezüglich der DNA-Reparatur besitzen sie p53 in seiner nicht-mutierten Form.

MDA-MB-231-Zellen sind dendritisch-gestreckt wachsende, hoch-invasive und metastasierende Mammakarzinome. Sie besitzen einen basalen, mesenchymalen Phänotyp. Die Zellen exprimieren weder ER noch HER2 oder PR und sind damit eine Modellzelllinie für TNBC. Durch eine *gain of function*-Mutation (R280K) hat p53 die Funktion als Tumorsuppressor verloren [314] und wirkt sogar als Onkogen mutp53 [315]

Tab. 4.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten des Proteoms der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231

	Kriterium	MDA-MB-231	MCF-7	Referenz
Adhäsion	ITGA2	++	+	[316]
	ITGB1	+++	+	Siehe Abb. 6.22
Adhäsion/RTK	DDR1	+	+++	[316]
	DDR2	++	+	[316]
RTK	EGFR	++	+	[317]
	ER	-	+++	[316, 317]
Hormonstatus	HER2	-	+/-	[316, 317]
	PR	-	++	[316, 317]
EMT	Vimentin	+	-	[316, 317]
	E-Cadherin	-	+	[316, 317]
DNA-Reparatur	p53	+++	+	[318, 319]
		(mutp53(R280K))	(wt)	
MAPK	MAPK-Mutation	+	-	[299, 320]
		(KRAS (G13D) / BRAF (G464V))		
PI3K / AKT	PIK3CA	-	+	[174]
	PTEN	-	(E542K/E545K)	
			-	[174]

Über die Grundeigenschaften der beiden Zelllinien heraus wurden Modifikationen der beiden Zelllinien verwendet (**Tab. 4.2**).

Tab. 4.2 Verwendete Varianten der MCF-7 Zelllinien. (sc = scrambled, kd = knockdown)

Zelllinie	Varianten	Veränderung	Effekt
MCF-7	wt	Keine Veränderung	Keinen Effekt
	sc	Lentivirale Insertation von scrambled shRNA	MCF-7 Zellen mit Puromycin Resistenz
	ITGB1kd	Lentivirale Insertion von anti-ITGB1 shRNA	MCF-7 Zellen mit einem ITGB1 knockdown auf 21% von sc und Puromycinresistenz
MDA-MB-231	wt	Keine Veränderung	Keinen Effekt
	sc	Lentivirale Insertation von scrambled shRNA	MDA-MB-231 Zellen mit Puromycin Resistenz
	ITGB1kd	Lentivirale Insertion von anti-ITGB1 shRNA	MDA-MB-231 Zellen mit einem ITGB1 knockdown auf 7,4% des sc und Puromycinresistenz
	mock	keine	Kontrollzelllinie zu HSPE Geschenk von Prof. Jin Pin Li
	HSPE	Einbau Fremd-DNA zur HPSE Exprimierung	Heparanase überexprimierend Geschenk von Prof. Jin Pin Li

Für die Herstellung wurde das folgende Plasmidsystem von Santa Cruz Biotechnology verwendet:

- sc Control shRNA Lentiviral Particles-A,
- Integrin β 1 shRNA (h) Lentiviral Particle: sc -35674 – V

4.1.2. Effluxtransporter überexprimierende Modelzelllinien

Im Zuge von ABC-Transporter Untersuchungen wurden auch ABC-Transporter überexprimierenden Zelllinien verwendet.

Tab. 4.3 ABC-Transporter überexprimierende Zelllinien

Parenteralzellen	Entität	Veränderung	Effekt
A2780adr	Ovarialkarzinom	Inkubiert mit Doxorubicin	ABCB1 überexprimierend
MDCKBCRP	Hundenieren	Insertion des ABCG2-Gens	ABCG2 überexprimierend
H69AR	Lungenkrebs	Inkubiert mit Doxorubicin	ABCC1 überexprimierend

4.2. Antikörper

4.2.1. Primäre Antikörper

Tab. 4.4 Verwendete primäre Antikörper (SCB = Santa Cruz Biotechnology, CST= Cell Signaling Technology)

	Protein	Epitop	Name	Eigenschaft	Hersteller	Anwendung
Intra- zelluläre Signal- moleküle	ERK-1/2	C-Terminus von ERK1/2		Kaninchen, polyklonal, IgG ₁	CST Frankfurt am Main	Western Blot
	p-ERK-1/2	p-Thr202/ pTyr204	E-4	Kaninchen, monoklonal IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
	pCREB	p-Ser133	10E9	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
	HSP27	Zentrale Region	F-4	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
	pHSP27	Ser82	B-3	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
	FAK	C-Terminus von FAK	C-20	Kaninchen, polyklonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
	pFAK	p-Y397	2D11	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
ABC- Transporter	MRP1	AS 918-924	QCRL- 1	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
	BCRP	AS 271-396	BXP-21	Maus, mono- klonal, IgG _{2a}	SCB Heidelberg	Western Blot
	P-gp/ MDR1	AS 1040- 1280	D11	Maus, mono- klonal, IgG _{2b}	SCB Heidelberg	Western Blot
RTKs	DDR1	Zentrale Region	D1G6	Kaninchen, monoklonal IgG ₁	CST Frankfurt am Main	Western Blot
	pDDR1	p-Y513	E1N8F	Kaninchen, monoklonal IgG ₁	CST Frankfurt am Main	Western Blot
	pEGFR	p-Tyr1068	15A2	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
Ober- flächen- protein	ICAM-1		BBA20	Fluorescein- gekoppelt	R&D Systems	FACS
EMT	Vimentin	Zentrale Region	V-9	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot
	E-Cadherin	AS 600-707 extrazellulär	G-10	Kaninchen, polyklonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	FACS
Integrine	Integrin β_1	Extra- zelluläre Domäne	P5D2	Maus, mono- klonal, IgG ₁	SCB Heidelberg	Western Blot FACS
	Integrin β_4	Zentrale Region	A9	Maus, mono- klonal, IgG _{2a}	SCB Heidelberg	Western Blot
	Integrin α_2	HT1080	P1H5	Maus, mono- klonal, IgG _{2b}	SCB Heidelberg	FACS
Loading control	GAPDH	Zentrale Region	GT239	Maus, mono- klonal, IgG _{2b}	Gene Tex Inc, Irvine, USA	Western Blot

4.2.2. Sekundäre Antikörper

Tab. 4.5 Übersicht der sekundären Antikörper

Antikörper	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
Donkey Anti-Mouse IgG	Maus-IgG	Esel, polyklonal, Alexa Fluor488	Abcam plc, Cambridge, UK
Donkey Anti-Rabbit IgG	Kaninchen-IgG	Esel, polyklonal, Alexa Fluor405	
mIgG κ BP	Maus-IgG κ Leichtketten	Bindungsprotein, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Goat Anti-Rabbit IgG	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal, HRP konjugiert	

4.3. Inhibitoren

Tab. 4.6 Verwendete Inhibitoren

	Bezeichnung	Zielstruktur	Hersteller
Inhibitoren intrazellulärer Strukturen	FAK 14 Inhibitor	Y397-Autophosphorylierungsstelle der FAK	Cayman Chemicals, Michigan, USA
	BEZ235 (Dactolisib)	PI3K/mTOR	Selleck Chemicals, München
	SCH772984	ERK1/2-Inhibition durch Inhibierung der Phosphorylierung des ERK-Substrates p90 ribosomal S6 Kinase	Hycultec GmbH, Beutelsbach
	U0126	Allosterischer Inhibitor von MEK1/2	Selleck Chemicals, München
	Trametinib	Inhibitor von MEK1/2	Selleck Chemicals, München
	666-15	Inhibiert die Bindung von CREB an das CREB-Bindeprotein (CBP)	Hycultec GmbH, Beutelsbach
	FiVe1	Vimentin-Inhibitor (FOXC2-inhibiting Vimentin effector 1)	Biotrend Chemikalien GmbH Köln
Blockade extrazellulärer Strukturen	P5D2	Blockierender anti-ITGB1 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
	Ronaparstat	Hemmt Heparanase	Geschenk von Israel Vlodawski
	Tinzaparin	Hemmt Blutgerinnung	Fertigarzneimittel
ABC-Transporter-Inhibitoren	WKX24/XR9577	P-gp- und MRP1-Inhibitor	Synthetisiert im AK Wiese, Bonn
	WKX34	P-gp-Inhibitor	
	Ko143	BCRP-Inhibitor	AK Wiese Bonn
	Cyclosporin A	P-gp-Inhibitor	AK Wiese Bonn
RTK-Inhibitor	Gefitinib	EGFR-Inhibitor	LC laboarotries
	Erlotinib	EGFR-Inhibitor	LC laboarotries
	7rh	DDR1-Inhibitor	Sigma Aldrich

Material

Stimulantien

Klassische Zytostatika	Cisplatin	Zytostatikum	Merck, Darmstadt, German
	Doxorubicin	Zytostatikum	MEDAC
	Mitoxantron	Zytostatikum	Hexal AG, Holzkirchen

4.4. Stimulantien

Tab. 4.7 Verwendete Stimulantien für Oberflächenrezeptoren

	Bezeichnung	Zielstruktur	Hersteller
EZM	Kollagen Typ 1 (COL1) Aus dem Rattenschwanz	Integrin $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ und $\alpha_{11}\beta_1$ DDR1 und DDR2	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	Fibronectin (FN)	FN-bindende Integrine, siehe Abb. 2.8	Corning / Fisher Scientific GmbH
	Mangan(II)chlorid	Alle Integrine	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach

4.5. Kits

Tab. 4.8 Verwendete Kits.

Bezeichnung	Vertreiber
Human EGF Mini ABTS ELISA Development Kit	PeproTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA
Proteome Profiler Human sReceptor Array Non-hematopoietic	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array Kit	R&D systems, Minneapolis, MN, USA

4.6. Hergestellte Reagenzien

4.6.1. Zellkultur

Tab. 4.9 Verwendete Nährmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Nährmedium MCF-7	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5,0 mL
	DMEM-Nährmedium (Glucose 4,9 g/L)	500,0 mL
Nährmedium MDA-MB-231	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5,0 mL
	Na-Pyruvatlösung (100 mM)	5,0 mL
	DMEM-Nährmedium (Glucose 4,9 g/L)	500,0 mL
Selektionsmedium (Integrin β1 shRNA) MCF-7sc MCF-7kd	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5,0 mL
	Puromycin	0,3 μ g/mL
	DMEM-Nährmedium (Glucose 4,9 g/L)	500,0 mL
Selektionsmedium (Integrin β1 siRNA) MDA-MB-231sc MDA-MB-231kd	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5,0 mL
	Na-Pyruvatlösung (100 mM)	5,0 mL
	Puromycin	0,2 μ g/mL
Nährmedium A2780adr MDCKBCRP H69AR	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5,0 mL
	RPMI-Nährmedium	500,0 mL
Kryo-Medium	FKS	45,0 mL
	DMSO	5,0 mL

Material

Hergestellte Reagenzien

4.6.2. Stamm- und Arbeitslösungen**Tab. 4.10** Verwendete Stamm – und Arbeitslösungen

	Bezeichnung	Zusammensetzung	
Cisplatin	Cisplatin-Stammlösung (5 mM)	Cisplatin DPBS	15,0 mg ad 10,0 mL
	Cisplatin-Arbeitslösung (1 mM)	Cisplatin-Stammlösung (5 mM) DPBS	0,200 mL 0,800 mL
	Cisplatin-Arbeitslösung (3,2 mM)	Cisplatin-Stammlösung (5 mM) DPBS	0,631 mL 0,369 mL
Doxorubicin	Doxorubicin-HCl-Stammlösung (2 mg/ml (als HCl) = 3,45 mM)	Fertigarzneimittel	
	Doxorubicin-HCl-Arbeitslösung (3,2 mM)	Doxorubicin-Stammlösung DPBS	0,917 ml 0,083 ml
	Doxorubicin-HCl -Arbeitslösung (1 mM)	Doxorubicin-Stammlösung DPBS	0,290 ml 0,710 ml
	Doxorubicin-HCl -Arbeitslösung (30 µM)	Doxorubicin-Stammlösung DPBS	0,134 ml 19,866 ml
Mitoxantron	Mitoxantron-Stammlösung (4,50 mM)	Fertigarzneimittel	
	Mitoxantron-Arbeitslösung (3,2 mM)	Mitoxantron-Stammlösung DPBS	0,703 mL ad 1,0 mL
	Mitoxantron-Arbeitslösung (1 mM)	Mitoxantron-Stammlösung DPBS	0,222 mL ad 1,0 mL
	Mitoxantron-HCl -Arbeitslösung (30 µM)	Mitoxantron-Stammlösung DPBS	0,134 mL 19,866 mL
Mangan(II)chlorid	Mangan(II)chlorid-Stammlösung (100 mM)	Mangan(II)chlorid Purelab Plus®-Wasser	0,629 mg ad 50,0 mL
	Mangan(II)chlorid-Arbeitslösung (10 mM)	Mangan(II)chlorid- Stammlösung (100mM) Purelab Plus®-Wasser	5,0 mL ad 50,0 mL
FAK14	FAK14 Inhibitor- Stammlösung (1 mM)	FAK 14 Inhibitor Purelab Plus®-Wasser	2,84 mg ad 10,0 mL
Dactolisib (BEZ235)	BEZ235.Stammlösung (10 mM)	BEZ235	1 mg
		DMSO	0,213 mL
Gefitinib	Gefitinib-Stammlösung (22,38 mM)	Gefitinib DMSO	10 mg 1 mL
SCH772984	SCH772984-Stammlösung (10 mM)	SCH772984 DMSO	5,0 mg 851,0 µL
U0126	U0126-Stammlösung (58,6 mM)	U0126 DMSO	5,8 mg 1000,0 µL
666-15	666-15-Stammlösung (10 mM)	666-15 DMSO	5,0 mg 806,0 µL
7rh	7rh-Stammlösung (10 mM)	7rh DMSO	10 mg 1,830 mL
COL1 bzw. FN	COL1-Stammlösung	Siehe Kapitel 5.1.2 (abhängig von Art und Anzahl der zu beschichtenden Oberflächen)	

4.6.3. Western Blot

Tab. 4.11 Hergestellte Western Blot Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blocking-Lösung	Magermilchpulver TBS-T	5,0 g ad 100,0 mL
BSA-Lösung 0,5 %	BSA Natriumazid PBS-Puffer	0,25 g 0,05 g 50,0 mL
BSA-Lösung 1 %	BSA PBS-Puffer	0,50 g 50,0 mL
BSA-Lösung 3 %	BSA PBS-Puffer	1,50 g 50,0 mL
Elektrodenpuffer	Elektrodenpuffer 10x Aqua Millipore®	100,0 mL ad 1000 mL
Elektrodenpuffer 10x	Glycin TRIS-Base SDS Aqua Millipore®	72 g 15 g 5 g ad 500 mL
Ethanol 10%	Ethanol 96% PBS-Puffer	10,4 mL ad 100,0 mL
Glycin-Lösung (0,1 M)	Glycin PBS-Puffer	0,375 g 50,0 mL
Luminol-Peroxidlösung	Clarity Western Peroxid- Reagenz Clarity Western Luminol- Reagenz	4,0 mL 4,0 mL
Lysepuffer	PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L) Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X) Cell Extraction Buffer	34 µL 500 µL 10,0 mL
MTT-Reagenz (5 mg/mL)	MTT PBS-Puffer	50,0 mg ad 10,0 mL
Paraformaldehyd-Lösung 2 %	Paraformaldehyd PBS-Puffer	1,0 g 50,0 mL
PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)	PMSF DMSO	250 mg 4,783 mL
Proteinstandard-Lösung (0,2 mg/mL)	BSA Aqua Millipore®	2,0 mg ad 10,0 mL
Saponin-Stammlösung 1 %	Saponin PBS-Puffer	0,5 g 50,0 mL
Saponin-Lösung 0,01 %	Saponin-Stammlösung (1 %) PBS-Puffer	500,0 µL 50,0 mL

Material

Hergestellte Reagenzien

TBS	TBS 10× Aqua Millipore®	100,0 mL ad 1000,0 mL
TBS 10x	Natriumchlorid TRIS-Base Aqua Millipore® pH-Einstellung mit 1 M Salzsäure auf 7,3	40,0 g 6,060 g ad 500,0 mL
TBS-T	TBS 10× Tween™ 20 Aqua Millipore®	100,0 mL 2,0 mL ad 1000,0 mL
Transferpuffer	Transferpuffer 10× Aqua Millipore®	100 mL ad 1000 mL
Transferpuffer 10x	Glycin TRIS-Base Aqua Millipore®	72,0 g 15,0 g ad 500,0 mL
Triton-Stammlösung 0,1 %	Triton PBS-Puffer	50,0 µL 50,0 mL
Triton-Lösung 0,001 %	Triton-Stammlösung (0,1%) PBS-Puffer	500,0 µL 50,0 mL

4.6.4. Antikörperverdünnungen Western Blot

Tab. 4.12 Hergestellte Antikörper-Lösungen

Antikörperverdünnung/-stammlösung	Zusammensetzung	
Primäre Antikörper Lösung (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	β-Aktin (C4)	50 µL
	TBS-T (1x)	10,0 mL
Primäre Antikörper-Lösung Loading control GAPDH (1:20000)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	GAPDH (GT239)	0,5 µL
	TBS-T (1x)	10,0 mL
Sekundäre Antikörper-Lösung (1:10000)	Magermilchpulver	1,000 g
	Anti-mouse mIgGκ BP	1 µL
	Oder Anti-rabbit	
	Streptactin aus Precision Plus Protein™ WesternC™ Pack	0,5 µL
	TBS-T (1x)	20,0 mL

4.7. Verbrauchsmaterialien

Tab. 4.13 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CASY®cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Combitips advanced® (1,0 mL/0,5 mL/0,1 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
CytoOne® 96-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 24-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
Deckgläser Stärke No. 1, eckig	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Einmalspritzen Injekt® Solo (10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Injekt® Solo (20 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Filterpapier 50/PKG, Mini T/B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN® TGX™ stainfree	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroplatte, 96-Well, PS, V-Boden, klar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, schwarz	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, weiß	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Objektträger Stärke ca. 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen (1-10 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-200 µL), gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (101-1000 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand®, natur	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettier Reservoirs	Argos Technologies, Inc., Illinois, USA
Reagiergefäße (0,6 mL)	Corning B.V.Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen, 15 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Roti®-PVDF, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Material

Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen, 50 mL, 25 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 250 mL, 75 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 550 mL, 175 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 650 mL, 175 cm ² , CELLCOAT Collagen Type I	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Bacillo [®] AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Bovines Serum-Albumin, BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CASY [®] ton	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
Cell Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, Massachusetts, USA
CellTiter-Fluor [™]	Promega GmbH, Mannheim
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clarity [™] ECL Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Collagen I (Rattenschwanz)	Corning, New York, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM-Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, MTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
DPBS ohne Calcium und Magnesium, steril	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Ethanol 96 % (V/V)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Fötale Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FuGENE [®] HD Transfektionsreagenz	Promega GmbH, Mannheim
Gigasept [®] Instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Glo Lysis Buffer	Promega GmbH, Mannheim
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Halt [™] Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hygromycin B Gold	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Isopropanol 100 %	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Kupfersulfat-Pentahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Laemmli-Probenpuffer, 2× Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Laemmli-Probenpuffer, 4× Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Lithiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mangan(II)chlorid	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Melsept [®] SF	B. Braun AG, Melsungen

Methanol 99,9 %	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA
Natronlauge (1M)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Nuclear/Cytosol Extraction Kit	BioVision, Inc., San Francisco, USA
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Polybrene	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Puromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-CELL PBS/EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI-1640® Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Salzsäure, (1 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sera Plus	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
TRIS-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung 0,25%	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Tween™ 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

4.8. Software

Tab. 4.14 Verwendete Software

Software	Urheberrechte
Graphpad Prism (V. 6)	© GraphPad Software, La jolla, CA, USA
Microsoft Office 365 for Windows	©Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
ChemDraw® Prime Version 16.0.1.4	©PerkinElmer Informatics, Inc.
GuavaSoft™ 3.1	© Merck Millipore. Burlington, MA, USA
Zen	© Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen
Citavi 6	© Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Image Lab V6	©Bio-Rad Laboratories
Thermo Fluorskan Ascent TGA Evaluation	© Technoclone GmbH. Wien, Österreich

5. Methoden

5.1. Zellkultur

5.1.1. Passagierung

Um Zellkontaminationen zu vermeiden, werden alle Arbeiten der Zellkultur unter aseptischen Bedingungen durch Verwendung eines *laminar-air-flow*-Systems durchgeführt. Nur im Zuge von Versuchen, bei denen Zellen nicht weiterkultiviert wurden, kann auf diese aseptische Arbeitsweise verzichtet werden. Auf Mykoplasmen wurde regelmäßig mit DAPI-Färbung und PCR-Analyse getestet.

Kryokonservierte Zellen (Kap. 5.1.3) können nach Auftauen resuspendiert und in eine mit Nährmedium befüllte Zellkulturflasche überführt werden. Beide Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden in DMEM (Glucose: 4,5 g/L) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Es wurden 10% FKS, 10 IU/mL Penicillin und Streptomycin, sowie 2 mM L-Glutamin und im Falle von der MDA-MB-231-Zellen 1 mM Natriumpyruvat hinzugegeben. Die Zellen wurden bis zu einem Konfluenzgrad von 80-90% gezüchtet. Um einen Nährstoffmangel, gekennzeichnet durch einen Farbumschlag des im Nährmedium befindlichen Indikators Phenolrot, zu vermeiden, wurde alle 48 h das Medium ausgetauscht.

Zur Weiterkultivierung und je nach Art des nachfolgenden Versuchs wurde der konfluente Zellrasen mit einem der Oberfläche der Zellkulturflasche angemessenen Aliquot aus EDTA (0,2 g/L) oder EDTA plus Trypsin (0,025%) für 5-15 min bei 37 °C abgelöst. Dabei wird das für Adhäsionsrezeptoren essenzielle Ca²⁺ durch EDTA komplexiert und verschiedenste CAMs enzymatisch durch Trypsin gespalten. Im Kontext von Versuchen, bei denen CAMs relevant sind, darf Trypsin nicht angewendet werden. Anschließend wurden die Zellen des Zellrasens mittels Zellmedium aufgenommen, teilweise beschleunigt durch eine mechanische Erschütterung („Klopfen“). Die resultierende Zellsuspension wurde bei 1680 rpm und 4 °C für 4 min zentrifugiert um EDTA und/oder Trypsin zu entfernen und erneut resuspendiert. Die resultierende Lösung wurde mittels *CASY cell counter* gezählt (5.1.4) und ein Aliquot in weiterer Zellkulturflaschen zur Weiterkultivierung überführt bzw. für Versuche verwendet.

5.1.2. Coating

Diese Arbeit untersucht den Einfluss der EZM-Proteine auf Krebszellen. Um diese Matrix *in vitro* auf Zellkulturflaschen und in Multi-well-Platten darzustellen, wurde diese mit den entsprechenden Proteinen (z.B. COL1 oder FN) beschichtet. Dazu wurden diese zunächst gelöst oder eine bereits gelöste Substanz erworben. Je nach Konzentration dieser Lösung wird nun ein Teil nach Arbeitsanweisung des Herstellers in DPBS gelöst, sodass die resultierende Lösung auf die jeweilige Oberfläche bezogen eine resultierende Proteinmenge von 10 µg/cm² im Gefäß ergibt. Für die Beschichtung ist es dabei entscheidend, jeweils die vom Hersteller angegebenen Oberflächen der wells oder Flaschen zu kennen, sowie ein empirisches Volumen festzulegen, bei dem einerseits die gesamte zu beschichtende Oberfläche bedeckt ist, aber andererseits eine Verdunstung nicht zu lange dauert (bspw. 25 µL pro 96well). Diese Lösungen wurden anschließend unter *laminar air flow* offen verdunstet (Dauer ca. 4 h), mit DPBS gewaschen und anschließend mit Zellmedium bzw. Zellsuspension gefüllt.

5.1.3. Kryokonservierung

Dem Vorgang der Kryokonservierung geht das Herstellen einer Zellsuspension voraus. Das abzentrifugierte Zellpellet wird jedoch nicht in Nährmedium resuspendiert, sondern in einer mit 10% (V/V) DMSO versetzten FKS-Lösung. DMSO unterbindet die beim Einfrieren wässriger Lösungen entstehenden Wasserkristalle, die die Zellen mechanisch schädigen würden. Die nun gebildete Zellsuspension wird in Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst bei -80 °C, später in flüssigen Stickstoff eingefroren. Sämtliche Arbeiten, die mit kryokonservierten Zellen in Verbindung stehen, sollten in einem geringen Zeitfenster durchgeführt werden, um die toxische Wirkung von DMSO zu verhindern.

5.1.4. Zellzählung

Um die für einige Experimente benötigte exakte Zellzahl zu ermitteln, wird ein CASY® counter (Modell TT) verwendet. Der vorher durch einen Vortexer homogenisierten Zellsuspension

werden 20 μ L entnommen und in ein mit 10 mL durch filtriertes CASY[®]ton gefülltes CASY[®]cup überführt. Anschließend wird die Lösung am Zellzähler CASY[®] 1 Model TT vermessen.

Das Gerät stellt eine Entwicklung des *coulter counter* da. Das Grundprinzip beruht auf der Eigenschaft von Zellen als Isolator zu fungieren. Wird eine unbestimmte Zahl von Zellen durch eine Kapillare vereinzelt und anschließend durch ein elektrisches Feld geleitet, so erhöht sich der bestehende Widerstand in der Elektrolytlösung abhängig vom Zellvolumen. Durch das erhaltene Messsignal wird die Zellpopulation als Größenverteilung im Bereich von 0-50 μ m Durchmesser dargestellt. Dabei werden meist zwei Maxima der Zellenverteilung ersichtlich - eines im Bereich geringer Zellgröße und eines im Bereich mittlerer Zellgröße. Da davon auszugehen ist, dass es sich bei der geringen Zellgröße und abgestorbene Zelle handelt, wird nur der Bereich ab dem Minimum zwischen den beiden Peaks zur Zählung der vitalen Zellen verwendet. Dieser Bereich umfasst standardmäßig die Grenzen 8 μ m und 30 μ m, kann aber je nach Größenverteilung den Minima und Maxima angepasst werden. Die Peaks innerhalb der Grenzen werden als *viable cells* / mL angegeben, die Gesamtpeaks als *total cells* / mL. Aus diesen beiden Größen kann die *viability* [%] berechnet werden. Neben diesen Größen können Parameter wie der Mittelwert der Zellgröße [μ m] erfasst werden.

5.1.5. Lentiviraler shRNA basierter *knockdown* der Integrin β_1 -Untereinheit

Der *knockdown* von ITGB1 in der Zelllinie MCF-7 wurde von Dr. Bastian Jakubzig durchgeführt und wird in seiner Dissertation beschrieben [321].

Der *knockdown* des ITGB1 der Zelllinie MDA-MB-231 wurde unter S2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Die shRNA codierende Fremd-DNA wurde über lentivirale Partikel in das Zellgenom eingeführt. Neben der shRNA, die über eine Prozessierung zu siRNA und Bildung eines RISC-siRNA Komplexes einen Abbau der ITGB1-mRNA eine Herabregulierung des Proteins bewirkt, codiert das Plasmid auch eine Puromycinresistenz (**Abb. 5.1**). Puromycin ist ein Nukleosidantibiotikum, welches in Zellen ab einer bestimmten Konzentration aufgrund einer gestörten Proteinbiosynthese Apoptose auslöst und hier als Selektionsmarker verwendet wird. Die vermittelte Resistenz vermittelt den Zellen die Fähigkeit Puromycin-N-Acetyltransferase zu bilden, welches das Antibiotikum inaktiviert.

Im Vorfeld wurde die Grenzkonzentration ermittelt, bei der die Zellen durch Puromycin abgetötet werden. Es wurde eine Konzentration von 0,1 µg/mL bis 7,5 µg/mL getestet. Nach drei Tagen waren Zellen bei 0,3 µg/mL noch vital, analog nach 5 Tagen bei 0,2 µg/mL und nach 7 Tagen bei 0,1 µg/mL. Da nach 7 Tagen ab 0,2 µg/mL bereits alle Zellen nekrotisch waren, wurde diese Konzentration für die spätere Selektion festgelegt.

Für die die Transduktion wurden 2000 Zellen in eine 96well-Platte überführt und mit dem polykationischen Reagenz Polybrene in einer Konzentration von 5 µg/100 µL beimpft. Diese Struktur richtet sich gegen die negativ geladenen Glykokalyx und erleichtert den lentiviralen Partikeln die Penetration der Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit 2,4 µL der Partikellösung inkubiert, was einer *multiplicity of infection* (MOI) von 6 entspricht. Neben der anti-ITGB1-shRNA codierenden DNA wurde in einem zweiten Ansatz durch Kontrollpartikel, die kein funktionierendes Protein codieren („scrambled“), aber eine Puromycinresistenz vermitteln, eine Kontrollzelllinie MDA-MB-231sc etabliert. Nach 24 h wurde das potenziell infektiöse Medium verworfen und die Zellen mit Nährmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen sukzessive in größere Zellkulturplatten und -flaschen überführt. Ab der T75er Flasche wurde wieder Puromycin in einer Konzentration von 0,2 µg/mL hinzugegeben. Abschließend wurden die Zellen kryokonserviert.

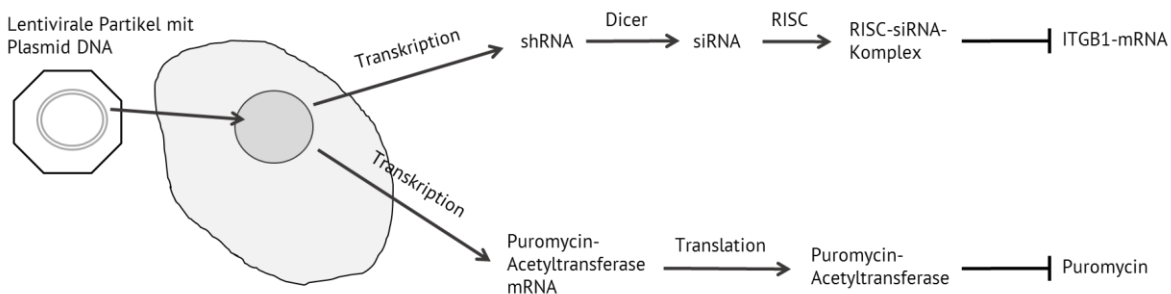


Abb. 5.1: Darstellung des Effekts des lentiviralen Partikels auf die Krebszelle beim *knockdown* von ITGB1. Die inserierte DNA transkribiert shRNA, die über die Prozessierung zu siRNA und der Bildung eines RISC (RNA-induced silencing complex)- siRNA Komplexes führt und damit die mRNA von ITGB1 abbaut und so die Proteinbildung verhindert. Zusätzlich wird eine Puromycin-Acetyltransferase gebildet, die das Selektionsantibiotikum Puromycin inaktiviert.

5.2. Zytotoxizitätsmessung

5.2.1. Messgrundlage des MTT assay

Der MTT *assay* ist neben ähnlichen analytischen Verfahren wie *Alamar blue* oder *CellTiterGlow* ein Zellviabilitätstest, durch den die metabolische Aktivität von Zellen auf Basis eines kolorimetrischen Analysenverfahrens gemessen werden kann.

Bei der ablaufenden Reaktion des MTT-Substrats 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid mit Reduktionsmitteln wie NADH und NADPH vitaler Zellen, katalysiert durch mitochondriale Dehydrogenasen, handelt es sich um eine Redoxreaktion. Bei dieser wird das gelbe, durch die positive Ladung wasserlösliche MTT-Substrat zu einem ungeladenen, wasserunlöslichen und violetten Formazanpräzipitat reduziert (**Abb. 5.2**). Je höher die metabolische Aktivität der Zellen ist, desto mehr Formazan kann gebildet werden. Durch ein Mikrotiterplattenspektrometer (Thermomultiscan EX, Thermo Fisher Scientific Inc) wird die Extinktion (hier gleich Absorption) des gebildeten Formazans bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (I) ist die Konzentration c des Formazans proportional zur erhaltenen Extinktion/Absorption E :

$$(I) \quad E_{570 \text{ nm}} = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_{570 \text{ nm}} \times c \times d$$

Die Messung der metabolischen Aktivität bildet das Grundprinzip dieser Messung und ist gleichzeitig der limitierende Faktor. So sind Situationen denkbar, in denen eine veränderte metabolische Aktivität nicht repräsentativ für Viabilitätszustände der Zelle ist.

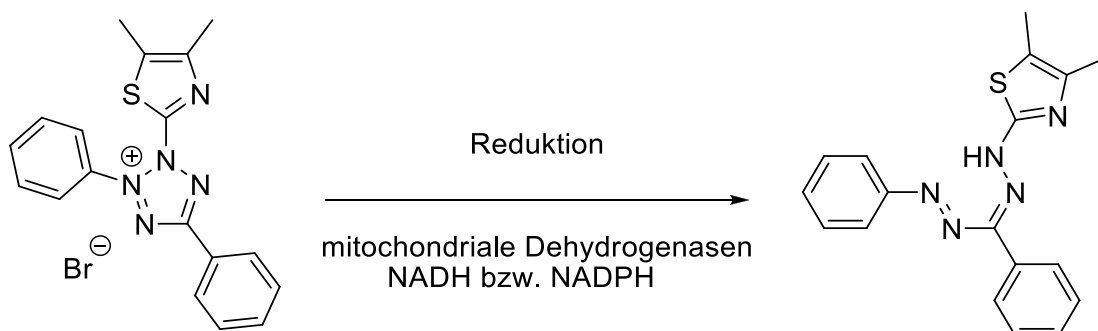


Abb. 5.2 Reduktion des gelben MTT-Reagenzes zum violetten Formazanpräzipitat durch die mitochondrialen Dehydrogenasen und intrazellulären Reduktionsmitteln vitaler Zellen.

5.2.2. Durchführung des eindimensionalen MTT assay

Eine Zellsuspension wird per CASY quantifiziert, verdünnt und in eine 96 Well-Mikrotiterplatte ausgesät, sodass in den Wells jeweils eine resultierende Anzahl von 2000 (MCF-7) bzw. 4000 (MDA-MB-231) Zellen in einem Volumen von 90 μL vorliegt, wobei die äußersten Wells mit 100 μL DPBS als Verdunstungsschutz gefüllt werden (**Abb. 5.3**).

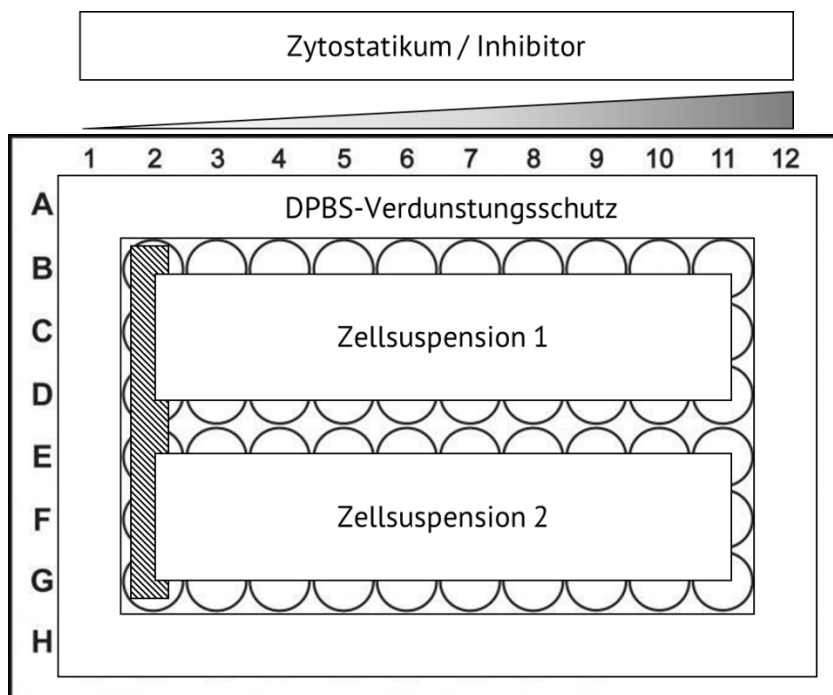


Abb. 5.3 Schema des eindimensionalen MTT assays. Die Zellsuspensionen 1 und 2 werden in Triplikaten aufgetragen. Die äußerste Reihe bietet einen Verdunstungsschutz. Die schraffierte Fläche stellt die 100% Viabilitätsprobe dar, die nur mit DPBS behandelt wird.

Die Zellsuspensionen werden in Triplikaten ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ zur Adhäsion der Zellen inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Zellen anhand eines Pipettierschemas mit 10 μL einer hergestellten Zytostatikum- bzw. Inhibitor-Verdünnungsreihe bestehend aus halblogarithmischen Konzentrationen zu einem Gesamtvolumen von 100 μL pro Well beimpft. Anschließend werden die Zellen wiederum 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Sollte eine weitere Komponente koinkubiert werden, werden von dieser Substanz weitere 10 μL hinzugegeben. Das entsprechende Volumen ist dann im Vorfeld bei der Zellsuspension anzupassen (Aussaat von 90 μL – 10 μL pro Zusatzkomponente), sodass die resultierende Lösung immer 100 μL beträgt.

Nach 71 h werden den 100 μL des Wellinhalts 20 μL einer MTT-Lösung (5 mg/mL in DPBS) hinzugefügt und eine weitere Stunde bei gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend werden die Platten auf Zellstoffpapier ausgeschlagen, das wasserunlösliche Formazan der Wells in 200 μL (bei MCF-7) bzw. 100 μL (bei MDA-MB-231) DMSO gelöst und abschließend spektrometrisch bei 570 nm vermessen, wobei eine Hintergrundmessung bei 690 nm zur Subtraktion durchgeführt wird. Die unterschiedlichen Volumina werden verwendet, damit die resultierenden Formazanabsorptionen im proportionalen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes (bis max. 1,2) liegen. Hierbei sei angemerkt, dass die metabolische Aktivität insbesondere von MDA-MB-231 Zellen u.a. abhängig von der eingesetzten FKS-Charge und -art ist. Bei einer zu geringen Absorption können die Faktoren MTT-Menge, MTT-Inkubationsdauer und Zellzahl nach oben angepasst werden, sofern eine Vergleichbarkeit gewährleistet wird.

5.2.3. Durchführung des zwei-/dreidimensionalen MTT assays

Während bei dem eindimensionalen Ansatz des MTTs weitere Komponenten konstant gehalten werden müssen, kann mit dem zweidimensionalen (2D-) Ansatz die Dosis einer zweiten Komponente variiert werden (**Abb. 5.4**). Dies bietet den Vorteil, dosisabhängige Kombinationseffekte (Synergie, Additivität, Antagonismus) zu untersuchen. Dabei werden in den Reihen A-H jeweils acht Konzentrationen einer Substanz A und in jeweils zwei Wells der Spalten 1-12 sechs Konzentrationen einer Substanz B verwendet.

Möglich ist die komplette Nutzung der Platte aufgrund des speziellen Plattenaufbaus (z.B. von CytoOne), die es ermöglicht, den Verdunstungsschutz neben die Wells zu füllen. Dafür ist kein Befüllen der äußersten Wells nötig. Im Gegensatz zum eindimensionalen Ansatz wird hier nur eine Zellsuspension pro Platte verwendet. Die Limitierung liegt also in der fehlenden Möglichkeit, zwei verschiedene Suspensionen direkt zu vergleichen. Die Normalisierung der Daten bezieht sich dabei auf den Mittelwert aus A1 und A2 als 100% Viabilität. Der dreidimensionale (3D-) Ansatz gleicht im Wesentlichen der 2D-Methode. Zusätzlich werden 10 μL der Wells durch eine fixe Konzentration einer dritten Substanz C ergänzt. Für jede Konzentration von Substanz C ist eine neue Platte erforderlich.

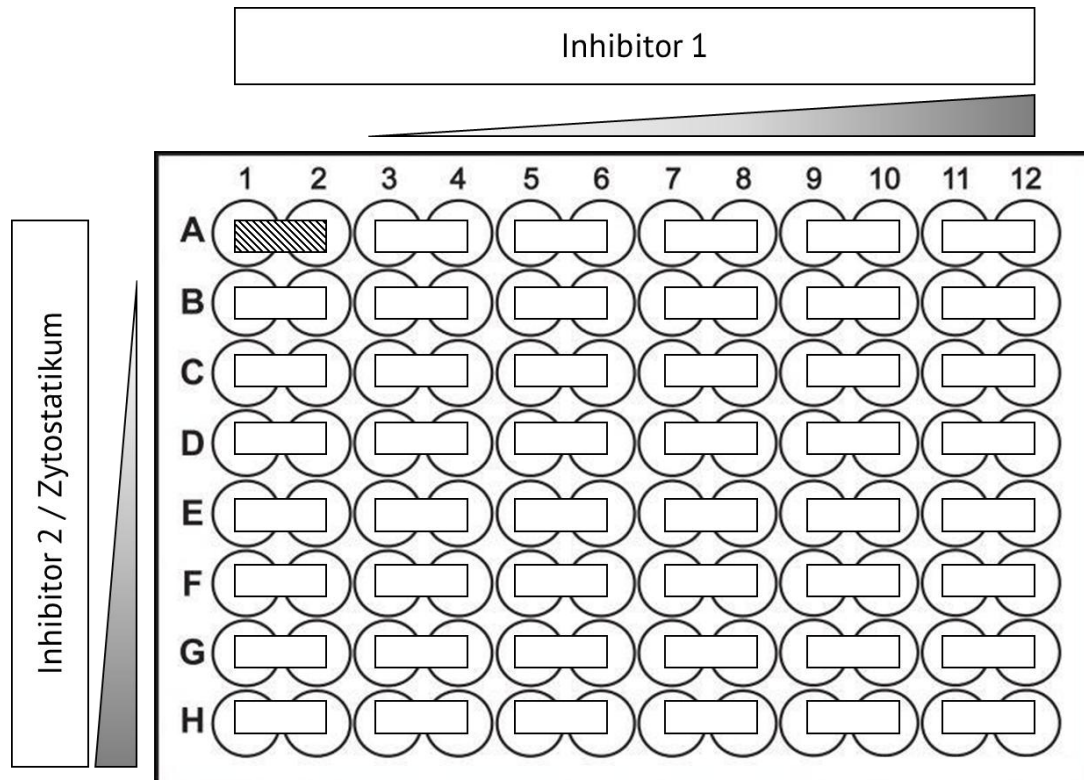


Abb. 5.4 Schema des zweidimensionalen MTT-Assays. Die verschiedenen Kombinationen zwischen Inhibitor 1 und Inhibitor 2 / Zytostatikum sind in Duplikaten aufgetragen. Das schraffierte Duplikat stellt den 100% Viabilitätswert dar, bei dem nur DPBS beimpft wurde und auf den alle anderen Absorptionen normalisiert werden.

5.2.4. Auswertung

Das Vorgehen zur Auswertung der MTT ist in **Abb. 5.5** dargestellt. Zur Auswertung der Messwerte werden diese in der Software GraphPad Prism 6 gegen den dekadischen Logarithmus der jeweils verwendeten Zytostatikum-/InhibitorKonzentration aufgetragen und ggf. nach dem DPBS-Wert normalisiert.

Mit Hilfe einer nichtlinearen vierparametrischen Regression nach Formel (II) resultiert eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve mit der Einschränkung, dass die Regression nur positive Werte (Bottom > 0) annehmen kann. Dabei wird der DPBS-Wert als 100 % (Top) festgelegt, was als vollständige Vitalität der Zellen aufgefasst werden kann.

$$(II) \quad Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(\text{Log}(\text{IC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

Aus dieser Kurve lässt sich der pEC₅₀-Wert berechnen. Durch Entlogarithmieren kann im Folgenden aus dem pEC₅₀-Wert die EC₅₀ als Maß der Zytotoxizität bestimmt werden. Die EC₅₀

ist die Konzentration, bei der 50% des maximalen Effekts erreicht wird, im Fall des Zytostatikums also 50% der Zellen abgestorben sind.

Da die EC_{50} -Werte durch die Verwendung des Logarithmus nicht normalverteilt sind, kann die Mittelwertbildung verschiedener Stichproben (mind. $n = 3$) und eine statistische Betrachtung nur über die pEC_{50} -Werte erfolgen. Erst dann kann der pEC_{50} -Mittelwert entlogarithmiert werden. Der Vergleich der resultierenden EC_{50} -Werte erfolgt über die Hilfsgröße des Resistenzfaktors RF, bei dem die Behandlung auf die jeweilige Kontrolle durch Quotientenbildung bezogen wird. Ein RF-Wert unter 1 beschreibt eine Sensitivierung durch die Behandlung, während ein Wert über 1 eine Resistenzbildung darstellt.

Je nach MTT-Ansatz werden die Einzelwerte in Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Jeder Messung muss jedoch mindestens aus $n=3$ unabhängigen Stichproben bestehen. Um die Behandlungsmethoden statistisch zu vergleichen, wird je nach Ansatz ein gepaarter oder ungepaarter t-Test verwendet.

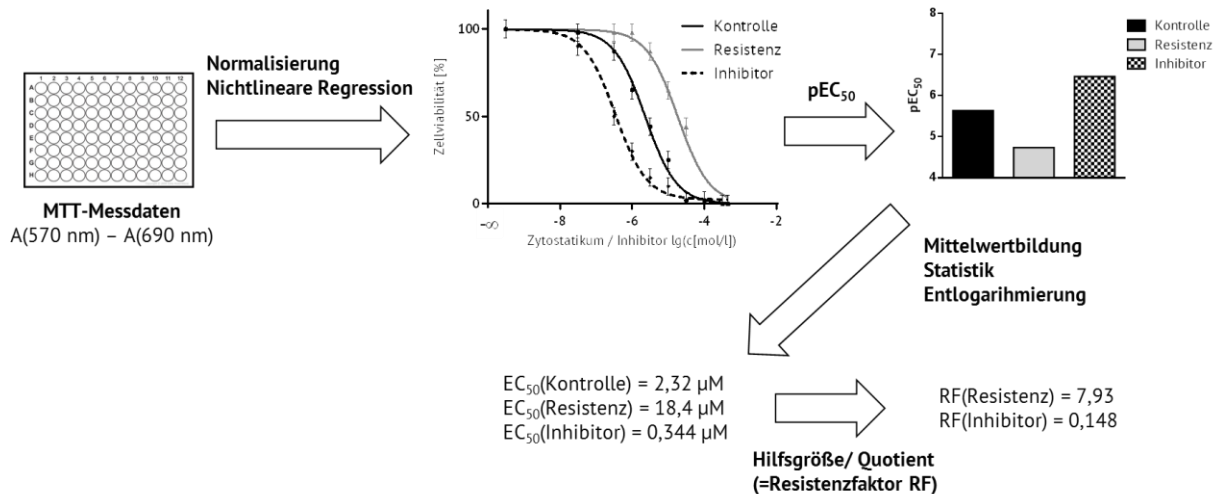


Abb. 5.5 Flow-Chart zur Auswertung des MTT-Assays. Die Messdaten werden normalisiert und über eine nicht-lineare Regression ausgewertet. Aus den daraus resultierenden pEC_{50} -Werten kann der Mittelwert gebildet, sowie eine statistische Auswertung durchgeführt werden. Anschließend kann durch Entlogarithmierung der EC_{50} Wert erzeugt, sowie als Hilfsgröße ein Resistenzfaktor berechnet werden.

5.2.5. Charakterisierung des Kombinationseffekts

Zur Beurteilung, ob eine Kombinationsbehandlung zweier oder mehrerer Substanzen in der Onkologie einen synergistischen, antagonistischen oder additiven Effekt auf die Zellviabilität

hat, können viele verschiedene mathematische Modelle angewendet werden, die sich grob in eine Effekt-basierte und eine Dosis-Effekt-basierte Methode unterscheiden lassen [322, 323].

Die beiden weit verbreitetsten Modelle sind:

- Effekt-basiert: Unabhängigkeit nach Bliss (*Bliss independence*)
- Dosis-Effekt-basierte Loewe-Additivität Modell (*Loewe additivity*) und darauf aufbauend und weiterentwickelt die Chou-Talalay-Methode

Beim Modell nach Bliss wird von einem unabhängigen Effekt ausgegangen. Die beiden Substanzen dürfen nicht die gleiche Zielstruktur haben und die Effekte können unabhängig voneinander stattfinden (**Abb. 5.6**).

$$(III) \quad E_{AB} = E_A \times E_B$$

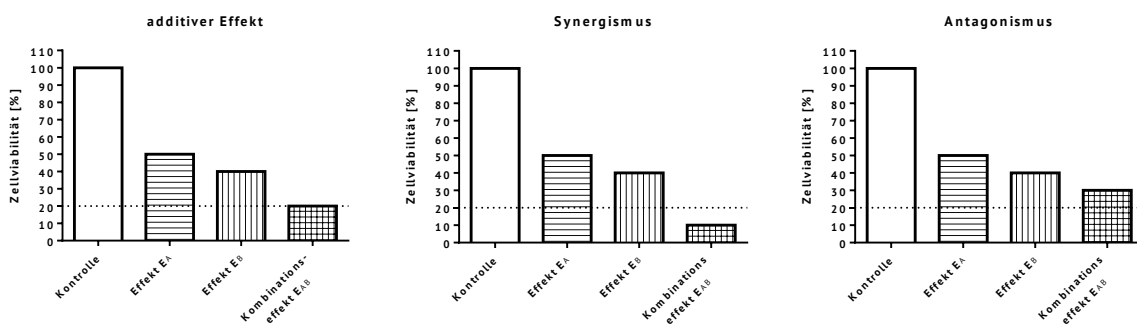


Abb. 5.6 Darstellung von additivem, synergistischem und antagonistischem Effekt nach Bliss im Falle eines zytotoxischen Effektes bei Krebszellen *in vitro*, bei einem Effekt EA von 0,5 und EB von 0,4. Der Theoretische Kombinationseffekt ist 0,2. Sollte dieser stärker ausgeprägt sein (<0,2) spricht man von einem Synergismus, und bei schwächerer Ausprägung (>0,2) von einem Antagonismus (modifiziert nach [324]).

Auf deren Basis kann der *combination index* (CI) als Hilfsgröße gebildet werden. Dieser basiert auf folgender Formel (IV) unter der Annahme, dass für den Effekt E gilt, dass $0 < E < 1$ ist. Der Zähler stellt den theoretischen Effekt nach der Theorie der unabhängigen Wahrscheinlichkeit dar [322]:

$$(IV) \quad CI = \frac{E_A + E_B(1 - E_A)}{E_{AB}} = \frac{E_A + E_B - E_A \times E_B}{E_{AB}}$$

Beim *combination index* (CI) wird ein Synergismus durch Werte < 1 , ein additiver Effekt durch den Werte 1 und ein Antagonismus durch Werte > 1 dargestellt.

Die Loewe-Additivität basiert auf dem Dosisäquivalenzprinzip, bei dem davon ausgegangen wird, dass bei der Additivität zwei Substanzen, die eine gleiche Wirkung hervorrufen können, untereinander austauschbar sind. Wenn bspw. die EC_{50} einer zytotoxischen Wirkung (Substanzeffekt A oder B) durch 100 μM der jeweiligen isolierten Substanz a oder b einer erreicht werden, geht das Prinzip davon aus, dass der gleiche Effekt durch 50 μM von Substanz a und 50 μM von Substanz b erreicht werden kann. Mathematisch lässt sich dieser Zusammenhang durch folgende Formel (IV) darstellen:

$$(V) \quad \frac{a}{A} + \frac{b}{B} = 1$$

Daraus lässt sich der *combination index* nach Formel (V) berechnen. Hierbei gilt analog der Berechnung nach Bliss ein additiver Effekt bei $CI = 1$:

$$(VI) \quad \frac{a}{A} + \frac{b}{B} = CI$$

Bei graphischer Darstellung entstehen dabei bei Isobogramme (**Abb. 5.7A**), bei denen sich ein Synergismus ($CI < 1$) durch eine zum Ursprung gekrümmte Kurve und ein Antagonismus ($CI > 1$) durch eine vom Ursprung weg gekrümmte Kurve darstellt. Das mathematischen Model von Chou und Talalay nach den Formeln (VII) und (VIII) [325] basiert auf diesem Ansatz, wurde aber um Details der Michaelis-Menten-, Hill-, Henderson-Hasselbalch-, and Scatchard-Gleichung erweitert. In Formel (VII) stellt f_a den fraktionierten Effekt dar und f_u den ungehemmten (Maximal-)Effekt. D stellt die Dosis dar, die im Verhältnis zur Median-Effektdosis D_m gesetzt wird. Der Faktor m stellt den Einfluss der Hill-Gleichung dar, sodass auch verschiedene Inhibitionskinetiken als Erweiterung zur Loewe-Additivität dargestellt werden können.

$$(VII) \quad \frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m$$

Der Kombinationsindex nach (VIII) basiert immer noch auf der Summe zweier Brüche, die die jeweiligen Effekte und Dosierungen in ein Verhältnis setzt. Im Gegensatz zu Loewe-Additivität, stehen hinter den Variablen die erwähnten vier Gleichungen. Im Zuge dieser Arbeit wird auf die Herleitung verzichtet [325]. Die Interpretation des Werts des CI verläuft analog Bliss und Loewe:

$$(VIII) \quad CI = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}}$$

Die Methode nach Chou-Talalay wird mit Hilfe der Software Compusyn® durchgeführt, wodurch ein für Chou-Talalay charakteristischer CI-Fa-Plot resultiert (**Abb. 5.7B**). Hierbei wird der jeweilige *combination index* gegen den Effekt Fa aufgetragen, sodass sich darlegen lässt, in welchem Effektbereich welche Art von Inhibitor-Wechselwirkung und ggf. wann ein *switch* stattfindet. Dabei kann sich der fraktionierte Effekt Fa aus verschiedenen Kombinationen der Inhibitoren zusammensetzen. Es werden von beiden Inhibitoren mindestens zwei Messpunkte benötigt.

Innerhalb dieser Arbeit werden bei der Eingabe der Zellviabilitäten Kombinationsindex werden folgende vier Annahmen getroffen:

1. Da der Effekt E zwischen 0 und 1 liegen muss ($0 < E < 1$), wird die Absorption des MTT-Reagenzes auf die DPBS-Probe normalisiert.
2. Sollten Zellviabilitäten nach Normalisierung bei oder über 100% (1) liegen, werden sie in der Software als 0,99 eingegeben
3. Es werden innerhalb des 2D-MTT nur die Umschlagsbereiche analysiert. Die Bereiche, in denen weder die isolierten Substanzen noch eine Kombination einen Effekt zeigen, werden nicht mit in die Betrachtung aufgenommen
4. Von Duplikaten und Triplikaten wird vor Eingabe in Compusyn® der Mittelwert gebildet

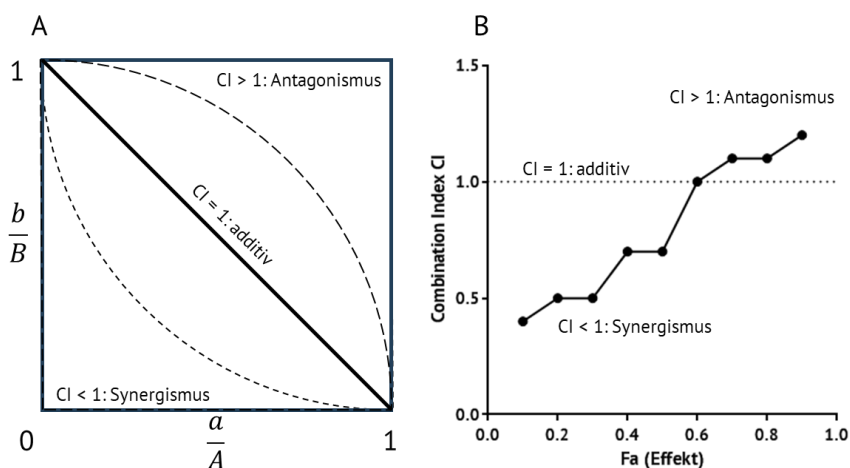


Abb. 5.7 Darstellung der Loewe-Additivität mit Hilfe eines Isobogramms (**A**), sowie des CI-Fa-Plot nach Chou-Talalay (**B**). Basierend auf der Loewe-Additivität wurde die Chou-Talalay-Methode entwickelt, aus der ein CI-Fa-Plot als Ergebnis resultiert, bei dem der jeweilige *Combination Index* (CI) in Abhängigkeit des Effekts dargestellt wird. Bei allen Methoden (Loewe, Chou-Talalay, Bliss) gilt: $CI = 1$ (additiv), $CI < 1$ (Synergismus) und $CI > 1$ (Antagonismus).

ATP-Bestimmung

Für die Bestimmung des ATP-Gehalts wurden 6-well Platten nach 5.2. mit COL1 oder FN beschichtet. Die Zellen wurden in einer Menge von $2,5 \times 10^5$ Zellen (MCF-7) und 5×10^5 Zellen (MDA-MB-231) ausgesät. Nach Erreichen Konfluenz (48-72 h) wurden die Zellen trypsiniert, in ein 5 mL Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert und abschließend in 2,5 mL PBS resuspendiert. Aus dieser Suspension werden 100 μ L zum Zweck einer anschließenden BCA-Proteinbestimmung aliquotiert. Im Folgenden wird aus einem ATP-Standard eine Kalibrierungsreihe von 1 nM bis 10 μ M in PBS hergestellt. 50 μ L dieser Standards, sowie 50 μ L der Zellsuspension werden in eine weiße Lumineszenzplatte pipettiert und mit 50 μ L fertig hergestellter CellTiterGlo® Lösung ergänzt. Die entstehende Lumineszenz basiert auf einer Luciferase-katalysierten Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin unter ATP verbraucht (**Abb. 5.8**).

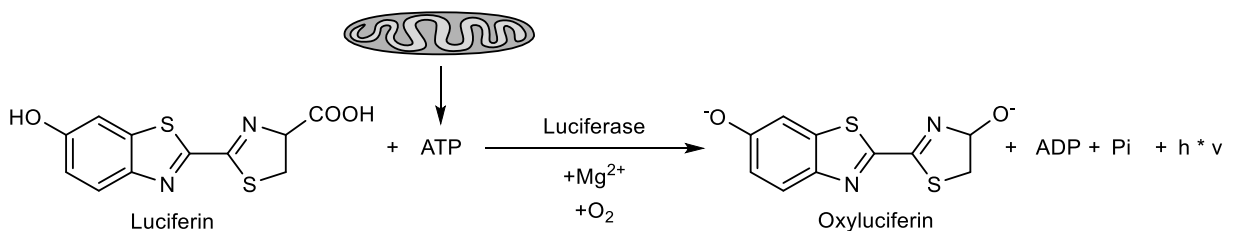


Abb. 5.8 Darstellung der Luciferase-Reaktion. Luciferin wird durch die Luciferase zu Oxyluciferin katalysiert. Dabei wird ATP zu ADP dephosphoryliert und Lumineszenz wird messbar.

5.3. Proteinanalytik

5.3.1. Zellyse

Um alle zellulären Bestandteile der Untersuchung zugänglich zu machen, ist es erforderlich, die Zellen zu lysieren. Dabei wird die Zellmembran unter Verwendung eines hergestellten Lysepuffers aufgelöst. Die Zellen werden im Vorfeld zweimal mit kaltem DPBS gewaschen, um tote Zellfragmente und Medium zu entfernen. Die Zellen werden mittels Gummischarber abgelöst und in ein 2 mL Reagiergefäß überführt. Dieses wird zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Zum Pellet werden nun 0,1-1 mL des Lysepuffers hinzugegeben und 30 min

unter Eiskühlung inkubiert. Dabei werden die Gefäße alle 10 min gevortext. Anschließend folgt eine Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C für 15 min. Das Lysat bleibt als klarer Überstand zurück, wird aliquotiert und bei -80 °C gelagert

5.3.2. Proteinquantifikation via BCA

Um die Proteinkonzentration von Lysate und Zellsuspensionen zu bestimmen wird ein BCA assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) durchgeführt. Die zu bestimmenden Proben werden in 1,5 mL Reagiergefäße 1:20, 1:50 und 1:100 mit Aqua Millipore verdünnt. Bei Zellsuspensionen (nach 5.4.2) werden nun 20 µL dieser Verdünnungen 10 µL 1 M NaOH hinzugegeben, 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit 10 µL 1 M HCl zur Neutralisierung versetzt. Bei Lysaten werden 20 µL der Proben in Duplikaten auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und 200 µL frisch hergestellte BCA-Lösung pro Well zugegeben.

Abschließend wird die Plate für 60 min bei 60 °C inkubiert und der entstandene Farbkomplex bei 570 nm am Mikroplattenphotometer vermessen. Zusätzlich zu den Proben werden BSA-Standards und Qualitätskontrollen vermessen, um über eine Kalibriergerade die Konzentration der Proben zu bestimmen. Bei der Farbreaktion werden Cu^{2+} -Kationen zunächst durch eine Biuret-Reaktion zu Cu^+ -Kationen reduziert, die dann von jeweils zwei Bicinchoninsäuremolekülen zu einem Komplex chelatisiert werden können, welcher eine Violettfärbung aufweist (**Abb. 5.9**).

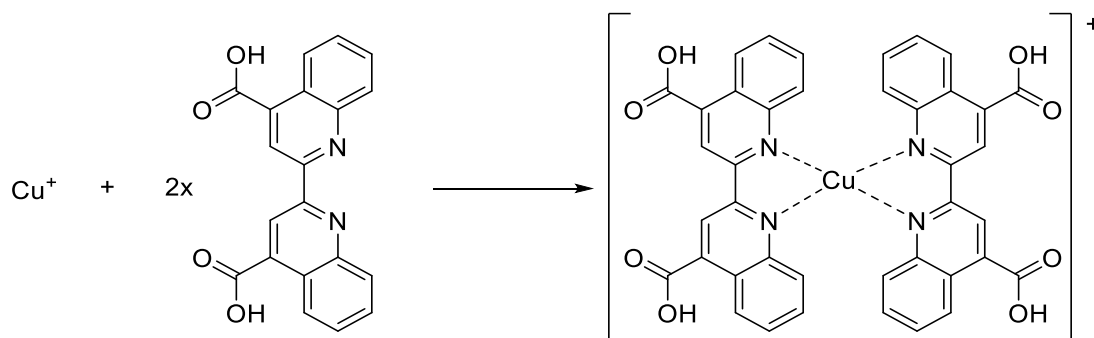


Abb. 5.9 Darstellung des BCA-Assays und die Bildung des violetten Chelatkomplexes aus Cu(I) und Bicinchoninsäure.

5.3.3. SDS-PAGE

Um die in quantifizierten Lysate aufzutrennen, wird die Gelelektrophorese angewendet. Die Proteingemische werden mit reduzierendem (bei ITGB1/P5D2: nicht-reduzierendem) Laemmli-Puffer versetzt und zur Protein-Denaturierung 30 min bei RT inkubiert.

Im nächsten Schritt wird die Elektrophoresekammer mit Elektrodenpuffer befüllt, die fertig erworbenen Gele eingesetzt und die Lysat-Proben in die Geltasche pipettiert. Zur Anwendung kommen Mini-PROTEAN® TGX™ Stain-Free™ Gele mit einem Polymerisationsgrad von 10%. Es soll ein Proteingehalt von 20-50 µg pro Tasche eingestellt werden, die Probenvolumina von 10 – 50 µL beinhalten können. Zur Bestimmung der Proteingrößen wird zusätzlich ein Strepgekoppelte Proteinstandard mit einem Volumen von 5 µL verwendet. Als Einstellung zur Gelelektrophorese werden 200 V bei einer Laufzeit von 45 min gewählt.

Die Gele bestehen aus Polyacrylamid, das je nach Polymerisierungsgrad eine unterschiedliche Vernetzungsstruktur und Porengröße besitzt. Je kleiner der Prozentsatz des Gels, desto größer sind die Poren. Dies ermöglicht es, Proteine unterschiedlicher Größen aufzutrennen und das Trennverhalten den Proteinen anzupassen. Dem Trenngel ist ein Sammelgel vorgeschaltet, in dem sich die Proben verdichten lassen, damit sie zu Beginn der Auftrennung auf einer Ebene liegen. Dies geschieht aufgrund des Tris-HCl-Puffersystems, durch das Glycin und Chlorid einen Gradienten aufbauen. Durch diesen Feldstärke-Gradienten reihen sich alle Proteine auf und verdichten sich auf der Grenze zum Trenngel.

Bei der hier angewendeten Gelelektrophorese handelt es sich um eine sogenannte *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Im Trenngel liegt ein schwach basischer pH-Wert vor, um eine stärkere negative Polarisierung der Proteine zu erreichen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch die Anlagerung der Natriumdodecylsulfat-Anionen, die sich proportional zur Größe der Moleküle anlagern. Dadurch wird das Verhältnis von Ladung und Größe in jedem Protein annähernd gleich. Durch die angelegte Spannung von 200 V wandern die negativ geladenen Proteine nun ausschließlich abhängig von ihrer Molekülgröße unterschiedlich schnell in Richtung der Anode und bleiben nach Abschalten des Stroms an ihrem zu diesem Zeitpunkt erreichten Laufpunkt fixiert.

5.3.4. Western Blot

Der Western Blot ist eine Technik zum Proteintransfer von einem Elektrophorese-Gel auf eine Membran, um auf dieser eine spezifische Detektion der transferierten Proteine mit Antikörpern zu ermöglichen.

Zunächst wird das Gel 5 min mit Transferpuffer equilibriert und eine PVDF-Membran 20 s mit Methanol aktiviert. Um Membran und Elektrophoresegel in direkten Kontakt zu bringen, wird die Membran zusammen mit dem Gel, jeweils von einem *transblot paper* und einem *fibrapad* flankiert, in die *blotting*-Halterung eingeklemmt und in eine Blot-Kammer eingesetzt. Diese wird anschließend mit gekühltem Transferpuffer befüllt und ein Kühlakku hinzugegeben, um eine starke Wärmeentwicklung zu verhindern. Der Proteintransfer wird mit einer konstanten Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 350 mA eine Stunde durchführt. Die Membran wird nun entnommen und 1 h in Milchpulver-Lösung bei RT unter Verwendung des Plattenschüttlers inkubiert, wodurch unspezifische Bindungen der Membran abgesättigt werden sollen, die eine Immunodetektion stören können. Anschließend wird die Membran dreimal 10 min mit 20 mL TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Inkubation 1 h mit 10 mL der primären Antikörper Lösung bei RT auf einem Plattenschüttler und anschließend im Kühlschrank über Nacht.

Die Membran wird dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend werden 10 mL der sekundären Antikörperlösung für 1,5 h bei RT unter Schütteln hinzugegeben. Die sekundären Antikörper binden spezifisch an die primären Antikörper und die Proteinstandards (Streptactin-HRP). Sie sind mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) konjugiert, welches als Detektionssubstrat dient. Abschließend wird die Membran zweimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wird eine 1:1-Mischung des Peroxid- und Luminol-Reagenz hinzugegeben, deren Reaktion durch die Peroxidase katalysiert wird (**Abb. 5.10**).

Die entstehende Chemolumineszenz ist als Bild mittels ChemiDoc XRS+ detektierbar und durch die Software ImageLab auswertbar. Die Auswertung erfolgt via Zuordnung der Banden durch Bestimmung der Proteingröße über die Standards. Dann erfolgt eine Messung der Pixelintensität, korrigiert um die Normalisierung auf einen internen Standard wie GAPDH.

5.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Möglichkeit, Zellen anhand ihrer Größe und molekularer Eigenschaften zu charakterisieren. Dazu werden die Zellen einer Zellsuspension über eine Kapillare vereinzelt und mit einem Laser angeregt. Dabei wird Streulicht zur Bewertung der Zellform detektiert. Das Streulicht lässt sich in die Vorwärtsstreuung (FSC) zur Bestimmung der Zellgröße und die Seitwärtsstreuung (SSC) zur Messung der Granularität einteilen. Darüber hinaus können Zellen mit fluoreszierenden Substraten oder Fluorophor-gekoppelten Antikörpern markiert werden. Diese Fluoreszenz kann durch Filter detektiert und zur Charakterisierung molekularer Eigenschaften oder Strukturen genutzt werden. Bei der Auswertung resultiert ein *Dot Plot*, bei dem SSC gegen FSC aufgetragen wird und der die Form der Zellen beschreibt (**Abb. 5.11A**). Daran lässt sich die Fraktion der lebendigen Zellen erkennen und als Subpopulation „*gaten*“. Innerhalb dieser Zellsubpopulation kann die Anzahl der Zellen gegen die jeweilige Fluoreszenz als Histogramm dargestellt werden (**Abb. 5.11B**), aus denen der Median gebildet wird. Innerhalb dieser Arbeit konnten die Fluorophore mit einem violetten (405 ± 5 nm) oder einem blauen (488 ± 5 nm) Laser angeregt und die Fluoreszenz durch einen blauen (448 ± 50 nm), grünen (525 ± 30 nm), gelben (583 ± 26 nm) oder roten (695 ± 50 nm) Filter detektiert werden.

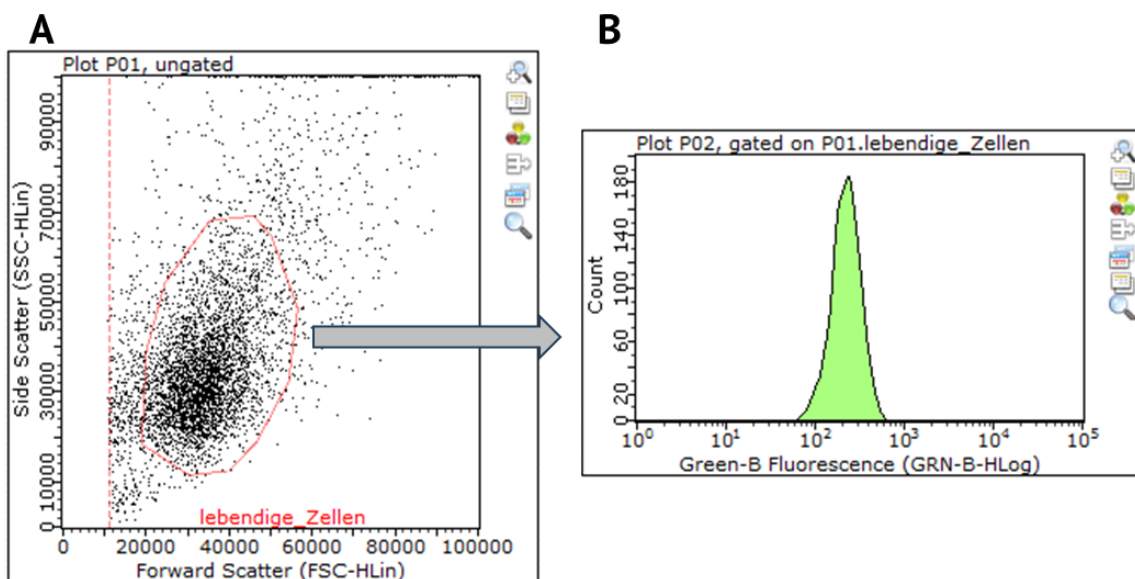


Abb. 5.11 Auswertung der Durchflusszytometrie über die Software Guava Incyte ©. **A**) Darstellung der Form der vermessenen Zellen als Dot-Plot (SSC gegen FSC) und der Eingrenzung der Subpopulation der „lebendigen Zellen“. **B**) Darstellung der grünen Fluoreszenz mit Anregung durch den blauen Laser (Green-B) innerhalb der lebendigen Zellen als Histogramm.

5.4.1. Durchflusszytometrie extrazellulärer Strukturen

Extrazelluläre Strukturen werden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörper markiert, so dass die Fluoreszenz der Zellen proportional zur Anwesenheit der extrazellulären Struktur ist. Dabei kann der primäre Antikörper direkt mit dem Fluorophor gekoppelt sein oder ein gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet werden.

Ca. 250.000-500.000 Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, sodass sie nach 72 h konfluent waren. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. In jedes Well wurden 1 mL EDTA/PBS gegeben und die Platte für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden in 1,5 mL Reagiergefäße überführt und für 5 min bei 4 °C mit 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 1 mL PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3%ige BSA-Lösung (200 µL für die Kontrolle/sekundärer AK & je 300 µl pro Epitop) aufgenommen und für 15 min inkubiert.

Daraufhin wurden 15 µL einer 1:10 Verdünnung der primären Antikörper hinzu pipettiert (ca. 1 µg prim. Antikörper /1 Millionen Zellen). Die Zellen wurden 45 min lichtgeschützt bei RT mit dem Antikörper inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C mit 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit je 100 µL Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µL Waschpuffer aufgenommen und je 15 µL der sekundären Antikörperlösung für die Zellsuspensionen mit primärem Antikörper ohne gekoppeltes Fluorophor wurde hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 35 min bei RT und lichtgeschützt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und mit 100 µL Waschpuffer gewaschen. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 400 bzw. 600 µL Waschpuffer resuspendiert und mit je 200 µL als Duplikat bzw. Triplikat in die wells gegeben. Die 96-well-Platte wurde per Durchflusszytometrie vermessen wobei eine Anregung bei 488 nm (blau) erfolgte und die Detektion der Emission bei 523±30 nm (grün). Die Auswertung der Daten wurde mit Guava Incyte© und anschließend mit GraphPad Prism® durchgeführt.

5.4.2. Charakterisierung der Apoptose durch Annexin V/PI

Der Annexin V assay basiert der Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin (PS) an der Außenseite der Zellmembran. In gesunden Zellen befindet sich PS auf der Innenseite der Membran und wird durch das Enzym Flippase in dieser Position gehalten. Bei apoptotischen Zellen verliert dieses Enzym seine Wirksamkeit, sodass dessen Gegenspieler Scramblase PS auf die Außenseite der Zellen invertieren kann. Im Organismus ist dies ein Zeichen für die Phagozytierung durch Makrophagen und das Einleiten der Apoptose. In diesem Versuch kann der zugesetzte Fluorophor-gekoppelte Farbstoff Annexin V-FITC von außen an das PS binden. Nekrotische Zellen weisen eine Permeabilisierung der Zellmembran auf, sodass der rote fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) die Zellmembran überwindet und in die DNA interkaliert (**Abb. 5.12**).

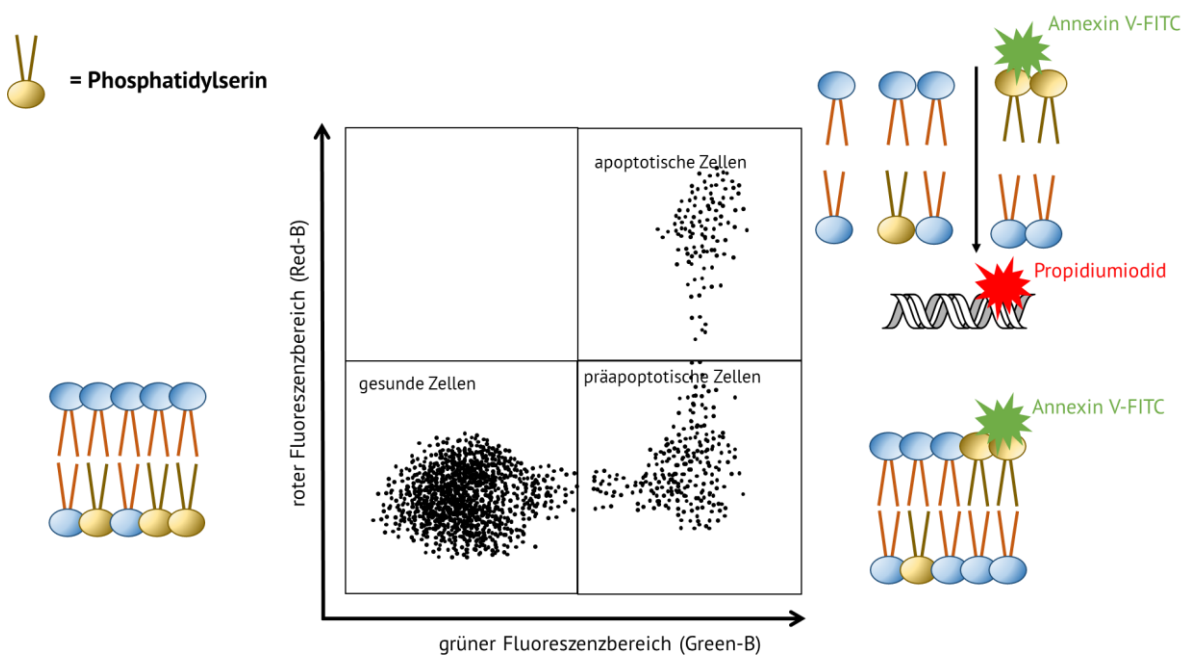


Abb. 5.12 Resultierender *dot-plot* eines Annexin-Assays per Durchflusszytometrie. Die rote Fluoreszenz aufgrund von Propidiumiodid wird gegen die grüne Fluoreszenz von Annexin V aufgetragen. Bei dieser Auswertung wird vorher keine Subpopulation definiert, da es explizit auch die Darstellung von nekrotischen Zellen geht.

Bei der Auswertung des Annexin V/PI-assays wird die durch einen blauen Laser (488 nm) angeregte, grüne (525±30 nm) Fluoreszenz von (Annexin V-) FITC gegen die ebenfalls durch einen blauen Laser angeregte rote (695±50 nm) Fluoreszenz von PI aufgetragen. Der resultierende *dot-plot* wird entsprechend vorher durchgeführter Kontrollversuche in einen

Bereich für gesunde, apoptotische (grüne Fluoreszenz) und nekrotische (grüne und rote Fluoreszenz) Zellen eingeteilt. Die Zellen mit ausschließlich roter Fluoreszenz werden dem nekrotischen Bereich zugeordnet. Die anschließende statistische Auswertung basiert auf dem prozentualen Anteil der jeweiligen Bereiche an der gemessenen Gesamtpopulation der Zellen.

5.5. Bestimmung der intrazellulären Zytostatika-Akkumulation

5.5.1. Doxorubicin- und Mitoxantron-Bestimmung über Durchflusszytometrie

Um die Akkumulation der fluoreszierenden Zytostatika Doxorubicin und Mitoxantron unter COL1-Einfluss zu bestimmen, wurden je 250.000-500.000 Zellen in 6-Well-Platten mit und ohne COL1-Beschichtung ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch 4,5 ml frisches Medium ausgetauscht. Nach 72 h wurden die Zellen mit 0,5 mL einer 30 μ M Lösung (resultierende Konzentration: 3 μ M) des jeweiligen Zytostatikums für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wird von einem Steady State zwischen passiven Influx und Efflux, sowie dem ABC-Transporter-vermittelten Efflux ausgegangen. Zur Inhibition der ABC-Transporter wurden bei einigen Proben 10 μ M XR9577 (subtoxisch bei 4 h, siehe **Abb. 6.10A**) hinzugefügt.

Das große Volumen stellt eine gleichbleibende Zytostatikakonzentration durch Sinkbedingungen sicher. Die Zellen wurden anschließend durch Trypsinisierung abgelöst, mit DPBS gewaschen, zentrifugiert und in 2 ml DPBS resuspendiert.

Anschließend erfolgte zeitnah die Vermessung am Durchflusszytometer. Hier werden jeweils nur max. 1000 Zellen pro Well vermessen, um eine schnelle Analytik zu gewährleisten.

Beide Zytostatika wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm (blau) angeregt und bei einer Emission von 583 ± 26 nm (Gelb, DOX) und 695 ± 50 nm (Rot, MX) detektiert. Die Auswertung der Daten wurde mit Guava Incyte[®] und anschließend mit GraphPad Prism[®] durchgeführt.

5.5.2. Doxorubicin und Mitoxantron Bestimmung über Fluoreszenzreader

In 6-well-Platten werden Zellen analog Kapitel 5.5.1 in Anwesenheit und Abwesenheit von COL1 für mit DOX oder MX und optional XR9577 inkubiert.

Methoden

Bestimmung der intrazellulären Zytostatika-Akkumulation

Nach Ablösung wird von der hergestellten Zellsuspension ein Aliquot zur anschließenden BCA-Proteinquantifizierung entnommen. Die Suspension wird zentrifugiert und das Zellpellet wird daraufhin mittels 1% Triton X-100 lysiert und per Fluoreszenzspektrometrie (Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) unter Verwendung einer Kalibriergerade vermessen. Dabei wird bei Doxorubicin eine Exzitation 485 nm (blau) und eine Emission von 590 nm (gelb) verwendet, bei Mitoxantron analog eine Exzitation von 584 nm (gelb) und Emission 675 nm (rot). Die Kalibriergeraden von Doxorubicin und Mitoxantron umfassen ein Konzentrationsbereich von 0,005 μM bis 10 μM . Die Menge an Zytostatika wird anschließend auf die per BCA bestimmte Proteinmenge des Aliquots normalisiert.

5.5.3. (Cis-)Platin Bestimmung durch Atomabsorptionsspektrometrie

Um den intrazellulären Gehalt von Platin quantitativ zu bestimmen wurde Graphite-furnance-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) verwendet. Dabei wurde das Protokoll von Pfankuchen *et al.* verwendet [89]. Die Zellen wurden in 6-well Platten mit und ohne COL1 für 72 Stunden inkubiert. Optional wurde nach 71 h bereits weitere Modulatoren wie ABC – Transporter Inhibitoren hinzugegeben. Anschließend wurde sie mit 20 μM CDDP für 4 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Trypsin geerntet und mit ad 1 ml aufgefüllt. Von der Zellsuspension wurden 100 μL . Die restliche Suspension wurde zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mittels 65%iger Salpetersäure 1 h bei 60 °C lysiert und anschließend per GF-AAS über eine Standardkalibrierungskurve vermessen. Die Bedienung der AAS erfolgte durch Ann Kathleen Wantoch von Rekowski. Um die Messfehler wegen unterschiedlicher Proliferation der Zellen oder Ungenauigkeiten beim Zellernten zu vermeiden, wurde der gemessene Platingehalt anschließend auf die Proteinmenge der Suspension normalisiert, indem aus dem 100 μL Aliquot eine Proteinstimmung per BCA erfolgte.

5.6. Untersuchungen der ABC-Transporter

Das Prinzip von ABC-Transporter-Assays basiert auf Substraten der jeweiligen Transportmoleküle, die selbst fluoreszierende Eigenschaften besitzen. So eignen sich die in 5.5.1 bereits erwähnten Zytostatika Doxorubicin und Mitoxantron zur Untersuchung der ABC-Transporter-Aktivität. Darüber hinaus gibt es im AK Wiese etablierte Farbstoff-Assays, von denen in dieser Arbeit Calcein AM (5.6.1) und Pheophorbid A (5.6.2) verwendet werden.

Während diese Assays meist die inhibitorischen Eigenschaften von Substanzen auf die ABC-Transporter charakterisieren, werden sie innerhalb dieser Arbeit außerdem zur Bestimmung der ABC-Transporter-Aktivität von Zellen und Zellbehandlungen verwendet. Dabei wird die Messung einer Zellbehandlung auf die (maximalen) Hemmung durch einen Standardinhibitor (z.B. XR9577) normalisiert. Je größer der Unterschied zur maximalen (100%) Inhibition durch den Inhibitor, ist, desto kleiner ist der resultierende Quotient und desto stärker ist die ABC-Transporter-Aktivität (**Abb. 5.13**).

Zur Inhibition von ABCB1 Transportern wird in der Regel XR9577 (WK-X-24) als Standardinhibitor genutzt und bei ABCG2 der Inhibitor Ko143. Cyclosporin A kann für die Funktionsmessung von ABCC1 Transportern eingesetzt werden.

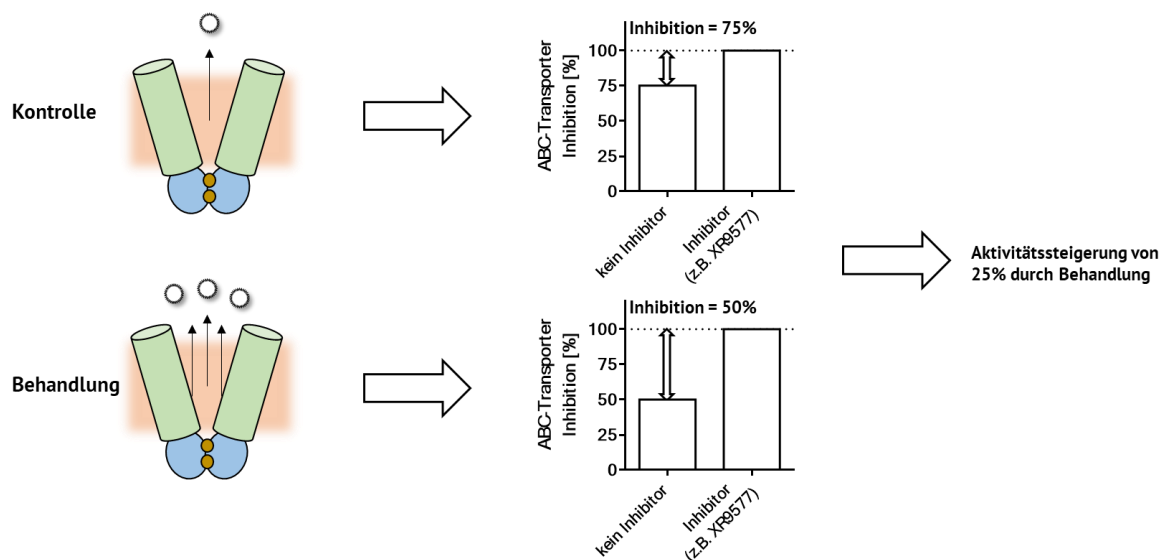


Abb. 5.13 Schematische Darstellung der Bestimmung der ABC-Transporter-Aktivität von Zellen und Zellbehandlungen unter der Verwendung von klassischen ABC-Transporter-Assays. Die Messwerte werden auf einen Standardinhibitor normalisiert, bei der eine maximale Inhibition (100%) erwartet werden kann. Je geringer der Quotient bzw. die Inhibition, desto größer ist die ABC-Transporter-Aktivität.

wurden mit einer Multikanalpipette 160 µl Zellsuspension (2,25 Millionen Zellen / 8,5 mL KHP) pipettiert. Nach Zugabe der Modulatoren wurde die Wellplatte 15 min lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden 20 µL Calcein-AM Lösung hinzupipettiert. Die Platte wird direkt nach Zugabe Calcein-AM im vortemperierten *Platereader* (37 °C) vermessen. Durch die Zugabe der Calcein AM-Lösung ergab sich eine Endkonzentration von 0,3125 µmol/L Calcein-AM. Die intrazelluläre Fluoreszenz wurde 60 Minuten lang bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm (blau) und einer Emission von 520 nm (grün) vermessen. Dabei wurde nicht die absolute Fluoreszenz gemessen, sondern der Fluoreszenzanstieg über Bestimmung der Steigung. Dies wird durchgeführt, da die Zellen theoretisch unbegrenzt Calcein-AM metabolisieren können, ohne einen Steady-State-Zustand zu erreichen. Die Aktivität der Transporter lässt sich also über die Fähigkeit, das ungespaltene Calcein-AM vor der Spaltung zu exportieren, und damit über die Steigung der Fluoreszenzzunahme quantifizieren (**Abb. 5.15**).

Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden in Excel transferiert und gegen die Zeit aufgetragen. Zur Auswertung wurden Werte des Fluoreszenzanstiegs von der 6. bis zur 25. Minute der Messung verwendet.

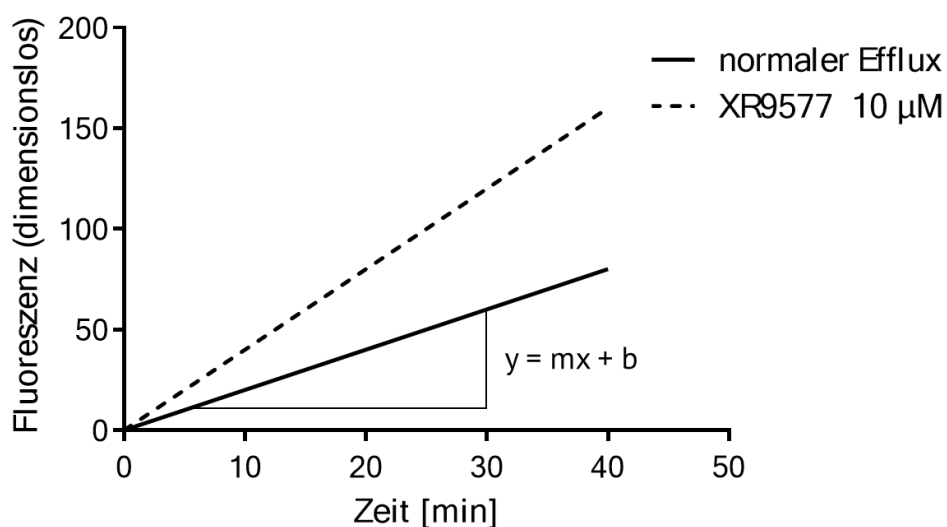


Abb. 5.15 Veranschaulichung des Einflusses des ABCB1-Inhibitors XR9577 auf die Steigung der Fluoreszenzentwicklung.

5.6.2. Pheophorbid A

Pheophorbid A (PheoA) diffundiert durch die Zellwand und akkumuliert in den Zellen. PheoA ist ein selektives BCRP-Substrat, welcher bei 488 nm angeregt werden kann [329]. Bei aktiven ABCG2-Transportern wird der Farbstoff aus der Zelle geschleust (Abb. 5.16). Durch Modulatoren wie Ko143 ($IC_{50} = 0,276 \mu\text{M}$ [330]) kann der Effluxtransporter inhibiert werden.

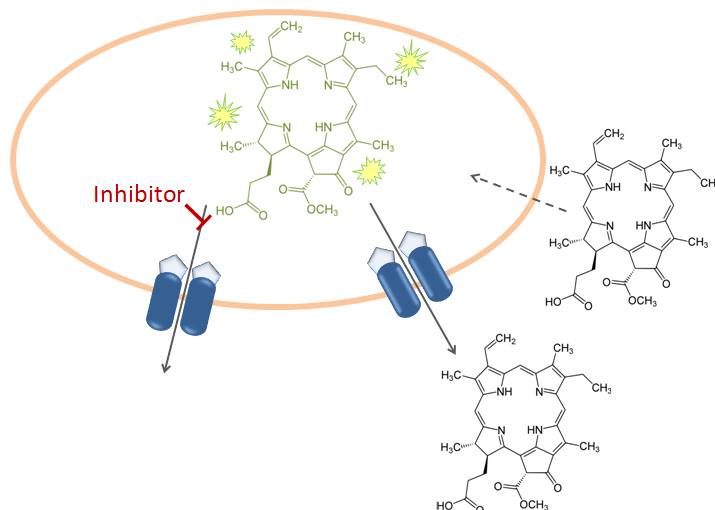


Abb. 5.16 Funktionsweise des Pheophorbid A assays (übernommen aus [327]).

Bei der Durchführung wurden Zellsuspensionen hergestellt, die auf eine Konzentration von 2,25 Mio. Zellen / 8,5 mL Krebs-Hepes-Puffer (KHP) mittels CASY eingestellt wurden (entsprechend 40.000 Zellen / 160 μL). Je 20 μL KHP und Modulator wurden in den wells vorgelegt. Es liegt eine Konzentration von 0,5 $\mu\text{mol/L}$ PheoA vor. 160 μL der Zellsuspensionen werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert (160 μL). Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 ist ein Gleichgewichtszustand (*Steady-State*) erreicht. Kurz vor dem Start der Messung im Guava® Durchflusszytometer wurden die Zellen mit einer Multikanalpipette vorsichtig auf- und abpipettiert und vermessen.

Die Erfassung der Fluoreszenz von PheoA erfolgt nach Anregung durch den violetten Laser (405 nm) bei einer Wellenlänge von 695 nm (rot). Die Fluoreszenzwerte der Zellen werden gegen die Intensität des Signals aufgetragen. Die Werte des Histogramms wurden in GraphPad Prism® übertragen und der Mittelwert der Triplets wurde gebildet und als Balkendiagramm dargestellt.

5.7. Messung funktioneller Zelleigenschaften

5.7.1. Adhäsionsassay

Der Zelladhäsionsassay wurde die Adhäsionskraft von Zellen an EZM Substraten, wie bspw. an COL1 untersucht (nach Sethi *et al.* [331]). Es wurden 96-well-Platten mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ COL1 beschichtet und unter der *Laminar-Air-Flow* trocknen gelassen. Die Reihen C, D, F und G wurden hingegen nicht beschichtet. Vor der Verwendung der Platten wurden die Wells mit je $100 \mu\text{l}$ PBS gewaschen. Die Platten wurden daraufhin für 1h mit je $50 \mu\text{L}/\text{Well}$ einer $1 \text{ mg}/\text{mL}$ BSA-Lösung blockiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die BSA-Lösung wieder abgesaugt. Es wurden 10.000 (MCF-7) bzw. 20.000 (MDA-MB-231) Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden mit jeweils $10 \mu\text{L}$ PBS, Mn^{2+} -Ionen-Lösung, DDR1-Inhibitor 7rh oder ITGB1-Antikörper P5D2.

Die Zellen wurden für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit zwei Mal mit je $100 \mu\text{l}/\text{Well}$ PBS vorsichtig gewaschen. Es wurden je $50 \mu\text{l}$ einer 3% Paraformaldehyd (PFA) Lösung zur Fixierung der wells auf die Wells gegeben und für 15 min inkubiert. Die PFA-Lösung wurde abgesaugt und jeweils $30 \mu\text{L}/\text{Well}$ Methylenblau-Lösung wurde für 10 min einwirken gelassen. Dann wurden die Wells je fünf Mal mit $200 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser ausgewaschen. Für 15 min wurden $100 \mu\text{L}$ einer $0,1 \text{ M}$ Salzsäure (HCl) auf die Wells gegeben. Die Platten wurden bei 620 nm im Plattenspektrometer vermessen und die Daten mit GraphPad Prism[®] ausgewertet.

5.7.2. Mikroskopie

Die Morphologie der Zellen wurde mittels Lichtmikroskop untersucht. Die Auswertung erfolgte über die Software Zen 3.0 (ZEISS[®]).

Um die durch die Beschichtung entstandenen COL1-Fasern zu betrachten, wurde ein konfokales Mikroskop mit der Software NIS-Elements verwendet. Es wurden Ibidi μ -Dishes mit COL1 durch Methode 5.2 beschichtet. Anschließend wurden Zellen ausgesät. Die Visualisierung von COL1 erfolgt über die Eigenfluoreszenz der Proteine bei 488 nm .

5.8. EGF-ELISA

Zur Bestimmung der sezernierten EGF-Konzentration der Zellen wurden diese in 6-well-Platten zu einem Konfluenzgrad von 80-90% kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit DPBS gewaschen und mit 1 ml farblosen DMEM-Medium ohne FKS für 24 h weiterkultiviert. Abschließend wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und eingefroren.

Die Proben wurden verdünnt und mittels Sandwich-ELISA analysiert (**Abb. 5.17**). Dafür wurden Nunc-Immuno® Micro-Well® 96-well Platten mit 100 µL einer Konzentration von 0,25 µg/mL des primären Antikörpers über Nacht inkubiert. Während dieser Zeit adsorbiert der Antikörper an die speziell dafür behandelte Oberfläche der Platte. Am nächsten Tag wird die Lösung entfernt, die wells gewaschen und mit Blockpuffer (3% BSA in DPBS) für eine Stunde inkubiert und erneut gewaschen.

Die Quantifizierung der EGF-Konzentration erfolgt über eine Standard-Kalibrierungskurve. Dazu wird der Standard von EGF von 1000 pg/ml bis 0 pg/mL hergestellt. Jeweils 100 µL der Standardkonzentrationen sowie der Proben werden nach Abnahme des Blockpuffers über Nacht oder mind. zwei Stunden inkubiert.

Nach mehreren Waschschritten wird der sekundäre, biotinylierte Antikörper mit einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Danach erfolgen erneut Waschschrritte und die Zugabe von HRP-gekoppeltem Avidin, welches das gekoppelte Biotin bindet. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgt die Zugabe des Detektionsreagenz Tetramethylbenzidin (TMB). Die enzymatische Umsetzung von TMB zu einem blauen Produkt erfolgt lichtgeschützt für 15 min und wird mit 2 M Schwefelsäure gestoppt. Durch diese pH-Veränderung <1 wird das die HRP denaturiert und die enzymatische Umsetzung damit gestoppt. Zusätzlich wechselt die blaue Farbe des Produkts nach gelb.

Die Auswertung erfolgt kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Subtraktion des Hintergrundes bei 570 nM. Bei der praktischen Durchführung des EGF-Sandwich-ELISAs erfolgte eine Unterstützung von Lukas Maria Gockel.

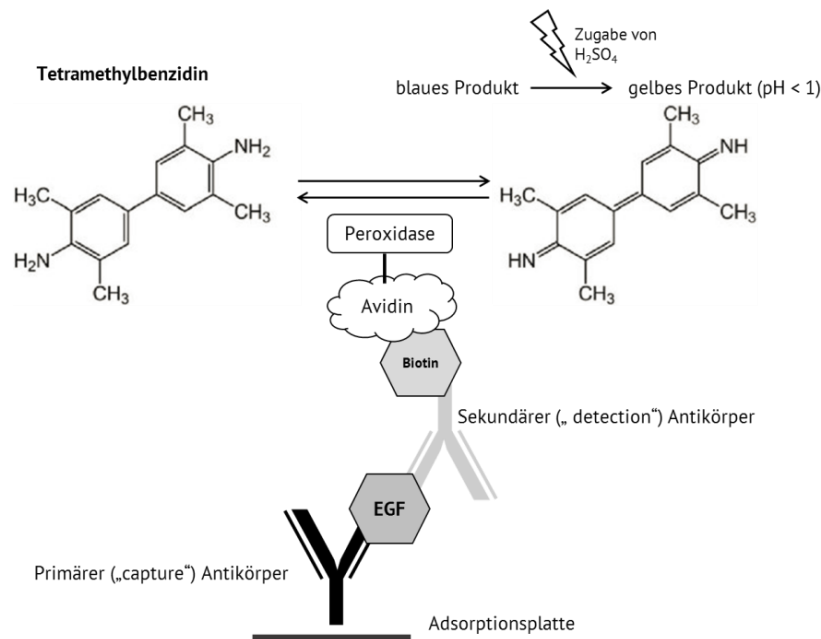


Abb. 5.17 Darstellung des durchgeführten Sandwich-ELISA zur Bestimmung von EGF. Tetramethylbenzidin wird durch Peroxidase in ein blaues Produkt katalysiert. Dabei ist die Bildung dieses Produkts proportional zur Quantität von EGF.

5.9. mRNA-Analytik

Die mRNA-Analytik wurde mit Hilfe einer *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) von Frau Katharina Schmutzler unter der Anleitung von Dr. Moritz Ponert durchgeführt und ist in seiner Dissertation nachzulesen [332]. Die Isolation der mRNA erfolgt mittels RNA-Isolations Kit der Firma Zymo Research. Danach wurde die mRNA mittels DNAsen aufgereinigt. Die Synthese der cDNA erfolgte mittels iScript cDNA Synthese Kit der Firma Bio-Rad, deren PCR-Amplifizierung mittels SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix. Eine Auswertung erfolgte über eine CT-Analyse mit Verifizierung über Schmelzpunktanalyse. In den Experimenten für diese Arbeit wurden ABCB1 und ABCG2 analysiert. Dabei wurde das RPL13 als interner Standard verwendet.

5.10. Statistik

Die jeweils durchgeführten statistischen Tests werden bei den einzelnen Experimenten beschrieben. Signifikante Unterschiede bei einem p-Wert <0,05 werden mit * gekennzeichnet; analog ** (p < 0,01) und *** (p < 0,001).

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1. Die Chemosensitivität von Mammakarzinomen durch EZM

6.1.1. Simulierung der EZM *in vitro*

Um die Interaktion zwischen EZM und den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 *in vitro* zu simulieren, wurden die Wells vor dem Aussäen der Zellen mit EZM-Proteinen wie Kollagen Typ 1 (COL1) als wichtigsten Vertreter der EZM inkubiert. **Abb. 6.1A** und **Abb. 6.1B** stellen die Kollagenfasern von COL1 in verschiedenen Fokussierungsstufen mittels konfokaler Lichtmikroskopie dar. Die Fibrillen erstrecken sich über den gesamten Wellboden. Sie bilden keinen vollständigen Abschluss und die Zellen liegen nicht vereinzelt in der Matrix vor. Eine zu dichte Matrix könnte Zell-Zell-Kontakte verhindern und damit apoptotisch wirken. Innerhalb dieses Versuchsaufbaus besteht also die Möglichkeit der Interaktionen der Mammakarzinomzellen mit anderen Zellen, mit COL1 oder dem Plastikboden der 96-Well-Platte (**Abb. 6.1C**). Dabei kann die Interaktion mit dem inerten Wellboden bestehend aus Kunststoffpolymeren wie Polypropylen oder Polystyrol als vernachlässigbar angenommen werden. Weiterhin wird nicht gesondert betrachtet, dass die Zellen innerhalb der typischen Inkubationsdauer von 72 h durchaus ihre eigene EZM produzieren und per Enzyme modulieren können.

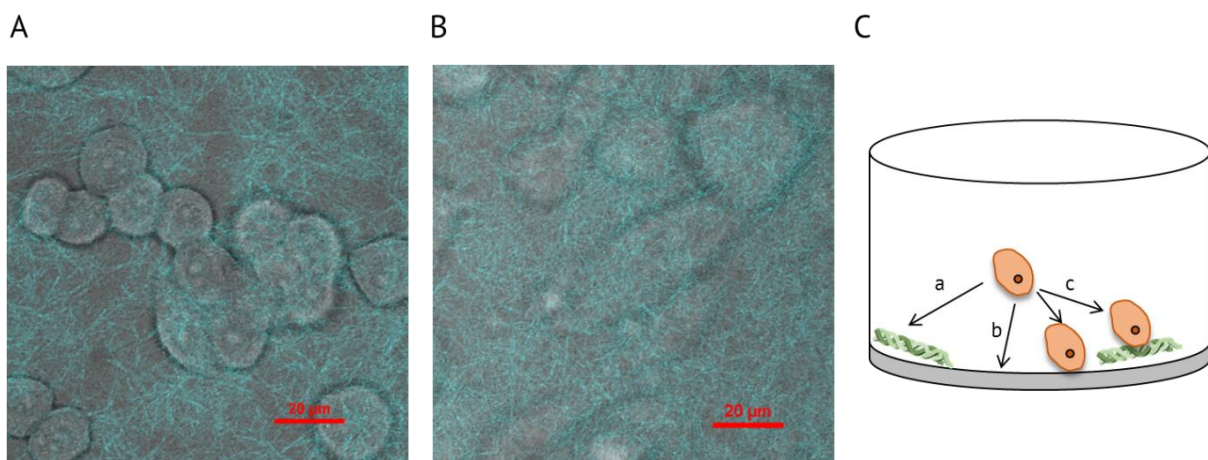


Abb. 6.1 Konfokale Aufnahme der COL1-Beschichtung am Beispiel ausgesäeter MDA-MB-231 Zellen mit einer COL1-Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in unterschiedlichen Fokussierungsstufen (**A**, **B**). Unterabbildung (**C**) legt die verschiedenen Interaktionsmechanismen einer Zelle in dem Versuchsaufbau dar: Zelle-EZM (a), Zelle-Wellboden (b) oder Zelle-Zelle (c).

6.1.2. EZM-Proteine wie COL1 und FN erhöhen die Chemoresistenz

Um den Einfluss der EZM auf die Resistenz gegenüber klassischen Zytostatika zu untersuchen, wurden die Zellen in Gegenwart der Matrixproteine COL1 und FN mit einer halblogarithmisch steigenden Konzentration der Zytostatika Cisplatin (CDDP), Doxorubicin (DOX) und Mitoxantron (MX) inkubiert und anschließend mittels *MTT assay* auf ihre Viabilität hin untersucht. Dabei ist die durch Reduktion des MTT-Reagenzes resultierende Färbung des Formazanpräzipitats direkt proportional zur Viabilität bzw. der metabolischen Aktivität der Zellen (siehe Kapitel 5.2.1).

Die COL1-Inkubation erzeugt eine erhöhte Viabilität bei gleicher Zytostatikakonzentration. Es ist also eine höhere Konzentration nötig, um das gleiche Ausmaß an Krebszellen in die Apoptose zu treiben. Als Parameter für den Kurvenverlauf wurden der pEC_{50} -Wert bzw. entlogarithmiert die EC_{50} verwendet. **Abb. 6.2** demonstriert den resistenzerhöhenden Effekt von COL1 beispielhaft in der tripel-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 in Gegenwart von DOX. Als weitere Hilfsgröße wurde der Resistenzfaktor RF als Quotient der EC_{50} -Werte von COL1-behandelten vs. nicht-behandelter Zellen gebildet. Der RF dient eigentlich als Parameter zur Beschreibung manifester, intrinsischer Resistenzen. Im Kontext dieser Arbeit eignet er sich aber auch zur Darstellung von *de novo* Resistenzen.

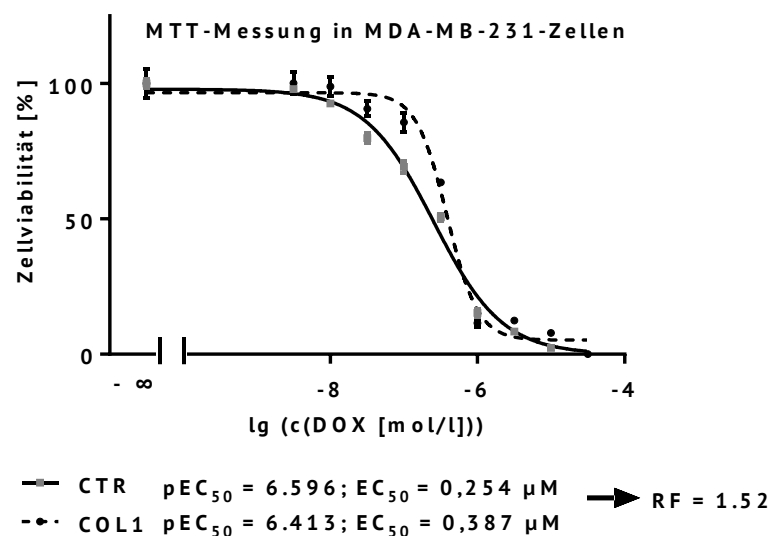


Abb. 6.2 Beispiel der Berechnung des RF-Wertes anhand der Wirkung von Doxorubicin auf MDA-MB-231 Zellen in Gegenwart von COL1. Dabei werden die COL1-behandelten Zellen mit Zellen ohne EZM-Zugabe verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Die Chemosensitivität von Mammakarzinomen durch EZM

Anhand der statistischen Analyse der pEC₅₀-Werte und der resultierenden Signifikanzen wird deutlich, dass die COL1-vermittelte Resistenz vor allem in MDA-MB-231-Zellen und als Reaktion auf die Zytostatika DOX und MX auftritt (**Abb. 6.3, Tab. 6.1**).

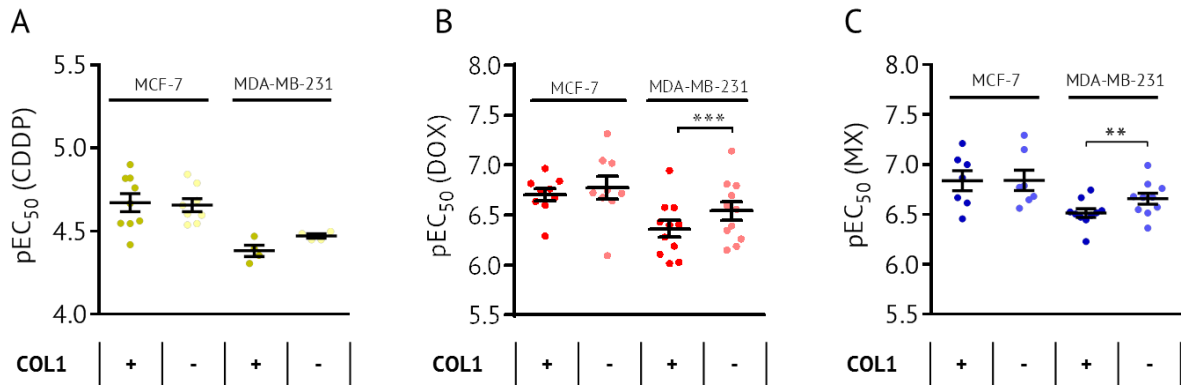


Abb. 6.3 Statistische Analyse des Einflusses von COL1 auf die zytotoxische Aktivität der Wirkstoffe Cisplatin (CDDP, **A**), Doxorubicin (DOX, **B**) und Mitoxantron (MX, **C**). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ($n = \text{mind. } 7$). Die statistische Analyse wurde durch einen gepaarten t-Test durchgeführt. Die Daten zu der Untersuchung von Cisplatin (**A**) wurden in der Masterarbeit von Fabian Baltes bereits verwendet. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Tab. 6.1 Übersicht der in **Abb. 6.3** dargestellten pEC₅₀-Werte zur Inkubation mit COL1, ergänzt um Daten zum weiteren EZM-Protein Fibronectin (FN). Als Kontrolle (CTR) werden jeweils die unbehandelten Zellen ergänzt.

		MCF-7					MDA-MB-231				
		pEC ₅₀ \pm SD	EC ₅₀ [μ M]	pEC ₅₀ \pm SD (CTR)	EC ₅₀ [μ M] (CTR)	RF	pEC ₅₀ \pm SD	EC ₅₀ [μ M]	pEC ₅₀ \pm SD (CTR)	EC ₅₀ [μ M] (CTR)	RF
CDDP	COL1	4,67 \pm 0,15	21,3	4,74 \pm 0,27	18,0	1,18	4,43 \pm 0,14	37,3	4,54 \pm 0,21	28,7	1,30
	FN	4,73 \pm 0,08	18,5	4,87 \pm 0,17	13,5	1,37	4,65 \pm 0,08	22,5	4,69 \pm 0,10	20,6	1,09
DOX	COL1	6,71 \pm 0,18	0,197	6,77 \pm 0,32	0,167	1,18	6,36 \pm 0,26	0,434	6,54 \pm 0,29	0,287	1,51
	FN	6,92 \pm 0,14	0,120	6,89 \pm 0,14	0,130	0,93	6,77 \pm 0,05	0,170	6,80 \pm 0,01	0,157	1,08
MX	COL1	6,83 \pm 0,27	0,147	6,94 \pm 0,32	0,115	1,27	6,55 \pm 0,13	0,284	6,69 \pm 0,14	0,203	1,40
	FN	6,91 \pm 0,20	0,124	7,04 \pm 0,25	0,091	1,36	6,68 \pm 0,05	0,208	6,74 \pm 0,06	0,182	1,14

Die COL1-vermittelte Resistenz der MDA-MB-231-Zellen manifestiert sich in einer Verringerung der pEC₅₀-Werte von 6,54 (= 287 nM) auf 6,36 (= 434 nM) bei Behandlung mit DOX und bei MX von 6,69 (= 203 nM) auf 6,55 (= 284 nM). Dies entspricht in beiden Fällen einer durchschnittlichen Resistenzzunahme von 40-50%. Die Resistenzzunahme von MDA-MB-231-Zellen gegenüber CDDP in Gegenwart von COL1 ist mit 30% verhältnismäßig hoch. Eine Resistenzentwicklung durch die Inkubation mit Fibronectin (FN) ist in bei MDA-MB-231-Zellen allenfalls moderat mit einer Zunahme der EC₅₀ von 10% ausgeprägt.

FN kann dagegen in MCF-7-Zellen eine Resistenzzunahme von ca. 36% bei CDDP und MX bewirken, bei DOX sorgt es allerdings für eine leichte Sensitivierung. Die Ergebnisse sind insgesamt für COL1 konsistenter, was an der ubiquitären Expression von COL1 und COL1-bindenden Rezeptoren der Zellen liegen kann. Die Zellen sind vermutlich aufgrund der Karzinogenese an eine COL1-Interaktion adaptiert. Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf die Verwendung von COL1 als repräsentative EZM fokussiert.

Die bisher beobachteten Resistenzsteigerung um bis zu 50% mag im direkten Kontrast zu resistenten Zelllinien wie die Ovarialkarzinomzelllinien A2780adr oder A2780cis, die mit Zytostatika gestresst und selektiert worden sind und eine Resistenzzunahmen auf das 5-10-fache aufweisen, quantitativ gering erscheinen. Allerdings müssen zur Einordnung der Ergebnisse vier Prämissen betrachtet werden:

- 1) Auch wenn im Labormaßstab eine EC_{50} -Zunahme von 50% nicht hoch erscheint, so kann innerhalb einer individuellen Chemotherapie eines Krebspatienten eine therapeutische Konzentration nicht beliebig erhöht werden, da auftretende Nebenwirkungen stark limitierend sein können.
- 2) Die Zellen befinden sich bei Zugabe des Zytostatikums bereits 24 h in Anwesenheit von COL1. Die resistenzerhöhenden Effekte verlaufen daher auf epigenetischer Ebene, was die *de novo* Natur dieser Resistenzentwicklung widerspiegelt. Eine dauerhafte Inkubation in Gegenwart von EZM-Proteinen wie COL1 über mehrere Passagierungen könnte daher den Effekt analog zur Zytostatikaselektion verstärken und permanente Veränderungen im Proteom erzeugen.
- 3) Resistent gezüchtete Zellen (wie die A2780cis Zellen) stellen eine artifizielle Modellzelllinie dar, die in der Praxis durch die Verwendung von Multikomponenten-Therapieschemata eher nicht auftreten. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz spiegelt daher eher die klinische Situation wider bzw. hat eine größere, klinische Nähe.
- 4) COL1 wird hier nur als Monolayer im Rahmen der 2D-Zellkultur verwendet. Es gibt jedoch Ansätze der 3D-/Organoid-Zellkultur (*mammospheres*), die die physiologischen Bedingungen ggf. besser widerspiegeln könnten. [334]. Allerdings kann hier insbesondere die anschließende Testung durch Organoidstrukturen erschwert werden.

Auf Basis der vorliegenden Daten lässt sich ableiten, dass die COL1-vermittelte Resistenzentwicklung bei MDA-MB-231-Zellen stärker ausgeprägt ist als bei der MCF-7-Zelllinie. MDA-MB-231-Zellen sind als mesenchymale Zellen dafür bekannt, vermehrt Zell-Matrix-Kontakte auszubilden im Gegensatz zu den epithelialen MCF-7-Zellen, die eher zu Zell-Zell-Kontakten neigen.

Said *et al.* haben einen ähnlichen COL1-Effekt bei DOX beobachtet und dies auf Thrombospondin1 zurückgeführt [335]. Dies soll nur stellvertretend für verschiedene Proteine stehen, da eine epigenetische Veränderung durch COL1 multifaktoriell ist. Joyce *et al.* zeigten im Zuge einer dreidimensionalen Zellkultivierung, dass MDA-MB-231-Zellen eine rigiditätsabhängige Resistenz gegen DOX im Gegensatz zu MCF-7-Zellen entwickeln [336]. Lovitt *et al.* bewiesen darüber hinaus, dass dabei nicht nur die 3D-Strukturen einen Einfluss haben, sondern auch die EZM selbst. Die Interaktion der *mammospheres* mit einem Matrigel aus EZM-Proteinen führte zu einer Chemoresistenz, die dagegen in einem rein artifiziellen Hydrogel ohne EZM-Proteine nicht auftrat [205]. Matrigel lässt sich aber nicht auf ein Protein beschränken, sodass es weiterer Forschung dieser Arbeit an den isolierten Proteinen bedarf, die als Stimulus für Adhäsionsrezeptoren wie Integrine fungieren können.

Die Stimulierung von Adhäsionsrezeptoren durch EZM kann diverse Wachstumssignale an die Zelle weiterleiten. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt der Resistenzhöhung auf einer veränderten Proliferation der Zellen durch EZM-Bindung basiert, wurde als Kontrollversuche der Einfluss der EZM ohne Zytostatika gemessen und auf die MTT-Absorption der unbehandelten Zellen normalisiert (**Abb. 6.4**).

COL1 und insbesondere FN führen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer tendenziell zu einer Erhöhung der gemessenen Zellviabilität um bis zu 15%. Dabei reagieren die mesenchymalen MDA-MB-231 Zellen erwartbar stärker auf die EZM-Proteine, was sich auch in den Signifikanzen widerspiegelt. Die Messwerte durch den Einfluss der EZM-Proteine schwanken teilweise deutlich, was anhand einiger erhöhter Standardabweichungen deutlich wird. Dabei nimmt die Erhöhung der Viabilität keineswegs konsequent mit andauernder Inkubationszeit zu. COL1 bewirkt in MCF-7 Zellen von 24-72 h keinen Effekt auf die Zellviabilität, während bei einer Kultivierung von 96 h auf Proteinen der EZM die Viabilität leicht abnimmt. Bei MDA-MB-231-Zellen wird dagegen von 24-72 h eine teils signifikante Erhöhung beobachtet, die bei

96 h nicht mehr erkennbar ist. Eine Kultivierungsdauer von 96 h ist dabei der relevanteste Messwert, da dies letztlich dem Auswertungszeitpunkt der MTT-Untersuchungen entspricht (24 h Anwachsen + 72 h Inkubation). Der Effekt von COL1 auf MDA-MB-231-Zellen lässt sich darauf zurückführen, dass die bestehenden COL1-Fasern (vgl. **Abb. 6.1**) die Adhäsion der Zellen nach Aussäen verstärken. Dies lässt sich morphologisch an früherem Spreizverhalten der Zellen beobachten. Durch diese verbesserte Adhäsion können die Zellen ihren Zellzyklus beschleunigen und schneller proliferieren. Dieser Effekt relativiert sich nach 96 h. Die Schwankungen können also durch die Phase des Zellzyklus der Zellen beim Aussäen bedingt sein.

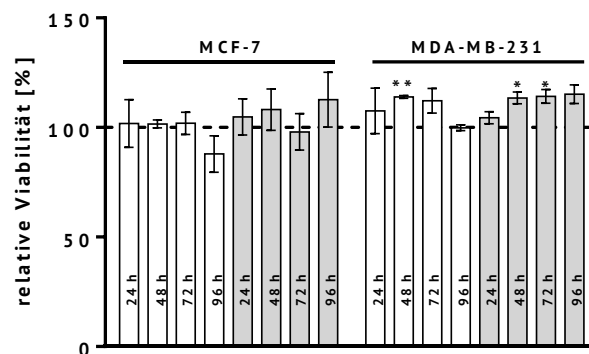


Abb. 6.4 Proliferation von MCF-7 und MDA-MB-231 in Gegenwart von COL1 (weiß) und FN (grau) anhand der normalisierten Absorption von Formazan in Relation zu den unbehandelten Zellen (n=3). Es sind nach 96 h für COL1 keine Viabilitätszunahmen zu erkennen, wodurch Änderungen in der Proliferation als Bias für Viabilitätsmessungen ausgeschlossen werden können. FN erhöht dagegen durchweg die Zellviabilität um bis zu 15%.

Insgesamt weicht die Zellviabilität durch EZM-Inkubation maximal um ca. 15% ab und ist damit als Grund für die beobachtete Chemosistenz-Erhöhung vernachlässigbar. Die Veränderungen sind bei COL1 insgesamt deutlich geringer ausgeprägt als bei FN und damit auch ein geringerer *Bias*. Dies spricht neben den höheren RF-Werten bei COL1 für die weitere Fokussierung auf COL1 als EZM. Es muss aber betrachtet werden, dass eine verstärkte Proliferation keineswegs zu einer verstärkten Chemosistenz führen muss. Gerade bei Zytostatika, deren Wirkung auf Ebene der Zellteilung stattfindet, kann eine verstärkte Proliferation die zytostatische Wirkung erhöhen. Außerdem werden die Messergebnisse einer Zytotoxizitätsuntersuchung auf den jeweiligen PBS-Wert, als 100% Viabilität normalisiert, sodass der Einfluss auf den pEC_{50} -Wert durch eine eventuelle Veränderung des Proliferationsverhaltens kompensiert wird.

Ergebnisse und Diskussion

Die Chemosensitivität von Mammakarzinomen durch EZM

Zusätzlich wurde lichtmikroskopisch die Zellmorphologie in Anwesenheit von COL1 und der Zytostatika untersucht (**Abb. 6.5**). Beide Zelllinien wachsen in Anwesenheit von COL1 strukturierter und bilden gespreizte, lineare, teilweise Filopodien-artige Strukturen aus. Bei den bereits mesenchymalen, EZM- bzw. COL1-affinen MDA-MB-231-Zellen ist der Unterschied geringer als bei den epithelialen MCF-7-Zellen, die unter COL1 weniger Zell-Zell-Kontakte und mehr Zell-EZM-Kontakte ausprägen. Die EC_{50} der drei Zytostatika CDDP, DOX und MX deformieren die Morphologie der Zellen durch den zytotoxischen Stress. Die Kombination mit COL1 lässt jedoch insbesondere im Fall von MDA-MB-231 und teilweise bei MCF-7-Zellen eine weniger deformierte Morphologie bestehen. Insgesamt lassen die Zytostatika das Zellvolumen deutlich anwachsen, was auf eine gestörte Zellteilung hindeuten kann. Der Zuwachs des Zellvolumens ist bei allen drei Zytostatika signifikant und wird in **Abb. 6.5** am Beispiel des DOX illustriert. Die Anwesenheit von COL1 sorgt für eine Reduktion dieses Zuwachses. Dieser ist in den MCF-7-Zellen gering und in den mesenchymalen MDA-MB-231-Zellen signifikant ausgeprägt. Dies kann neben der vitaleren Morphologie ein Hinweis auf eine geringere Wirkung des Zytostatikums in Anwesenheit von COL1 und damit einer weniger gestörten Zellteilung sein, in Analogie zur beobachteten Resistenzzunahme.

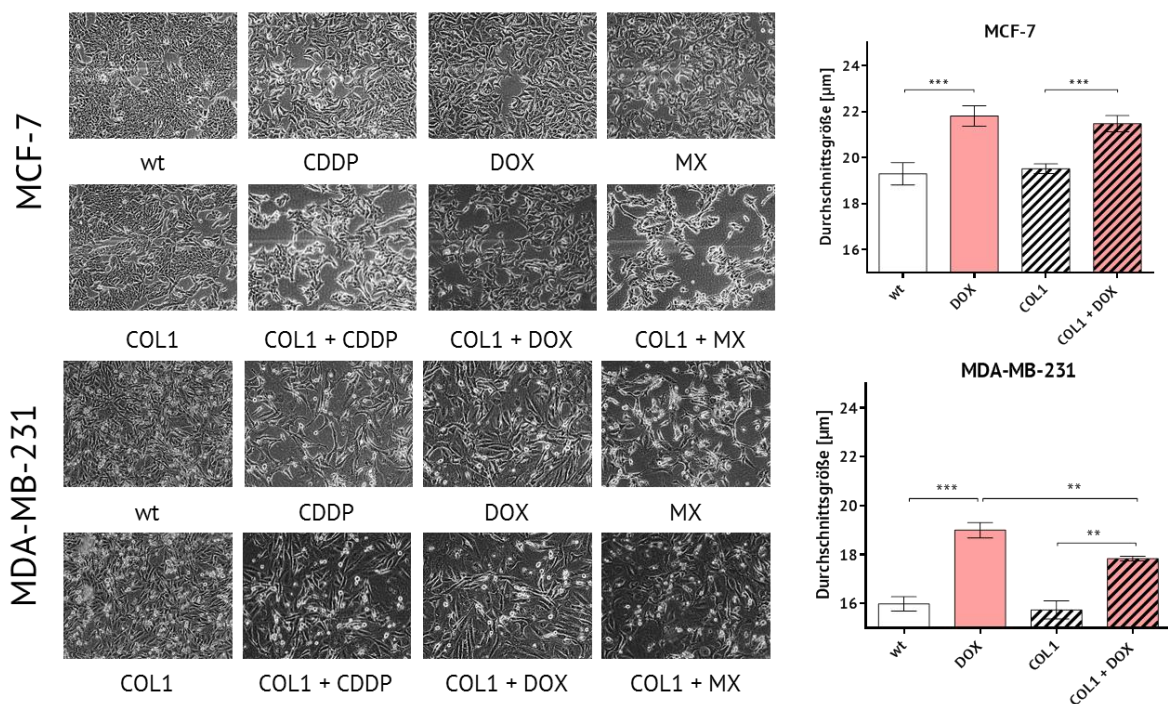


Abb. 6.5 Morphologische Veränderung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 unter dem Einfluss von COL1 und den Zytostatika Cisplatin (CDDP), Doxorubicin (DOX) und Mitoxantron (MX). Die Zellen wurden 24 h mit den EC_{50} der jeweiligen Zytostatika beimpft. Nach der mikroskopischen Analyse wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst und die Zellgröße per CASY-Messung bestimmt (n = mind. 3, ungepaarter t-Test).

6.1.3. Metabolische Aktivität

Deregulation des Energiestoffwechsels ist ein *hallmark of cancer*. Daher wurde der ATP-Gehalt der Zellen und damit die metabolische Aktivität auf die Zellproteinmenge normalisiert. Es ist ein direkter Zusammenhang zwischen einem erhöhten oder auch erniedrigten ATP-Gehalt einer Zelle und der Chemoresistenz nachgewiesen [337]. Primär ist dabei für den Einfluss externer Stimuli ausschlaggebend, ob der Energiestoffwechsel dereguliert wird.

Für die Untersuchung wurden die Zellen für 72 h mit COL1 inkubiert, anschließend wurde nach der Ablösung der Zellen der ATP-Gehalt über eine Luciferin/Luciferase-Reaktion bestimmt. Die Bestimmung erfolgt nach Ablösung, d.h. die Unterschiede basieren auf den bis dahin eingetretenen Veränderungen des Metaboloms der Zellen.

Interessanterweise führt COL1 bei MCF-7-Zellen zu einer Erhöhung des ATP-Gehalts, während ATP bei MDA-MB-231-Zellen reduziert ist (**Abb. 6.6**). Die Ergebnisse weisen allerdings keine Signifikanzen auf. Die Erhöhung des ATP-Gehalt bei MCF-7-Zellen kann direkt bspw. über HIF-1 α zellprotektiv wirken, während die Reduktion des ATP-Gehalts der MDA-MB-231-Zellen in Anwesenheit von COL1 eine erhöhte ATP-Hydrolyse darstellen kann. Analog konnten Zontelli *et al.* ein Zusammenhang bei MDA-MB-231-Zellen zwischen 3D-Kollagen-Strukturen und einer vermehrten ATP-Hydrolyse herstellen, was mit dem Migrationsverhalten der Zellen begründet wurde [338]. ATP-Hydrolyse aber auch durch eine vermehrte Aktivität von ABC-Transportern verstärkt sein.

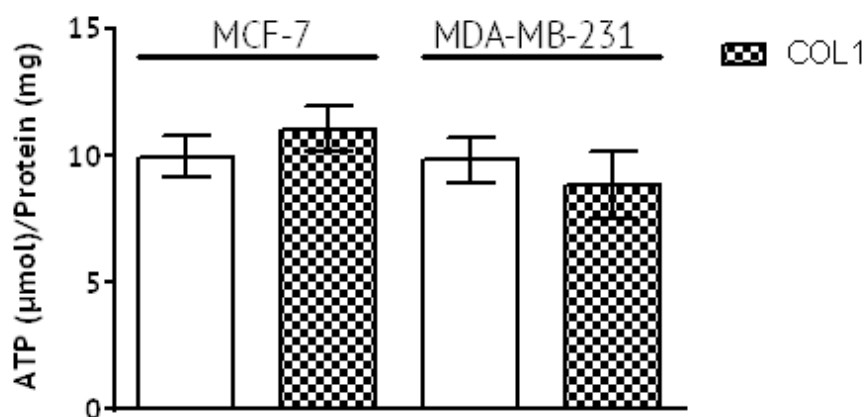


Abb. 6.6 ATP-Menge der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit der Inkubation mit COL1 (72 h) normalisiert auf die per BCA quantifizierte Proteinmenge. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mind. drei biologischen Proben, die jeweils mind. einmal vermessen wurden. Die statistische Analyse mittels t-Test konnte keinen signifikanten Unterschied feststellen.

6.2. Die intrazelluläre Konzentration der Zytostatika

6.2.1. Cisplatin

Resistenzen basieren häufig auf der Reduktion des Xenobiotikums oder des aktiven Metabolits im Zellplasma bspw. durch Verringerung von Influxpumpen, der Aktivierung von ABC-Efflux-Transportern oder durch veränderte Metabolisierungswege. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung der EZM auf solchen Mechanismen basiert.

Um die intrazelluläre Platinierung zu beurteilen, wurden die Zellen nach CDDP-Inkubation mittels AAS auf ihren Platiningehalt untersucht. CDDP selbst ist kein Substrat von ABC-Transportern, kann aber nach Kopplung an Glutathion durch die Glutathion-S-Transferase als CDDP-GSH-Konjugat durch den Transporter ABCC2 erkannt werden. Während unsere Arbeitsgruppe eine Reduktion des Gehaltes und eine erhöhte Expression von ABCC2 bei Ovarialkarzinomen feststellen konnte [339], wurde bei den beiden Mammakarzinom-Zelllinien kein signifikanter Unterschied der intrazellulären Platinkonzentration beobachtet (**Abb. 6.7A**). Die zusätzliche Inkubation mit dem pan-ABC-Transporter-Inhibitor XR9577 (4 h, 10 μ M, subtoxisch, **Abb. 6.10A**) konnte ebenfalls keine signifikante Akkumulation von CDDP bewirken (**Abb. 6.7B**). Bei den MDA-MB-231-Zellen führte die Inkubation mit XR9577 sogar zu einer Reduktion des intrazellulären Platiningehaltes. Dies ist vermutlich auf eine direkte Wechselwirkung (z.B. Chelatisierung) zwischen XR9577 und CDDP zurückzuführen.

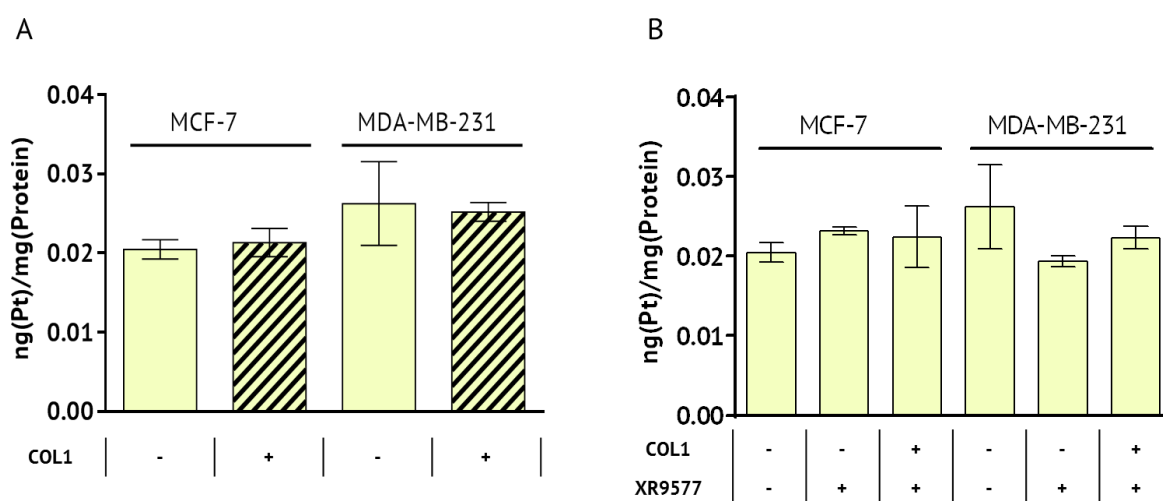


Abb. 6.7 Darstellung der intrazellulären Platinkonzentration in MCF-7- und MDA-MB-231 Zellen in Abhängigkeit von COL1 (**A**) sowie 10 μ M des ABC-Transporter-Inhibitor XR9577 (**B**) ermittelt per AAS (n=3). In beiden Fällen sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Die Daten aus A sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

6.2.2. Doxorubicin und Mitoxantron

Der intrazelluläre Gehalt der fluoreszierenden Zytostatika DOX und MX wurde über verschiedene Ansätze bestimmt. DOX und MX sind bekannte Substrate von ABC-Transportern. DOX wird von den Transportern ABCB1 (Pg-p) und ABCC1 (MRP1), sowie der ABCG2 (BCRP)-Mutante R482 [340] erkannt. MX wird dagegen von ABCG2 und in geringem Maße von ABCB1 exportiert. Zunächst wurden die Zellen analog der CDDP-Bestimmung mit den Zytostatika präinkubiert. Die intrazelluläre Konzentration wurde per Fluoreszenzspektroskopie (Kapitel 5.5) bestimmt und auf den mittels BCA quantifizierten Proteingehalt der jeweiligen Probe normalisiert. COL1 bewirkt eine signifikante Reduktion von DOX in beiden Zelllinien (MCF-7: 114,5 ng/mg zu 82,6 ng/mg, MDA-MB-231: 115,2 ng/mg zu 91,8 ng/mg, **Abb. 6.8A**). Im Fall von MX tritt dieser Effekt nur bei den MDA-MB-231-Zellen (516,7 ng/mg zu 393,7 ng/mg) auf.

Zusätzlich wurden die MDA-MB-231-Zellen mit dem pan-ABC-Transporter-Inhibitor XR9577 (10 µM) inkubiert. XR9577 erhöht DOX und MX in unterschiedlichem Maße. Der Quotient der DOX/MX-Konzentrationen zwischen nicht-inhibiert (- XR9577) und inhibiert (+ XR9577) ist durch COL1 größer (**Abb. 6.8B**). Unter der Annahme einer maximalen Inhibition (=100%) durch XR9577 weist dies auf eine COL1-induzierte, erhöhte Transporter-Basalaktivität von P-gp, MRP1 und BCRP in MDA-MB-231 hin (DOX: +12,7% / MX: +7,3%).

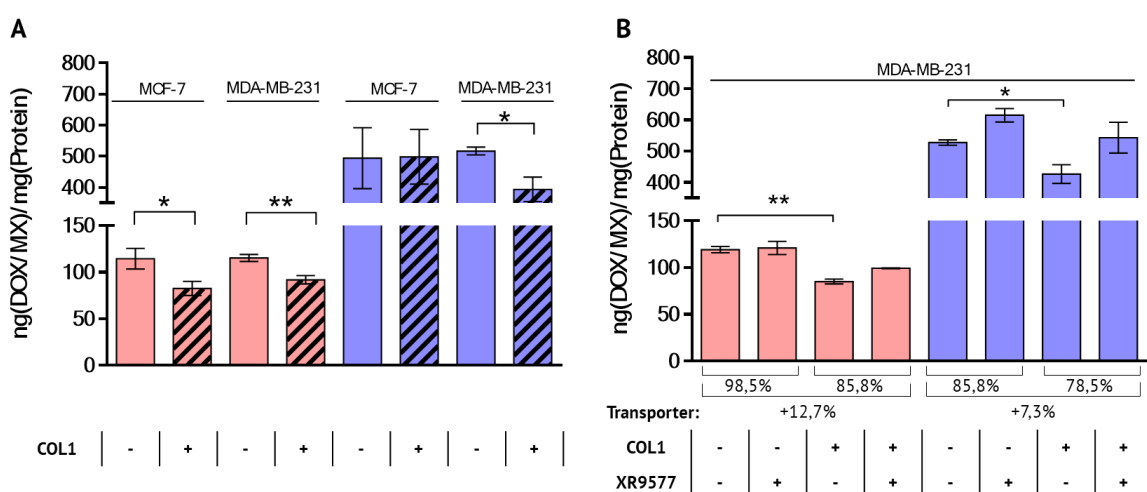


Abb. 6.8 Darstellung der intrazellulären Doxorubicin- und Mitoxantron-Konzentration in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen. **(A)** Die intrazellulären Zytostatika wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert und auf die per BCA quantifizierten Proteingehälter normalisiert (n=5, gepaarter t-Test). **(B)** Inkubation der MDA-MB-231-Zellen mit dem ABC-Inhibitor XR9577 (10 µM). Es zeigt sich eine, wenn auch nicht signifikante Zunahme des intrazellulären Gehalts unter ABC-Inhibition (n=3, gepaarter t-Test). Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Ergebnisse und Diskussion

Die intrazelluläre Konzentration der Zytostatika

In diesem Versuchsaufbau besteht jedoch die Limitierung, dass der Monolayer aus COL1 eine Barriere für die Zytostatika-Aufnahme darstellen kann. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde der Versuchsaufbau verändert. Statt der direkten Inkubation der adhären Zellen mit den Zytostatika, wurden die Zellen nach COL1-Inkubation (72 h) abgelöst und suspendiert. Erst dann wurden die Zellen mit 3 μ M DOX oder MX inkubiert (4 h bis zum *steady state*) und im Anschluss wurde die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. So kann COL1 als Barriere ausgeschlossen werden. Die gemessenen Effekte müssen auf zellulären Veränderungen basieren, die während der Inkubation mit COL1 entstanden sind.

Die in diesem Versuchsaufbau gewonnenen Daten (**Abb. 6.9**) sind kohärent mit den vorherigen Ergebnissen, die per Fluoreszenzspektrometrie gemessen wurden. Es kann eine signifikante Reduktion von DOX und MX in MDA-MB-231-Zellen durch COL1 nachgewiesen werden. In MCF-7-Zellen findet sich eine nicht-signifikante Reduktion von DOX und MX, aber eine signifikante Differenz zu der jeweiligen Inhibition mit XR9577. Dies impliziert eine hohe Pg-P/BCRP-Basalaktivität, die durch COL1 noch gesteigert werden kann (DOX: +6,9%, MX: 4,2%). MDA-MB-231-Zellen weisen ebenfalls signifikante Differenzen bei inhibierten Proben auf und eine noch größere Transporter-Aktivierung (DOX: 11,3%, MX: 7,5%) durch COL1.

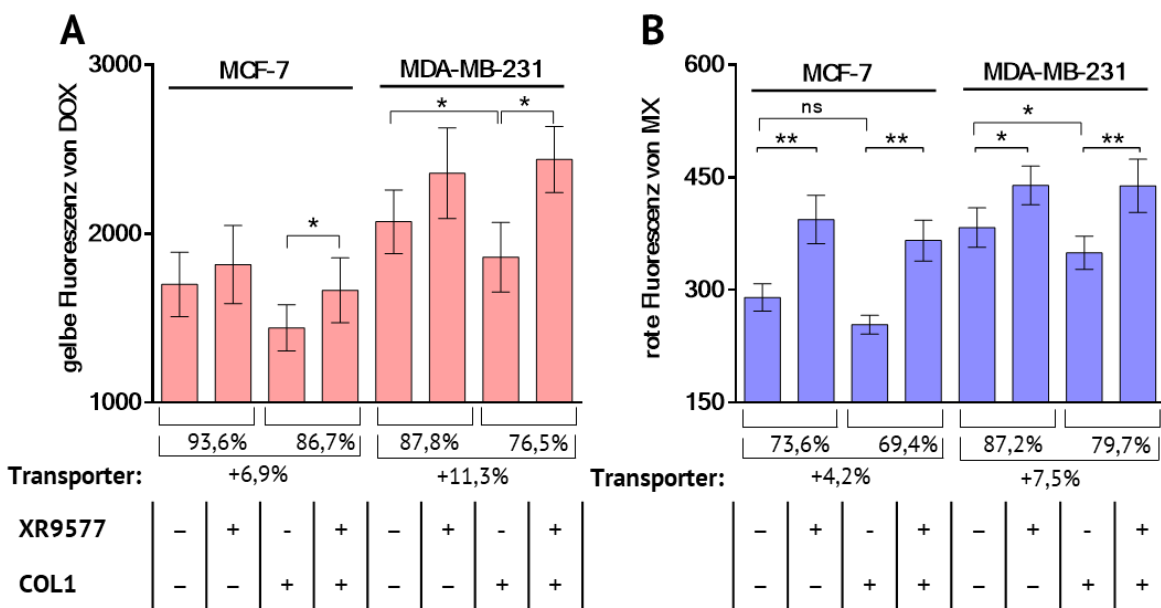


Abb. 6.9 Bestimmung des intrazellulären DOX (**A**) und MX (**B**) mittels Durchflusszytometrie in Abhängigkeit von COL1 und dem ABC-Inhibitor XR9577 (10 μ M). Die Zellen wurden nach der Inkubation auf der EZM abgelöst und als Suspension mit den Zytostatika inkubiert (n=4, gepaarter t-Test). Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Die Erkenntnisse der veränderten intrazellulären Akkumulation wurden anschließend auf Ebene der Zellviabilität untersucht. XR9577 selbst ist bei einer Konzentration von 10 μM bei 72 h subtoxisch bis maximal EC_{20} (**Abb. 6.10A**), ruft aber analog zur intrazellulären Akkumulation von DOX und MX signifikante Sensitivierungen der Zellen gegenüber diesen Zytostatika hervor (**Abb. 6.10, Tab. 6.2**). Dabei werden bei MDA-MB-231-Zellen Resistenzfaktoren von 0,62 (MX) und 0,59 (DOX) erhalten und bei MCF-7-Zellen sogar 0,39 (MX) bis 0,54 (DOX). Die Anwesenheit von COL1 kann diese Sensitivierung nicht revidieren, was ein Hinweis auf die Involvierung von ABC-Transportern in der COL1-vermittelten Resistenz ist. Alternative Überlebenssignale müssten die erhöhte Sensitivität kompensieren können. Die Koinkubation von XR9577 erzeugt eine erhöhte Resistenz gegenüber CDDP (**Tab. 6.2**), was in **Abb. 6.7B** durch reduzierte Pt-Gehälter bereits angedeutet wurde.

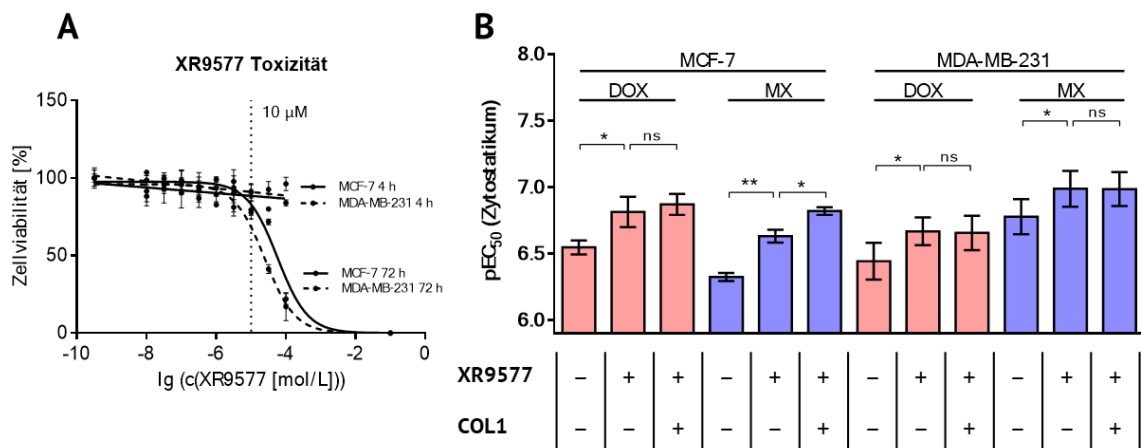


Abb. 6.10 A) Zytotoxizität von 10 μM XR9577 bei 72 h und 4 h. **B)** Statistische Analyse der pEC_{50} -Werte der MTT-Viabilitätsuntersuchungen der Inkubation von DOX und MX in Kombination mit dem pan-ABC-Transporter-Inhibitor XR9577 bei 10 μM nach 72 h (n= mind. 3, gepaarter t-Test). Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Tab. 6.2 Übersicht der Ergebnisse zum Einfluss von XR9577 (10 μM) auf die Zellviabilitäten aus **Abb. 6.10** mit zusätzlichen Messwerten zur Koinkubation mit CDDP und jeweils der Bildung des RF-Wertes.

		CDDP			DOX			MX		
		$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} [\mu\text{M}]$	RF	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} [\mu\text{M}]$	RF	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} [\mu\text{M}]$	RF
MCF-7	CTR	4,70 \pm 0,19	19,6	1	6,54 \pm 0,11	0,283	1	6,80 \pm 0,50	0,236	1
	XR9577	4,41 \pm 0,15	38,7	1,97	6,81 \pm 0,28	0,153	0,54	7,04 \pm 0,56	0,092	0,39
	COL1 + XR9577	4,49 \pm 0,17	32,2	1,64	6,87 \pm 0,17	0,134	0,47	7,31 \pm 0,59	0,048	0,20
MDA-MB-231	CTR	4,80 \pm 0,27	15,7	1	6,56 \pm 0,36	0,360	1	6,78 \pm 0,30	0,166	1
	XR9577	4,51 \pm 0,17	31,0	1,97	6,74 \pm 0,31	0,214	0,59	6,99 \pm 0,30	0,103	0,62
	COL1 + XR9577	4,43 \pm 0,18	37,3	2,37	6,71 \pm 0,24	0,221	0,61	6,99 \pm 0,28	0,103	0,62

6.3. ABC-Transporter-Aktivität durch die EZM

Die Aktivität von ABC-Transportern kann auf mehreren Ebenen erfasst werden.

- Funktionelle Aktivität (6.3.1)
- Proteinexpression (6.3.2)
- mRNA-Expression (6.3.3)

Postranslationale Modifikationen, die Aktivierungszustände und das Zusammenspiel der ABC-Transporter sind dabei fließend. Viele Substrate werden von mehreren Transportern mit unterschiedlichen Affinitäten erkannt, sodass gegenseitig die Funktion übernommen werden kann. Daraus folgt, dass bspw. eine reduzierte Expression eines Transporters nicht zwangsläufig in einer erhöhten, intrazellulären Substratkonzentration münden muss, wenn seine Funktion durch andere Transportproteine kompensiert werden kann. Darüber hinaus sind weitere Wege bekannt, über die eine Zelle die Aktivität eines Transporters steigern kann, bspw. im Falle von MRP1 über die Interaktion des Transporters mit dem Aktinskelett [219].

6.3.1. Aktivität der ABC-Transporter

Da in Kapitel 6.2 dargelegt werden konnte, dass die Anwesenheit des pan-ABC-Transporter-Inhibitors XR9577 zu einer intrazellulären Akkumulation von DOX und MX, sowie einer Sensitivierung der Zelllinien führt, wurde im Folgenden auf die Aktivität der ABC-Transporter fokussiert. Dazu wurden etablierte ABC-Transporter-Testsysteme verwendet, die normalerweise bei überexprimierenden Zellsystemen wie MCF-7BCRP, MDCKIIBCRP, H69MRP1 und A2780adr existieren. Die in dieser Arbeit angewendete Methodik nutzt Referenzinhibitoren dieser Testsysteme, bei denen eine maximale Inhibition des jeweiligen Transporters erwartet werden kann. Diese maximale Inhibition wird als interner Standard genutzt, um die Efflux-Aktivität der Zellen unter den verschiedenen Behandlungsschemata zu normalisieren. Für die Betrachtung des Transporters ABCG2 wurden das Testsystem Pheophorbid A mit Ko143 (3 μ M) als Inhibitor verwendet (Kapitel 5.6.2). Für die Transporter ABCB1 und ABCC1 wurde Calcein AM benutzt (Kapitel 5.6.1). Als Inhibitor für dieses Testsystem wurde abweichend XR9577 (10 μ M) verwendet, da der Standard-Inhibitor Cyclosporin A toxisch auf die beiden Zelllinien wirkte.

Die Zellen wurden 72 h an COL1 inkubiert, abgelöst und entsprechend dem Protokoll der Testsysteme vermessen. Die basale Aktivität der Zellen ist mit ca. 95% Inhibition äußerst gering, da es sich nicht um Zytostatika-selektierte Zellen wie A2780adr handelt, sondern um unbehandelte Zelllinien. Insgesamt führt der Einfluss von COL1 zu einer signifikanten Erhöhung (d.h. verminderte Inhibition) aller Transporter-Aktivitäten in MDA-MB-231-, sowie von ABCB1/ABCC1 in MCF-7-Zellen (**Abb. 6.11**). Die gemessenen Aktivitätssteigerungen betragen jeweils ungefähr 20%. Eine Aktivitätssteigerung von ABCG2 in MCF-7 wurde initial im wt beobachtet, konnte aber in späteren Messungen (vgl. **Abb. 6.26**) innerhalb der sc-Variante (siehe Kapitel 6.5) nicht mehr reproduziert werden. Da die sc-Variante sich von der wt-Zelle nicht unterscheiden sollte, wird aufgrund der Widersprüchlichkeit auf eine Darstellung der Daten in **Abb. 6.11** verzichtet. Der Calcein AM-Assay unterscheidet nicht zwischen der Aktivität von ABCB1 und ABCC1 (siehe Kapitel 5.7.1) und kann nur in der Summe erfasst werden. Daher wurde zusätzlich der Inhibitor WK-X-34 verwendet, der eine geringere Affinität zu ABCC1 aufweist [341]. Die Ergebnisse waren vergleichbar, sodass die Hauptwirkung der Aktivitätssteigerung per Calcein AM auf ABCB1 zurückzuführen ist. Analog haben El Arzreq *et al.* einen COL1-Effekt auf MRP1 in hämatopoetischen Suspensionskrebszellen untersucht [210]. Dabei ist aber limitierend, dass nur eine vierstündige Aktivierung mit gelöstem COL1 erfolgte und die Messung ohne Inhibitor als Kontrolle als Einpunktmessung per Durchflusszytometrie durchgeführt wurde.

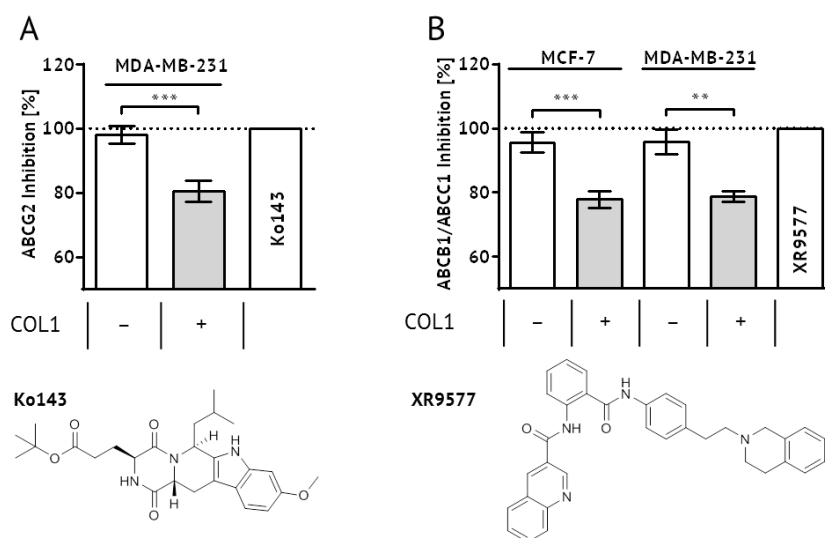


Abb. 6.11 ABC-Transporter-Aktivitäten der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231. MDA-MB-231-Zellen zeigen eine ca. 20%ige Aktivierung von ABCG2 (A, n=11) und ABCB1/ABCC1 (B, n=8), MCF-7-Zellen nur in ABCB1/ABCC1 (n=10) durch Inkubation mit COL1. Einige Messungen wurden z.T. von Vladlena Pfeifer in ihrer Masterarbeit erhoben [327]. Die Daten wurden per ungepaartem t-Test analysiert und sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

6.3.2. Proteinexpression

Bisher konnte eine Aktivitätssteigerung von ABC-Transportern durch COL1 auf funktionaler Ebene festgestellt werden. Der naheliegendste Grund dabei ist die Expressionssteigerung der jeweiligen Transporterproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphatierungen, die die Aktivität modulieren, sind darüber hinaus denkbar, werden im Rahmen dieser Arbeit aber nicht explizit betrachtet.

Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot-Analytik untersucht. Da ABC-Transporter postrtranslationale Veränderungen aufweisen oder im Falle von BCRP Di- und Tetramerisierungen erfolgen können, wodurch die Bandenidentifizierung erschwert wird, wurde als Kontrolle jeweils ein Lysat einer den jeweiligen Transporter überexprimierende Zelllinie verwendet (ABCB1: A2780adr, ABCC1: H69AR, ABCG2: MCF-7BCRP).

Die Expression der ABC-Transporter weist bei der Zelllinie MDA-MB-231 (**Abb. 6.12B**) eine signifikante Erhöhung bei ABCB1 (68%, $p=0,0465$) und ABCG2 (62%, $p=0,0128$) auf, während der Transporter ABCC1 lediglich einen nicht-signifikanten gesteigerten Trend aufweist. Die Expressionssteigerung von MCF-7-Zellen (**Abb. 6.12A**) ist moderat und ist lediglich bei ABCB1 leicht (15%), aber signifikante ($p=0,0420$) erhöht. ABCC1 weist deutliche Schwankungen auf, während die Proteinexpression von ABCG2 sogar durch COL1 abnimmt. Dies passt zu den widersprüchlichen Ergebnissen der MCF-7-Zellen in Bezug auf BCRP und Mitoxantron, welches gleichermaßen Substrat von ABCB1 und ABCG2 ist. Denkbar ist also, dass ABC-Transporter sich gegenseitig in ihren Funktionen kompensieren.

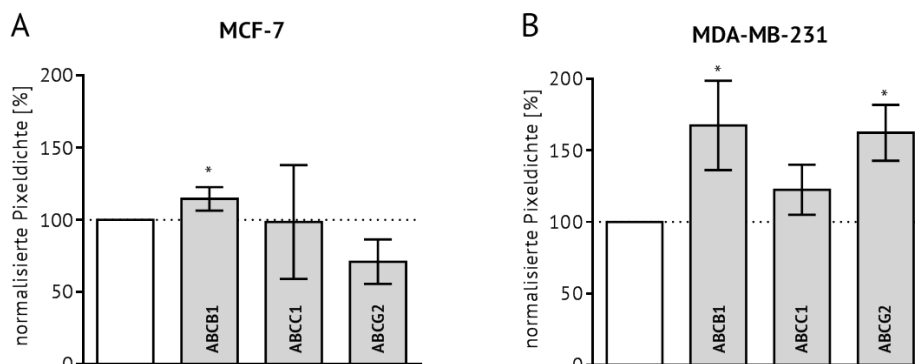


Abb. 6.12 Pixeldichteanalyse der Proteinexpression der ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 in Anwesenheit von COL1 in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231. Dargestellt sind die gegen die unbehandelte Probe normalisierten Mittelwerte aus mind. drei biologischen Proben mit dem Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. Repräsentative Blotbilder sind in **Abb. 6.26** visualisiert. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

6.3.3. mRNA-Analytik

Auch wenn die zelluläre mRNA der ABC-Transporter nicht mit deren Proteinexpression korrelieren muss, ist die Veränderung der mRNA dennoch ein wichtiger Faktor für die Betrachtung des Wirkungsmechanismus der CAM-DR.

Da die Steigerung der Proteinexpression von ABCB1 und ABCG2 in der Zelllinie MDA-MB-231 am deutlichsten ausgeprägt war, wurden diese Transporter zur Betrachtung der mRNA-Level ausgewählt. Durch Inkubation mit COL1 liegt die mRNA von ABCG2 um 20% vermehrt vor, während die mRNA von ABCB1 um 15% reduziert ist (**Abb. 6.13**).

Die Aktivität von ABCB1 kann durch verschiedene Signalkaskaden, wie MAPK erhöht werden, allerdings nicht über eine Steigerung der Translation oder mRNA, sondern über den verminderten proteasomalen Abbau des resultierenden Proteins [209]. Das heißt, eine hier gemessene reduzierte Menge von ABCB1-mRNA muss nicht im Widerspruch zu einem erhöhten Aktivierungszustand liegen.

Im Falle von ABCG2 korrelieren die Aktivitäten meist mit dem Expressionslevel. Dies spiegelt sich auch in den erhöhten mRNA-Konzentration von ABCG2 wider. Während die Erhöhung um 20% zwar mit der funktionellen Aktivitätssteigerung per Pheophorbid A korreliert, liegt die über Western Blot bestimmte Proteinexpression mit 60% weit darüber.

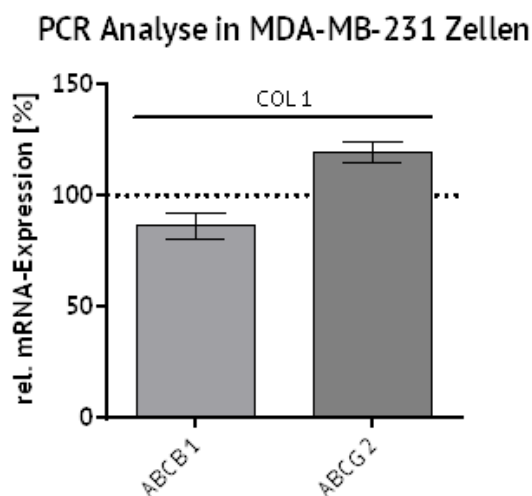


Abb. 6.13 Die mRNA-Analyse der Transportproteine ABCB1 und ABCG2 nach Inkubation durch COL1. Die Experimente wurde von Frau Katharina Schmutzler durchgeführt. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl (n=2) ist keine statistische Analyse möglich.

6.4. Einfluss der Integrine auf die matrixvermittelte Chemoresistenz

6.4.1. Analyse der Integrinstrukturen

Die Interaktion zwischen Zellen und EZM verläuft über Adhäsionsrezeptoren, deren wichtigste Klasse die Integrine darstellen. Um die bisherigen Befunde zur COL1-vermittelten Resistenz der Zellen mit deren Integrin-Expressionsprofil in einen funktionellen Zusammenhang zu bringen, wurden mittels Durchflusszytometrie die COL1-bindenden Integrine bestehend aus der β_1 -Untereinheit (ITGB1) und den korrespondierenden krebsassoziierten α -Untereinheiten α_1 und α_2 analysiert. Die Durchflusszytometrie (nach Kapitel 5.4.1) wurde als Alternative zum Western Blot ausgewählt, um selektiv die an der Zelloberfläche präsentierten Integrine zu untersuchen. Die Zellen wurden suspendiert, mit einem anti- β_1 (P5D2) bzw. anti- α_2 - (P1H5) Antikörper versetzt und anschließend mit einem Fluorophor-gekoppelten sek. Antikörper inkubiert. Abschließend wurden die Zellen über Durchflusszytometrie vermessen, sodass das Fluoreszenzsignal proportional zur Anwesenheit der jeweiligen Integrinstruktur ist. Neben der deutlichen ITGB1-Expression konnte von den α -Untereinheiten lediglich α_2 (ITGA2), nicht aber α_1 (ITGA1) nachgewiesen werden (**Abb. 6.14**). Dabei wird deutlich, dass ITGB1 ($p=0,0001$) und ITGA2 ($p=0,0042$) signifikant stärker in MDA-MB-231- in Relation zu MCF-7-Zellen exprimiert werden.

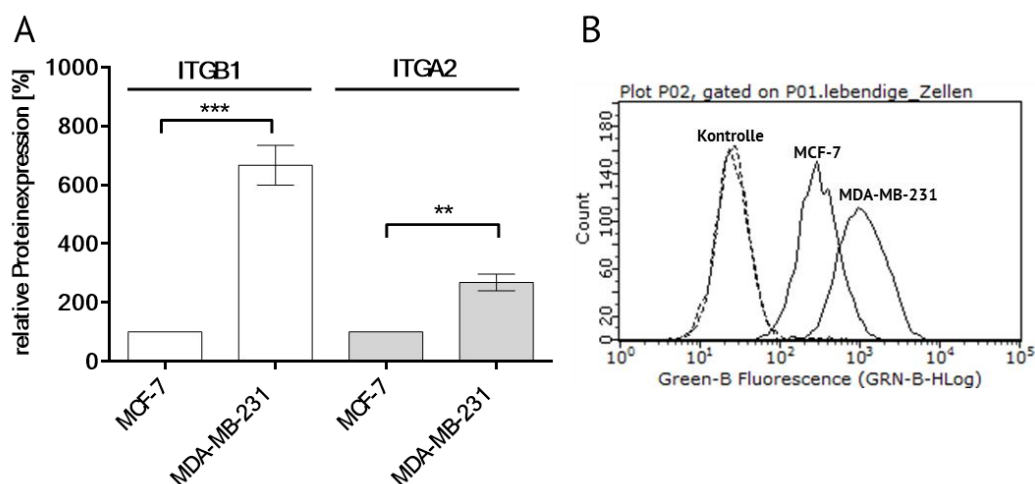


Abb. 6.14 Rel. Expression der Integrine ITGB1 und ITGA2 per extrazellulärer Durchflusszytometrie, in mind. $n=3$ biologischen Proben. **A)** Dargestellt sind die Mittelwerte der Mediane der Fluoreszenzintensitäten von MDA-MB-231-Zellen, normalisiert auf den Mittelwert der Mediane von MCF-7-Zellen. Der t-Test zeigt signifikante Steigerungen der Expression von ITGA2 und ITGB1 in MDA-MB-231-Zellen. **B)** Exemplarische Darstellung der Histogramme der Integrine ITGA2 von MCF-7 und MDA-MB-231. Exemplarische Histogramm zu ITGB1 befinden sich in **Abb. 6.21**. Die Daten sind publiziert in Baltés *et al.* [333].

6.4.2. Einfluss der Integrine auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen

Um die funktionellen Auswirkungen der Integrinexpression zu untersuchen, wurde die COL1-Adhäsion der Zellen unter ITGB1-aktivierenden (Mn^{2+} -Kationen) und inhibierenden (blockierender ITGB1-Antikörper P5D2) Stimuli betrachtet (**Abb. 6.15**).

Beide Zelllinien adhären verstärkt in Gegenwart von COL1. Dies ist bei MDA-MB-231-Zellen signifikant, bei MCF-7-Zellen ist für eine signifikante Erhöhung die zusätzliche Integrinaktivierung mittels Mn^{2+} -Kationen (1 mM) nötig. Diese binden an die MIDAS-Region der Integrine und können deren Konformation im Gegensatz zu physiologischen Substraten wie Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Kationen superaktivieren. Die alleinige Stimulation mit Mn^{2+} -Kationen ohne das Vorhandensein von Substraten wie COL1 erhöht nicht die Adhäsion, jedoch kann eine Bindung zur EZM durch die Anwesenheit von Mn^{2+} -Kationen in beiden Zelllinien verstärkt werden, während die Anwesenheit des blockierenden Antikörpers P5D2 zu einer Reduktion der durch COL1 vermittelten Adhäsion führt.

Dieses Experiment demonstriert die ITGB1-Abhängigkeit beider Zelllinien in der COL1-Bindung. Dabei ist die Zunahme der COL1-Adhäsion proportional zu dem Vorhandensein dieser Untereinheit, da MDA-MB-231-Zellen eine deutlich höhere Expression von ITGB1 aufweisen (vgl. **Abb. 6.14**).

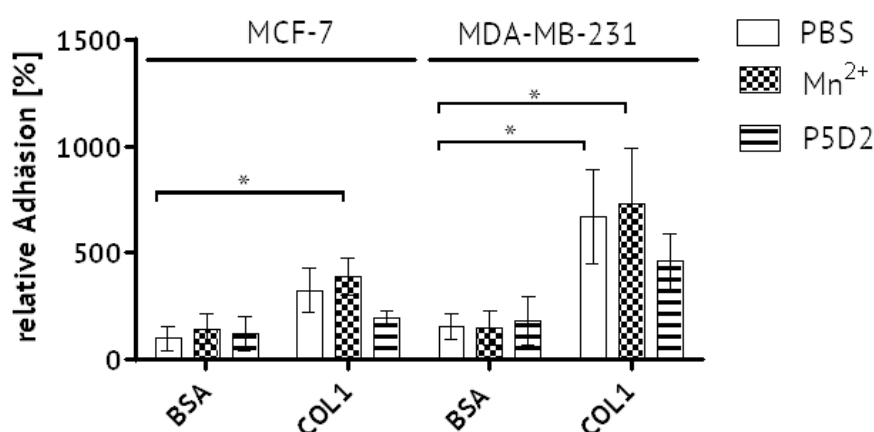


Abb. 6.15 Relative Adhäsion von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1, Integrin-Stimulation mittels Mn^{2+} -Kationen sowie ITGB1-Inhibition durch den Antikörpers P5D2. Das *staining* der Zellen wurde mit Methylenblau durchgeführt. BSA wurde als Negativkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei biologischen Proben, gemessen in Triplikaten. Die statistische Analyse mittels ungepaarten t-Test zeigt signifikante Erhöhungen der Adhäsion durch COL1. Die gleichzeitige Verwendung eines blockierenden Antikörpers kann diesen Effekt reduzieren. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

6.4.3. Einfluss der Integrinaktivierung auf die Chemoresistenz

Die COL1-Adhäsion und -Interaktion der Zellen wird durch Stimuli wie Mn^{2+} -Kationen verstärkt. Daher wurde im nächsten Schritt die Chemoresistenz in Abhängigkeit der Integrinaktivierung untersucht. Obwohl die alleinige Anwesenheit von Mn^{2+} -Kationen nicht zu einer Erhöhung der Adhäsion führt, kann dennoch eine gesteigerte Resistenz gegen CDDP beobachtet werden (Abb. 6.16, Tab. 6.3). Dies impliziert, dass Mn^{2+} -Kationen zwar nicht die Adhäsion ohne EZM-Substrat erhöhen, jedoch trotzdem ein *outside-in* Integrin-signaling bewirken können. Im Vergleich zu den vorherigen CDDP-Chemoresistenz-Messungen (vgl. Abb. 6.3) kann durch Mn^{2+} ($p=0,0243$) bzw. $Mn^{2+} + COL1$ ($p=0,0176$) bei MCF-7-Zellen eine signifikante Zunahme der Resistenz gegenüber einer unbehandelten Probe bzw. auch signifikant zwischen Mn^{2+} und $COL1 + Mn^{2+}$ ($p=0,0495$) erreicht werden. In MDA-MB-231-Zellen führt die Stimulation mit Mn^{2+} zu keiner signifikanten Erhöhung der Resistenz gegen CDDP, was mit der geringen Adhäsionssteigerung (vgl. Abb. 6.15) durch Mn^{2+} -Kationen korreliert. Der Einfluss von Mn^{2+} konnte nur in Bezug auf CDDP untersucht werden, da die beiden Anthrazyklin-Zytostatika das Kation chelatisieren, wodurch sie ihre Wirkung verlieren [342].

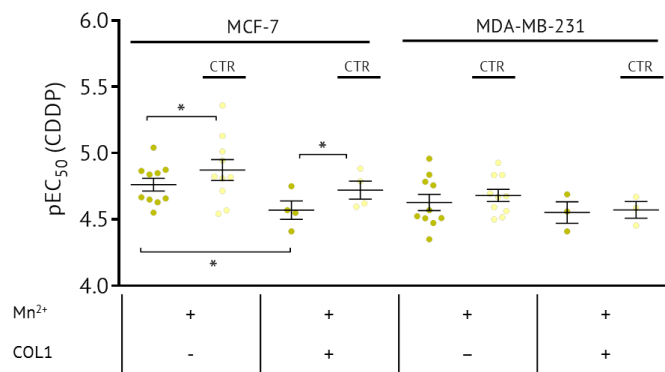


Abb. 6.16 Darstellung der pEC_{50} -Werte der MTT Zellviabilitätsuntersuchungen zum Einfluss von Mangan als Integrinstimulator auf die Chemoresistenz von Mammakarzinomzelllinien gegenüber CDDP. Die hellgelben unbehandelten Kontrollen (CTR) zeigen im direkten Vergleich zu den behandelten MCF-7-Zellen (dunkelgelb) einen niedrigeren pEC_{50} -Wert und damit eine Chemoresistenz. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Tab. 6.3: Übersicht der Ergebnisse von Abb. 6.16 mit Bildung des RF.

	MCF-7					MDA-MB-231				
	$pEC_{50} \pm SD$	EC_{50} [μM]	$pEC_{50} \pm SD$ (CTR)	EC_{50} [μM] (CTR)	RF	$pEC_{50} \pm SD$	EC_{50} [μM]	$pEC_{50} \pm SD$ (CTR)	EC_{50} [μM] (CTR)	RF
Mn^{2+}	4,76 \pm 0,14	17,3	4,87 \pm 0,24	13,4	1,29	4,62 \pm 0,18	23,5	4,68 \pm 0,14	20,8	1,13
$COL1 + Mn^{2+}$	4,57 \pm 0,12	26,9	4,72 \pm 0,12	19,0	1,42	4,55 \pm 0,11	28,0	4,57 \pm 0,09	26,8	1,04

6.4.4. Regulation der Integrine

Um die Regulation von ITGB1 und ITGA2 auf bestimmte Stimuli wie COL1 oder Zytostatika wie CDDP, DOX und MX (24 h, EC₅₀) zu untersuchen, wurde die extrazelluläre Expression der Integrine per Durchflusszytometrie bestimmt (**Abb. 6.17**). Dabei ist die Eigenfluoreszenz von DOX und MX vernachlässigbar, da das Antikörper-gekoppelte FITC im grünen Bereich detektiert wird, in dessen Bereich die beiden Zytostatika nicht emittieren.

Die Inkubation mit Zytostatika kann je nach Zellart eine gegensätzliche Reaktion hervorrufen: Die epithelialen MCF-7-Zellen reagieren mit der Hochregulation beider Integrine ITGA2 und ITGB1, während die mesenchymalen MDA-MB-231-Zellen die Expression von ITGB1 reduzieren und gleichzeitig ITGA2 erhöhen.

Der Effekt von COL1 auf die Expression der Integrin-Untereinheiten ist dagegen bei beiden Zelllinien gleich. Durch die Inkubation mit COL1 wird die Menge von ITGB1 und ITGA2 an der Zelloberfläche beider Zelllinien reduziert. Diese Verringerung ist in MDA-MB-231-Zellen bei beiden Integrinuntereinheiten ITGA2 bzw. ITGB1 signifikant (**Abb. 6.17B** und **D**), im Fall der MCF-7-Zellen nur bei ITGB1 (**Abb. 6.17A**). Insbesondere in Kombination mit Zytostatika wird dieser Integrin-reduzierende Effekt von COL1 deutlich. So werden die Zytostatika-induzierten ITGA2-Hochregulationen in MDA-MB-231-Zellen durch COL1 signifikant auf ein Expressionsniveau unterhalb des Basallevels reduziert (**Abb. 6.17D**). Die durch alle Zytostatika reduzierten Expressionen von ITGB1 in MDA-MB-231 Zellen können durch COL1 weiter verringert werden, wenn auch nur im Falle von CDDP in signifikantem Ausmaß (**Abb. 6.17B**). MCF-7-Zellen exprimieren ITGB1 als Reaktion auf alle Zytostatika signifikant mehr (**Abb. 6.17A**), die durch COL1 wiederum bei CDDP und MX signifikant reduziert wird. Der gleiche Effekt auf diese Zellen ist bei ITGA2 insgesamt geringerer, aber bei MX signifikant ausgeprägt (**Abb. 6.17C**).

Wenn die Hochregulation der Integrine als Reaktion auf zytostatischen Stress interpretiert werden kann, so bewirkt die Anwesenheit von COL1 eine Reduktion dieses Stresses. Dies kann beispielsweise durch den bereits festgestellten erhöhten Efflux durch die Inkubation mit COL1 begründet werden oder durch bislang im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelte Signaltransduktionswege. In weiteren Versuchen wurde per Western Blot bestimmt, ob es sich

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss der Integrine auf die matrixvermittelte Chemoresistenz

bei der Deregulation um eine Internalisierung der Integrine oder um eine Reduktion der Gesamtmenge der zellulären Integrine (ITGB1 und ITGA2) handelt (vgl. **Abb. 6.21**).

Die Herabregulierung eines Adhäsionsrezeptors bei Aktivierung/Bindung scheint zunächst unter der Annahme einer reduzierten Stressreaktion paradox. Allerdings sind in der Literatur Fälle von ITGA2B1-Downregulationen beschrieben, vor allem im Zusammenhang mit ITGA2 als Tumorsuppressor z.B. im Zusammenhang mit der Metastasierung von Tumorzellen [259, 343]. Dabei wird insbesondere die Korrelation einer Reduzierung von ITGA2 mit einer Aktivierung des EGFR-Signalwegs diskutiert.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die beiden Integrinuntereinheiten ITGB1 und ITGA2 integraler Bestandteil einer zellulären Reaktion auf die COL1-Bindung sowie gegen zytostatische Wirkstoffe sind. Dies qualifiziert die Integrine für weitere inhibitorische Untersuchungen, auf deren Basis die Entwicklung einer CAM-DR verhindert werden könnte.

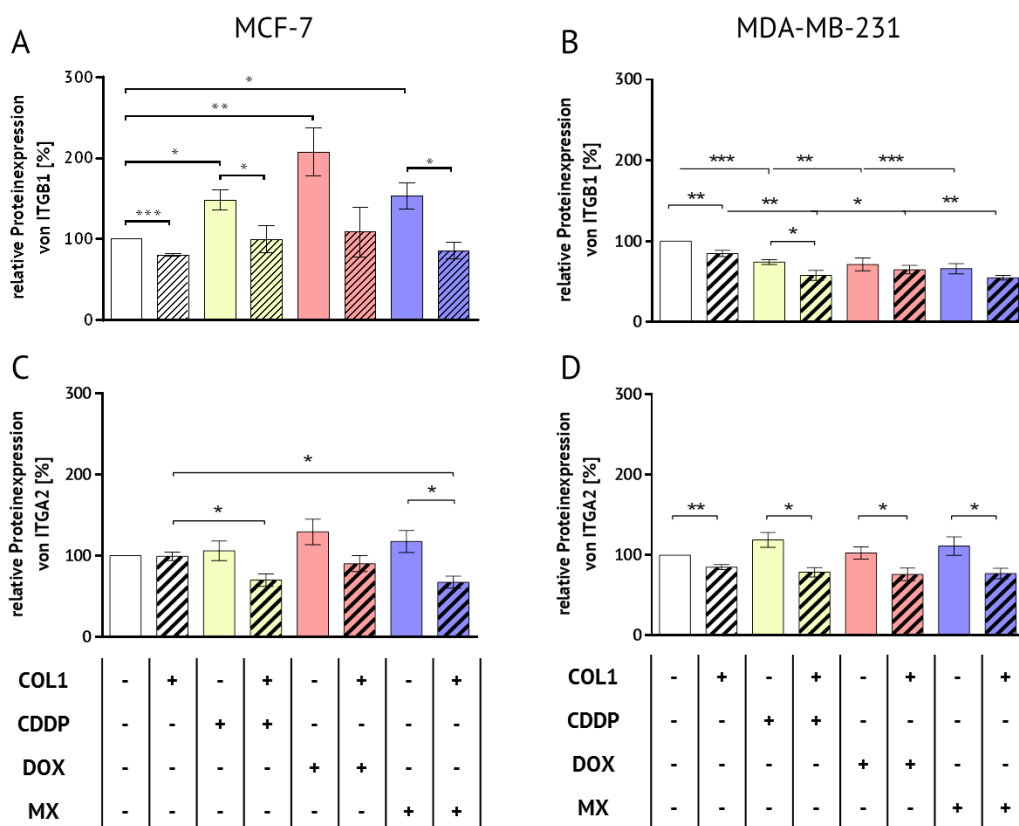


Abb. 6.17 Relative extrazelluläre Expression der Integrinuntereinheiten ITGA2 und ITGB1 in Abhängigkeit von COL1 und den Zytostatika CDDP, DOX und MX (jeweils EC₅₀, 24 h Inkubation), bestimmt mittels Durchflusszytometrie. Bei der Beurteilung müssen die Unterschiede in der Basalexpression der beiden Integrine zwischen den beiden Zelllinien (**Abb. 6.14**) berücksichtigt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung jeweils auf die unbehandelte Probe normalisiert. Die statistische Analyse von mind. drei biologischen Replikaten wurde per ungepaarten t-Test durchgeführt. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

6.4.5. Sterische Blockade von ITGB1 durch den Antikörper P5D2

Aus den vorangegangenen Ergebnissen wird eine Involvierung der Integrine ITGB1 und ITGA2 in der CAM-DR deutlich und damit die Notwendigkeit einer Inhibition zur mechanistischen Aufklärung. Der antiadhäsive Effekt des blockierenden Antikörpers P5D2 konnte funktionell schon bestimmt werden (vgl. **Abb. 6.15**). Damit eignet er sich für weiterführende Chemoresistenz-Untersuchungen. Lovitt *et al.* [205] verwendeten für ähnliche Blockade-Experimente eine Konzentration von 1,5 µg/mL P5D2 bei beiden Zelllinien, die in dieser Arbeit verifiziert und daher übernommen wurde.

Wie die Morphologie der Zellen darlegt (**Abb. 6.18**), hat der Antikörper in Abwesenheit von COL1 keine Auswirkungen auf die Zellen. Diese lichtmikroskopischen Darstellungen unterstützen damit die quantitativen Adhäsionsversuche (vgl. **Abb. 6.15**), die ohne EZM keinen Effekt des Antikörpers aufweisen. In Gegenwart von COL1 wird die Adhäsion von MCF-7-Zellen jedoch deutlich unter Agglomeratbildung und im Falle von MDA-MB-231 teilweise reduziert. MDA-MB-231-Zellen wachsen trotz sterischer Inhibition durch den Antikörper gespreizt an COL1, was auf kompensatorische Adhäsionsmoleküle oder eine zu geringe Antikörper-Konzentration schließen lässt.

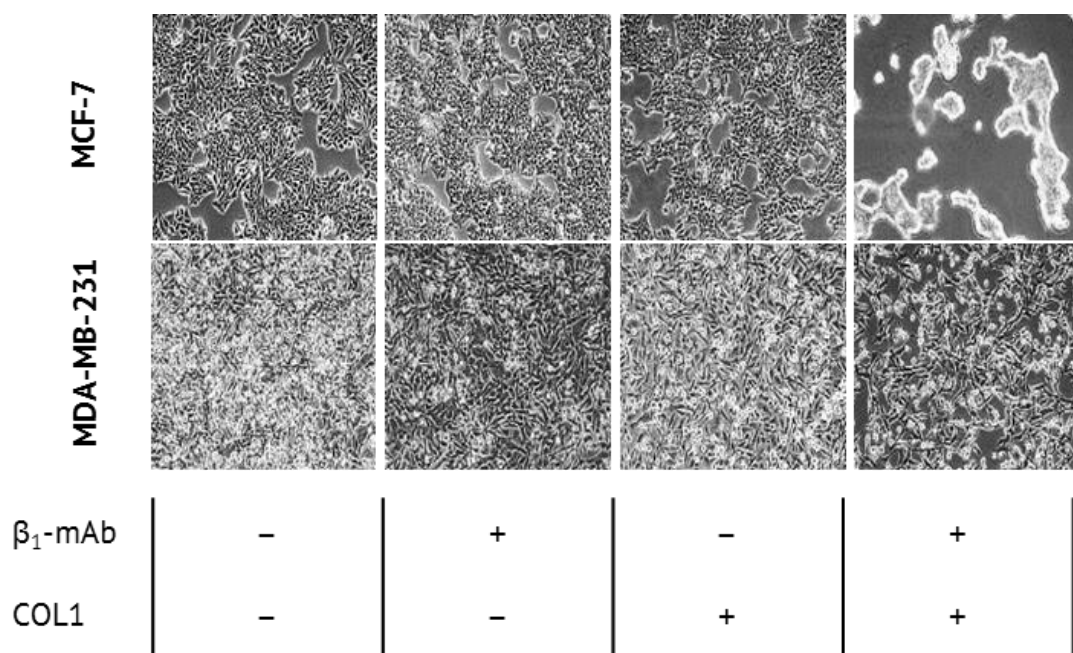


Abb. 6.18 Lichtmikroskopische Aufnahmen des Effekts des anti-ITGB1-Antikörpers P2D5 in einer Konzentration von 1,5 µg/mL abhängig von COL1 in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen. Die Antikörper wurden nach 48 h COL1-Inkubation und -Adhäsion den Zellen hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte 24 h nach Zugabe des Antikörpers. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss der Integrine auf die matrixvermittelte Chemoresistenz

Der stärkere Effekt des Antikörpers auf die MCF-7-Zellen lässt die Schlussfolgerung zu, dass MCF-7-Zellen in ihren Adhäsionseigenschaften deutlich ITGB1-abhängiger sind. Dies kann auf die geringere ITGB1-Expression in MCF-7- im Gegensatz zu MDA-MB-231-Zellen zurückzuführen sein oder durch das Fehlen alternativer Adhäsionsrezeptoren. Bei geringeren Konzentrationen des Antikörpers reagieren MCF-7-Zellen mit einer verstärkten Agglomeratbildung durch vermehrte und intensivere Zell-Zell-Kontakte. Diese Agglomerate erschweren die Durchführung von Folgeversuchen, weshalb sich bei den weiteren Untersuchungen auf die Zelllinie MDA-MB-231 beschränkt wurde. Zur Einordnung der morphologischen Veränderung muss beachtet werden, dass der Antikörper auf eine bestehende, konfluente Zelloberfläche für 24 h gegeben wurde. Bei den Ergebnissen des Adhäsionsassays (vgl. **Abb. 6.15**) wurde der Antikörper bereits initial vor Adhäsion hinzugegeben.

Zunächst wurde der Chemoresistenz-erhöhende Effekt von COL1 unter Blockade von ITGB1 in MDA-MB-231-Zellen untersucht (**Abb. 6.19, Tab. 6.4**). Die COL1-vermittelte Resistenzbildung gegenüber CDDP (RF 1,36), DOX (RF 1,59) und MX (RF 1,93) wird durch die Koinkubation mit dem blockierenden ITGB1-Antikörper P5D2 antagonisiert. Der RF-Wert bei CDDP-Inkubation fällt von 1,36 auf 1,05, bei DOX von 1,59 auf 1,15 und bei MX von 1,93 auf 1,62. Die Messungen mit Antikörper ohne Substrat nehmen intermediäre Zustände zwischen diesen RFs ein. Obwohl die Resistenzfaktoren überzeugend sind, streuen die Messwerte sehr. Aufgrund dieser hohen Standardabweichung (**Tab. 6.4**), treten in diesen Messungen keine Signifikanzen auf.

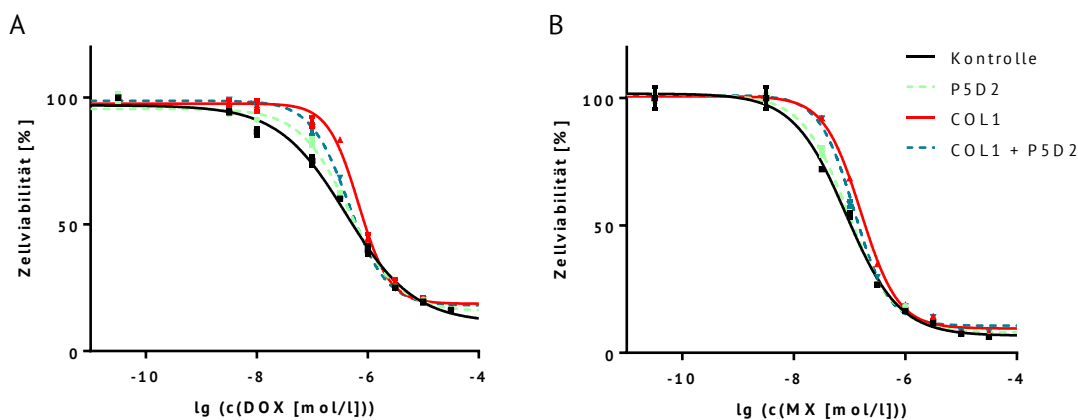


Abb. 6.19 Repräsentative MTT-Zellviabilitätskurven (von mind. drei biologischen Proben) zur Darstellung des antagonisierenden Effekts des ITGB1-blockierenden Antikörpers P5D2 (1,5 µg/mL) auf die COL1-vermittelte Chemoresistenz gegenüber DOX und MX in MDA-MB-231-Zellen. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Tab. 6.4 Übersicht der Daten aus **Abb. 6.19** bei der Antagonisierung von ITGB1 durch Antikörper P5D2. Die Tabelle ist ergänzt um den jeweiligen RF-Wert, sowie die Daten zum P2D5-basierten antagonisierenden Effekt gegenüber der COL1-vermittelten CDDP-Chemoresistenz.

MDA-MB-231	CDDP			DOX			MX		
	pEC ₅₀ ± SD	EC ₅₀ [µM]	RF	pEC ₅₀ ± SD	EC ₅₀ [µM]	RF	pEC ₅₀ ± SD	EC ₅₀ [µM]	RF
Kontrolle	4,54 ± 0,08	28,7	1	6,38 ± 0,33	0,418	1	6,90 ± 0,47	0,127	1
P5D2	4,51 ± 0,11	31,2	1,09	6,30 ± 0,27	0,503	1,20	6,80 ± 0,41	0,157	1,24
COL1+P5D2	4,52 ± 0,11	30,2	1,05	6,32 ± 0,12	0,479	1,15	6,69 ± 0,18	0,205	1,62
COL1	4,41 ± 0,04	39,1	1,36	6,18 ± 0,18	0,665	1,59	6,61 ± 0,21	0,245	1,93

Dass die COL1-vermittelte Resistenzerhöhung insbesondere bei MX nicht vollständig revertiert wurden, kann damit begründet werden, dass die Antikörper kurz vor der Zugabe des Zytostatikums hinzugegeben werden und als Biomoleküle innerhalb der 72 h Inkubation degradiert werden. Weiterhin sind COL1-bindende Moleküle neben ITGA2B1 denkbar, die ebenfalls eine anti-apoptotische Wirkung von COL1 vermitteln. Der grundsätzliche Trend zur Aufhebung der COL1-Resistenz durch ITGB1-Antagonisierung ist aber deutlich erkennbar.

Die Viabilitätsversuche mit den blockierenden Antikörpern bei MCF-7-Zellen demonstrieren bei der Behandlung mit Antikörper in Gegenwart von COL1 eine Sensitivierung um den Faktor 10 (z.B. MX: Kontrolle pEC₅₀=6,65 (224 nM); P5D2 pEC₅₀=6,98 (105 nM); COL1+P5D2 pEC₅₀=7,97 (11 nM), die aber auf der Ablösung der Zellen nach **Abb. 6.18** basiert

Um die Viabilitätsdaten zu verifizieren, wurde geprüft, ob diese mit den intrazellulären Wirkstoffkonzentrationen übereinstimmen (**Abb. 6.20A und B**). Dabei wurde die Bestimmung der Wirkstoffmenge von DOX und MX per Durchflusszytometrie präferiert. Da sich die Proteinmenge der Zellen durch die Antikörper verändern kann und die veränderte Morphologie durch den Antikörper die sterische Aufnahme der Zytostatika erschwert, eignet sich die Quantifizierung per Fluorimeter mit anschließender Normalisierung auf Proteingehalt nicht. Die Zellen wurden in Gegenwart von COL1 kultiviert und 24 h vor Auswertung mit P5D2 inkubiert. Danach wurden die Zellen abgelöst und mit 3 µM der fluoreszierenden Zytostatika DOX und MX inkubiert. Im Fall von DOX und MX wird die COL1-vermittelte Reduktion der Zytostatika signifikant antagonisiert (**Abb. 6.20 A und B**). COL1 aktiviert im Falle von DOX die Transporter signifikant um 10,1% (p=0,0031). Der Antikörper P5D2 kann diesen Effekt ebenso signifikant (p=0,0258) zurückführen. Der COL1-Effekt wird

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss der Integrine auf die matrixvermittelte Chemoresistenz

damit nahezu vollständig unterdrückt. Die Messungen von MX demonstrieren eine ähnliche signifikante Aktivitätssteigerung um 7,6% ($p=0,0342$). Auch dieser COL1-Effekt lässt sich durch Kombination mit P5D2 signifikant ($p=0,021$) verhindern.

Alternativ wurde die Transporter-Aktivität durch den Pheophorbid A oder Calcein AM Assay untersucht. Es konnte nur bei Calcein AM eine signifikante Aktivitätssteigerung von 82,7% auf 69,8% (um 12,9%) bei COL1 ($p=0,033$) festgestellt werden. Die Aktivitätssteigerung bei ABCG2 um 4,9% ist nicht-signifikant. Die antagonisierenden Effekte durch die Wirkung des Antikörpers P5D2 auf COL1 spiegeln sich auch innerhalb dieser Messungen wider (Abb. 6.20 C und D), im Gegensatz zur direkten Messung von DOX und MX aber nicht-signifikant.

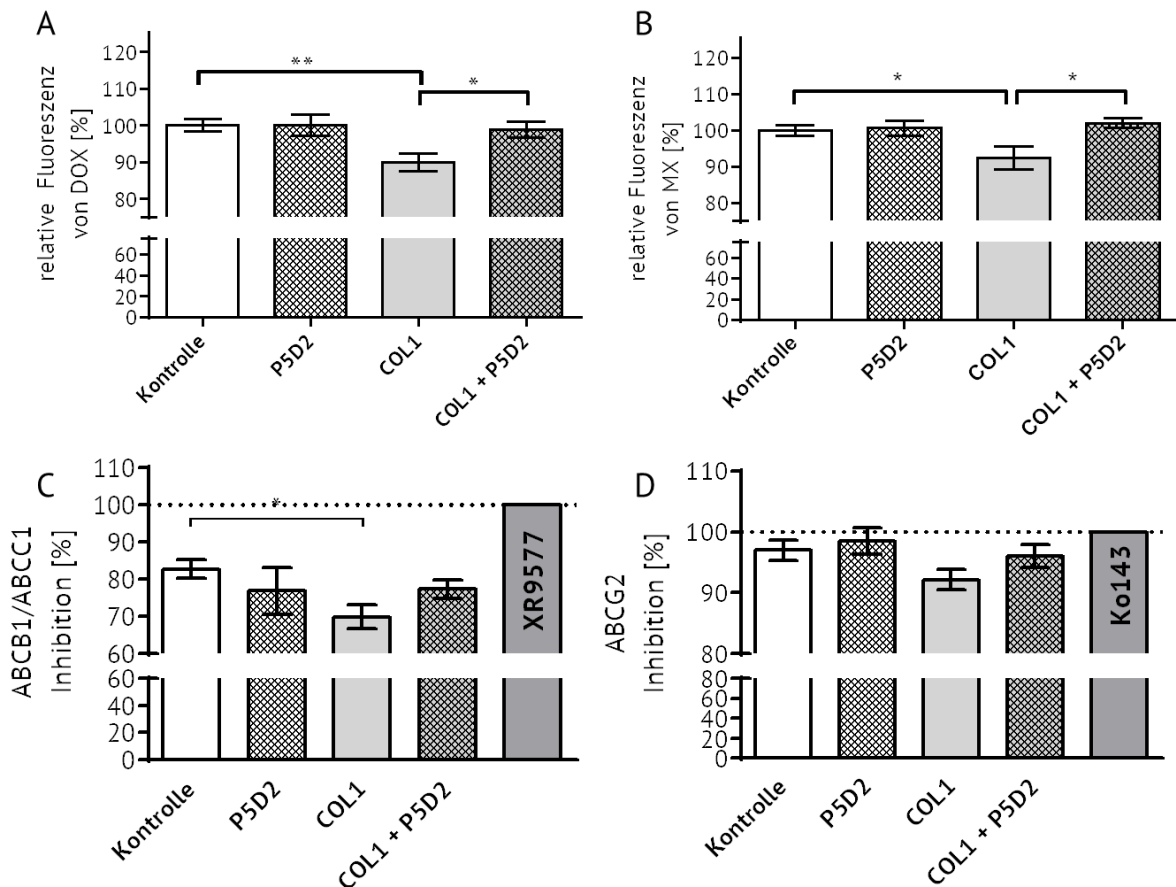


Abb. 6.20 (A, B) Untersuchung der intrazellulären Wirkstoffkonzentration von DOX und MX in MDA-MB-231-Zellen per Durchflusszytometrie. Die COL1-vermittelte Reduktion durch die blockierenden ITGB1-Antikörper P5D2 wird invertiert. (C, D) Darstellung der funktionellen Transporter-Untersuchung von ABCB1/ABCC1 per Calcein AM und ABCG2 per Pheophorbid A Assay in MDA-MB-231-Zellen. Die Aktivitätssteigerung (verminderte Inhibition) durch COL1 wird durch den Antikörper abgeschwächt. Dargestellt sind bei allen Abbildungen die Mittelwerte und die jeweiligen Standardfehler von mind. drei biologischen Replikaten, die mittels ungepaarten t-Test statistisch untersucht wurden. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

6.4.6. Modulation der Heparansulfatproteoglykane

In vorangegangenen Arbeiten konnte postuliert werden, dass intrinsische und matrixvermittelte Chemoresistenz über HSPGs vermittelt werden können, welche als Co-Faktor für Integrinbindung und *-signaling* fungieren und damit bspw. den *wnt-pathway* aktivieren können [89, 344, 345]. Insbesondere Tinzaparin konnte hier als Inhibitor für die HSPG-vermittelte Resistenz identifiziert werden. Innerhalb eines Nebenprojekts dieser Promotionsarbeit konnte experimentell dargelegt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen Oligosaccharidlänge bzw. Sulfatierungsgrad der HSPG und Chemoresistenz in Ovarialkarzinomzellen gibt, welcher im Rahmen der Dissertation von Daniel Pfankuchen oder Pfankuchen, Baltes *et al.* nachzulesen ist [345].

Um die Klasse der HSPG als Zielstrukturen für Resistenzeffekte zu untersuchen, wurden Heparanase (HSPE)-überexprimierende MDA-MB-231-Zellen von Prof. Jin Ping-Li von der Universität Uppsala (Schweden) und deren Vergleichszellen (mock) untersucht. Hierbei ist limitierend zu betrachten, dass die Funktion von HPSE als Matrix-regulierendes Enzym nicht optimal in einem 2D-Zellkulturansatz dargestellt wird. Neben der extrazellulären Modifikation durch ITGB1 blockierende Antikörper wurde daher versucht, mit dem HSPG-Proteom über extrazelluläre Blockade mittels Tinzaparin (als sterischer Inhibitor von HSPGs) und Ronesparstat als Inhibitor der Heparanase zu interferieren. Beide Behandlungen hatten keinen Einfluss auf die Toxizität der verwendeten Chemotherapeutika. Diese Mutante ist sensitiver gegenüber den Zytostatika CDDP, DOX und MX, allerdings konnte keine Sensitivierung durch Tinzaparin und Ronesparstat nachgewiesen werden (**Abb. 6.21**).

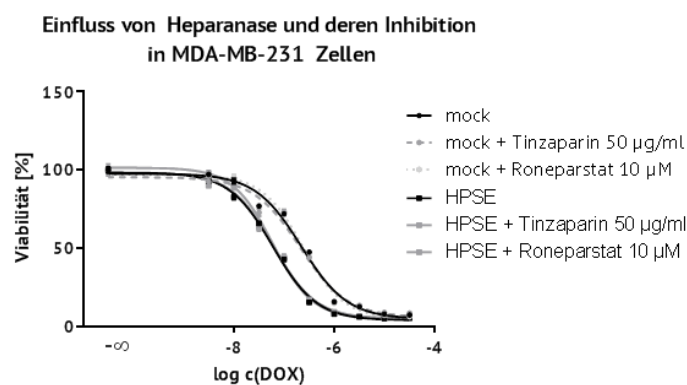


Abb. 6.21 Darstellung von repräsentativen Zytotoxizitätskurven der HPSE-überexprimierenden Zelllinien MDA-MB-231HPSE sowie deren Kontrollzelllinie mock. Es zeigt sich ein Unterschied in der intrinsischen Resistenz (hier $EC_{50}(\text{mock}) = 200 \text{ nM}$, $EC_{50}(\text{HPSE}) = 60 \text{ nM}$), aber keinen Unterschied durch Tinzaparin und Ronesparstat.

6.5. Etablierung und Charakterisierung von ITGB1-kd Mutanten

6.5.1. ITGB1-knockdown durch lentivirale shRNA-Insertion

Nach der pharmakologischen Blockade von ITGB1 mittels Antikörper wurde ITGB1 gentechnisch entfernt. Damit sollten sterische Probleme an der Zelloberfläche durch Bindung der großen P5D2-Antikörpermoleküle verhindert werden. Der ITGB1-knockdown der MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen erfolgte über shRNA, deren genetische Informationen lentiviral in das Genom der Zelllinien eingebaut wurde und die von den Mutanten aktiv transkribiert wird. Die shRNA wird zu siRNA prozessiert, die die mRNA von ITGB1 abbaut und damit die Proteintranslation verhindert. Der *knockdown* von MCF-7-Zellen wurde von Bastian Jakobzig im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt [321], der *knockdown* von MDA-MB-231-Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Der Erfolg des *knockdowns* wurde mittels Western Blot (**Abb. 6.22A**) und Durchflusszytometrie (**Abb. 6.22B**) verifiziert.

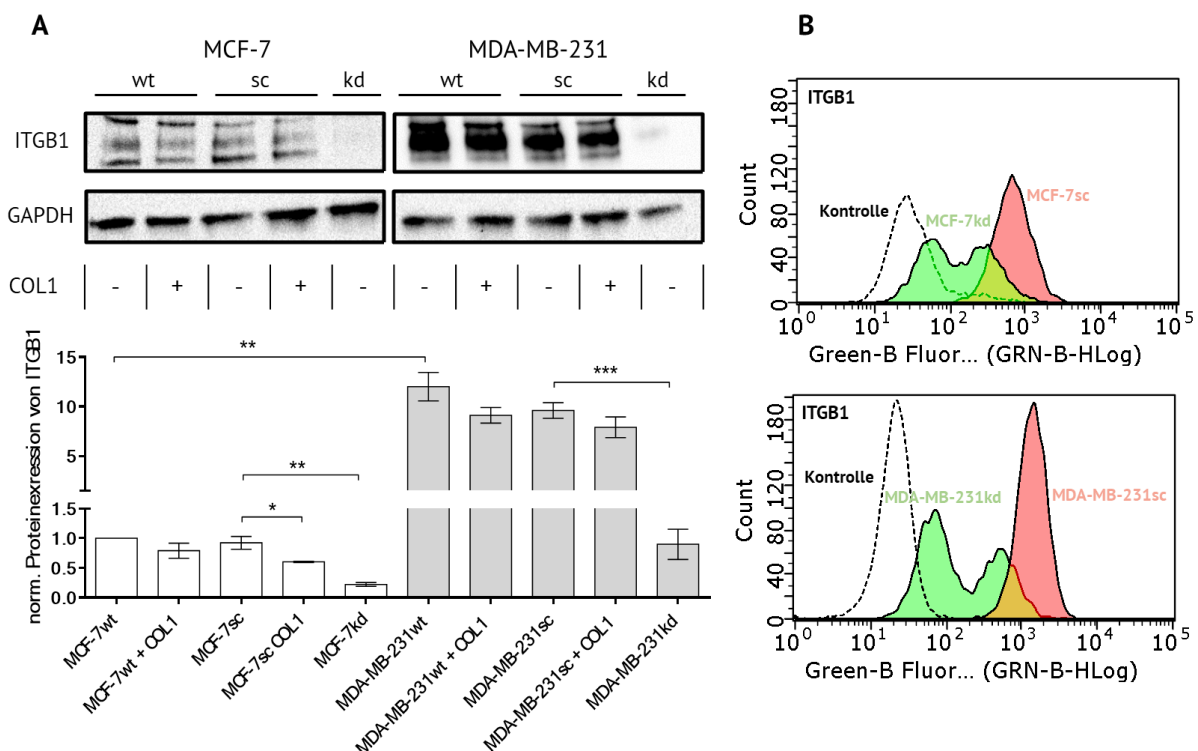


Abb. 6.22 Bestimmungen von ITGB1 zur Charakterisierung und Effektivitätsmessung des shRNA-basierten ITGB1-knockdowns in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen. **A)** Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Western Blots, von denen einer exemplarisch dargestellt ist mit GAPDH als internen Standard. Die Werte sind auf den normalisierten Wert von MCF-7-Zellen bezogen. Die statistische Analyse erfolgt per ungepaarten t-Test. **B)** Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen des ITGB1 der beiden Zelllinien. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert (*supplementary data*).

Die per Western Blot bestimmte Gesamtmenge des ITGB1 ist bei MCF-7- auf 22% des Ausgangsniveaus ($p=0,0034$) und bei MDA-MB-231-Zellen um den Faktor 10 ($p=0,0005$) signifikant reduziert. Die COL1-vermittelte Reduktion des ITGB1, die per FACS wurde (vgl. **Abb. 6.17**), ist auch per Western Blot nachweisbar, wenn auch nur signifikant bei den *scramble* (sc) Kontrollzellen MCF-7sc ($p=0,0416$). Abseits der Signifikanzen demonstrieren wildtyp- und *scramble*. Variante dem Effekt in ähnlichem Ausmaß. Damit kann die sc-Variante als Kontrollzelllinie für die weiteren Versuche verwendet werden.

Die zwei Maxima bei der durchflusszytometrischen Analyse basieren auf verschiedenen Insertionsstellen der shRNA-Gene in das Genom der Zellen, die eine unterschiedliche Effektivität aufweisen. Die shRNA wird daher unterschiedlich stark transkribiert. Entsprechend wird auch die mRNA des ITGB1 mehr oder weniger effizient abgebaut. Mittels präparativer Durchflusszytometrie wäre eine Isolierung der Kolonien mit der niedrigeren ITGB1-Expression möglich. Da aber eine Reduktion der extrazellulären Integrine auf 21% (MCF-7) und 7,4% (MDA-MB-231), bestimmt per Durchflusszytometrie, erreicht wurde, ist der *knockdown* ausreichend ausgeprägt und die Isolation nicht nötig.

Zusätzlich konnte per Durchflusszytometrie erkannt werden, dass ITGA2, dessen einzige korrespondierende Untereinheit das ITGB1 ist, durch den ITGB1-kd herabreguliert ist (**Abb. 6.23**). Innerhalb der kd-Zellen wird ITGA2 durch COL1 nicht weiter erniedrigt.

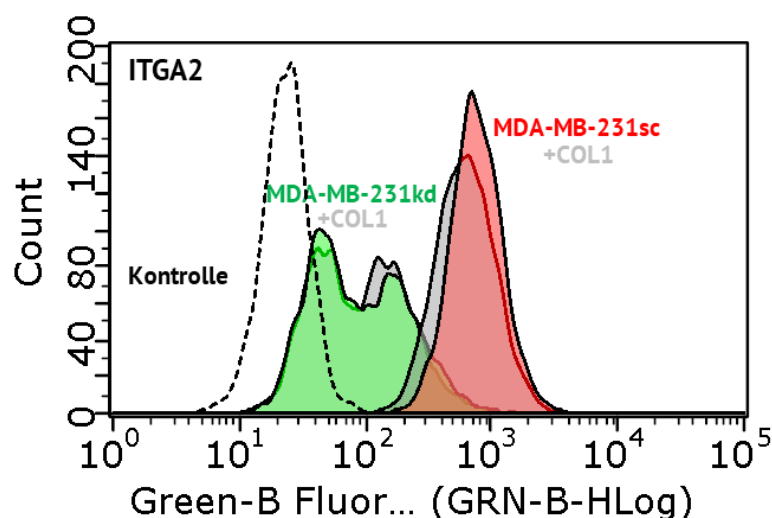


Abb. 6.23 Repräsentative Darstellung der extrazellulären Expression von ITGA2 in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und des ITGB1-kd, bestimmt mittels Durchflusszytometrie. ITGA2 ist entsprechend des ITGB1-*knockdowns* ebenfalls herabreguliert. Eine COL1-vermittelte Herabregulation von ITGA2 ist im ITGB1-*knockdown* nicht mehr nachweisbar.

6.5.2. Funktionelle Untersuchungen der ITGB1-kd-Zelllinien

Der ITGB1-*knockdown* bewirkt morphologische Veränderungen beider Zelllinien (**Abb. 6.24**). Die MDA-MB-231kd-Zellen bilden deutlich mehr Zell-Zell-Kontakte aus, unabhängig von der Anwesenheit von COL1. Durch die Interaktion mit COL1 werden die bereits im Wildtyp beobachteten linearen Strukturen weiterhin ausgebildet, jedoch mit Ausprägung deutlich erhöhter Zell-Zell-Kontakte. ITGB1 kann als mesenchymaler Marker betrachtet werden, sodass eine Reduktion eine Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) bewirkt, deren resultierender epithelialer Phänotyp durch erhöhte Zell-Zell-Kontakte gekennzeichnet ist.

MCF-7kd-Zellen weisen keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen auf. Erst bei Koinkubation mit COL1 bilden sich deutliche Agglomerate aus, die 3D-Sphäroiden bzw. *mammospheres* ähneln. (vgl. **Abb. 6.18**).

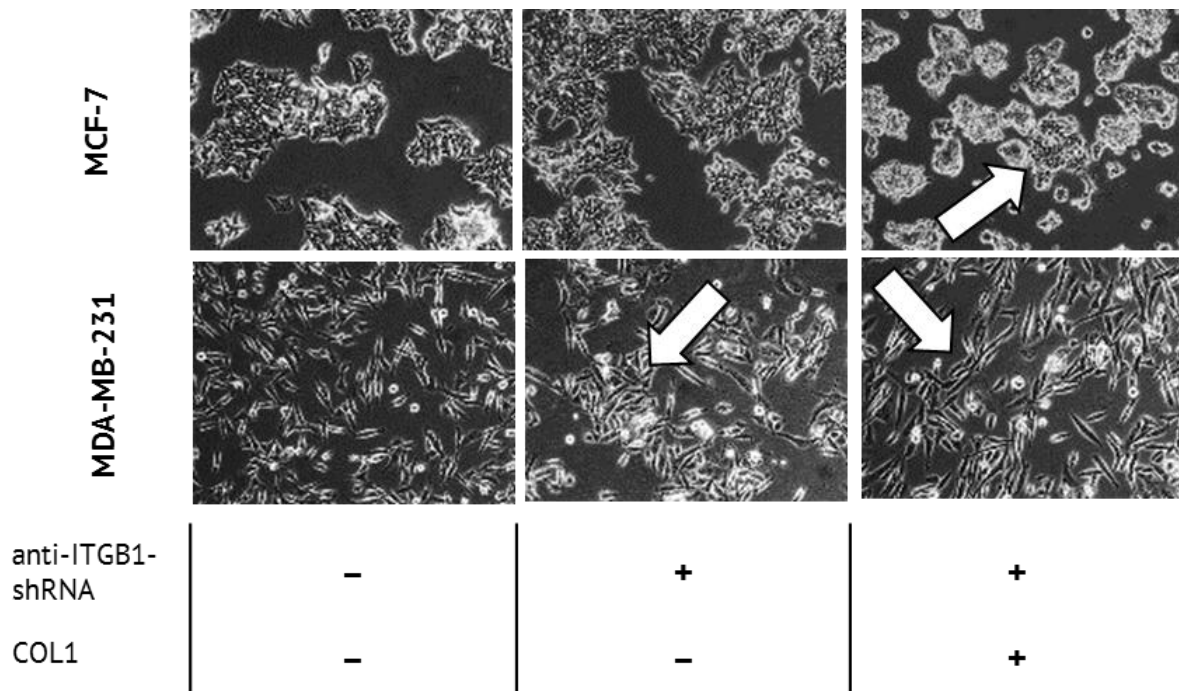


Abb. 6.24 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit des ITGB1-Status und der Anwesenheit von COL1 (10 µg/cm²). Die Besonderheiten sind mittels Pfeilen gekennzeichnet. MCF-7kd-Zellen bilden Sphäroide durch COL1. MDA-MB-231kd-Zellen bilden verstärkt Agglomerate durch Zell-Zell-Kontakte, die durch COL1 in linearen Strukturen verlaufen. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Weiterhin wurde die Sensitivität der ITGB1-kd-Zellen gegenüber den Zytostatika CDDP, DOX und MX untersucht (**Abb. 6.25**). MCF-7kd-Zellen reagieren sensitiver gegenüber MX und

CDDP, was durch das fehlende ITGB1 und der damit verbundenen fehlenden Möglichkeit zum *outside-in signaling* von Überlebenssignalen erklärbar ist. Die Resistenz gegenüber DOX bleibt unverändert. Dies kann ein Hinweis auf DOX-spezifische Kompensationsmechanismen sein, die offenbar durch die Herabregulierung des ITGB1 erfolgen. Diese oder ähnliche Kompensationsmechanismen durch die Herabregulation von ITGB1 können der Grund für die gering ausgeprägte, dennoch signifikante Erhöhung der Resistenz von MDA-MB-231kd-Zellen gegenüber allen drei Zytostatika sein.

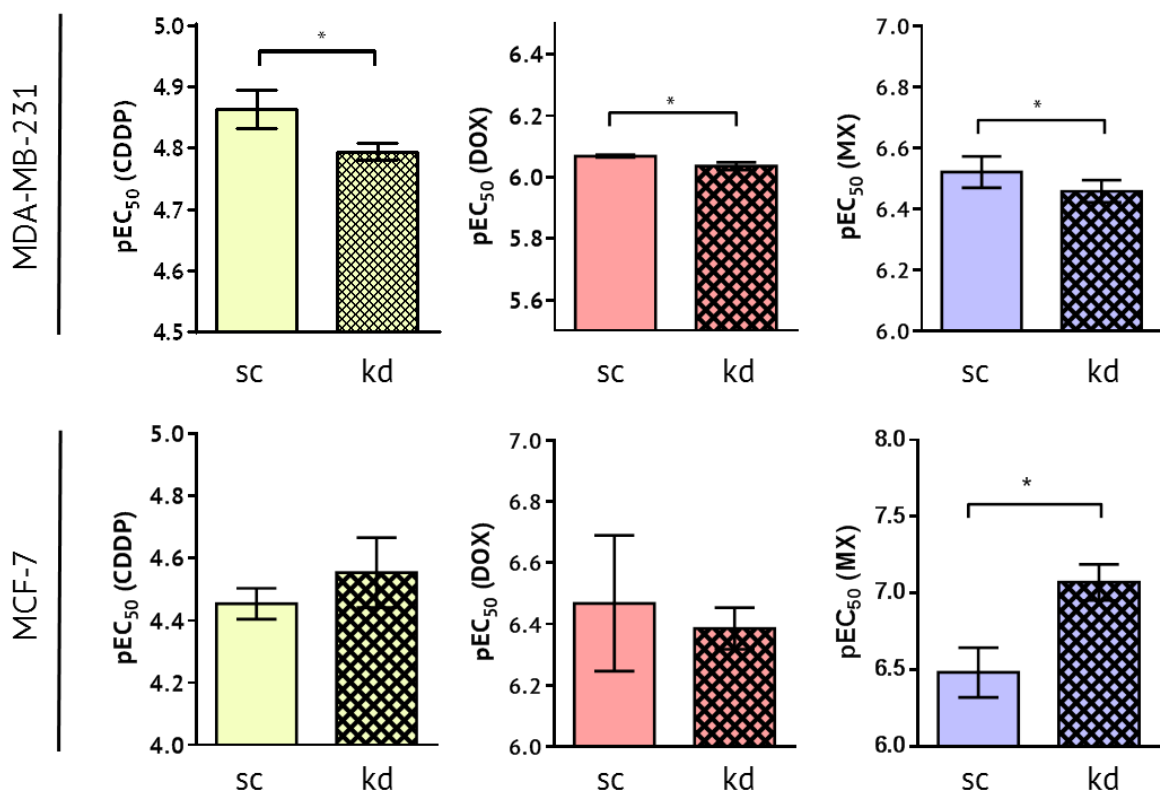


Abb. 6.25 Zellviabilitätsuntersuchungen der jeweiligen ITGB1-kd-Variante der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 mit ihren jeweiligen sc-Kontrollvarianten. MDA-MB-231kd-Zellen sind resistenter gegenüber allen Zytostatika, während MCF-7kd Zellen eine signifikante Sensitivierung gegenüber MX und eine leichte Sensitivierung gegenüber CDDP erfahren. Sie zeigen jedoch eine leichte, nicht-signifikante Resistenzentwicklung bei DOX. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der pEC₅₀-Werte aus MTT-Kurven von mind. drei unabhängigen biologischen Replikaten. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert (*Supplementary Data*).

Bislang wurde dargelegt, dass die COL1-vermittelte Resistenz in den Wildtyp-Zellen von MCF-7 und MDA-MB-231 maßgeblich über ABC-Transporter vermittelt wird und dass die COL1-Bindung in großen Teilen ITGB1-abhängig ist. Daher werden in nächsten Schritt die ITGB1-defizitären Zellen auf Ebene der ABC-Transporter analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Etablierung und Charakterisierung von ITGB1-kd Mutanten

Eine Bestimmung der Aktivität von ABCB1 und ABCC1 (**Abb. 6.26A**) mittels Calcein AM Assay führt zu der Annahme, dass in beiden Zelllinien der ITGB1-*kd* zu einer stärkeren ABC-Transporter-Aktivierung führt als durch COL1 erreicht wird. Diese Aktivität kann aber dennoch über COL1 weiter gesteigert werden. Dies kann auf die verbleibenden ITGB1-Moleküle zurückzuführen sein. Alternativ kann es ein Hinweis auf die Expression weiterer COL1-bindender Rezeptoren und deren Signalkaskaden sein.

Die Analyse der ABCG2-Aktivität (**Abb. 6.26B**) spiegelt eine ähnliche ausgeprägte Steigerung in MDA-MB-231kd-Zellen wie bei Anwesenheit von COL1 wider. MCF-7-Zellen dagegen reduzieren im *knockdown* und bei COL1-Koinkubation die Transporteraktivität. Dieses Ergebnis ist kohärent der reduzierten ABCG2-Expression durch COL1 (vgl. **Abb. 6.12**) und der signifikanten Sensitivierung des von MCF-7kd gegenüber MX.

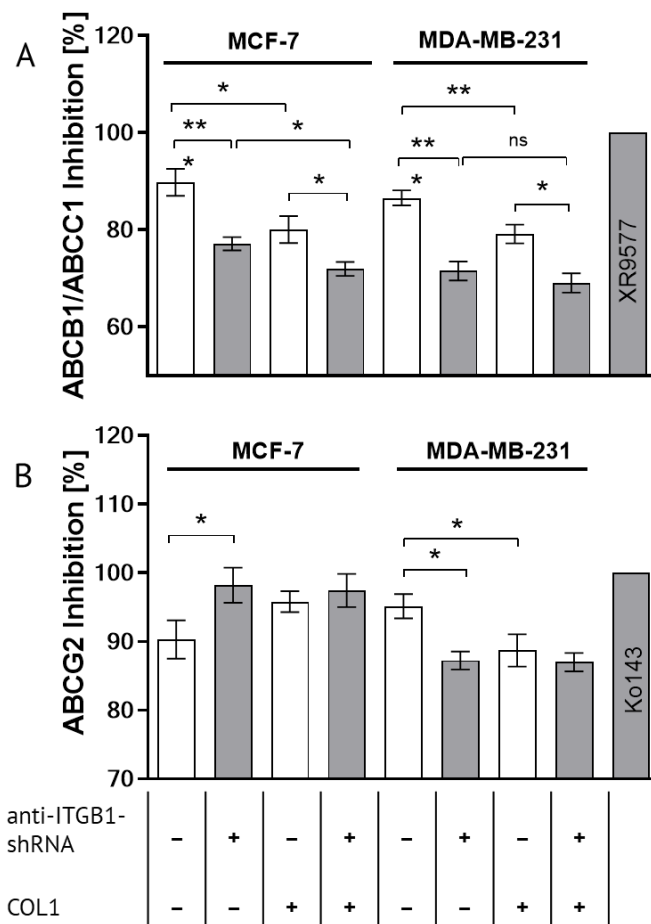


Abb. 6.26 Bestimmung der Aktivität vom ABCB1/ABCC1 mittels Calcein AM assay (**A**) mit XR9577 als Inhibitor und von ABCG2 mittels Pheophorbid A (**B**) mit Ko143 als Inhibitor in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit des ITGB1-Status und von COL1. Darstellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten, die mittels ungepaarten t-Test statistisch verglichen werden. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen können durch Western Blot-Analytik auf Proteinebene verifiziert werden (**Abb. 6.27**). In den sc-Kontrollzellen lässt sich der gleiche im wt beobachteten COL1-Effekt reproduzieren, welcher in **Abb. 6.12** statistisch ausgewertet ist.

COL1 bewirkt in MCF-7-Zellen eine Erhöhung von ABCB1, die im ITGB1-*knockdown* unterhalb des Basallevels liegt. ABCC1 wird wiederum in den MCF-7kd Zellen verstärkt exprimiert, jedoch wird dieser Effekt in Anwesenheit von COL1 auf Basallevel der sc-Variante reduziert. Beide Effekte von ABCB1 und ABCC1 zusammen und insbesondere deren Wechselwirkungen sind eine Erklärung für die in **Abb. 6.26A** dargestellten Aktivitätssteigerungen.

Der *ITGB1-knockdown* hat keinen Effekt auf die ABCG2-Mono- und Dimere der MCF-7-Zellen. Insbesondere das aktive Dimer wird dagegen durch COL1 deutlich reduziert unabhängig des ITGB1-Status, was mit den Ergebnissen von **Abb. 6.26B** kohärent ist. Dieser wenn auch negative Effekt von Kollagen auf die Zellen erscheint widersprüchlich, da den kd-Zellen eigentlich das Adhäsionsprotein ITGB1 zur Interaktion mit COL1 weitestgehend fehlt, was sich morphologisch sehr gut darstellen lässt (**Abb. 6.24**). Dies ist also ein Hinweis auf andere Rezeptoren, die ggf. auch von COL1 aktiviert werden können, wie z.B. DDR1.

Die MDA-MB-231-Zelllinie zeigt dagegen einheitlich eine deutliche Erhöhung der drei ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 im ITGB1-*knockdown* und in Gegenwart von COL1 (unabhängig des ITGB1-Status). Die Western Blots (**Abb. 6.27**) spiegeln damit die funktionellen Steigerungen der Transporter (**Abb. 6.26**) wider. Dabei übersteigt die Transporter-Expression der ITGB1-kd-Zellen quantitativ die der sc-Zellen nach COL1-Inkubation. Vor dem Hintergrund, dass COL1 eine Herabregulation des ITGB1 in MDA-MB-231-Zellen bewirkt (vgl. **Abb. 6.17** und **6.22**), erscheint es folgerichtig, dass die COL1-induzierte Expressionssteigerung der ABC-Transporter durch den ausgeprägten ITGB1-*knockdown* noch weiter übertroffen wird. Dies unterstützt die Theorie, dass ITGB1 eher als Tumorsuppressor fungiert und die Herabregulation Überlebenssignale vermittelt. Interessanterweise finden sich in der Zelllinie MDA-MB-231 bei gleichen Zellysebedingungen auch deutlich mehr dimerisierte als monomere ABCG2-Proteine wieder. Da die dimerisierten ABCG2-Moleküle die aktive Form darstellen, spricht dies für ein grundsätzlich erhöhtes Aktivitätszustand.

Ergebnisse und Diskussion

Etablierung und Charakterisierung von ITGB1-kd Mutanten

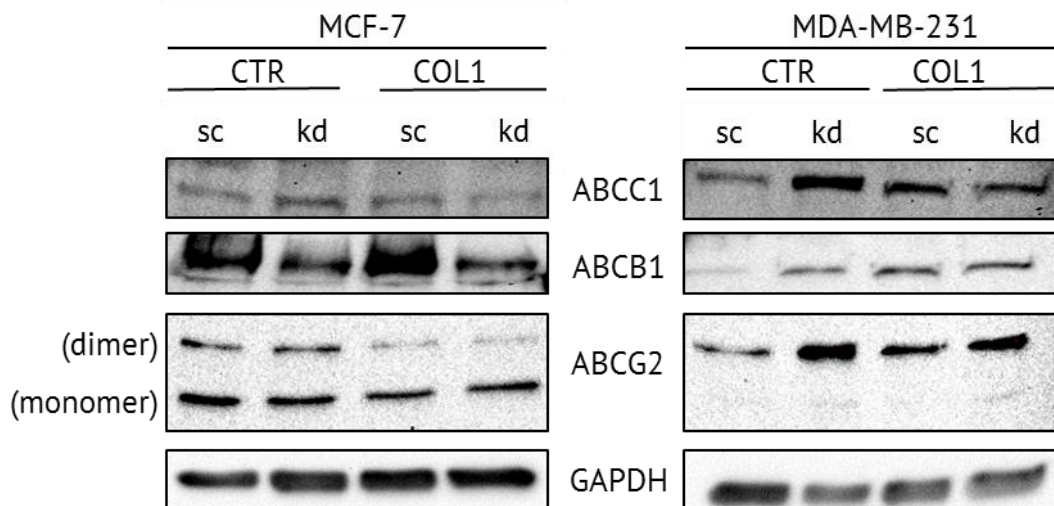


Abb. 6.27 Repräsentative Darstellung der Western Blot Analyse der ABC-Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2 in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit des ITGB1-Status sowie COL1. MCF-7-Zellen zeigen nur im sc (wt) bei COL1-Inkubation eine Erhöhung des Transporters ABCB1. Die MDA-MB-231-Zellen erhöhen die Expression aller drei ABC-Transporter deutlich sowohl in Gegenwart von COL1 und bei ITGB1-kd. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Weiterhin wurde erneut die metabolische Aktivität der ITGB1kd-Zellen über deren ATP-Gehalt analysiert (**Abb. 6.28**). Es ließ sich der gleiche Trend wie beim Effekt von COL1 feststellen (vgl. **Abb. 6.6**), d.h. eine Erhöhung bei MCF-7kd- sowie eine signifikante Erniedrigung bei MDA-MB-231kd-Zellen. Damit weisen MDA-MB-231-Zellen eine deutlich verstärkte ATP-Hydrolyse auf, die mit der vermehrten ABC-Transporter-Aktivität nach den **Abb. 6.26** und **6.27** korreliert.

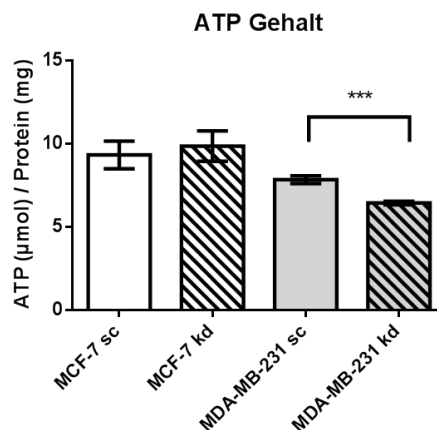


Abb. 6.28 Darstellung des ATP-Gehalts normalisiert auf die per BCA quantifizierte Proteinmenge von den kd-Varianten der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 im Vergleich zu ihren sc-Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei biologischen Replikaten, die mittels t-Test statistisch untersucht wurden. Es ist eine signifikante Reduktion des ATP-Gehalts in MDA-MB-231kd Zellen detektierbar, die auf eine vermehrte ATP-Hydrolyse und damit eine erhöhte ABC-Transporter-Aktivität hinweist.

6.5.3. Zusammenfassung der Charakterisierung der ITGB1-kd-Zelllinien

Der lentivirale, shRNA-basierte knockdown des ITGB1 wurde in beiden Zelllinien erfolgreich umgesetzt. Die durch Durchflusszytometrie bestimmte verbliebene Integrinexpression beträgt im Vergleich zur Kontrollzelllinie (sc): 21% (MCF-7) und 7,4% (MDA-MB-231). ITGA2 als korrespondierende Untereinheit wird entsprechend auch herunterreguliert.

Morphologisch demonstrieren die MDA-MB-231kd-Zellen deutlich vermehrte Zell-Zell-Kontakte, behalten aber auch die Fähigkeit, an COL1 zu adhären. Dabei ist als Grund sowohl die verbleibende Menge an ITGB1, als auch kompensatorische Rezeptoren möglich. MCF-7kd-Zellen wachsen in Gegenwart von COL1 Sphäroid-artig.

Es wird deutlich, dass ein ITGB1-*knockdown* nicht zwangsläufig zu einem defizitären, letalen Phänotyp führt. Dies wird durch einen positiven *CERES-score* der Datenbank *DepMap* unterstützt, d.h. ITGB1 ist nicht essentiell für das Überleben der Zellen [346–348].

Die MCF-7kd-Zellen weisen diverse eingeschränkte Zellfunktionen auf, wie verringerte COL1-Adhäsion, Chemoresistenz oder Transporteraktivität. Daher scheint es hier einen Zusammenhang zwischen Funktionshomöostase und der Expression von ITGB1 zu geben.

MDA-MB-231kd-Zellen weisen dagegen bei gleichbleibender COL1-Adhäsionsfähigkeit eine deutlich gesteigerte Chemoresistenz und ABC-Transporter-Aktivität auf, die durch eine vermehrte ATP-Hydrolyse unterstützt wird. Es handelt sich also eher um eine Modellzelllinie für ITGB1-*knockdown*-induzierte Kompensationsmechanismen. Die COL1-Bindung bewirkt in wt- bzw. sc-Zellen selbst eine Verringerung der ITGB1- und ITGA2-Expression. Ein *knockdown* steigert diesen Effekt also noch weiter artifiziell. Diese Betrachtung wird durch die Literatur unterstützt, die ITGA2B1 u.a. als Tumorsuppressorgen definiert [96, 259, 343]. ITGA2B1 ist wichtig für die COL1-Bindung, aber die Herabregulation kann die Expression anderer Rezeptoren wie EGFR begünstigen, die wiederum Überlebenssignale vermitteln können. Wichtig ist an dieser Stelle zu betrachten, dass es sich bei den Mutanten nicht um einen *knockout* handelt, sondern dass durch den *knockdown* ein deutlich physiologischerer Zustand durch eine Restmenge an ITGA2B1 erzeugt wird.

Die Kompensationsmechanismen vor allem der MDA-MB-231kd-Zellen auf Rezeptor- oder Signaltransduktionsebenen werden im Folgenden betrachtet.

6.6. Signalkaskaden und Proteom unter COL1- und ITGB1-Modulation

6.6.1. Screening des Phosphoproteoms

Bislang konnte in dieser Arbeit eine COL1- und ITGB1-vermittelte Chemoresistenz über die Aktivierung von ABC-Transportern beschrieben werden. Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen und Signalwege wurde ein *proteome profiler array* zur Bestimmung des Phosphoproteoms in Anwesenheit von COL1 und in Abhängigkeit des ITGB1-Status durchgeführt (**Abb. 6.29**). Aus Kapazitätsgründen wurde sich dazu entschieden, nur den wt mit den ITGB1-kd zu vergleichen. Daher besteht die Möglichkeit, dass einige Veränderungen durch die lentivirale Transduktion bedingt sind, die durch die sc-Zellen kontrastiert werden könnten. Allerdings implizieren die bisherigen Ergebnisse, dass die sc-Zellen in Bezug auf die relevanten Eigenschaften mit den wt-Zellen vergleichbar sind.

Beide Zelllinien weisen im Basalzustand bereits eine Phosphorylierung der Integrin-gekoppelten fokalen Adhäsionskinase (FAK) an Y397 auf. MDA-MB-231-Zellen weisen bereits eine sehr ausgeprägte Expression von pFAK auf, die von COL1 nicht weiter gesteigert werden kann. MCF-7-Zellen dagegen reagieren auf COL1 mit einer erhöhten Expression von pFAK und infolgedessen von pJNK1/2/3 (T183/Y185, T221/Y223), welche über die mechanosensitive FAK-Rac1-PAK1-Kaskade reguliert wird. In beiden Zelllinien bewirkt der *kd* einen nahezu vollständigen Wegfall von pFAK(Y397). Dies ist auf Basis der reduzierten ITGB1-Expression folgerichtig, allerdings in diesem Ausmaß beachtlich. In den MCF-7kd-Zellen (und geringer ausgeprägt in den MDA-MB-231kd-Zellen) wird durch diese stark reduzierte pFAK das pJNK1/2/3 auf ein Minimum verringert. In beiden Zelllinien wird durch den Wegfall von FAK die Phosphorylierung von ERK maximiert, da FAK hier als Suppressor fungieren kann [191].

Die klassischen Überlebenssignalwege PI3K/AKT/mTOR- [349, 350] und Ras/Raf/MEK/ERK- unterscheiden sich in diesen Zellen deutlich. Beide Zelllinien besitzen den PTEN-wt, wodurch die Phosphatase ihre Funktion zum Abbau von PIP₃ ausüben kann, und es zu keiner übermäßigen Rekrutierung und Aktivierung von AKT kommt. MCF-7sc-Zellen besitzen im Gegensatz zu MDA-MB-231-Zellen leicht erhöhte Basalexpressionen von pAKT und p-mTOR, die im ITGB1-kd komplett verloren geht. Lediglich bei COL1-Inkubation wird mTOR in sc

leicht erhöht. Dieser Befund steht im Kontrast zu PIK3CA-Mutation der MCF-7-Zellen [173], jedoch wird PI3K in diesem Array selbst nicht untersucht.

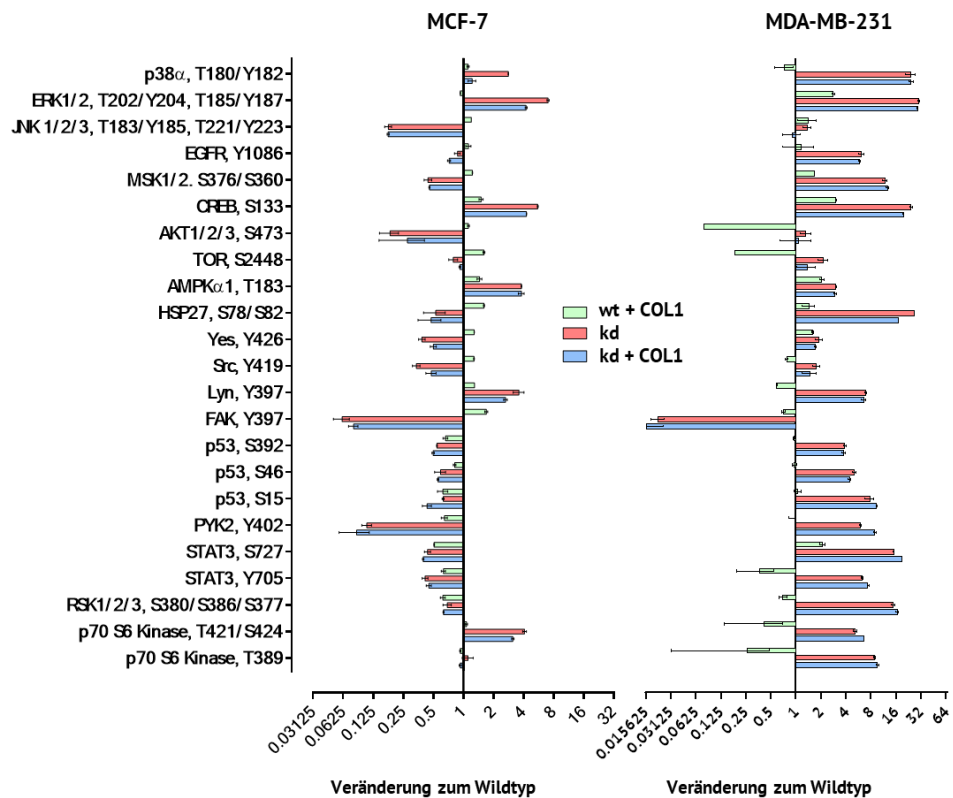
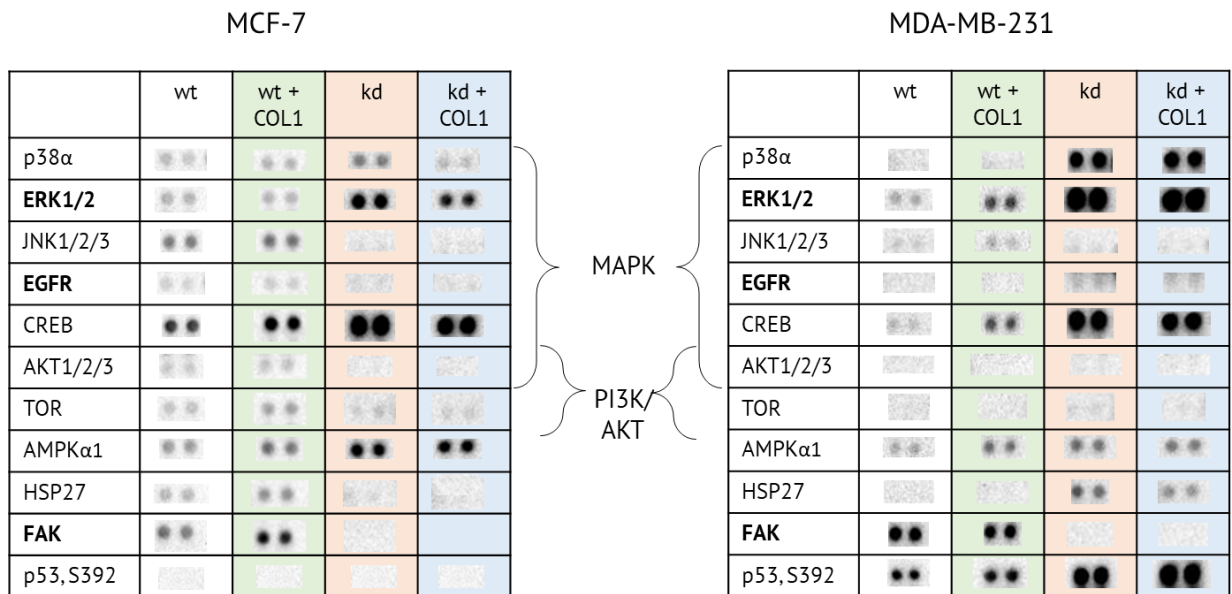


Abb. 6.29 Darstellung des Phosphoproteoms der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit von COL1 und reduzierter ITGB1-Expression (kd), analysiert mittels *Proteome Profiler Array*[®]. Daten basieren auf einer biologischen Probe, deren Proteine in Duplikaten vermessen wurden. Die Pixeldichten wurden auf die der wildtyp-Probe normalisiert und als Faktor einer log₂-Skala dargestellt. Aufgrund der geringen Stichprobe (2 dots, eine Durchführung) ist keine statistische Auswertung möglich. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

MDA-MB-231-Zellen aktivieren den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg weder im Grundzustand noch durch Stimuli. Der einzige Hinweis auf eine Beteiligung von PI3K ist hier die Aktivierung von p70S6 (T421/S242 und T389). 70S6K (T389) wird von mTOR (und damit PI3K) in MDA-MB-231kd-Zellen phosphoryliert, sodass eine anti-apoptotische Wirkung über die Beeinflussung des *microenvironments* oder eine Chemoresistenz entfaltet werden kann [352]. Als Gegenspieler von mTOR wird in beiden Zelllinien die AMP-(*activated protein kinase*) pAMPK α 1 (T183) durch COL1 aktiviert und diese durch den *knockdown* nochmals verstärkt. AMPK α 1 wird durch vermehrtes intrazelluläres AMP aktiviert, welches durch eine gesteigerte ATP-Hydrolyse insb. in den MDA-MB-231-Zellen (**Abb. 6.6** und **6.27**) entsteht.

Deutlicher ist allerdings die Phosphorylierungsstelle p70S6K (T421/S424) als *downstream*-Zielmolekül von ERK [353, 354] sowohl in MCF-7kd-, als auch in MDA-MB-231kd-Zellen. Darüber hinaus wird der Transkriptionsfaktor CREB durch COL1 und den *knockdown* in beiden Zelllinien stark phosphoryliert (S133). Dieses Signalmolekül kann als Schnittstelle sowohl von pAKT sowie von pERK1/2 gleichermaßen phosphoryliert und aktiviert werden. Damit stellt es ein interessantes Target im weiteren Verlauf dar.

Insgesamt ist die MAPK-Signaltransduktion beider Zelllinien durch COL1 und den ITGB1-kd deutlich extensiver hochreguliert. Neben der dualen Phosphorylierung des zentralen Moleküls ERK1/2 an T202/Y204 und T185/Y187 werden zusätzlich die MAPK-verwandten Moleküle pp38 α (T180/Y182) und pMSK1/2 (S376/S360), sowie im Falle der MDA-MB-231-Zellen die RTK pEGFR (Y1086) phosphoryliert. Dabei finden sich bei den MDA-MB-231-Zellen deutlich intensivere *dots* von pERK1/2 als bei den MCF-7-Zellen, sowohl im *knockdown* und bei Stimulierung durch COL1. Neben pCREB zeigen MDA-MB-231-Zellen eine Phosphorylierung von weiteren ERK1/2 *downstream*-Molekülen wie RSK1/2/3, p70^{S6K} (T421/S424) und HSP27. Letzteres kann bezüglich der beobachteten CDDP-Chemoresistenz in MDA-MB-231kd-Zellen eine Rolle spielen. HSP27 kann durch die MAPK-Kaskade aktiviert werden und zu einer Erhöhung von Glutathion führen, welches Cisplatin-Addukte bilden kann, die durch Transporter aus der Zelle exportiert werden.

Die Aktivierung von EGFR stellt eine besonders interessante Gegenregulation der MDA-MB-231kd-Zellen dar, da diese RTK ein prominentes Beispiel für ein MAPK-aktivierendes *outside-in signaling* darstellt. Aber nicht nur der Stimulus von außen (z.B. durch EGF) kann diesen

Rezeptor aktivieren. Durch sterische Heteromerisierung mit anderen Rezeptoren z.B. Integrine über ILK oder anderen RTKs kann eine Phosphorylierung des Rezeptors induziert werden, aus der eine MAPK-Aktivierung resultiert. Dabei steht ITGA2 im reziproken Verhältnis zu EGFR. Die Aktivierung von EGFR sorgt für eine Internalisierung von ITGA2, also kann ggf. auch der eine ITGA2 Internalisierung zu einer EGFR Aktivierung führen [343].

Hou *et al.* haben Erhöhungen von pScr, pEGFR und pERK und eine Erniedrigung von pAKT in CRIPSR/CAS9 erzeugten MDA-MB-231kd-Zellen beschrieben [355]. In deren Proteom-Analysen wurde allerdings ein konfluenzabhängiger Effekt untersucht, der insbesondere bei pERK je nach Konfluenzgrad konträre Effekte erbrachte. Diese Abhängigkeit konnte in der shRNA-basierten *knockdown*-Zelllinie dieser Arbeit bei Western Blot Experimenten (**Abb. 6.36**) nicht bestätigt werden. Dabei muss betrachtet werden, dass *knockout* und *knockdown* nicht identisch sind. Ein *knockout* stellt einen artifizielleren Eingriff in die Physiologie der Zelle dar, während der *knockdown* zelleigene Regulationsmechanismen besser abbilden kann.

Die Adhäsion an COL1 kann in MDA-MB-231-Zellen bereits eine deutliche Aktivierung von ERK1/2 über ein *outside-in signaling* bewirken. Trotz des *knockdowns* werden MDA-MB-231kd-Zellen noch weiter in ihrer MAPK-Aktivierung gesteigert und behalten ihre Möglichkeit der Adhäsion an COL1 (vgl. **Abb. 6.24**). Der Grund für die vermehrte Aktivierung von MAPK liegt neben der EGFR-Aktivierung also möglicherweise an Kompensationsmechanismen der Adhäsionsrezeptoren. Dies wird insbesondere durch die Aktivierung der im *Proteom Profiler Array* vorhandenen Kinasen der Src-Family (Src, Lyn, Fyn, Yes) deutlich. Insbesondere Lyn ist bei Brustkrebs mit aggressiven, triple-negativen Brustkrebs korreliert [356, 357]. Weiterhin ist PYK2, das Homolog der FAK, kompensatorisch erhöht bei MDA-MB-231kd-Zellen. PYK2 steht bspw. in Kontakt zu COL1-bindenden Rezeptoren wie DDR1 und DDR2.

MCF-7wt-Zellen verwenden im unstimulierten Zustand den ERK-pathway kaum zur Zellhomöostase. Erst im *knockdown* findet ein *switch* zu den MAP-Kinasen statt. Dennoch berichtet die Literatur, dass MCF-7wt-Zellen über ITGA5B1-vermittelte ERK-Aktivierung eine DOX-Resistenz vermitteln kann [358]. Dieser Effekt wurde auch besonders in hämatopoetischen Krebszellen beobachtet. So aktiviert COL1 MAPK in Jurkat Zellen [185] und kann in diesen eine Chemoresistenz gegen DOX bewirken [269]. Nach der Therapie mit DOX

oder Docletaxel wurden verschiedene Expressionsmuster von MAP-Kinasen in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen beobachtet [359].

Ein weiterer Unterschied besteht in dem Tumorsuppressorgens p53. Während MCF-7 keine Phosphorylierung aufgrund des p53-wt aufweist, demonstrieren MDA-MB-231-Zellen deutliche Phosphorylierungen an verschiedenen Aminosäuren des mutierten p53. Die Effekte dieser Phosphorylierungen sind vielseitig und können chemoresistenz erhöhend und vor allem anti-apoptotisch sein [360]. So haben Hui *et al.* [318] eine MAPK-Abhängigkeit von mutiertem p53 durch den MEK-Inhibitor U0216 experimentell bestätigt. Die *gain-of-function* Mutation von p53 in MDA-MB-231-Zellen wird als Voraussetzung für DOX-Resistenz durch NF-KB diskutiert [361]. Dabei wurde eine Erhöhung von ICAM-1 unter DOX-Inkubation per Western Blot beobachtet. Im Zuge dieser Arbeit wurde diese Hypothese anhand von CDDP, DOX und MX mittels Durchflusszytometrie in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen untersucht, um die Involvierung von der NF-KB-Signalkaskade zu analysieren.

Die erhöhte Expression von ICAM-1 und damit der Zusammenhang zu NF-KB [362] konnte in MDA-MB-231-Zellen unter allen Zytostatika festgestellt werden (**Abb. 6.30A**). Interessanterweise findet sich der Effekt auch in geringem Maße in MCF-7-Zellen (**Abb. 6.30B**), was im Widerspruch zu den Western-Blot Ergebnissen von Dalmases *et al.* steht [361]. Weiterhin konnte eine Erhöhung von ICAM-1 in MDA-MB-231kd-Zellen nachgewiesen werden, während COL1 keine Veränderungen bewirkt (**Abb. 6.30C**). Diese Erkenntnis passt zu der im *Proteom Profiler Array* festgestellten Erhöhung von pSTAT3 (S727) in MDA-MB-231kd-Zellen (vgl. **Abb. 6.29**). Die Expression von pSTAT3 korreliert mit der Anwesenheit von dessen Transkriptionsprodukt ICAM-1 und damit der Aktivität des NF-KB-Signalwegs.

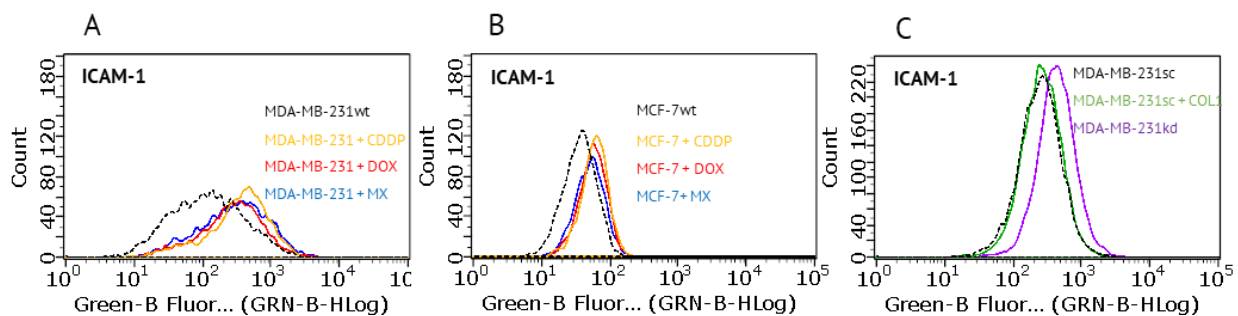


Abb. 6.30 Darstellung der durchflusszytometrische Analyse von ICAM-1 in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen. Gezeigt sind jeweils repräsentative Kurven. **A)** Messung in MDA-MB-231-Zellen in Anwesenheit von CDDP, DOX und MX (EC₅₀). **B)** Der Effekt ist in MCF-7-Zellen deutlich geringer ausgeprägt. **C)** Darstellung des Effekts von COL1 und ITGB1-kd in MDA-MB-231-Zellen.

Zusammenfassend kann auf Basis der Untersuchung ausgewählter Proteine/Moleküle im Phosphoproteom durch den *Proteom Profiler Array* festgehalten werden, dass in beiden Zelllinien die Interaktion mit COL1 und der ITGB1-kd MAP-Kinasen und deren nachgeschaltete Moleküle wie CREB aktiviert. Bei MCF-7-Zellen ist MAPK im Wildtyp kaum involviert, allerdings führt der ITGB1-kd zu einem *switch* in von AKT/mTOR zu MAPK.

MDA-MB-231-Zellen besitzen konstitutiv aktive MAP-Kinasen, die durch COL1 gesteigert und durch den ITGB1-*knockdown* maximal aktiviert werden. Darüber hinaus bestehen Indizien der Involvierung weiterer Signaltransduktionen wie NF- κ B in MDA-MB-231-Zellen, die aber im direkten Vergleich zur deutlichen Aktivität und Involvierung der MAP-Kinasen im weiteren Verlauf der Arbeit vernachlässigt werden.

6.6.2. Betrachtung der MAPK-Signalkaskade

Um den Einfluss der MAP-Kinasen auf die Viabilität der MDA-MB-231-Zellen zu untersuchen, wurde die Zytotoxizität des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 analysiert. SCH772984 interagiert selektiv als Typ II-Inhibitor, also ATP-kompetitiv in der inaktiven Enzymkonformation, und zusätzlich allosterisch per π π -stacking der Piperazin-Phenyl-Pyrimidin-Struktur (**Abb. 6.31**) mit einer besonderen hydrophoben Bindungstasche (P-loop) nahe der ATP-Bindungstasche von ERK1/2 [363–367]. Diese Wechselwirkung zeichnet sich durch eine langsame Dissoziation und damit verlängerte Wirkung aus. SCH772984 weist eine IC_{50} von 4 nM (ERK1) und 1 nM (ERK2) auf [365] und bewirkt v.a. in Zellen mit BRAF- oder KRAS-Mutation einen antiproliferativen Effekt, z.B. in Melanomzellen [365, 366].

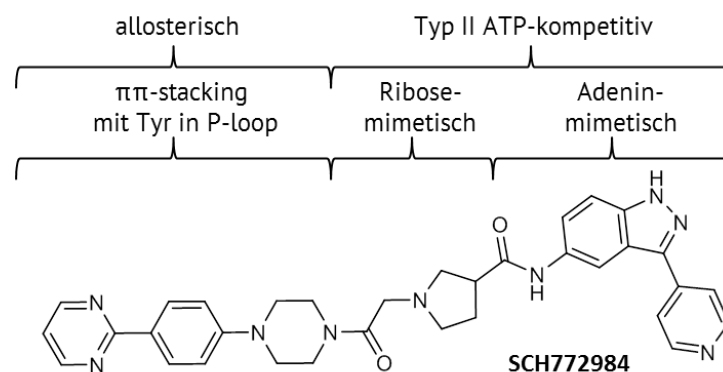


Abb. 6.31: Strukturformel des ERK1/2-Inhibitors SCH772984. Der Inhibitor weist einen dualen Inhibitionsmechanismus aus einer ATP-kompetitiven mit zusätzlicher allosterischen Hemmung auf.

Nach 72 h beträgt die Zytotoxizität von SCH772984 1,85 μM (EC_{50}). Dabei werden die Zellen aber nicht komplett abgetötet, sondern verbleiben in einem Plateau der Viabilität (**Abb. 6.32A**). Der ITGB1-*knockdown* sensitiviert die Zellen signifikant ($p=0,0060$; $\text{EC}_{50} = 0,32 \mu\text{M}$) um den Faktor 6 (**Abb. 6.32B**). Die Anwesenheit von COL1 in der sc-Variante erzeugt dagegen mit 4,71 μM eine signifikante ($p=0,0315$), matrixvermittelte Resistenz um den Faktor 2,6. Hieran wird deutlich, dass die COL1-induzierte *environment mediated drug resistance* auch bei Inhibitoren von intrazellulären Kinasen auftreten kann. Diese COL1-Resistenz ist im *knockdown* mit dem Faktor 2 (0,320 μM auf 0,627 μM) geringer ausgeprägt als in der sc-Variante, aber dennoch vorhanden. Dies deutet auf eine noch verbliebene ITGB1-Restaktivität oder Kompensationsmechanismen in der Interaktion mit COL1 hin. Auch MCF-7kd-Zellen sind deutlich sensitiver gegenüber SCH772984 als die sc-Zellen. Allerdings ist der Effekt nicht so stark ausgeprägt wie in MDA-MB-231-Zellen.

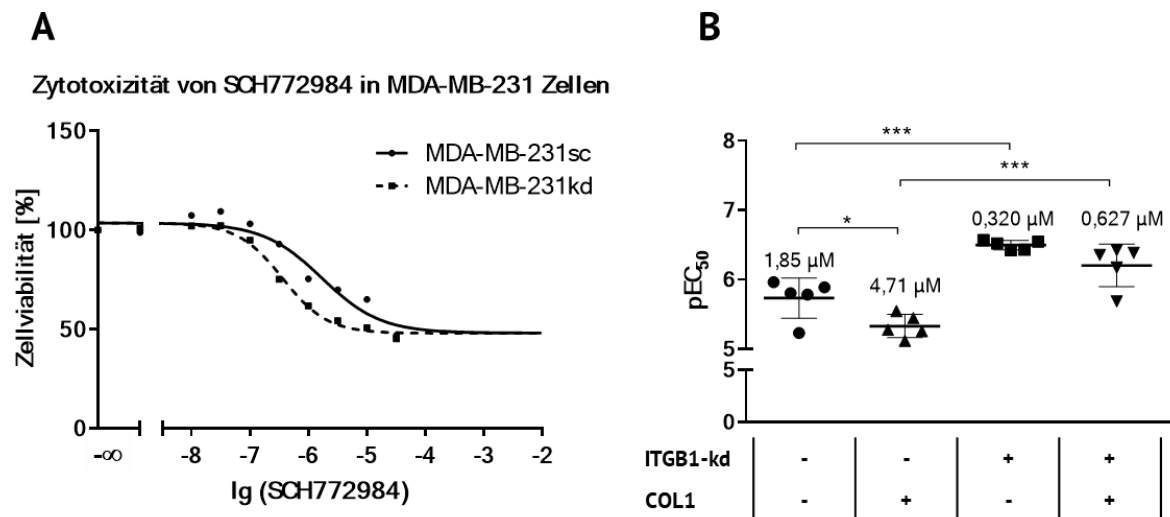


Abb. 6.32 Zytotoxizität von SCH772984 in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und der Expression von ITGB1. **A**) Repräsentative Dosis-Wirkungs-Kurven der MTT-Analysen. **B**) Darstellung der pEC_{50} -Werte ($n=5$) mit Mittelwert und Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgt über gepaarten t-Test und demonstriert signifikante Unterschiede durch den Einfluss von COL1 und ITGB1-kd. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Die Resistenzentwicklung gegenüber Kinase-Inhibitoren und die erhöhte Sensitivität bei verminderter ITGB1-Expression soll im Folgenden anhand des MEK-Inhibitors Trametinib (**Abb. 6.33**) verifiziert werden. MEK ist die vorgeschaltete Kinase, die ERK1/2 phosphoryliert. Auch Trametinib weist analog der ERK-Inhibition durch SCH772984 ein Plateau der Zellviabilität auf (**Abb. 6.34A**). Trametinib hat nach 72 h eine EC_{50} von 131 nM (**Abb. 6.34B**).

Die Anwesenheit von COL1 führt zu einer deutlichen Resistenz gegenüber Trametinib ($EC_{50}=221$ nM). Die kd-Zellen sind mit 94 nM (EC_{50}) sensitiver gegenüber Trametinib und weisen analog SCH772984 eine COL1-vermittelte Resistenz selbst im ITGB1-kd auf.

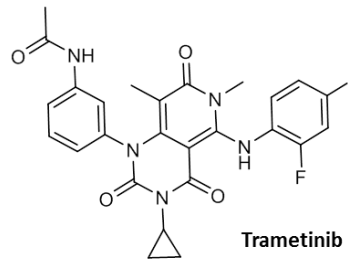


Abb. 6.33 Strukturformel des MEK-Inhibitors Trametinib.

Beide MAPK-Inhibitoren demonstrieren ein ähnliches Bild auf die Zellmodifikationen. Der ITGB1-*knockdown* sensibilisiert die Zellen, während COL1 in den sc-Zellen deutlich und in den kd-Zellen geringer eine Resistenz induziert. Die Resistenz gegenüber Kinase-Inhibitoren wie dem MEK-Inhibitor Trametinib durch Kollagen ist bekannt [368]. Mehrheitlich ist dieser Effekt bei Melanomzellen zu finden, da Trametinib zu deren Leitlinientherapie gehört [369]. Der Effekt des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 ist dabei signifikant ausgeprägt, während der Effekt des MEK-Inhibitors Trametinib das gleiche Bild, allerdings nicht signifikant darstellt. Während die COL1-vermittelte Resistenzentwicklung gegenüber SCH772984 und Trametinib ähnlich ausgebildet wird, ist die Resistenzentwicklung im ITGB1-*knockdown* nur bei SCH772984 vorhanden, wenn auch abgeschwächt.

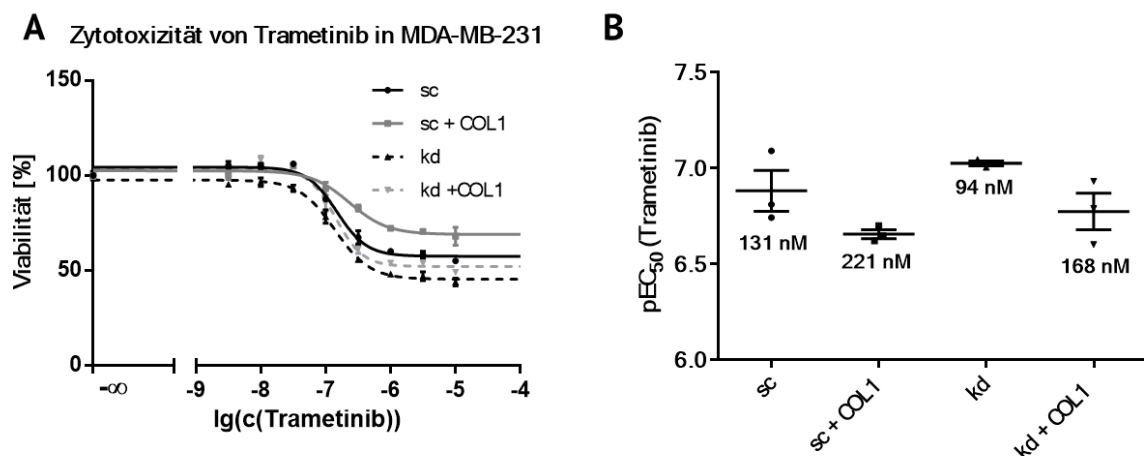


Abb. 6.34 Zytotoxizität von Trametinib in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und der Expression von ITGB1. **A**) Repräsentative Zytotoxizitätskurven **B**) Übersicht der Stichproben der pEC_{50} -Werte ($n=3$) mit Mittelwert und Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgt über gepaarten t-Test und demonstriert die signifikante Unterdrückung der COL1-vermittelten Resistenz im ITGB1-kd.

Aufgrund der beobachteten Sensitivitätsunterschiede zwischen MDA-MB-231sc- und kd-Zellen gegenüber SCH772984 soll weitergehend der Zustand der Apoptose mittels Annexin-V/PI-Assays untersucht werden. Dabei soll insbesondere auch der Resistenzeffekt des Kollagens untersucht werden, der zwar im *knockdown* geringer ausgeprägt, aber dennoch deutlich messbar ist. Auf eine Betrachtung von MEK-Inhibitor Trametinib wird verzichtet, da die Effekte nicht ausgeprägt genug bzw. signifikant waren.

Dabei wird deutlich, dass die MDA-MB-231kd-Zellen trotz ähnlicher Absorptionsmessungen innerhalb des MTT-basierten Zellviabilitätstests einen deutlich geringeren vitalen Anteil von Zellen besitzen, was durch eine Verschiebung des *dot-plots* nach rechts-oben dargestellt wird (**Abb. 6.35A**). Der nicht-vitale Anteil ist dabei in gleichen Teilen als apoptotisch und nekrotisch zu beschreiben. Während die MDA-MB-231sc-Zellen im Basalzustand einen vitalen Anteil von 91% aufweisen, reduziert sich dieser in den kd-Zellen signifikant ($p = 0,0151$) auf 75% (**Abb. 6.35B**). In Gegenwart von COL1 steigt der Anteil der vitalen sc-Zellen auf 93%, während sich die kd-Zellen sehr signifikant ($p < 0,0001$) weiter auf 69% reduzieren.

Dies macht die Notwendigkeit der Verwendung von unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden deutlich. Obwohl die kd-Zellen eine höhere intrinsische Resistenz gegenüber diversen zytotoxischen Xenobiotika und eine vergleichbare metabolische Aktivität (gemessen über MTT) im Vergleich zu den Kontrollzelllinien besitzen, bewirkt die Reduktion des ITGB1 dennoch eine Erhöhung des apoptotischen und nekrotischen Anteils der Zellpopulation in Gegenwart von COL1.

Die Toxizität von SCH772984 spiegelt sich in den Apoptosedaten wider. Ab einer SCH772984-Konzentration von 0,316 μM nimmt der Anteil der vitalen Zellen in den kd-Zellen signifikant ab auf einen Anteil von 48% (bei 0,316 μM und 1 μM) und in Anwesenheit von COL1 auf 29% (bei 0,316 μM , $p = 0,0017$) und 34% (bei 1 μM). Dabei ist bei 1 μM SCH772984 in Gegenwart von COL1 der nekrotische Anteil deutlich ausgeprägter. Somit ist eine dosisabhängige Wirkung gegeben. Diese Abnahme der vitalen Zellen steht im Widerspruch zu den MTT-Messungen, bei denen eine Resistenz experimentell dargelegt wurde.

Ein positiver Einfluss von COL1 auf die Zellviabilität kann im *knockdown* also nicht bestätigt werden. Bei den MDA-MB-231sc-Zellen erhöht sich der Anteil der vitalen Zellen von ca. 89% ohne COL1 auf 93% mit COL1 bei Inkubation mit SCH772984.

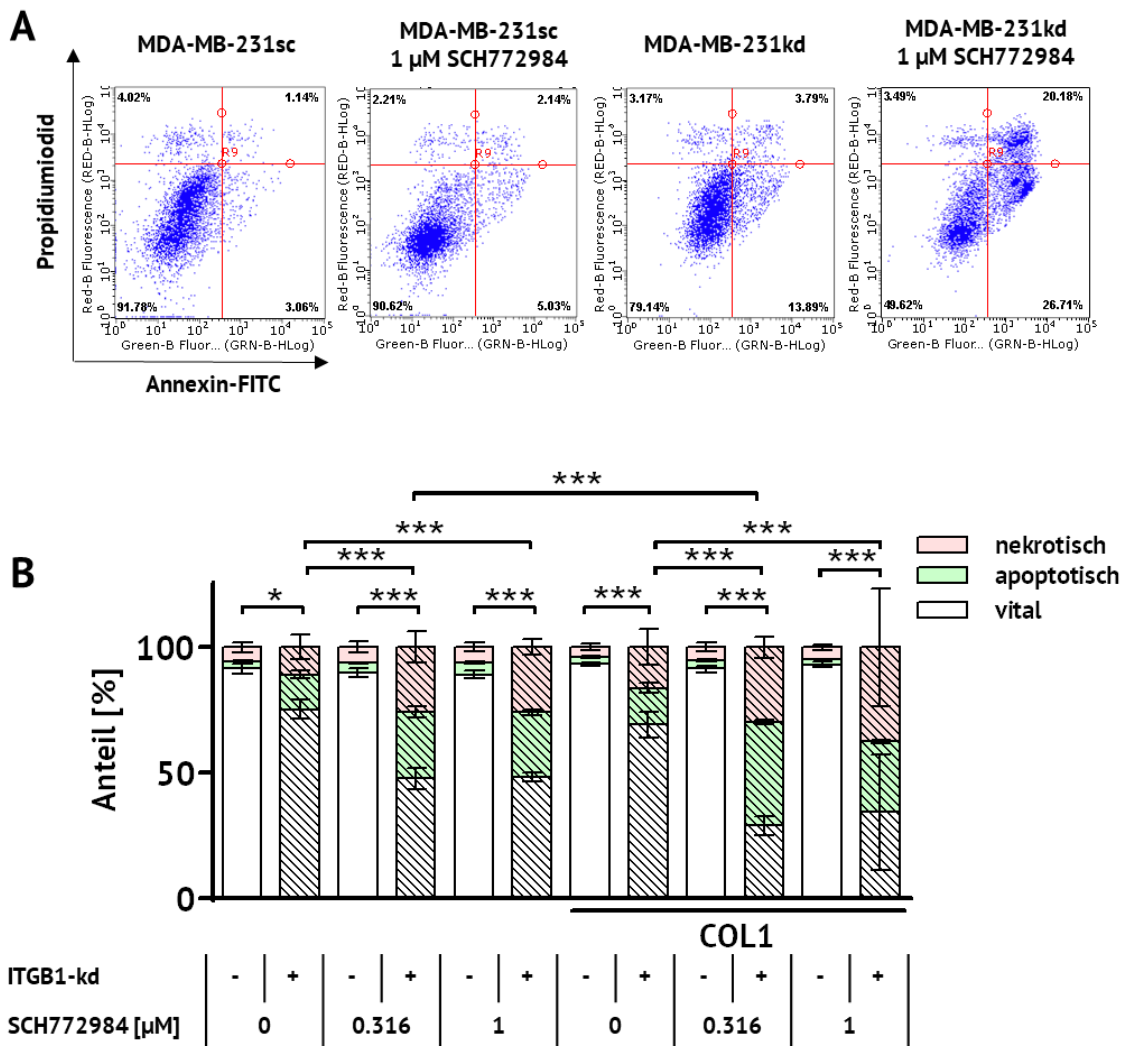


Abb. 6.35 Darstellung der Messung des Apoptosezustands von MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1, der Expression von ITGB1 und des ERK-Inhibitors SCH772984 mittels Annexin-V / Propidiumiodid Assay. Gezeigt sind (A) exemplarische *dot-plots*, die den Effekt von *knockdown* und SCH772984 darstellen und (B) die Mittelwerte (n=4) sowie die Standardabweichung des prozentualen Anteils der im *dot-plot* gemessenen Zellpopulationen (vital, apoptotisch, nekrotisch) innerhalb der Quadranten. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe eines zweiseitigen ANOVAs durchgeführt. Es sind nur Signifikanzen des vitalen (und nicht des apoptotischen/nekrotischen) Anteils durch Sterne illustriert. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351] (*supplementary data*).

Der Effekt der pERK-Inhibition durch SCH772984 wurde per Western Blot überprüft. Dabei sollte auch der Effekt der Hemmung auf weitere *downstream*-Signalmoleküle untersucht werden. Durch Western Blot-Analyse kann in MDA-MB-231-Zellen auf Proteinebene eine Erhöhung von pERK1/2 (T202/Y204) durch eine verstärkte Doppelbande bei 42 und 44 kDa unter dem Einfluss von COL1 dargestellt werden (**Abb. 6.36A**).

Ergebnisse und Diskussion

Signalkaskaden und Proteom unter COL1- und ITGB1-Modulation

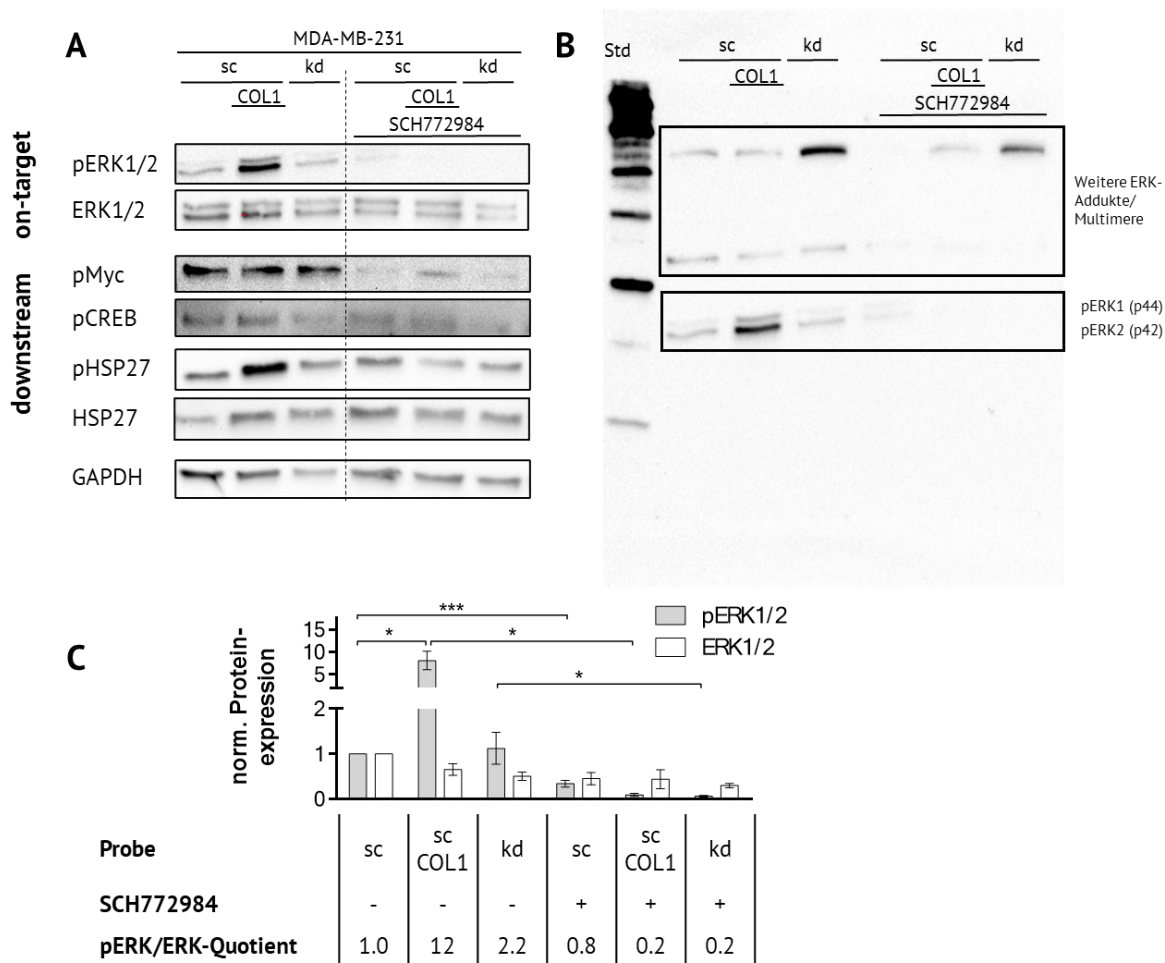


Abb. 6.36 Darstellung der Western Blot Analyse von (A) pERK1/2 (*on-target*), sowie den pERK-assozierten *downstream*-Signalmolekülen unter dem Einfluss des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 in einer Konzentration von 1 μ M für 24 h. (B) Exemplarische Darstellung der Gesamtbanden und Addukte von pERK. (C) Die Expression von pERK1/2 wird als Mittelwert der normalisierten Pixeldichten dargestellt und mittels t-Test analysiert (n=3). Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Diese Erhöhung von pERK (T202/Y204) wird erst nach Normalisierung auf einen internen Standard wie GAPDH oder als Aktivierungsquotient zu ERK1/2 (**Abb. 6.36C**) deutlich. Insgesamt kann jedoch bei der Auswertung der Membran mit anti-pERK-mAb eine deutlich intensivere Summe aller Banden bei den kd-Zellen festgestellt werden, insbesondere auf der Höhe von ERK-Multimeren und -Addukten (**Abb. 6.36B**). Dies kann durch eine nicht ausreichend optimierte Lyse- oder Denaturierungsmethode zum Nachweis dieses Proteins begründet werden. Bezogen auf die Gesamt-Lumineszenz kann so aber das deutliche Ergebnis des *Proteome Profiler Arrays* (**Abb. 6.29**) bestätigt werden, da bei diesem durch die fehlende SDS-PAGE-Gelelektrophorese nur die Summe aller pERK Epitope auf der vorbeschichteten Screening-Membran bestimmt wird.

Die Inkubation des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 (1 μ M für 24 h) kann die Phosphorylierung von ERK1/2 an T202/Y204 im Bereich von 42 und 44 kDa im unstimulierten Basalzustand und in Gegenwart von COL1 oder bei dem ITB1-*knockdown* vollständig unterdrücken (**Abb. 6.36B**). Unter Betrachtung der ERK-Multimere wird auch im ITGB1-*knockdown* eine deutliche, wenn auch nicht vollständige Reduktion der Lumineszenz, ersichtlich.

Die COL1-abhängige Aktivierung von *downstream*-Molekülen wie HSP27 [370, 371] und Myc [372] wird durch Blockade von pERK1/2 (T202/Y204) verhindert. Insgesamt ist die inhibitorische Wirkung auf pMyc sowohl im basalen Zustand, sowie durch COL1 oder den ITGB1-*knockdown* besonders ausgeprägt. Lediglich in Gegenwart von COL1 verbleibt eine Restaktivität, was einen alternativen Aktivierungsweg abseits von der Ras-Raf-MEK-ERK1/2-Kaskade vermuten lässt. Während die COL1-vermittelte Phosphorylierung von HSP27 komplett unterdrückt wird, ist innerhalb der *knockdown*-Zellen kein Effekt der ERK-Inhibition auf pHSP27 sichtbar.

CREB wird u.a. von pERK1/2 *downstream* aktiviert [373]. SCH772984 reduziert pCREB innerhalb aller Zellbehandlungen. Allerdings verbleibt in der unbehandelten und COL1-aktivierten Probe eine Restaktivität von pCREB. Dies liegt vermutlich an der Vielzahl von Signalmolekülen, die statt pERK (T202/Y204) CREB phosphorylieren und damit kompensatorisch agieren können. Daher bietet sich CREB als Target zur separaten Inhibition neben der ERK1/2-Hemmung an.

Die Signaltransduktion der MAP-Kinasen ist komplex und einzigartig für jede Zelllinie. Leung *et al.* haben in verschiedenen Brustkrebszelllinien dargelegt, dass kein Zusammenhang zwischen der antiproliferativen Wirkung des MEK-Inhibitors Trametinib und der Hemmung der ERK-Phosphorylierung festgestellt werden konnte [374]. Einerseits konnte ERK1/2 durch Konzentrationen inhibiert werden, die keine proliferativen Einschränkungen für die Zellen ergaben, andererseits waren Zellen mit sehr geringer pERK-Expression sensitiv gegen Trametinib [374]. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen der SCH772984-vermittelten ERK-Inhibition wider. Zukünftige Experimente sollten diesen Versuchsansatz unter MEK-Inhibition wiederholen, um zu überprüfen, ob die COL1-Aktivierung Ras-Raf-MEK-abhängig verläuft. Ein weiterer MEK-Inhibitor neben Trametinib ist das Molekül U0126.

6.6.3. Status der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT)

Die Aktivierung von MAP-Kinasen ist neben der Chemoresistenz-Genese mit Metastasierungsprozessen verbunden. Dabei korreliert ein erhöhtes Metastasierungspotential generell mit der EMT und somit mit einem mesenchymalen Phänotyp. Im Folgenden wird untersucht, inwieweit die Zellen durch die Reduktion des mesenchymalen Markers ITGB1 oder der Inkubation mit COL1 in ihrem Phänotyp verändert werden.

Als EMT-Marker wurden die beiden Proteine E-Cadherin (**Abb. 6.37**) für den epithelialen und Vimentin (**Abb. 6.38**) für den mesenchymalen Zustand analysiert. Weitere EMT-Marker wie Snail sind fast ausschließlich auf mRNA-Ebene nachweisbar. Darüber hinaus sind E-Cadherin und Vimentin essentiell für die Reorganisation des Zytoskeletts, sowie für Signaltransduktionen und die Malignität der Zellen [375, 376]. E-Cadherin wechselwirkt mit anderen Proteinen der Zelloberfläche und ist mit der Regulation von Adhäsionsrezeptoren wie ITGA2B1 und DDR1, aber auch RTKs wie EGFR verbunden [377, 378].

Ein ITGB1-*knockdown* sollte durch Wegfall des mesenchymalen Markers den epithelialen Phänotyp, d.h. vermehrte E-Cadherin-Bildung und Zell-Zell-Kontakte begünstigen, da Zell-Matrix-Kontakte infolgedessen vermindert und Zell-Zell-Wechselwirkungen vermehrt ausgebildet werden.

Die extrazelluläre Expression von E-Cadherin wird allerdings durch die Interaktion mit COL1 und den ITGB1-kd signifikant reduziert (**Abb. 6.37**). Dies kann mit einem mesenchymalen Charakter und der Aktivierung von Signalkaskaden wie wnt [379] oder IGF1 [380] einhergehen.

Die Aktivierungen der Signalkaskaden durch COL1 und ITGB1-kd lassen sich durch die Herabregulierung von E-Cadherin erklären, da es selbst als Tumorsuppressor agiert, dessen Reduktion wiederum Signalkaskaden wie wnt, PI3K und MAPK aktiviert. MDA-MB-231-Zellen exprimieren E-Cadherin nicht und auch der *knockdown* exprimiert dieses Molekül trotz der vermehrten Zell-Zell-Kontakte nicht. Hou *et al.* konnten bei einem ITGB1-*knockout* in MDA-MB-231-Zellen E-Cadherin zumindest auf mRNA-Ebene nachweisen [355].

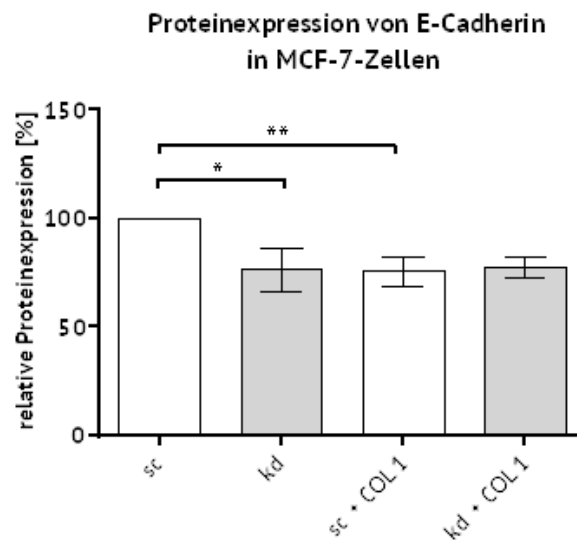


Abb. 6.37 Extrazelluläre Expression von E-Cadherin in MCF-7-Zellen, bestimmt per Durchflusszytometrie. Die statistische Auswertung erfolgt über einen gepaarten t-Test und demonstriert die teilweise signifikante *downregulation* von E-Cadherin durch COL1 und/oder ITGB1-kd. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (n=3). MDA-MB-231-Zellen besitzen weder im *knockdown* noch in Gegenwart von COL1 E-Cadherin (Detektionssignale < 5). Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert (*supplementary data*).

Vimentin ist in MCF-7-Zellen per Western Blot nicht detektierbar. In MDA-MB-231-Zellen ist Vimentin vorhanden, wobei COL1 keine Veränderung bewirkt (**Abb. 6.38**). Der ITGB1-*kd* bewirkt dagegen eine signifikante ($p = 0,028$) Expressionssteigerung bis auf das 30-fache. Damit sollten MDA-MB-231kd-Zellen noch mesenchymaler als der Wildtyp sein, was allerdings im direkten Widerspruch zu den verstärkten Zell-Zell-Kontakten steht. Vimentin kann ebenfalls die Ursache für die Aktivierung von MAPK [381, 382] sein. So kann Vimentin pERK1/2-Phosphatasen inhibieren, die pERK sonst inaktivieren würden [382].

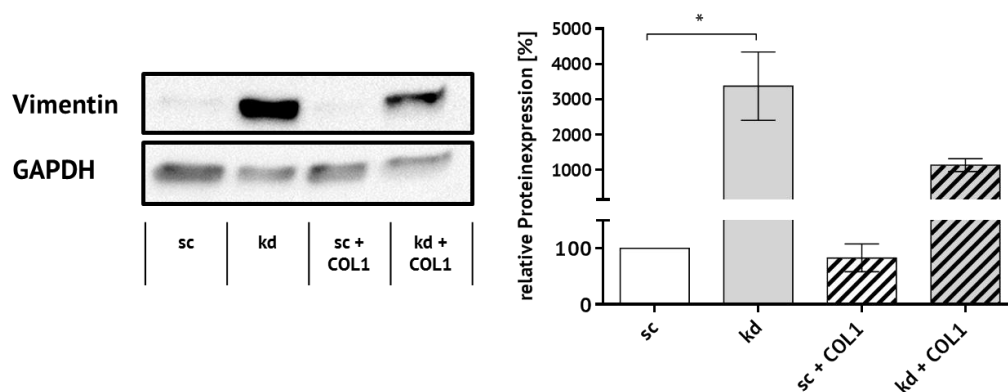


Abb. 6.38 Vimentin-Expression in MDA-MB-231-Zellen mittels Western Blot. Dargestellt sind repräsentative Western Blots mit GAPDH als interner Standard sowie die Mittelwerte mit Standardfehler der Pixeldichten (n=3) und statistischer Auswertung mittels ungepaartem t-Test. Die Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert (*supplementary data*).

Ergebnisse und Diskussion

Signalkaskaden und Proteom unter COL1- und ITGB1-Modulation

Es besteht auch die Möglichkeit einer kompensatorischen Erhöhung des Vimentins. Vimentin stabilisiert fokale Adhäsionen durch Integrine [383], sowohl an Matrixproteine als auch an Zellen durch Hemidesmosome wie ITGB4. Durch den ITGB1-*knockdown* kann es hier zu einer Erhöhung kommen, um die fokalen Adhäsionen sicherzustellen.

Um diese Ergebnisse funktionell zu verifizieren, wurde der Vimentin-Inhibitor FiVe1 verwendet (**Abb. 6.39**), der Zellen mit hoher Vimentin-Expression abtötet [384].

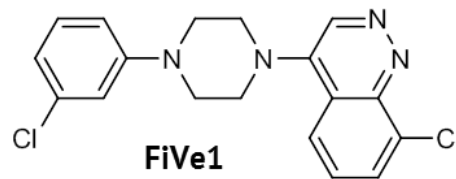


Abb. 6.39 Chemische Struktur des Vimentin-Inhibitors FiVe1.

MDA-MB-231sc-Zellen ($EC_{50} = 9,5 \mu\text{M}$) sind gegenüber der Vimentin-überexprimierenden ITGB1-kd-Variante ($EC_{50} = 4,1 \mu\text{M}$) um den Faktor 2 resistenter (**Abb. 6.40A**). Des Weiteren kann eine COL1-vermittelte Resistenzentwicklung gegen den Inhibitor in sc-Zellen ($EC_{50} = 10,6 \mu\text{M}$), aber nicht in kd-Zellen ($EC_{50} = 4,4 \mu\text{M}$) beobachtet werden. MCF-7-Zellen sind gegenüber dem Inhibitor unempfindlich (**Abb. 6.40B**). Dies war zu erwarten, da MCF-7-Zellen kein Vimentin ausbilden.

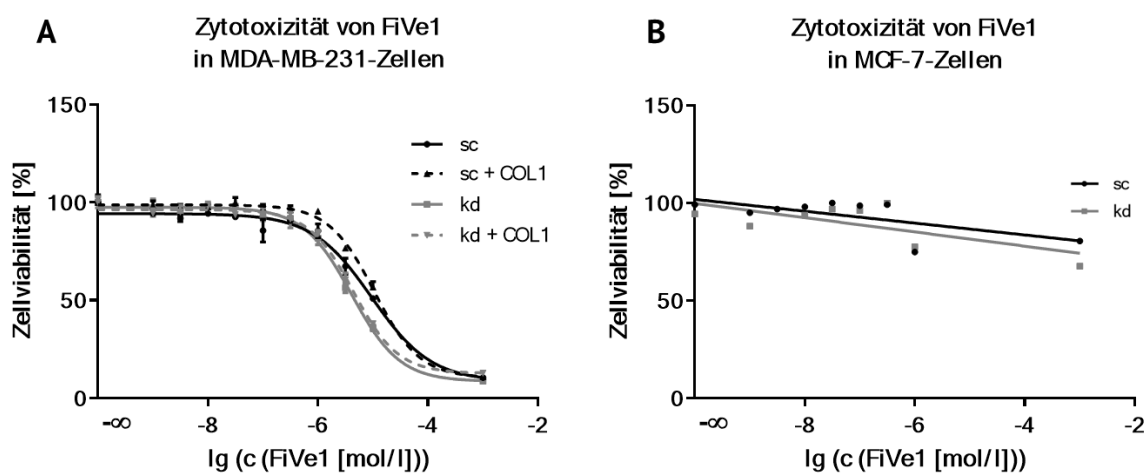


Abb. 6.40 Repräsentative Zytotoxizitätskurven des Vimentin Inhibitors FiVe1 in MDA-MB-231- (**A**) und MCF-7- (**B**) Zellen. MCF-7-Zellen sind gegenüber dem Vimentin-Inhibitor unempfindlich. Die Zytotoxizität von MDA-MB-231-Zellen sind abhängig von COL1 und ITGB1 (und der damit verbundenen Vimentin-Expression).

6.6.4. Das Adhäsom bei ITGB1-knockdown

Bisher konnte demonstriert werden, dass beide Brustkrebs-Zelllinien durch COL1 oder ITGB1-kd eine stärkere Aktivierung der MAP-Kinasen aufweisen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen und die Interaktion der Zellen mit COL1 eine Reduktion von ITGB1 bewirkt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Reduktion von ITGB1 durch andere Proteine kompensiert wird. Dabei ist entscheidend, dass diese Proteine der Gegenregulation nicht nur die adhäsiven Fähigkeiten der Zellen aufrechterhalten, sondern aktivierend auf der Signalebene wirken. Als Screening für die möglichen Proteine wurde ein *Proteome Profiler Array* für extrazelluläre Strukturen (*non-hematopoitic soluble receptor*, **Abb. 6.41A**) in den MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen sowie den deren ITGB1-kd-Varianten durchgeführt.

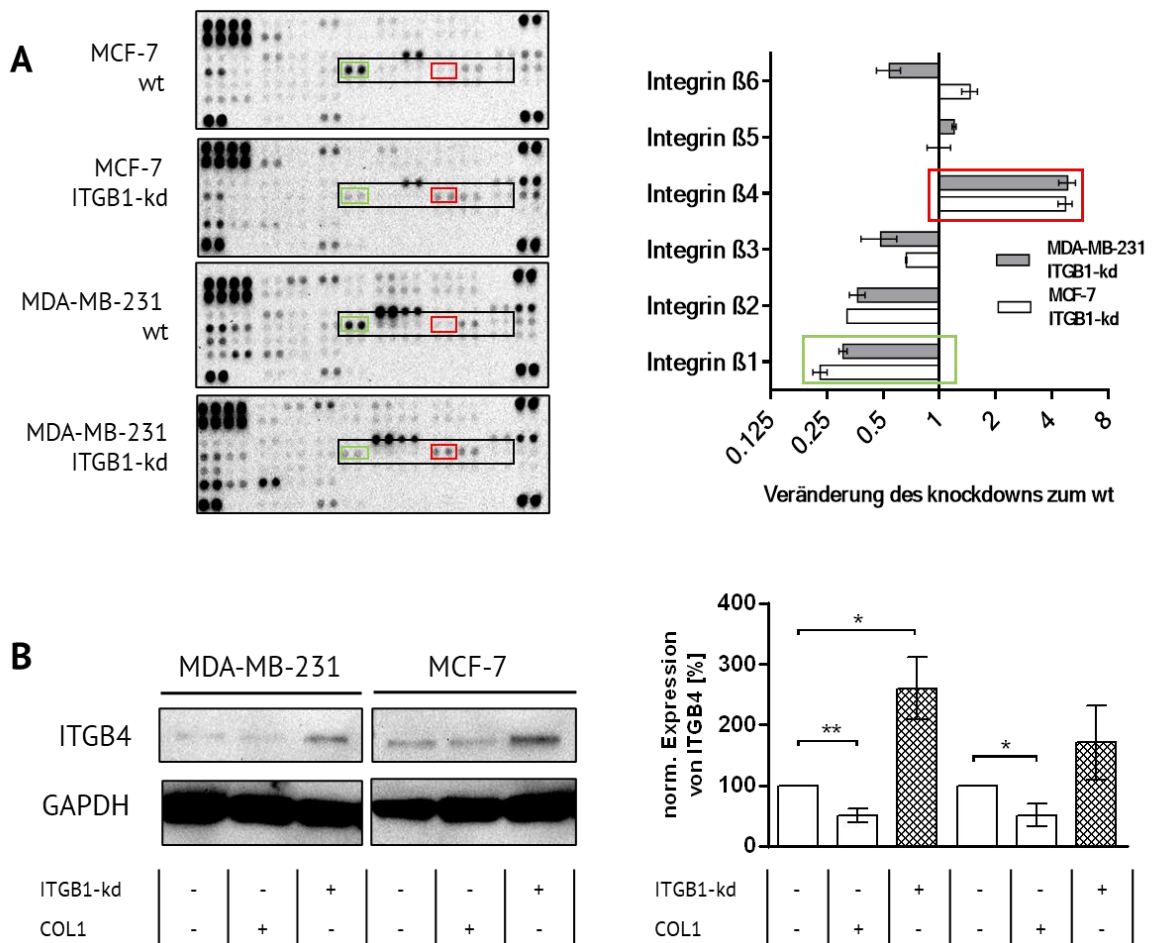


Abb. 6.41 Änderung des Adhäsoms im ITGB1-kd. (A) *Non-hematopoitic soluble receptor proteome profiler array* der MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen sowie deren ITGB1-kd-Varianten (n=1). Es wird eine kompensatorische Hochregulierung des ITGB4 in ITGB1-kd-Zellen deutlich. (B) Repräsentative Western Blot Analyse von ITGB4 sowie die statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test (n=3). Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Bei den *dots* der β -Integrine kann die fehlende Lumineszenz des ITGB1 innerhalb des ITGB1-kd als interne Kontrolle für den Erfolg des *knockdowns* genutzt werden, die in **Abb. 6.22** bereits validiert wurde. Obwohl ein Integrin *switch* von ITGB1 auf ITGB3 bei Brustkrebs bekannt ist [385], wird hier eine vermehrte Proteinexpression bei Integrin β_4 (ITGB4) deutlich. ITGB4 ist besonders bei der Entwicklung des Brustgewebes von Bedeutung [106] und besitzt abweichend zu den anderen β -Integrinen einen deutlich längeren zytoplasmatischen Teil, der zusätzlich Kinasefunktionen aufweist [386] und darüber mit anderen RTKs wie EGFR wechselwirken kann [387, 388]. Zusätzlich erkennt das Heterodimer durch seine korrespondierende α_6 -Untereinheit das Basallaminaprotein Laminin als Bindungspartner und kann daher Zell-Zell-Kontakte aufbauen und als sogenanntes Hemidesmosom fungieren. Dies erklärt die deutliche Ausbildung von Zell-Agglomeraten der ITGB1-kd-Zellen. Außerdem steht ITGB4 in Wechselwirkung zu Vimentin, wodurch die Vimentin-Erhöhung in **Abb. 6.36** erklärt werden kann [389]. Diese Veränderung von ITGB4 kann im Western Blot verifiziert werden (**Abb. 6.41B**). Dabei zeigt sich im Falle von MDA-MB-231kd-Zellen ein signifikanter ($p=0,02$) Anstieg um das Dreifache. COL1 reduziert in dem Zusammenhang ITGB4 beider Zelllinien signifikant (MDA-MB-231 $p=0,0052$, MCF-7 $p=0,0418$), was erklärbar ist, da durch COL1 vermehrt Zell-Matrix- und weniger Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden. ITGB4 steht bislang trotz seiner intrinsischen Kinasefunktion nicht im Fokus der Forschung, allerdings gibt es erste Erkenntnisse, die in Zukunft, z.B. innerhalb immunbasierter Onkologie, weiter verfolgt werden sollten [386, 390].

In der begrenzten Auswahl der im Array getesteten α -Integrine wird eine Reduktion der Expression der meisten α -Integrine deutlich (**Abb. 6.42**). Lediglich im Falle von α_v (MCF-7kd) und α_5 (MDA-MB-231kd) war die Proteinexpression unverändert bzw. konnte eine leichte Steigerung festgestellt werden. Die α -Integrine α_3 und α_9 werden durch den ITGB1-kd in beiden Zelllinien herabreguliert, da ITGB1 der einzig mögliche Bindungspartner ist. Interessanterweise wird α_6 herabreguliert, obwohl der andere Bindungspartner ITGB4 als Gegenregulation verstärkt exprimiert wird.

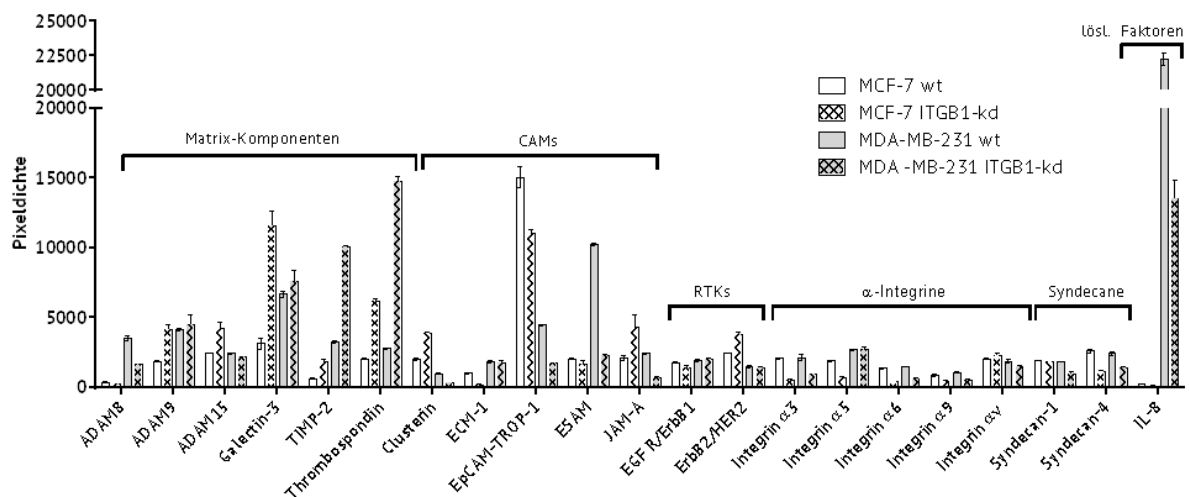


Abb. 6.42 Darstellung der Veränderung extrazellulärer Strukturen in Abhängigkeit des ITGB1, gemessen per Proteome Profiler array (n=1). Eine statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Stichprobe nicht möglich. Teile der Daten sind in Baltes *et al.* [333] publiziert.

Neben den Integrinen und RTKs werden durch den ITGB1-kd Veränderungen in matrixmodulierenden Strukturen sichtbar. Veränderungen in ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*) und TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinases 2*) weisen darauf hin, dass die Zellen ihre eigene EZM modulieren und sich somit auf veränderte Bindungsmöglichkeiten einstellen. ADAM9 kann direkt an ITGB1 binden und eine Endozytose dieser Integrinuntereinheit bewirken [391]. Von diesen Strukturen ist vor allem Galectin-3 zu nennen, welches als Lectin-Protein multifaktoriell die Adhäsion sowie Zell-Matrix-Kontakte vermittelt und in positivem Zusammenhang zur Entartung von Zellen, sowie der Genese von Fibrosen steht [392, 393].

Weiterhin wird Thrombospondin in beiden kd-Varianten hochreguliert. Als adhäsives Glykoprotein vermittelt es sowohl Zell-Zell-, sowie Zell-Matrix-Kontakte, ist gleichermaßen Bindungspartner für Integrine und außerdem in der Lage, MAP-Kinasen zu aktivieren. Dabei kann es als Tumorsuppressor oder als Onkogen wirken. So haben Said *et al.* dargelegt, dass Thrombospondin über den Rezeptor CD47 die DOX-induzierte Apoptose verhindern kann [335].

Ein besonderes Molekül stellt das Chaperon und Heat Shock-Molekül Clusterin dar, welches diverse Signalkaskaden wie NF- κ B, MAPK und AKT aktivieren kann [394, 395] und im *cross-talk* zu anderen anti-apoptotischen HSPs wie HSP27 steht [396]. Clusterin wird in MCF-7kd-

Zellen heraufreguliert, während es in der MDA-MB-231kd-Variante vermindert exprimiert wird.

Das ITGB1-assoziierte Adhäsionsmolekül EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) wird in MCF-7kd und MDA-MB-231kd herabreguliert [397]. *Knockout*-Experimente haben bestätigt, dass der Wegfall von EpCAM auch pFAK reduzieren kann. Dabei ist die Funktion von EpCAM aber abhängig vom EMT-Phänotyp, sodass die Funktion in MCF-7- (endothelial) und MDA-MB-231-Zellen (mesenchymal) variiert [398]. Zell-Zell-Kontakte werden neben dem Hemidesmosom ITGB4 über andere CAMs vermittelt, die teilweise auf die Signalkaskaden Einfluss nehmen. Im Falle von MDA-MB-231kd-Zellen werden diese jedoch fast ausschließlich herabreguliert, was besonders deutlich anhand von ESAM (*Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*) erkennbar ist. Lediglich ECM-1 bleibt in MDA-MB-231kd-Zellen von dem *knockdown* unbeeinflusst. Das Adhäsionsmolekül ESAM wiederum bleibt bei MCF-7kd-Zellen unbeeinflusst, die ECM-1 (*Extracellular matrix protein 1*) herabregulieren und JAM-A vermehrt exprimieren, welches neben der nicht so ausgeprägten ITGB4-Überexprimierung Zell-Zell-Kontakte verursacht.

Insgesamt kann aber vermutet werden, dass die durch den *knockdown* entstandenen Zell-Zell-Kontakte fast ausschließlich durch ITGB4 kompensiert werden, da kein anderes CAM die Funktion auf Basis der beobachteten Expressionen übernimmt.

Anhand der Expression des Chemokins Interleukin 8 (IL-8, CXCL8) kann demonstriert werden, dass eine Trennung zwischen CAM-DR und SFM-DR nur artifiziell ist. Der ITGB1-kd ist in der Lage, die sezernierte Menge von IL-8 deutlich zu reduzieren. IL-8 wird von MDA-MB-231-Zellen sezerniert, um über CXCR1 und CXCR2 verschiedenste Signalkaskaden bspw. MAP-Kinasen parakrin zu aktivieren [239] und per EMT den mesenchymalen und invasiven Phänotyp aufrecht zu halten [399]. Eine Reduktion dieses Botenstoffes könnte der Hinweis auf einen verstärkt epithelialen Phänotyp sein.

Die in diesem Array gefundenen Ergebnisse erklären zwar die im *knockdown* auftretenden Zell-Zell-Kontakte über die Expression von ITGB4, allerdings nicht die noch vorhandene COL1-Bindung vor allem von MDA-MB-231-Zellen (sofern sie nicht auf der Restaktivität der verbliebenen ITGB1-Rezeptoren basiert).

6.6.5. Rolle des Discoidin Domain Receptors 1 (DDR1)

Basierend auf der Literatur sind DDR1 bzw. DDR2 die wichtigsten COL1-Rezeptoren neben ITGB1, die sowohl adhäsive als auch Kinase-Funktionen vermitteln. In den ITGB1-*knockdown* Zellen könnte DDR1 die Bindung an COL1 übernehmen und den Verlust von ITGB1 somit kompensieren. Im Falle von Brustkrebs besitzt DDR1 teilweise widersprüchliche Funktionen [223], was in dieser Arbeit mit der Auswahl der luminalen Zelllinie MCF-7 und der TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 widerspiegelt wird. Die epithelialen MCF-7-Zellen exprimieren DDR1 deutlich, die mesenchymalen MDA-MB-231-Zellen nur gering [316]. Obwohl die Signalkaskaden von DDR1 noch nicht abschließend geklärt und für DDR2 fast unbekannt sind, wird eine Involvierung der MAP-Kinasen vermutet. Die Funktion als negativer Regulator der EMT wird für beiden Zelllinien gleichermaßen beschrieben [400].

Um die Rolle von DDR1 funktionell zu evaluieren, wurde der Inhibitor 7rh verwendet (**Abb. 6.43**), welcher selektiv die intrazelluläre ATP-Bindungsstelle von DDR1 blockiert und durch diese Interferenz anti-adhäsiv wirkt [401–403]. 7rh demonstriert dabei eine 15-fach höhere inhibitorische Wirkung an DDR1 (IC_{50} 6,8 nM) gegenüber DDR2 (IC_{50} 101,4 nM) [401].

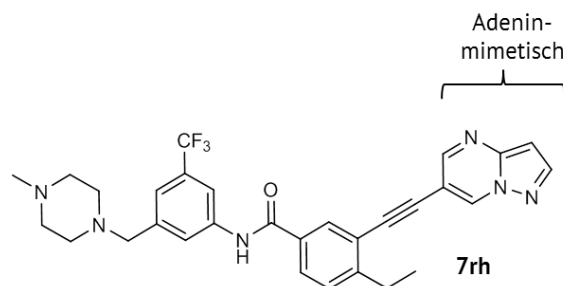


Abb. 6.43 Chemische Struktur des DDR1-Inhibitors 7rh, welcher über die hydrophobe adeninmimetische Struktur als Typ II Inhibitor die ATP-Bindungstasche der inaktiven DDR1-Konformation blockiert und darüber hinaus über einen Linker an eine allosterische Region bindet [403].

Zunächst wurde die Zytotoxizität von 7rh in beiden Zelllinien untersucht. MCF-7-Zellen weisen mit einem pEC_{50} von 5,325 (4,73 μ M) im Vergleich zu MDA-MB-231-Zellen mit einem pEC_{50} von 4,875 (13,34 μ M) eine signifikant ($p < 0,0001$) erhöhte Sensitivität gegenüber der Blockade von DDR1 auf (**Abb. 6.44A+B**). Dabei kann mit 7rh ein vollständiges Absterben der Zellen erreicht werden im Gegensatz zur Plateaubildung von SCH772984 und Trametinib. Beide ITGB1-kd-Varianten sind im Vergleich zu ihrer jeweiligen sc-Variante sensitiver

Ergebnisse und Diskussion

Signalkaskaden und Proteom unter COL1- und ITGB1-Modulation

gegenüber 7rh. Insbesondere bei MDA-MB-231-Zellen ist diese Sensitivierung signifikant ($pEC_{50}(sc) = 4,875$ ($13,34 \mu M$), $pEC_{50}(kd) = 5,123$ ($7,53 \mu M$), $p=0,0033$). Die erhöhte Sensitivität der kd Zellen gegenüber 7rh lässt den Schluss zu, dass ITGB1 funktionell durch DDR1 kompensiert wird.

In Anwesenheit von COL1 tolerieren die Zellen eine erhöhte Konzentration von 7rh. Wie bereits bei den Zytostatika und Kinase-Inhibitoren beobachtet, findet also eine Resistenzentwicklung in Anwesenheit von COL1 statt, die im *knockdown* ($pEC_{50} = 4,915$ ($12,16 \mu M$)) signifikant ist ($p=0,0075$).

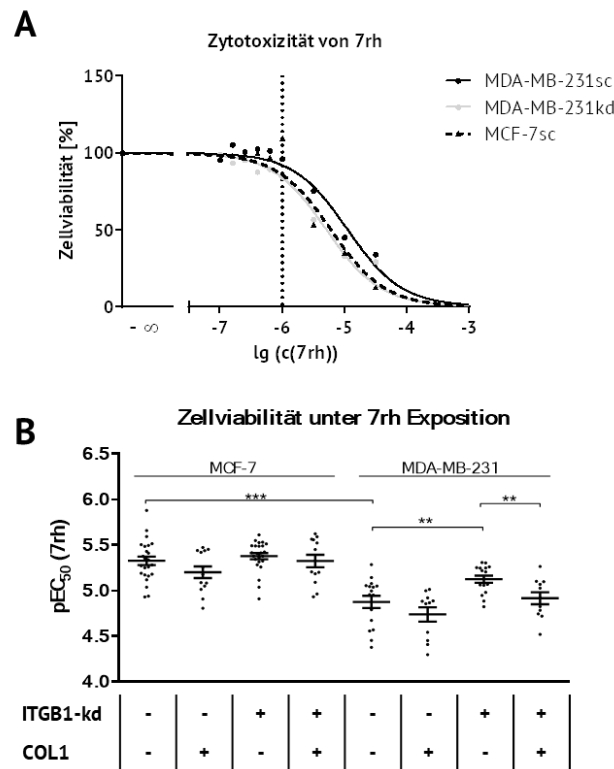


Abb. 6.44 Zytotoxizität von 7rh. **A)** Repräsentative Dosis-Effekt-Kurve einer MTT-Analytik zur Zytotoxizität von 7rh über 72 h. Markiert ist die einsetzende, subtoxische Konzentration von $1 \mu M$. **B)** Darstellung und statistische Analyse der MTT-Ergebnisse per ungepaartem t-Test ($n=\text{mind. } 10$). Teile dieser Messungen wurde von Julia Caspers in ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung erhoben [404]. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Um den Effekt der Inhibition von DDR1 auf die COL1-Adhäsion in Abhängigkeit des Integrinstatus zu untersuchen, wurde eine subtoxische Konzentration von $1 \mu M$ verwendet (**Abb. 6.45**). Die Adhäsion von MDA-MB-231-Zellen an COL1 wird durch den ITGB1-kd kaum reduziert (8%) und die DDR1-Blockade bei MDA-MB-231sc hat isoliert keinen Effekt (3%). Die Kombination aus reduziertem ITGB1 und einer DDR1-Hemmung führt jedoch zu einer

signifikanten (25%, $p=0,0002$) Reduktion der Adhäsion an COL1. Nach der Unabhängigkeitstheorie von Bliss kann hier von einer Synergie gesprochen werden.

MCF-7-Zellen zeigen im Falle der DDR1-Blockade eine leichte, aber signifikante (9%, $p=0,0015$) und beim ITGB1-kd eine deutliche Reduktion (33%, $p=0,0001$) der Adhäsion an COL1, die sich im Falle des ITGB1-kd auch morphologisch (**Abb. 6.23**) widerspiegelt. Eine Kombination aus beiden Inhibitionen kann aber die Wirkung des dominanten ITGB1-*knockdowns* nicht übertreffen. Die Daten unterstreichen deutlich die Rolle von DDR1 als Bindungspartner von COL1 im Wechselspiel mit ITGB1. Dies wird insbesondere bei den MCF-7sc- und den MDA-MB-231kd-Zellen unter dem Einfluss von 7rh deutlich. Dies steht im Einklang mit Lu *et al.*, die eine anti-adhäsive Wirkung von 7rh feststellen [402].

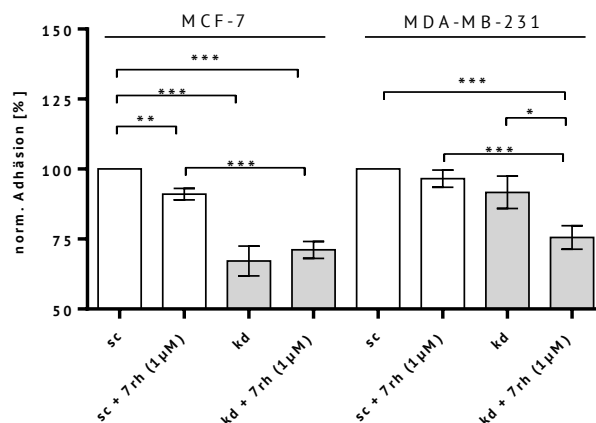


Abb. 6.45 Messung der Adhäsion an COL1 in Abhängigkeit von ITGB1 und DDR1 ($n=6$). Die Behandlungen wurden auf die sc-Variante der jeweiligen Zelllinie normalisiert. Teile dieser Messungen wurde von Julia Caspers im Rahmen ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung erhoben [404]. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Anhand des Adhäsionsverhaltens konnte insbesondere in MDA-MB-231kd-Zellen das Zusammenspiel von DDR1 und ITGB1 dargelegt werden. Konsequenterweise wurde als nächster Schritt dieser Sachverhalt auf Proteinebene durch Western Blot-Analytik von DDR1 und pDDR1(Y513) untersucht (**Abb. 6.46**). Die antagonisierende Wirkung von 7rh gegenüber der COL1-vermittelten Phosphorylierung von DDR1 konnte unabhängig von ITGB1-Status in beiden Zelllinien und in MCF-7kd experimentell bestätigt werden. Die Phosphorylierungsstelle Y513 ist nur in den aktiven DDR1-Splicing-Varianten b und c vorhanden, aber entscheidend für die Aktivierung von MAPK.

Ergebnisse und Diskussion

Signalkaskaden und Proteom unter COL1- und ITGB1-Modulation

Es wird deutlich, dass die DDR1-Grundexpression der epithelialen MCF-7-Zellen jene der mesenchymalen MDA-MB-231-Zellen deutlich übersteigt. Die DDR1-Rezeptoren der MCF-7-Zellen werden durch COL1 phosphoryliert. Dieser Effekt wird allerdings erst signifikant im ITGB1-*kd* deutlich. Die Inhibition durch 7rh in MCF-7sc-Zellen ist vorhanden, aber erst im *knockdown* wird die aktivierende Wirkung von COL1 komplett unterdrückt.

Obwohl MDA-MB-231-Zellen DDR1 in geringerem Maße als MCF-7-Zellen exprimieren, sind diese Zellen in der Lage DDR1 und pDDR1 in Anwesenheit von COL1 als Gegenregulation zum ITGB1-*kd* die Expression von DDR1 signifikant um das 3-4 fache zu erhöhen. Dieser Effekt von COL1 wurde bereits in Lungenfibroblasten beobachtet, bei denen COL1 über DDR2 eine MAPK-abhängige Expressionssteigerung von DDR1 induzierte [157]. MDA-MB-231-Zellen besitzen bspw. eine hohe Expression von DDR2 [405]. Diese DDR1-Regulation erklärt die Ergebnisse der Adhäsions- und Zytotoxizitätsmessungen, da die jeweils größten zytotoxischen und antiadhäsiven Effekte bei MCF-7sc- und MDA-MB-231kd-Zellen auftraten und somit mit der DDR1-Expression korreliert.

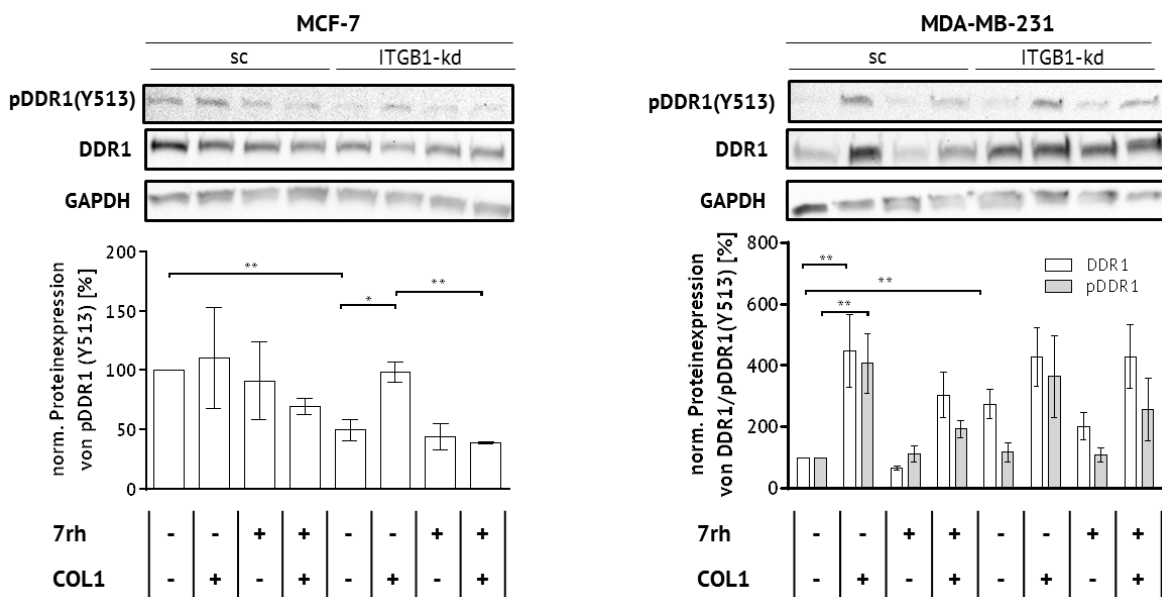


Abb. 6.46 Darstellung von DDR1 und pDDR1 (Y513) in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen in Anwesenheit von COL1, ITGB1 und 7rh (n = mind. 3). Teile dieser Messungen wurde von Julia Caspers im Rahmen ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung erhoben [404]. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Ongusaha *et al.* stellten fest, dass eine vermehrte Expression von DDR1 über p53 möglich ist [153]. Anhand des *Proteome Profiler Arrays* wurde eine verstärkte Phosphorylierung von MDA-

MB-231-Zellen (p53-Mutation) festgestellt, die hier zu einer Erhöhung der DDR1 Expression führen kann.

Da bereits die Involvierung der MAP-Kinasen durch COL1 und ITGB1 dargelegt wurde, wird im nächsten Schritt die Phosphorylierung von ERK1/2 unter DDR1-Inhibition untersucht (Abb. 6.47). Die Anwesenheit von COL1 sorgt bei MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen (vgl. Abb. 6.36) für eine Erhöhung von pERK1/2. Der aktivierende COL1-Effekt ist in beiden ITGB1kd-Zelllinien signifikanter ausgeprägt als in den sc-Kontrollzellen. Die DDR1-Inhibition mit 7rh hat bei MCF-7sc keinen Effekt, während die erhöhten pERK-Level von MCF-7kd in Gegenwart von COL1 durch 7rh fast vollständig antagonisiert werden können. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass durch Wegfall des ITGB1 die COL1-vermittelte Aktivierung von ERK nur noch von DDR1 abhängig ist.

MDA-MB-231-Zellen weisen hingegen eine gegenteilige Reaktion auf die 7rh-Exposition auf, bei der pERK phosphoryliert wird, was durch COL1 additiv verstärkt wird. Dies lässt einen *escape*- bzw. Kompensations-Mechanismus vermuten. Ähnliche Effekte unter 7rh wurde bei Lu *et al.* in nasopharyngealen Krebszellen CNE2 in Bezug auf pMEK, pAKT und pSrc beobachtet [402].

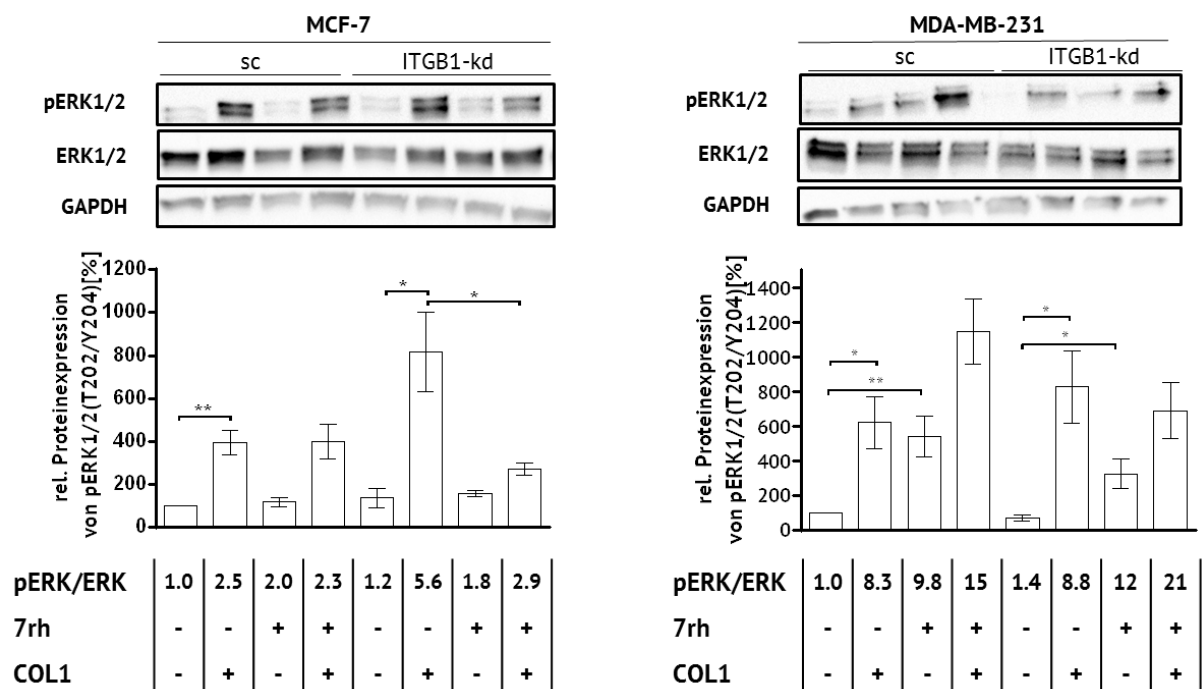


Abb. 6.47 Darstellung von ERK und pERK in Anwesenheit von COL1, ITGB1 und 7rh. Teile dieser Messungen wurde von Julia Caspers im Rahmen ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung erhoben [404]. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Ergebnisse und Diskussion

Signalkaskaden und Proteom unter COL1- und ITGB1-Modulation

Die Inhibition von ERK1/2 mittels SCH772984 kann CREB als nachgeschalteten Transkriptionsfaktor nicht vollständig inhibieren (vgl. **Abb. 6.36**). Daher soll die direkte Abhängigkeit von DDR1 untersucht werden (**Abb. 6.48**).

Beide Zelllinien erhöhen bei COL1-Stimulierung pCREB, welches sich im Falle von MCF-7sc durch 7rh antagonisieren lässt. Die ITGB1-defizitären Varianten der Zelllinien demonstrieren keine Heraufregulierung, die der *Proteome Profiler Array* vermuten ließ (**Abb. 6.29**). CREB lässt sich in den MCF-7kd-Zellen nicht mehr durch COL1 aktivieren. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivierung in MCF-7sc-Zellen vollständig über ITGB1 induziert wird. Andererseits kann die COL1-induzierte pCREB-Aktivierung in MCF-7sc signifikant und in MCF-7kd-Zellen das Basalniveau deutlich durch 7rh reduziert werden, sodass die Vermutung naheliegt, dass DDR1 schon an der Aktivierung bzw. Phosphorylierung von CREB beteiligt ist.

In MDA-MB-231kd-Zellen wird CREB weiterhin in Anwesenheit von COL1 phosphoryliert, das im Gegensatz zur sc-Variante durch 7rh antagonisiert werden kann. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die CREB-Aktivierung dieser Zelllinie sowohl über ITGB1 als auch über DDR1 möglich ist. In MDA-MB-231sc-Zellen wird CREB über ITGB1 aktiviert, während sich pCREB im *knockdown* nach einem Wechsel zu DDR1 durch 7rh inhibieren lässt. Eine Inhibition von DDR1 durch 7rh in MDA-MB-231kd-Zellen kann die CREB-Phosphorylierung verhindern.

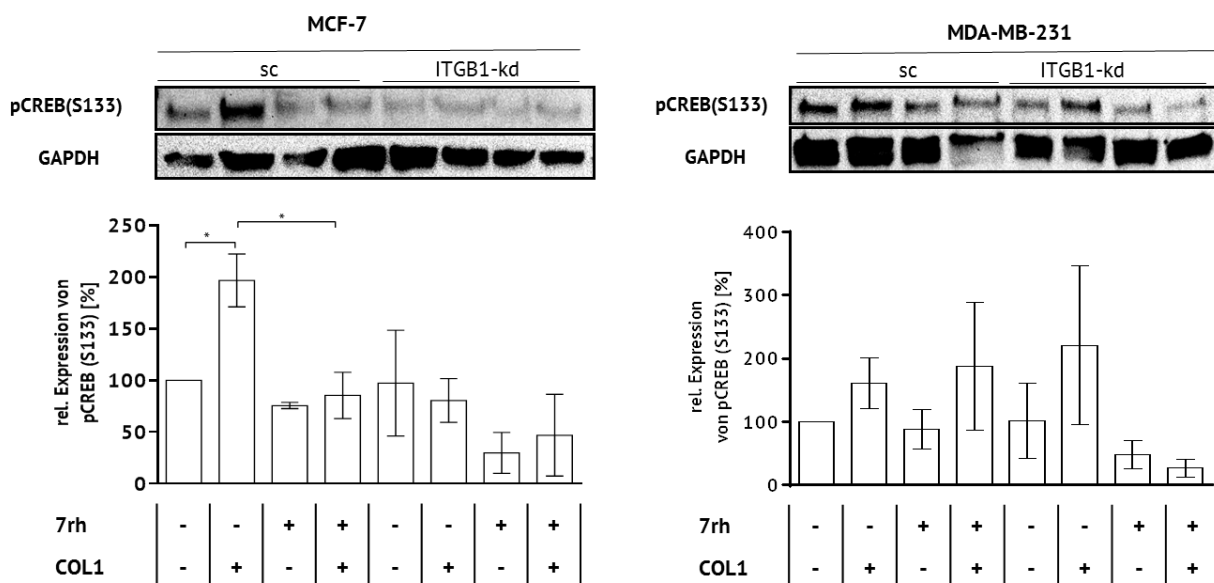


Abb. 6.48 Darstellung von pCREB (Ser133) in MCF-7 und MDA-MB-231-Zellen in Anwesenheit von COL1, ITGB1 und 7rh. Teile dieser Messungen wurde von Julia Caspers im Rahmen ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung erhoben [404].

6.6.6. Rolle des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR)

Die Phosphorylierung von RTKs kann grundsätzlich über zwei verschiedene Wege erfolgen. Einerseits kann ein externer Stimulus in Form eines Wachstumsfaktors wie z.B. EGF die RTK aktivieren. Andererseits besteht durch den *cross-talk* zu anderen Rezeptoren die Möglichkeit über diese direkt phosphoryliert zu werden, z.B. durch Homodimerisierung miteinander, oder durch Heterodimerisierung mit Integrinen per ILK. In den Ergebnissen des *Proteome Profiler Arrays* wurde diskutiert, dass die Aktivität der MAP-Kinasen durch den ITGB1-*knockdown* in beiden Zelllinien erhöht ist. Die MAP-Kinasen werden besonders von RTKs wie EGFR aktiviert, deren Phosphorylierungen im Proteom von MDA-MB-231kd-Zellen erhöht waren.

Die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot konnte bestätigen, dass der ITGB1-*knockdown* zu einer erhöhten Phosphorylierung von EGFR in MCF-7 und MDA-MB-231 führt (**Abb. 6.49A+B**). MDA-MB-231-Zellen steigern pEGFR sogar signifikant ($p=0,014$) auf 800%. MCF-7-Zellen, die nur eine sehr niedrige Grundexpression von EGFR aufweisen, weisen eine leicht erhöhte Phosphorylierung im *knockdown* auf. Dies ist erklärbar durch den Wegfall von FAK im *knockdown*, da FAK als Suppressor für das RTK-MAPK *signaling* fungieren kann [191].

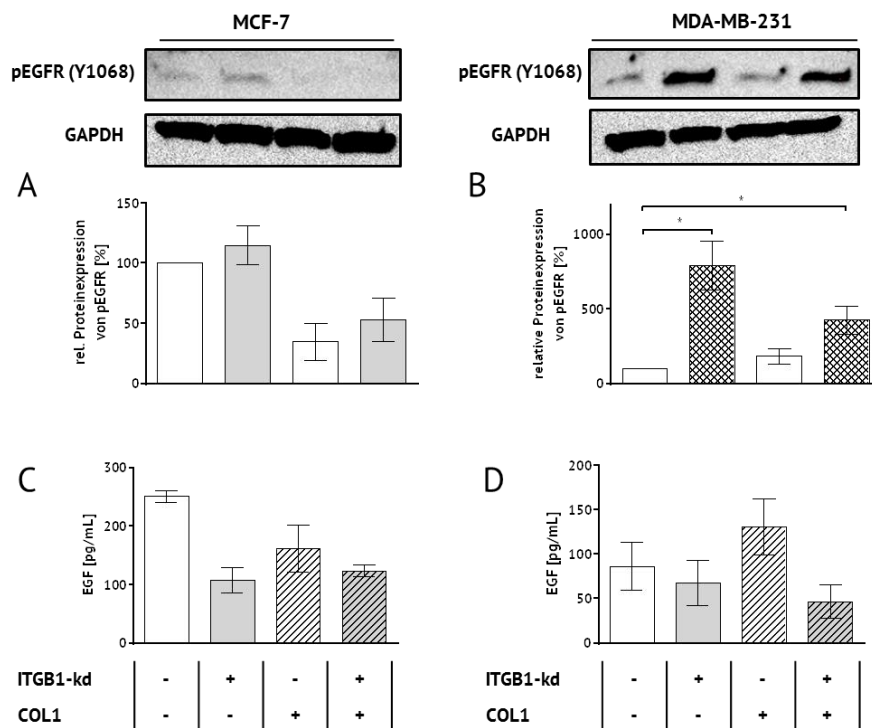


Abb. 6.49 Regulation des EGFR in Gegenwart von COL1 und im ITGB1-*knockdown*. (**A, B**) Repräsentative Western Blot Analyse von pEGFR (Y1068) in Abhängigkeit von COL1 und ITGB1. (**C, D**) Quantifizierung von sezernierter EGF im Zellüberstand mittels ELISA. Die Daten der Unterabbildungen A und B sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Die Anwesenheit von COL1 aktiviert EGFR nur im Falle der MDA-MB-231-Zellen. Diese ist zwar nicht signifikant, aber dennoch mit einer Erhöhung um 87% relativ stark ausgeprägt. Die Anwesenheit von COL1 in MCF-7-Zellen führt zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung, aber auch in MDA-MB-231kd-Zellen bewirkt COL1 eine leichte Reduktion der *ITGB1-kd*-vermittelten Erhöhung von pEGFR (Y1068). Diese Phosphorylierungsstelle ist zentral für Signalkaskaden, da über das Adaptermolekül GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) die MAP-Kinasen und über PI3K AKT aktiviert werden kann.

Um den Mechanismus dieser Aktivierung und den Einfluss von Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurde mittels ELISA die EGF-Konzentration des Zellüberstands bei annähernd gleicher Zellkonfluenz gemessen (**Abb. 6.49C+D**). MCF-7-Zellen setzen durch die Anwesenheit von COL1, sowie den ITGB1-kd nur vermindert EGF frei. Eine vermehrte Aktivierung über EGF ist also ausgeschlossen. Auch MDA-MB-231 Zellen sezernieren EGF durch den ITGB1-*knockdown* vermindert. Die Anwesenheit von COL1 bei normaler ITGB1-Funktion führt jedoch zu einer Erhöhung der EGF-Sezernierung, die damit die verstärkte EGFR-Phosphorylierung und MAPK-Aktivierung bei Anwesenheit von COL1 erklären kann.

Da die Korrelation zwischen EGF-Konzentration und pEGFR-Expression nur den Einfluss von COL1 auf MDA-MB-231 Zellen erklärt, muss der Einfluss des *knockdowns* über die intrazelluläre Phosphorylierung durch andere Kinasen/Rezeptoren erfolgen. Hier bietet sich bspw. ITGB4 als einziges Integrin mit Kinasefunktion als mögliche Ursache an, von dem eine deutliche Expressionssteigerung nachgewiesen wurde. Alternativ könnte auch DDR1 eine Wechselwirkung mit der RTK EGFR eingehen.

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Unterscheidung zwischen CAM-DR und SFM-DR nicht das empfindliche zelluläre Gleichgewicht widerspiegelt, da die Adhäsion von Zellen an EZM-Proteine in der Lage ist, die Produktion von löslichen Faktoren wie EGF zu begünstigen. Es sollte vielmehr die Definition der EM-DR verwendet werden, um die Komplexität dieses Phänomens besser abzubilden, da beide Prozesse offenbar parallel ablaufen können und eine Abgrenzung nicht vollständig möglich ist.

Eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung von pEGFR konnte innerhalb dieser Arbeit deutlich sowohl im ITGB1-kd und als durch COL1-Inkubation bei der TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 nachgewiesen werden. Um diese Phosphorylierung zu verhindern, wird der

EGFR-Inhibitor Gefitinib (**Abb. 6.50**) verwendet und es wurde die Viabilität der unterschiedlichen Zellen und Zellklone untersucht.

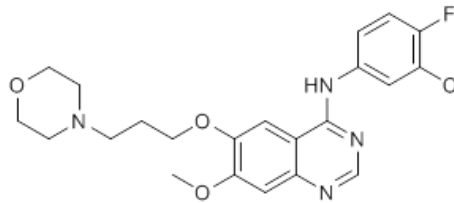


Abb. 6.50 Strukturformel von Gefitinib.

MDA-MB-231-Zellen reagieren sowohl in Gegenwart von COL1 und *knockdown* sensitiver gegenüber Gefitinib (**Abb. 6.51**). Die MDA-MB-231kd Zellen sind sogar um 50% signifikant sensitiver gegenüber der Inhibition durch Gefitinib ($EC_{50}(sc) = 47,1 \mu M$ zu $EC_{50}(kd) = 23,4 \mu M$). Dies passt zu Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, bei denen eine Sensitivierung Gefitinib-resistenter NSCLC durch Inhibition oder *knockout* von ITGB1 erreicht wurde [184, 285]. Einen ähnlichen Effekt konnten *Hou et al.* in CRISPR ITGB1-*knockout* Zellen mittels des EGFR-Inhibitors AG1478 darstellen [355].

MCF-7-Zellen weisen keinerlei Unterschied in einer Gefitinib-Behandlung bzgl. ITGB1kd oder Anwesenheit von COL1 auf (**Abb. 6.70D**). Obwohl MDA-MB-231-Zellen in Gegenwart von COL1 sensitiver sind, konnte in anderen Studien dargelegt werden, dass COL1 zu TKI-resistenten EGFR-Mutanten in Lungenadenokarzinomen führte [406].

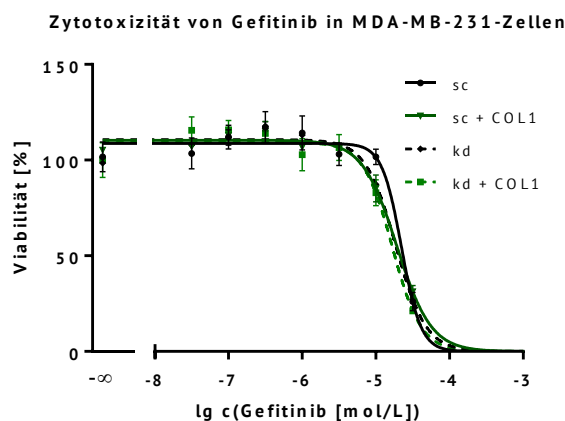


Abb. 6.51 Repräsentative Zytotoxizitätskurven des EGFR-Inhibitors Gefitinib in MDA-MB-231-Zellen.

6.7. Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

6.7.1. Screening von Kinaseinhibitoren für einen Kombinationsansatz

Kombinationstherapien sind der Schlüssel zu neuen Therapieoptionen und dem Umgehen von Resistenzen. Dabei sind echte Synergien selten und oft von weiteren Bedingungen abhängig. [407–409].

Um die Auswirkungen der betrachteten Deregulationen auf Ebene der Signalkaskaden auf die Sensitivität beider Zelllinien und damit potentiell als Kombinationsansatz zu untersuchen, wurden diese mit den klassischen Zytostatika CDDP, DOX und MX in Abhängigkeit von Inhibitoren der RAF-MEK-ERK oder PI3K-AKT-mTOR Signalkaskaden inkubiert. Insbesondere PI3K-AKT ist bekannt für Zellüberleben und daher ein folgerichtiges Target.

In ersten mechanistischen Studien zur Sensitivität von MCF-7-Zellen gegenüber klassischen Zytostatika wurde experimentell bestätigt, dass die MCF-7-Zellen sensitiv auf Inhibition der fokalen Adhäsionskinase (FAK) über den Inhibitor FAK14 reagieren (**Abb. 6.52**) und damit die Involvierung von Integrin-vermittelten Resistenzen bestätigt. Die Effektivität von CDDP und MX konnte in MCF-7-Zellen bei gleichzeitiger Inhibition von FAK leicht gesteigert werden. Dabei konnte die Anwesenheit von COL1 die Effektivität der FAK-Inhibition abschwächen. Interessanterweise konnte die Inhibition der anderen Integrin-vermittelten Kinase (ILK) mittels des Inhibitors cpd22 keine Sensitivierung in Kombination mit klassischen Zytostatika hervorrufen, weder in MCF-7-, noch in MDA-MB-231-Zellen.

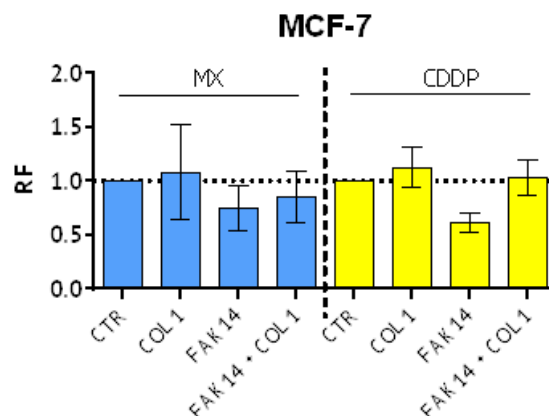


Abb. 6.52 Inhibition der fokalen Adhäsionskinase durch den Inhibitor FAK14 in MCF-7-Zellen in Abhängigkeit der Inkubation mit COL1. Dargestellt sind die Resistenzfaktoren (modifiziert nach Jakubzig, Baltés *et al.* [410]).

Bislang wurde für die MCF-7wt-Zellen eine vermehrte PI3K/AKT-Aktivität diskutiert, sowie ein *switch* zur MAPK-Signalkaskade durch den ITGB1 *knockdown* postuliert. Auf Basis dieses Postulats sollen die Sensitivitäten mittels Koinkubation der Inhibitoren U0126 (MEK), SCH772984 (ERK1/2), 666-15 (CREB) und BEZ235 (PI3K) untersucht werden (**Abb. 6.53**). Dabei reagieren die ITGB-kd Zellen sensitiver auf die Zytostatika bei Koinkubation mit den MAPK-Inhibitoren U0126 und SCH772984.

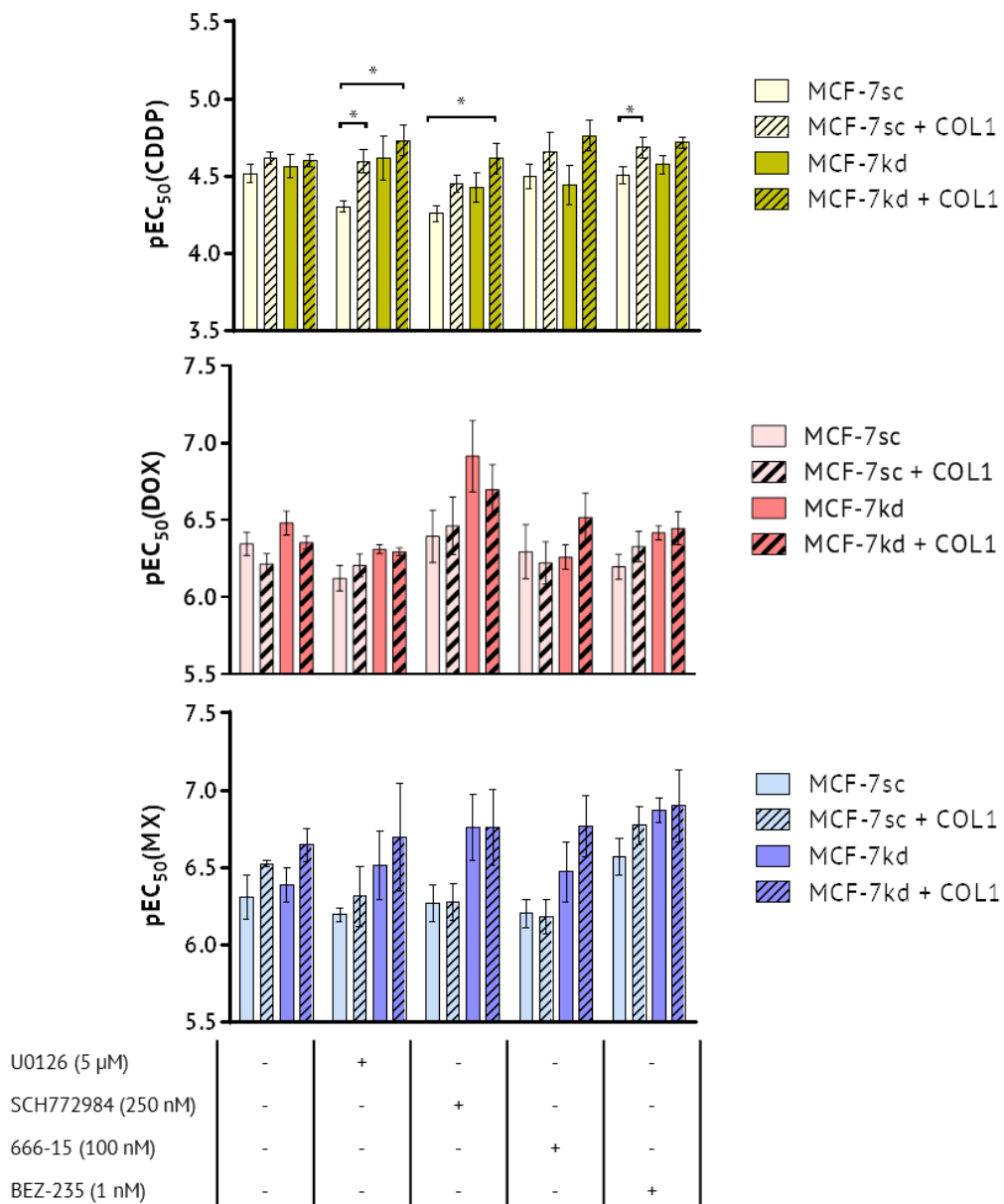


Abb. 6.53 Screening verschiedener Inhibitoren auf einen chemosensitivierenden Effekt bzgl. der Wirkung klassischer Zytostatika in MCF-7-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und ITGB1-*knockdown*. Darstellung von pEC_{50} -Werten von MTTs zur Berechnung der Zellviabilität von MCF-7 in Abhängigkeit der Inhibitoren U0126, SCH772984, 666-15 und BEZ-235. Die Daten zu CDDP und MX bei den Kontrollen, U0126, SCH772984 und 666-15 wurden in der Publikation von Jakubzig, Baltes *et al.* [410] in Form von normalisierten Resistenzfaktoren publiziert und Herrn Bastian Jakubzig innerhalb seiner Dissertation [321] zur Verfügung gestellt (n= 3).

Der MEK-Inhibitor U0126 kann die Wirksamkeit von CDDP, DOX und MX erhöhen. Insbesondere bei MX wird dieser Effekt bei ITGB1-kd deutlich. Der ERK-Inhibitor SCH772984 sorgt bei DOX für eine Sensitivierung in allen Proben. Der Effekt ist beim ITGB1-*knockdown* am deutlichsten. Bei CDDP werden MAP-Kinasen mit CDDP-Resistenz diskutiert [411].

Wenngleich durch die Inhibitoren in MCF-7sc-Zellen ein niedrigerer pEC₅₀-Wert auftritt, also rein rechnerisch eine Resistenzentwicklung durch einen Inhibitor stattfindet, wird im direkten Vergleich zu COL1 oder zur kd-Variante deutlich, dass beide Modifikationen durch eine Inhibition der MAPK- oder PI3K-Signalkaskade deutlich sensitiviert werden. Dabei stellt die Gegenwart von COL1 den physiologischen Zustand dar, weshalb die Resistenzentwicklung in den sc-Zellen ohne COL1 vernachlässigbar ist. Besonders im Fall von CDDP zeigen sich die teilweise signifikanten Unterschiede der Wirksamkeit der Koinkubation des Inhibitors durch COL1 oder ITGB1-kd. Dieser Unterschied wird noch deutlicher, wenn man die geringe Varianz in den pEC₅₀ Werten ohne Inhibitor betrachtet.

Der CREB-Inhibitor 666-15 erzeugt gegenüber DOX und MX eine Sensitivierung im *knockdown*, der mit COL1 stimuliert wird bzw. bei MX schon im *knockdown* ohne COL1. Die Ergebnisse spiegeln die deutlichere Beeinflussbarkeit des MAPK Signalweges im ITGB1-kd *Signaling* wider. Die Sensitivierung von DOX und MX wird erst im *knockdown* zugänglich. Allerdings kann unter der Betrachtung der Ergebnisse von BEZ235 nicht von einem *switch* gesprochen werden. Es ist deutlich, dass die Inhibition der PI3K durch BEZ235 in MCF-7sc- und in MCF-7kd-Zellen eine Sensitivierung bewirkt. Daher sollte hier von einer *Signaling*-Aufweitung gesprochen werden.

Insgesamt sind die Sensitivierungen der MCF-7-Zellen eher moderat. Die vorangegangenen Ergebnisse belegen darüber hinaus, dass die COL1-vermittelte Resistenz vor allem in TNBC wie MDA-MB-231-Zellen stattfindet (**Abb. 6.3**). Für diese Art des Brustkrebses fehlen bislang Zielstrukturen und Therapieoptionen neben den klassischen Zytostatika. MCF-7 stellt die ER-positive, luminal A Variante des Brustkrebses dar, die neben Chirurgie primär über endokrine Therapie (Tamoxifen, Anastrozol) effektiv behandelt werden kann. Eine Optimierung der klassischen Chemotherapie wäre klinisch nicht nötig und soll hier nur Zwecks mechanistischer Aufklärung durchgeführt werden. In den nächsten Teilen wird sich daher besonders auf die TNBC Zelllinie MDA-MB-231 konzentriert.

Bevor Sensitivierungsstrategien am Zellsystem MDA-MB-231 Wildtyp und ITGB1-*knockdown* in Abhängigkeit von COL1 getestet wurden, wurde ein *MAPK Proteome Profiler Array* durchgeführt (Abb. 6.54), um die zellulären Reaktionen auf die Zytostatika-Einwirkung zu analysieren. Als Proben wurden dafür MDA-MB-231wt Zellen in Gegenwart von COL1 sowie zusätzlich zu COL1 mit den jeweiligen EC_{50} -Werten der drei Zytostatika CDDP, DOX und MX inkubiert.

Auch dieser Array bestätigt, dass AKT keine Rolle in der matrixvermittelten Chemoresistenz bei MDA-MB-231-Zellen spielt und identifiziert ERK1 und ERK2 neben CREB und p53 als dominante Strukturen innerhalb der MAP-Kinasen, deren Aktivität bei der Exposition der Zytostatika nochmals gesteigert wird. Interessanterweise scheint DOX keine Steigerung von pERK zu bewirken, allerdings eine umso deutlichere Aktivierung von p53.

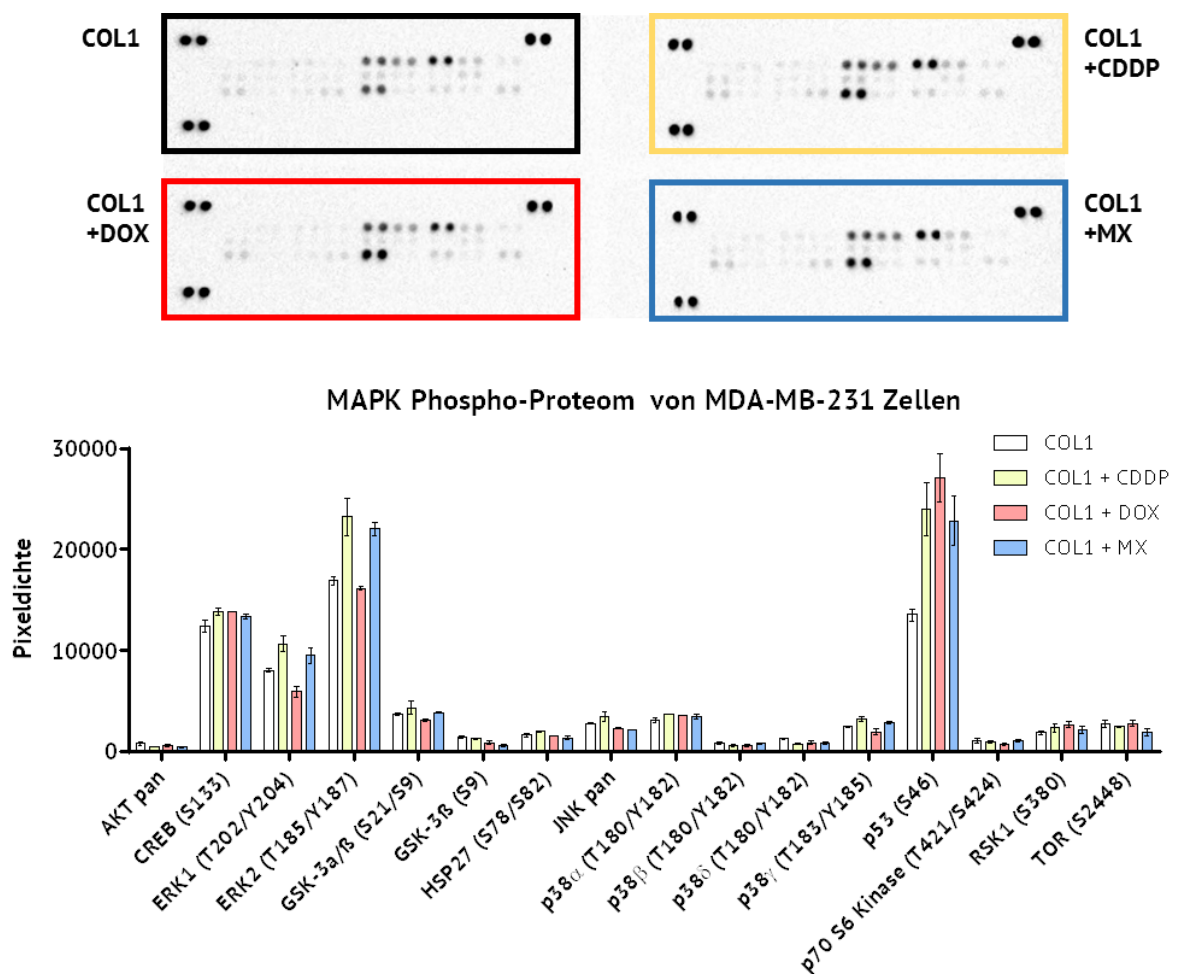


Abb. 6.54 MAPK-Proteome Profiler Array nach Inkubation der MDA-MB-231-Zellen mit COL1 und einer EC_{50} der Zytostatika CDDP, DOX und MX. Eine statistische Auswertung ist aufgrund des Probenumfangs ($n=2$) nicht möglich.

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

Aufgrund der Verzögerung der Etablierung der *kd*-Variante von MDA-MB-231-Zellen wurde ein erstes Screening bezüglich der Kinase-Inhibitoren für diese Zelllinie zunächst ohne den *ITGB*-*knockdown* in den wt-Zellen in Abhängigkeit von COL1 durchgeführt (**Abb. 6.55**).

Die direkte Inhibition der FAK sowie PI3K erzeugt keinen chemosensitivierenden Effekt in Kombination mit CDDP, DOX und MX innerhalb der Zelllinie MDA-MB-231. Als chemosensitivierend konnte der Einfluss des MEK-Inhibitors U0126 auf alle Zytostatika und des ERK-Inhibitors SCH772984 auf DOX und MX identifiziert werden. Eine CREB-Inhibition per 666-15 führt nur in Kombination mit DOX zu einer Sensitivierung.

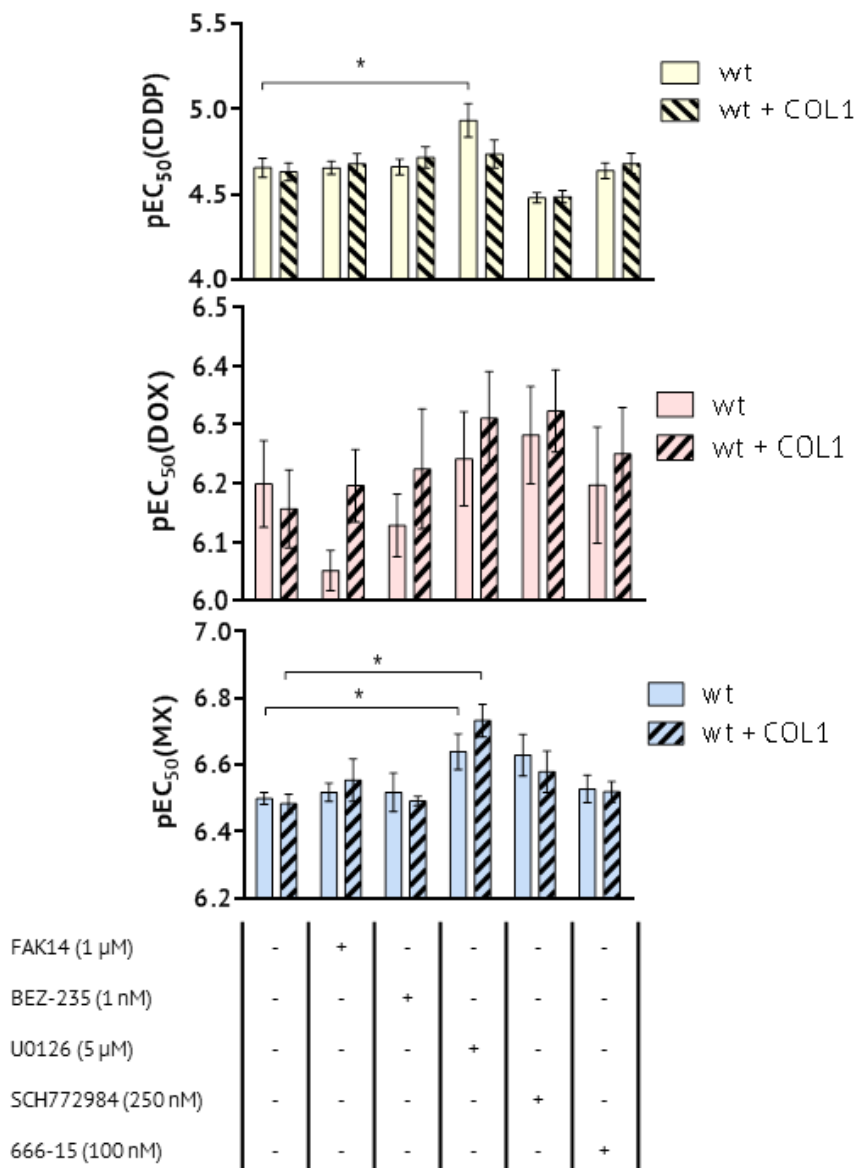


Abb. 6.55 Screening verschiedener Inhibitoren auf einen chemosensitivierenden Effekt bzgl. der Wirkung klassischer Zytostatika in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1. Dargestellt sind die pEC_{50} -Werte der Zytostatika CDDP, DOX und MX in Abhängigkeit verschiedener Inhibitoren ($n = \text{mind. } 4$).

6.7.2. MAPK-Inhibition zur Chemosensitivierung

MDA-MB-231-Zellen weisen bereits im Wildtyp eine verstärkte MAPK-Aktivität auf. Diese Signale werden durch verschiedenste Gegenregulationsmechanismen bei einem *knockdown* von ITGB1 gesteigert. Bei den folgenden Untersuchungen werden im Gegensatz zur Einpunktmessung einer subtoxischen Konzentration aus dem Screening aus **Abb. 6.55** verschiedene Konzentrationen der Inhibitoren in Abhängigkeit von COL1 und des ITGB1 verwendet, um u.a. Einblicke in den molekularen Mechanismus bzw. Synergien zu erhalten.

Die Inhibitoren können dabei verschiedenste *off-target* Effekte z.B. auf strukturell ähnliche Kinasen ausüben. Darüber hinaus können die *small molecules* von ABC-Transportern als Substrate erkannt werden. Dabei können diese Substrate die Wirkung der ABC-Transporter bei der Detoxifizierung der Zytostatika verringern, indem sie die Transporter entweder allosterisch blockieren oder die Effluxkapazität auslasten, indem sie selbst als Substrat transportiert werden. Um daher einerseits die Wirkung der Signalinhibition isoliert zu betrachten, andererseits eine Konzentrationsabhängigkeit aufzuklären, muss zunächst die intrinsische ABC-Transporter-Inhibitionswirkung der jeweiligen Moleküle bestimmt werden. Dazu wurden die etablierten Testsysteme Calcein AM in A2780adr-Zellen (**Abb. 6.56**) und Pheophorbid A in MDCKBCRP-Zellen (**Abb. 6.57**) zurückgegriffen.

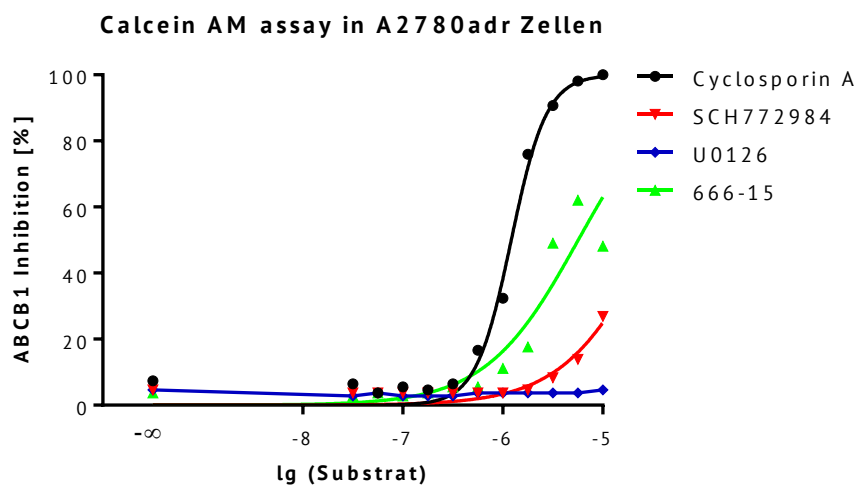


Abb. 6.56 Messung des inhibitorischen Potentials der verwendeten MAPK- und *downstream*-Inhibitoren auf die Transportproteine ABCB1 und ABCC1. Dargestellt sind repräsentative Kurven (n=3).

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

Mit Ausnahme des CREB-Inhibitors 666-15 ($IC_{50} = 5,6 \mu\text{M}$) weisen die eingesetzten Inhibitoren nur eine geringe oder vernachlässigbare Wirkung gegenüber ABCB1 und ABCC1 auf (**Abb. 6.56**). Der ERK-Inhibitor SCH772984 demonstriert bis $1 \mu\text{M}$ keine inhibitorische Aktivität, und bei $10 \mu\text{M}$ bis zu 27% der maximalen Inhibition. Der MEK-Inhibitor U0126 führt sogar bis einschließlich $10 \mu\text{M}$ zu keiner Blockade der ABC-Transporter. Da in diesem Versuch die Zelllinie A2780adr verwendet wurde, konnte Cyclosporin A ($IC_{50} = 1,22 \mu\text{M}$) als Standard verwendet werden, da es hier im Gegensatz zu MCF-7- oder MDA-MB-231-Zellen keine toxischen Effekte entfaltet.

Die Wirkung auf den Transporter ABCG2 ist dagegen deutlich ausgeprägter (**Abb. 5.57**). Hier lässt sich nur bei ERK-Inhibitor SCH772984 eine inhibitorische Wirkung bis $1 \mu\text{M}$ ausschließen, und auch bei $10 \mu\text{M}$ ist die Hemmung nur gering (10%). MEK-Inhibitor U0126 ($IC_{50} = 6,42 \mu\text{M}$) und CREB-Inhibitor 666-15 ($IC_{50} = 5,81 \mu\text{M}$) demonstrieren bis $1 \mu\text{M}$ keine Inhibition. Darüber hinaus steigt die ABC-Transporter-Inhibition steil an. Daher muss die ABCG2-Inhibition bei der Interpretation von Effekten mitbedacht werden. In dem ABCG2-Testsystem wurde Ko143 ($IC_{50} = 194 \text{ nM}$) als Referenz-Inhibitor verwendet.

In der klinischen Praxis ist es letztlich unerheblich, ob die Sensitivierung von Tumorzellen durch eine Hemmung der ABC-Transporter oder des *Signalings* erreicht wird. Dennoch muss im Zuge dieser Arbeit die Unterscheidung getroffen werden. Wichtig ist bei der Betrachtung der MAPK- und *downstream*-Inhibitoren, dass bei U0126 und 666-15 eine Hemmung bis $1 \mu\text{M}$ weitestgehend (<10%) und bei SCH772984 sicher ausgeschlossen werden kann.

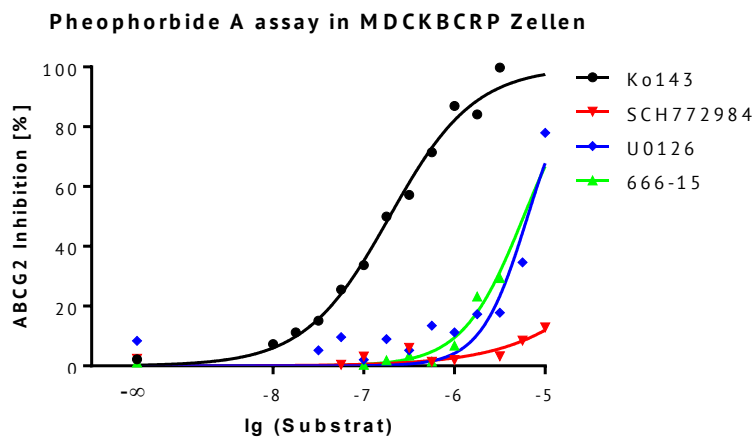


Abb. 6.57 Messung des inhibitorischen Potentials der verwendeten MAPK- und *downstream*-Inhibitoren auf ABCG2. Als Standard zur Normalisierung wurde Ko143 verwendet. Dargestellt sind repräsentative Kurven (n=3). Die Inhibitionskurve von SCH772984 ist publiziert in Baltes *et al.* [351].

Um den Einfluss der MAP-Kinasen auf die Resistenzmechanismen zu untersuchen, wurde zunächst ERK1/2 als zentrales Molekül der MAPK-Signalkaskade inhibiert. Dazu wurde der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 verwendet, dessen inhibitorisches Potential auf Proteinebene in **Abb. 6.36** bereits bestätigt wurde. SCH772984 weist bis zu der hier maximal eingesetzten Konzentration von 1 µM keine inhibitorische Wirkung auf die ABC-Transporter auf.

Im *Screening* sensitivierte SCH772984 die Zellen gegenüber DOX und MX, aber nicht CDDP. Zunächst wurde also die Kombination von DOX und SCH772984 untersucht. Obwohl nur eine geringe Resistenz durch COL1 in den sc-Zellen detektierbar war, konnte eine Sensitivierung durch die Koinkubation mit SCH772984 erzeugt werden (RF= 0,75) **Abb. 6.58, Tab. 6.5**). Allerdings impliziert der Resistenzfaktor bei einer Zugabe von 1 µM einen höheren Wert bei Anwesenheit von COL1 (RF=0,9) als bei Abwesenheit von COL1, sodass hier auch eine Resistenz gegen den ERK-Inhibitor stattfindet.

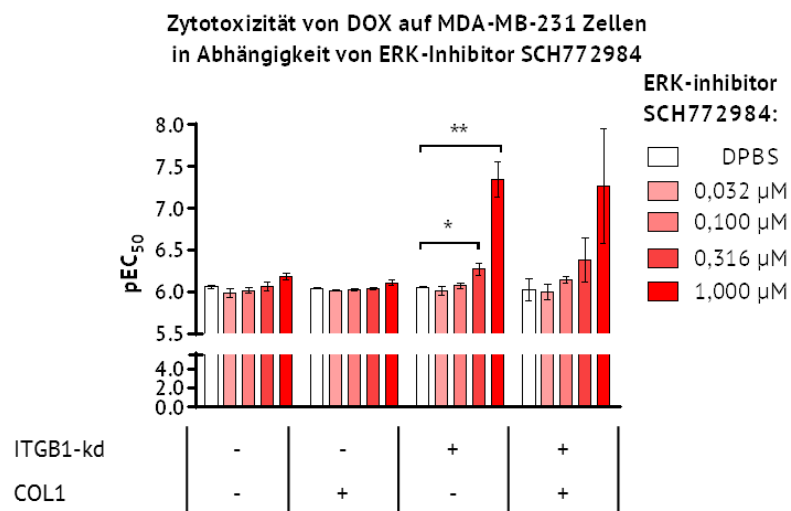


Abb. 6.58 Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination aus Doxorubicin mit SCH772984 in MDA-MB-231. Dargestellt ist die Übersicht der pEC₅₀-Mittelwerte der Zytotoxizität von DOX in Abhängigkeit verschiedenen Konzentrationen von ERK-Inhibitor SCH772984 (n=3, t-Test).

Tab. 6.5 Tabellarische Übersicht der in **Abb. 6.58** dargestellten Messergebnisse in Form der EC₅₀-Werte und des RFs. Auf die Darstellung der Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet. Diese ist allerdings in **Abb. 6.58** als Fehlerbalken zu erkennen.

MDA-MB-231 DOX	SCH772984									
	PBS		0,0316 µM		0,1 µM		0,316 µM		1,000 µM	
	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF
sc	0,872	1,00	1,042	1,20	0,966	1,11	0,868	1,00	0,657	0,75
sc + COL1	0,915	1,05	0,968	1,11	0,946	1,09	0,919	1,05	0,782	0,90
kd	0,890	1,02	0,983	1,13	0,854	0,98	0,538	0,62	0,045	0,05
kd + COL1	0,956	1,10	0,998	1,14	0,719	0,83	0,421	0,48	0,054	0,06

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

Während SCH772984 in den sc-Kontrollzellen ausschließlich subtoxisch wirkt, muss bei der Beurteilung der Ergebnisse der kd-Zelllinien beachtet werden, dass ab der Konzentration von 0,316 μM bereits toxische Nebeneffekte auftreten können (vgl. **Abb. 6.32**). Eventuelle Probleme der Vergleichbarkeit werden über die Normalisierung auf den PBS-100%-Wert ausgeglichen. Vor allem die pEC_{50} -Werte in den kd-Zellen sind bereits ab einer Konzentration von 0,316 μM , bei der SCH772984 apoptotische Vorgänge durch ERK-Inhibition begünstigt, deutlich erhöht. Sie beschreiben damit eine deutliche Sensitivierung, was an den sehr geringen Resistenzfaktoren illustriert ist (**Tab. 6.5**). Da diese Toxizität aber auf der Manipulation des ITGB1 und Inhibition von pERK basiert, kann sie hier als synergistischer Effekt angenommen werden, die sich auch zum Teil durch den Kombinationsindex nach Chou-Talalay bestätigten lassen (**Abb. 6.60**). Die meisten Kombinationsindices lassen sich aber in der Region von 1 verordnen, sodass je nach Kombination auch mit additiven Effekten zu rechnen ist.

Im Folgenden wurden die Kombinationen von SCH77982 und Mitoxantron untersucht. Hier erfolgt eine deutliche Resistenzentwicklung bei Inkubation mit COL1 (RF = 1,47) und im *knockdown* (RF=1,35). Ab 0,1 μM SCH772984 wird dieser Effekt allerdings schon komplett revidiert und bei 0,316 μM und 1 μM findet bereits eine deutliche Sensitivierung, insbesondere im *knockdown* in Anwesenheit von COL1 statt (RF=0,20). Insbesondere in den sc-Zellen, bei denen SCH772984 in den Konzentrationen von 0,316 μM und 1 μM keine Toxizität aufweist.

Tab. 6.6 Tabellarische Übersicht der in **Abb. 6.59** dargestellten Messergebnisse in Form der EC_{50} und des RFs (n=3). Auf die Darstellung der Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet. Diese ist allerdings in **Abb. 6.59** als Fehlerbalken zu erkennen.

MDA-MB-231 MX	SCH772984									
	PBS		0,0316 μM		0,1 μM		0,316 μM		1,000 μM	
	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF
sc	0,369	1,00	0,383	1,04	0,362	0,98	0,300	0,81	0,261	0,71
sc + COL1	0,541	1,47	0,422	1,14	0,336	0,91	0,308	0,83	0,197	0,53
kd	0,499	1,35	0,411	1,11	0,345	0,93	0,211	0,57	0,019	0,05
kd + COL1	0,530	1,44	0,486	1,32	0,396	1,07	0,074	0,20	0,003	0,01

Im direkten Vergleich der Messergebnisse und der Kombinationsindices (**Abb. 6.60**) ist dieser sensitivierende Effekt von SCH77984 bei MX deutlich ausgeprägter als bei DOX. Dies passt zu den Ergebnissen des MAPK *Proteome Profiler Arrays*, der die unveränderte pERK-Expression bei DOX-Exposition gemessen hat (**Abb. 6.54**).

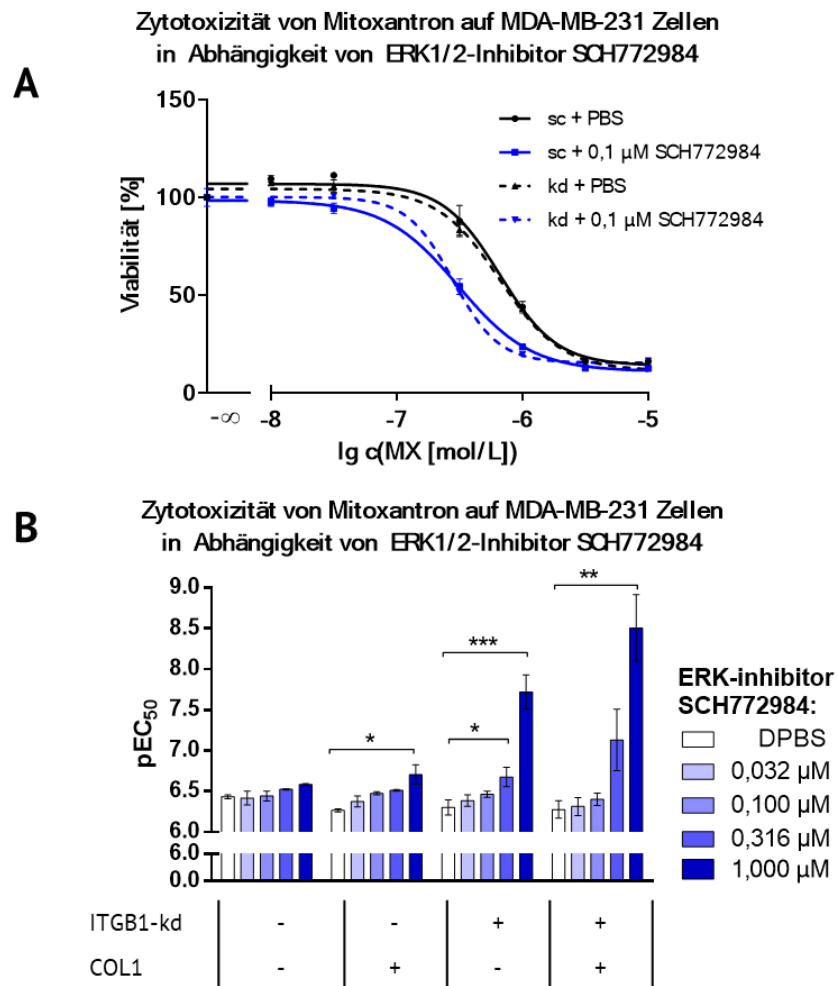


Abb. 6.59 Kombination von Mitoxantron und SCH772984 in MDA-MB-231-Zellen **A)** Repräsentative Zytotoxizitätsuntersuchungen zur Kombination aus Mitoxantron mit SCH772984 in MDAMB-321 Zellen (n=3) **B)** Übersicht der pEC₅₀-Werte der Zytotoxizität von Mitoxantron in Abhängigkeit verschiedenen Konzentrationen von ERK-Inhibitor SCH772984 (n=3, t-test). Publiziert in Baltes *et al.* [351].

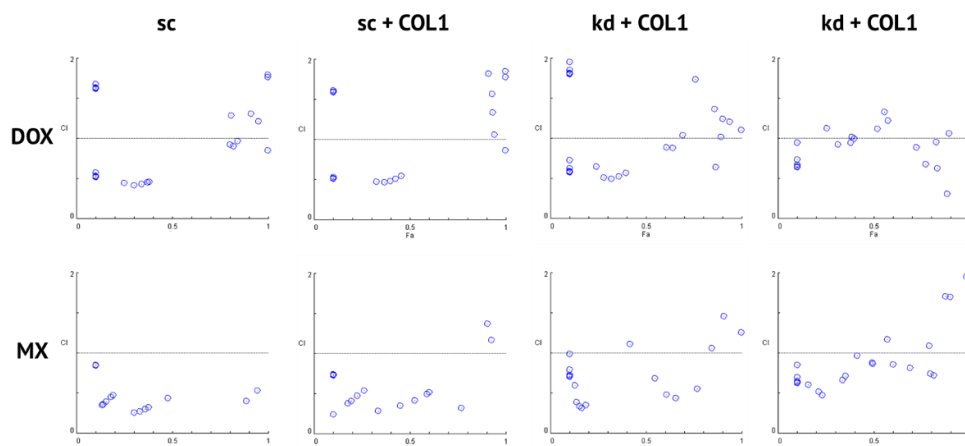


Abb. 6.60 Repräsentative Verteilung der Kombinationsindizes nach Chou-Talalay für die Kombination von SCH772984 und DOX bzw. MX in MDA-MB-231 Zellen. Beide Zytostatika zeigen ein synergistisches Verhalten (CI-Werte <1) mit dem ERK-Inhibitor SCH772984. MX weist allerdings absolut gesehen mehr synergistische Kombinationsmöglichkeiten der beiden Wirkstoffe, sowie eine grundsätzliche Verschiebung in den synergistischen Bereich auf.

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

Der im Screening der MCF-7-Zellen (**Abb. 6.53**) beobachtete sensitivierende Effekt von SCH772984 konnte im Zuge der konzentrationsabhängigen Experimente ebenfalls bestätigt werden (**Tab. 6.7**). Sowohl in Kombination mit DOX als auch mit MX führt bereits eine geringe Konzentration von 0,0316 μM SCH772984 zu einer deutlichen Sensitivierung, die im Falle von DOX nicht weiter steigt, sondern ein Plateau bildet, bei dem sich der RF kaum noch verändert.

Im Fall von MX wird dagegen eine Konzentrationsabhängigkeit demonstriert. Sc-Zellen haben bei 0,316 μM SCH772984 ihre maximale Sensitivierung erreicht, während COL1 dies bei einer Konzentration von 0,0316 μM ermöglicht. Im *knockdown* wird die maximale Inhibition erst mit einer Konzentration von 1 μM erreicht. MCF-7-Zellen weisen keine zytotoxischen Effekte bei dieser Konzentration auf. Der Einfluss von MX auf das *signaling* von MCF-7-Zellen insbesondere im Kontext des ITGB1-*knockdowns* wurde von Bastian Jakubzig in seiner Dissertation [321] beschrieben und soll hier daher nicht weiter vertieft werden.

Tab. 6.7 Tabellarische Übersicht der Messergebnisse von MCF-7-Zellen in Form von EC_{50} und RFs.

MCF-7	SCH772984									
	PBS		0,0316 μM		0,1 μM		0,316 μM		1,000 μM	
DOX	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF
sc	0,555	1,00	0,347	0,62	0,300	0,54	0,352	0,63	0,333	0,60
sc + COL1	0,520	0,94	0,331	0,60	0,344	0,62	0,372	0,67	0,316	0,57
kd	0,503	0,91	0,486	0,88	0,537	0,97	0,507	0,91	0,470	0,85
kd + COL1	0,609	1,10	0,299	0,54	0,386	0,70	0,284	0,51	0,239	0,43
MX	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF
sc	0,226	1,00	0,181	0,80	0,158	0,70	0,065	0,29	0,125	0,55
sc + COL1	0,194	0,86	0,071	0,32	0,062	0,27	0,060	0,27	0,030	0,13
kd	0,313	1,39	0,210	0,93	0,132	0,58	0,204	0,90	0,030	0,13
kd + COL1	0,192	0,85	0,261	1,15	0,225	1,00	0,159	0,70	0,052	0,23

ERK1/2 spielt eine zentrale Rolle in der EM-DR der beiden Brustkrebszelllinien. Dabei bleibt aber offen, über welchen Signalweg ERK1/2 phosphoryliert wird. Klassischerweise wird über eine RTK die Signalmoleküle Ras und Raf aktiviert, die MEK phosphorylieren, welches wiederum ERK1/2 aktiviert. Die Ähnlichkeit der Toxizitätsuntersuchungen von SCH772984 und Trametinib legt nahe, dass die klassische MAPK-Kaskade involviert ist (**Abb. 6.32** und **6.34**). Um den Mechanismus der ERK1/2-Aktivierung funktionell zu untersuchen, soll im nächsten Versuch die MAPK-Kinase MEK durch U0126 inhibiert werden.

U0126 ist in der Lage, eine Sensitivierung von MDA-MB-231 Zellen gegenüber MX zu bewirken (Abb. 6.61, Tab. 6.8). Da eine IC₅₀ von 6,4 µM bei U0126 gemessen wurde, kann nur bis zu einer Konzentration von 3,16 µM die intrinsische inhibitorische Wirkung auf ABCG2 (BCRP) ausgeschlossen werden. Es wird deutlich, dass die Sensitivierung in den kd-Zellen sowohl mit als auch ohne Einfluss von COL1 deutlich stärker erfolgt als in den sc Zellen und die anfängliche Resistenz komplett antagonisiert werden kann.

Der Effekt ist im Fall von DOX nicht ausgeprägt (Tab. 6.8). Ab 100 µM tritt jedoch in den kd-Zellen eine Sensitivierung ein. Eine intrinsische inhibitorische Wirkung gegenüber ABCB1 und ABCC1 konnte bis 10 µM ausgeschlossen werden, ist aber ab 100 µM denkbar, wenn auch unwahrscheinlich. Aufgrund der direkten Interferenzen als Substrat bzw. Inhibitor der ABC-Transporter wird auf eine Betrachtung des Kombinationsindex verzichtet.

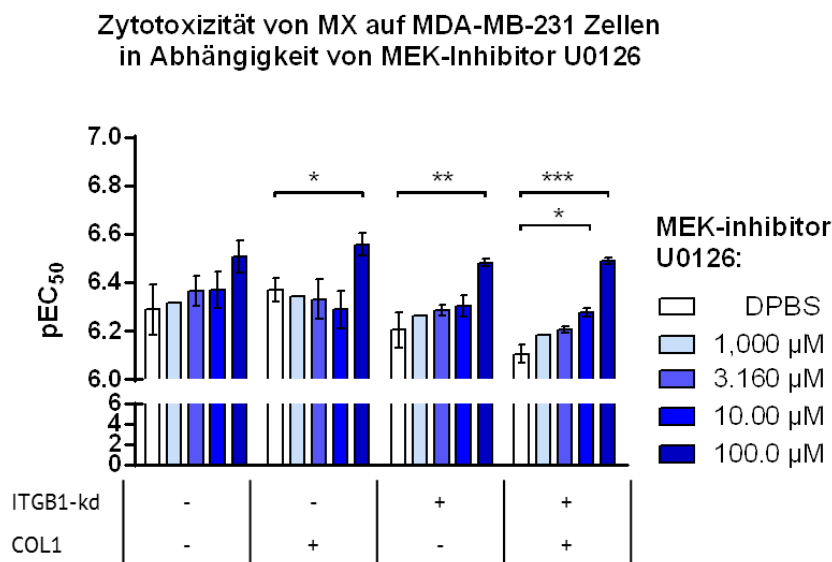


Abb. 6.61 Kombination von Mitoxantron und U0126 in MDA-MB-231-Zellen. Darstellung der pEC₅₀ Werte der Koinkubation von MX mit U0126 (n=3). Die statistische Auswertung erfolgt mittels t-Test.

Tab. 6.8 Übersicht der Messwerte der Koinkubation von MX bzw. DOX mit U0126. Auf die Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet. Diese ist allerdings in **Abb. 6.61** als Fehlerbalken zu erkennen.

MDA-MB-231	SCH772984											
	PBS		0,1 µM		1 µM		3,16 µM		10 µM		100 µM	
	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF
MX												
sc	0,514	1,00	0,476	0,93	0,482	0,94	0,431	0,84	0,428	0,83	0,310	0,60
sc + COL1	0,428	0,83	0,412	0,80	0,455	0,88	0,467	0,91	0,513	1,00	0,277	0,54
kd	0,625	1,22	0,560	1,09	0,543	1,06	0,517	1,01	0,497	0,97	0,329	0,64
kd + COL1	0,783	1,52	0,723	1,41	0,654	1,27	0,621	1,21	0,529	1,03	0,324	0,63
DOX												
sc	0,919	1,00	0,884	0,96	0,898	0,98	0,912	0,99	0,852	0,93	0,742	0,81
sc + COL1	0,872	0,95	0,933	1,02	0,959	1,04	0,853	0,93	0,956	1,04	0,994	1,08
kd	1,018	1,11	0,976	1,06	1,007	1,10	0,987	1,07	0,966	1,05	0,665	0,72
kd + COL1	1,046	1,14	1,054	1,15	0,989	1,08	0,951	1,03	0,930	1,01	0,440	0,48

6.7.3. MAPK-Abhängigkeit der ABC-Transporter

Der synergistische Effekt der MAPK-Inhibition durch SCH772984 lässt sich theoretisch auf verschiedene Ursachen zurückführen. Neben der Interferenz mit der mitotischen Aktivität der Zellen kann die erhöhte Effektivität der klassischen Zytostatika durch einen verminderten Efflux begründet werden. Dieser kann einerseits auf eine direkte Interaktion zwischen dem Inhibitor und dem ABC-Transporter durch allosterische oder kompetitive Inhibition, oder auf eine posttranslationelle Modifikation der Transporteraktivität andererseits zurückzuführen sein. Da die intrinsische inhibitorische Wirkung von SCH772984 mittels Calcein AM assay (vgl. **Abb. 6.56**) und Pheophorbid A assay (vgl. **Abb. 6.57**) ausgeschlossen werden konnte, kann durch SCH772984 die reine Wirkung der ERK-Inhibition auf die COL1- und ITGB1-vermittelte Effluxerhöhung untersucht werden. Dabei zeigt sich bei den Pheophorbid A (**Abb. 6.62A**) und Calcein AM (**Abb. 6.62B**) Assays eine antagonisierende Wirkung des Effekts von COL1 und des *knockdowns*.

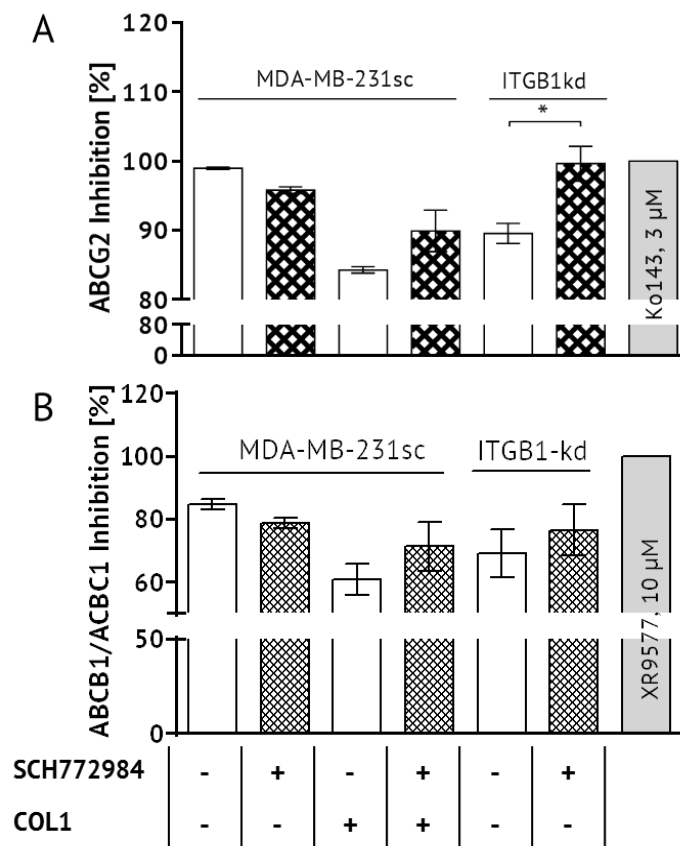


Abb. 6.62 Wirkung der Inhibition durch SCH772984 (1 µM, 24 h) auf die ABC-Transporter-Aktivität in MDA-MB-231-Zellen. A) Die Inhibition von ABCG2 wurde mittels Pheophorbid A assay untersucht. B) Die Aktivität von ABCB1 und ABCC1 wurde mittels Calcein AM bestimmt (n=3). Die Statistik wurde mittels t-Test durchgeführt. Publiziert in Baltes *et al.* [351].

Die Aufhebung der Effluxsteigerung kombiniert mit dem Erreichen einer 100% Inhibition ist bei ABCG2 im ITGB1-kd signifikant ($p=0,0253$). Dieser Effekt ist bei ABCB1/ABCC1 im *knockdown* geringer ausgeprägt.

Die Blockade der durch COL1 gesteigerten Transporteraktivität durch SCH772984 ist bei ABCB1/ABCC1 und ABCG2 vergleichbar deutlich ausgeprägt, aber nicht signifikant.

Die gefundenen Erkenntnisse wurden nachfolgend mittels Western Blot verifiziert (**Abb. 6.63**). Eine direkte Abhängigkeit, d.h. Verringerung der Proteinmenge durch Inkubation mit SCH772984 (1 μM) konnte nur in BCRP festgestellt werden. ABCB1 ist unverändert bzgl. der Expression infolge einer SCH772984-Koinkubation.

Neben der Basalexpression kann die hier festgestellte Erhöhung von ABCG2 in Anwesenheit von COL1 um 15%, sowie die signifikante Erhöhung im *knockdown* um ca. 50% ($p=0,0014$) vollständig antagonisiert werden. Auch dabei ist die Antagonisierung in den sc-Zellen auf 10% ($p<0,0001$) sowie innerhalb des *knockdowns* auf 27% ($p=0,0049$) signifikant. Die Reduktion innerhalb des Einflusses von COL1 ist mit 34% deutlich, aber nicht signifikant.

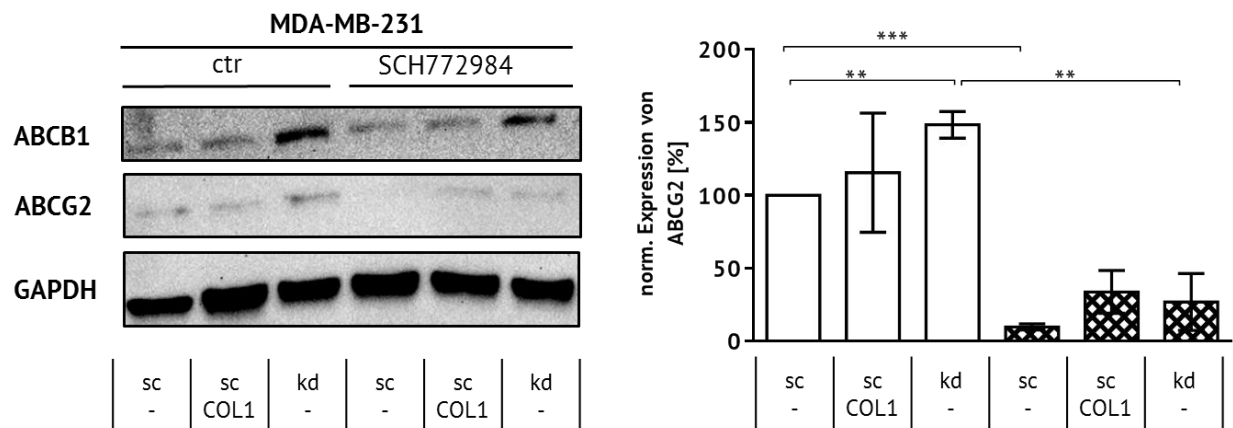


Abb. 6.63 Western Blot Analyse von den ABC-Transportern ABCB1 (P-Gp) und ABCG2 (BCRP) in Abhängigkeit von COL1 und ITGB1-*knockdown*, sowie der ERK-Inhibition per SCH772984 mit Pixeldichtenanalyse. Die Zellen wurden vor Lyse mit 1 μM SCH772984 für 24 h inkubiert. Die Normalisierung erfolgt zunächst auf die *loading control* GAPDH und anschließend auf die unbehandelte *scrambled* Probe. Die Statistik erfolgt mittels t-Test ($n=3$). Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Neben dem Effekt von SCH772984 sollte außerdem der Einfluss des MEK Inhibitors U0126 und des CREB Inhibitors 666-15 auf funktionaler Ebene mittels Pheophorbid A (**Abb.6.64A**) oder Calcein AM (**Abb.6.64B**) untersucht werden. Beide Inhibitoren bewirken eine Antagonisierung der erhöhten Efflux-Aktivität durch COL1 oder den ITGB1-*knockdown*.

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

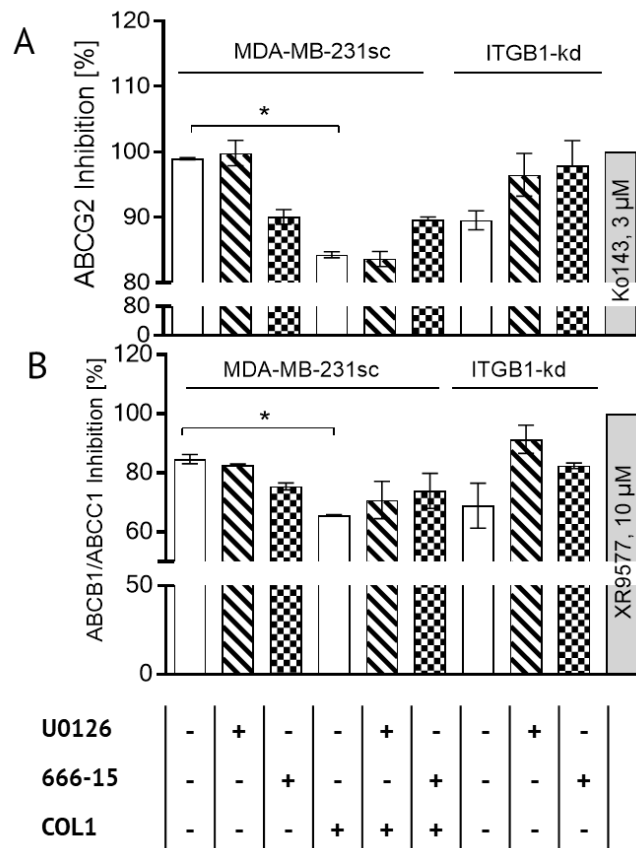


Abb. 6.64 Testung der funktionellen Aktivität der ABC-Transporter ABCG2 (A) und ABCB1/ABCC1 (B) bei MEK-Inhibition durch U0126 (1 μ M, 24 h) oder CREB-Inhibition durch 666-15 (100 nM, 24 h). Als Aktivator wurde COL1 und als Transporter-Inhibitoren Ko143 und XR9577 verwendet. Die Statistik wurde per t-Test berechnet (n=3).

Der MEK-Inhibitor U0126 wird dabei bei einer Konzentration von 1 μ M, also unterhalb der inhibitorischen Wirkung auf ABC-Transporter verwendet. Interessanterweise kann eine Aktivitätssteigerung bei dieser geringen Konzentration erreicht werden. Eine direkte Interaktion mit den Transportern kann als Mechanismus für diesen Effekt wahrscheinlich ausgeschlossen werden. In Bezug auf ABCB1 ist selbst bei einer Konzentration von 10 μ M nicht mit einer direkten ABC-Transporter-Wechselwirkung zu rechnen.

Der CREB-Inhibitor 666-15 wird bei einer Konzentration von 100 nM eingesetzt, bei der ebenfalls keine Transporter-Wechselwirkung erwartet werden kann. 666-15 kann in beiden Testsystemen die jeweilige COL1-induzierte Aktivitätssteigerung konsequent antagonisieren. Dies ist bereits eine Neuigkeit innerhalb der Literatur zum ABC-Transporter-*signaling*. Eine Aktivierung über Transkriptionsfaktoren wie Myc ist bekannt. Der Effekt einer CREB-Blockade ist im Zusammenhang mit dem ABC-Transporter-*Signaling* bis dato nicht beschrieben. Daher wird der Einfluss dieses Inhibitors im Folgenden genauer untersucht.

6.7.4. CREB-Inhibition zur Chemosensitivierung

Die ERK1/2-*downstream*-Zielstruktur CREB zeigte in den *Protein Profiler Arrays* eine deutliche Phosphorylierung an S133 durch diverse Stimuli wie COL1, ITGB1-kd oder Zytostatika. Zur Inhibition von CREB wird der Inhibitor 666-15 (**Abb. 6.65**) verwendet. Innerhalb des funktionellen Screenings (**Abb. 6.53**) wurde sich ein chemosensitivierender Effekt von 666-15 bei einer Konzentration 100 nM beim Zytostatikum MX innerhalb der MCF-7-Zellen deutlich. Dieser Effekt wird nun in MDA-MB-231-Zellen untersucht.

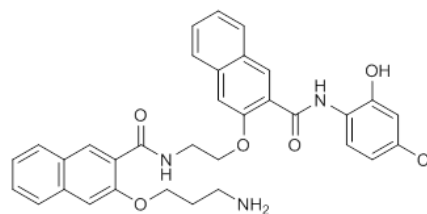


Abb. 6.65 Strukturformel von CREB-Inhibitor 666-15.

Eine Interaktion mit ABC-Transportern kann bis zu einer Konzentration von 100 nM ausgeschlossen werden. Dennoch kann bei MX eine Sensitivierung durch die Inhibition von pCREB bereits bis zu dieser Grenze nachgewiesen werden. Der Effekt innerhalb der MDA-MB-231-Varianten sc und kd ist dennoch eher moderat (**Abb. 6.66A**) und nicht mit der Sensitivierung der MCF-7-Zellen gegenüber MX aus **Abb. 6.53** zu vergleichen. Ein Effekt auf DOX ist nicht detektierbar (**Abb. 6.66B**). Obwohl die Abhängigkeit der ABC-Regulation und -Aktivität von CREB bestätigt werden konnte, scheint es keine deutliche Wirkverstärkung der beiden untersuchten Zytostatika zu innerhalb der Zelllinie MDA-MB-231 zu geben. Der Effekt in MCF-7-Zellen (**Abb. 6.53**) ist dagegen deutlicher ausgeprägt und könnte im Rahmen zukünftiger Untersuchungen näher charakterisiert werden.

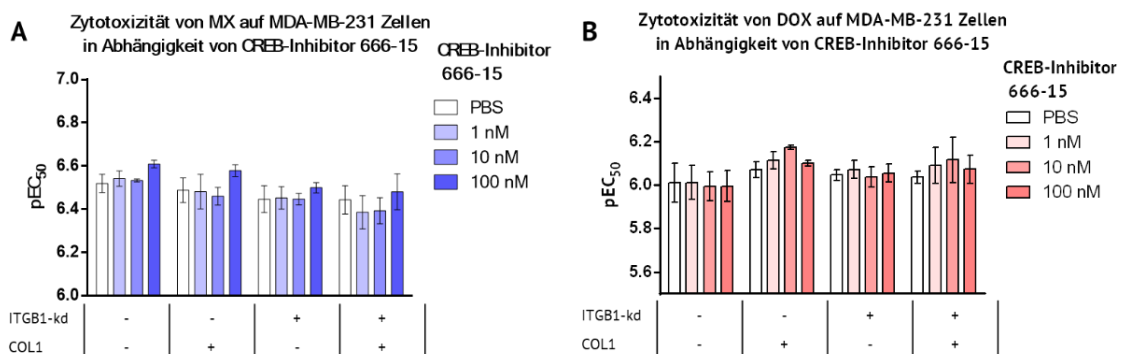


Abb. 6.66 Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination aus MX bzw. DOX mit CREB-Inhibitor 666-15 in MDA-MB-231-Zellen.

6.7.5. EGFR-Inhibition zur Chemosensitivierung

In Kapitel 6.6.6 konnte dargestellt werden, dass in MDA-MB-231-Zellen eine COL1-Bindung und der ITGB1-kd eine Erhöhung der Phosphorylierung von EGFR bewirkt. Dabei kann Gefitinib die intrazelluläre Phosphorylierung blockieren. Jedoch bindet Gefitinib unspezifisch an andere RTKs [412] und wird als Substrat von vielen ABC-Transportern erkannt. So sind IC₅₀-Werte bei ABCG2 von 1,74 µM (per Pheophorbid A) und 3,25 µM (per Hoechst 33342) beschrieben, respektive 10,7 µM für den Transporter ABCB1 und 14,5 µM für ABCC1 [216].

Die Koinkubation von MX/DOX und Gefitinib induziert in MDA-MB-231-Zellen bereits ab 0,1 µM eine Sensitivierung (Abb. 6.67, Tab. 6.9). Da eine intrinsische inhibitorische Wirkung auf die ABC-Transporter bis zu einer Konzentration von 0,316 µM bzw. 0,1 µM weitestgehend auszuschließen ist, kann diese Sensitivierung auf die pharmakologische Hemmung von EGFR zurückgeführt werden. Ab einer Gefitinib-Konzentration von 3,16 µM muss die direkte Inhibition von ABCG2 mitberücksichtigt werden. In Abb. 6.67 sind diese Messergebnisse trotz beachtlicher Signifikanzen grau dargestellt.

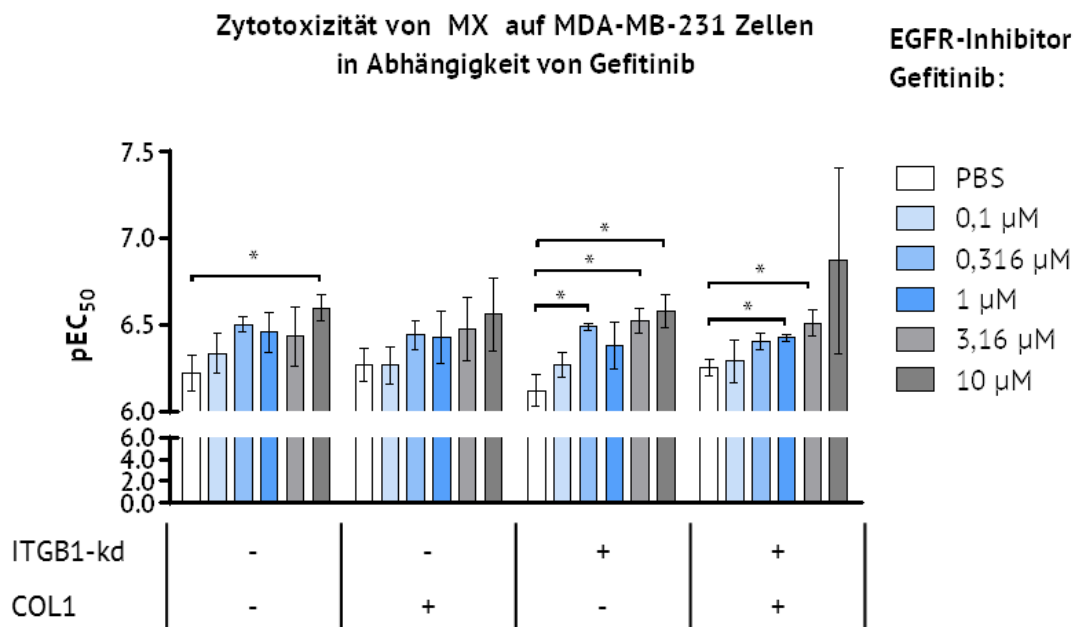


Abb. 6.67 Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombinationsbehandlung aus MX mit Gefitinib in MDA-MB-231-Zellen. Die grau dargestellten Balken stellen die Möglichkeit der direkten Interaktion des Gefitinibs mit den ABC-Transportern dar und beinhalten somit einen möglichen systematischen Fehler. Die statistische Auswertung erfolgte über t-Test (n= 3). Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351] (*Supplementary Data*).

Den stärksten Effekt innerhalb der Konzentration, bei der eine ABC-Transporter-Inhibition sicher ausgeschlossen werden kann, wird bei 0,316 μM erreicht. Die sc-Zellen werden sensitiver von einem pEC_{50} -Wert von 6,22 (602 nM, $\text{RF}=1,0$) auf einen Wert von 6,50 (314 nM, $\text{RF}=0,52$). In den ITGB1-kd Zellen wird die entstandene Chemoresistenz mit einem Wert von $\text{pEC}_{50} = 6,12$ (755 nM, $\text{RF}=1,25$) noch verstärkt ($\text{pEC}_{50} = 6,49$, 324 nM, $\text{RF}=0,54$, $p=0,0187$).

Tab. 6.9 Übersicht der EC_{50} Werte der Koinkubation von MX und Gefitinib. Auf die Darstellung der Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet. Diese ist allerdings in **Abb. 6.67** als Fehlerbalken zu erkennen.

MDA-MB-231		Gefitinib										
MX	PBS	0,1 μM		0,316 μM		1 μM		3,16 μM		10 μM		
	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF
sc	0,602	1,00	0,462	0,77	0,314	0,52	0,349	0,58	0,367	0,61	0,253	0,42
sc + COL1	0,537	0,89	0,542	0,90	0,362	0,60	0,371	0,62	0,335	0,56	0,274	0,46
kd	0,755	1,25	0,537	0,89	0,324	0,54	0,415	0,69	0,299	0,50	0,265	0,44
kd + COL1	0,555	0,92	0,513	0,85	0,393	0,65	0,377	0,63	0,310	0,51	0,135	0,22

Die Kombinationsindices implizieren einen synergistischen Effekt (<1) der Wirkstoffkombination Gefitinib/Mitoxantron, der bei COL1 und ITGB1-kd-Zellen noch ausgeprägter ist. (**Abb. 6.68**). Dabei macht es keinen Unterschied, ob die höheren Gefitinib-Konzentrationen mit betrachtet werden, bei denen eine ABC-Transporter-Hemmung nicht ausgeschlossen werden kann. Der synergistische Effekt (<1) bleibt bestehen.

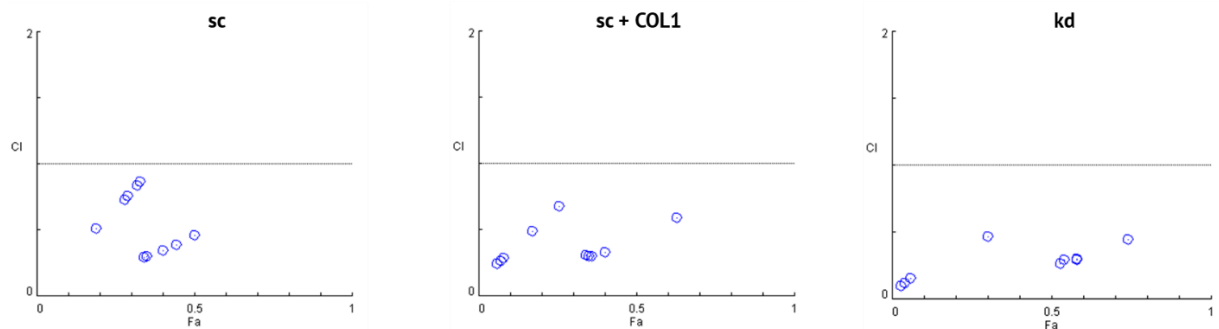


Abb. 6.68 Repräsentative Verteilung der Kombinationsindices nach Chou-Talalay für die Kombination von Gefitinib und MX in MDA-MB-231 Zellen. Die Kombination zeigt ein synergistisches Verhalten (CI -Werte <1), welches bei Anwesenheit von COL1 oder im ITGB1-*knockdown* ausgeprägter ist. Die Gefitinib-Konzentrationen von 3,16 μM und 10 μM sind bei der Berechnung inkludiert.

Bei Doxorubicin ist der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt (**Tab. 6.10**). Die durch COL1 und ITGB1-kd induzierte Chemoresistenz wird zwar reduziert, deutliche Sensitivierungen werden aber erst bei einer Gefitinib-Konzentration von 3,16 μM bzw. 10 μM deutlich. 10 μM

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

entsprechen allerdings der IC_{50} an dem Transporter ABCB1 und sind nahe an der IC_{50} von ABCC1, sodass die Hemmung dieser ABC-Transporter ggf. die Ursache für die Sensitivierung darstellt.

Tab. 6.10 Übersicht der EC_{50} Werte der Koinkubation von DOX und Gefitinib. Auf die Darstellung der Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet.

MDA-MB-231		Gefitinib										
DOX	PBS		0,1 μ M		0,316 μ M		1 μ M		3,16 μ M		10 μ M	
	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF
sc	0,921	1,00	0,906	0,98	0,881	0,96	0,912	0,99	0,858	0,93	0,700	0,76
sc + COL1	1,033	1,12	0,959	1,04	0,876	0,95	0,966	1,05	0,865	0,94	0,638	0,69
kd	1,029	1,12	0,986	1,07	0,988	1,07	0,891	0,97	0,891	0,97	0,765	0,83
kd + COL1	0,873	0,95	0,956	1,04	1,032	1,12	0,817	0,89	0,680	0,74	0,366	0,40

Eine Koinkubation von Gefitinib mit Zytostatika ist in MCF-7-Zellen, die den EGF-Rezeptor gering ausdragen, ineffektiv (**Abb. 6.69**).

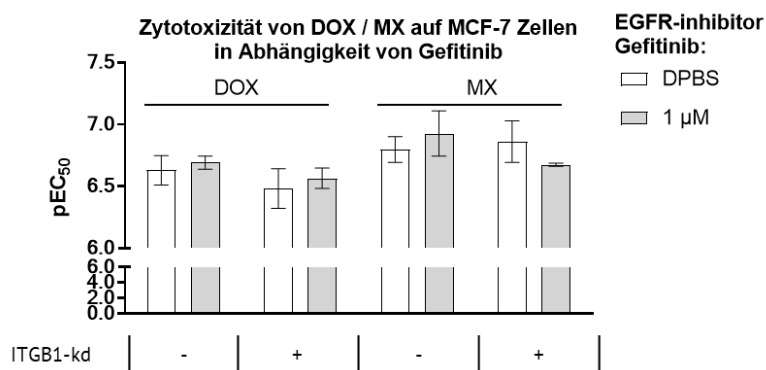


Abb. 6.69 Darstellung der pEC_{50} -Werte von Doxorubicin und Mitoxantron unter der Koinkubation von jeweils 1 μ M Gefitinib ($n=3$). Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351] (*Supplementary Data*).

EGFR kann verschiedenste Signalkaskaden aktivieren. Dabei ist die MAPK-Signaltransduktion die Prominenteste. Innerhalb der Kombinationsforschung bestehen Ansätze, dass multiple Inhibitionen innerhalb der gleichen Signalkaskade synergistische Effekte aufweisen können. Resistenzen in Brustkrebstumoren hängen oft mit einem deregulierten EGFR *signaling* zusammen [413]. In den beiden hier verwendeten Zelllinien kann bereits durch die subtoxische Konzentration des ERK-Inhibitors SCH772984 von 0,1 μ M eine verstärkte Zytotoxizität von Gefitinib erzeugt werden (**Abb. 6.70A**).

Im Folgenden wurde daher eine Kombination von Kinaseinhibitoren verwendet. Gefitinib als EGFR-Antagonist und SCH772984 als ERK1/2-Inhibitor sollen damit an zwei Angriffspunkten

der MAPK-Signalkaskade angreifen (**Abb. 6.70, Tab. 6.11**). Klinisch wird ein ähnlicher Ansatz bereits in der Therapie des malignen Melanoms durch die Kombination von BRAF- und MAPK-Inhibitoren erfolgreich umgesetzt.

Dabei wird gleichermaßen eine Sensitivierung innerhalb der Kontrollzellen, als auch innerhalb der ITGB1-defizitären Zellen deutlich (**Abb. 6.70A und B**). Dabei ist der Unterschied in den sc-Zellen durch die Koinkubation mit beiden Wirkstoffen deutlich größer. Dies ist allerdings dadurch erklärbar, dass der ITGB1-kd und die Anwesenheit von COL1 allerdings schon eine Sensitivität gegenüber Gefitinib induzieren (**Abb. 6.51**). Die sc-Zellen fallen signifikant ($p=0,0062$) von einem EC_{50} -Wert von $47,1 \mu\text{M}$ ($RF=1$) auf $14,8 \mu\text{M}$ ($RF=0,31$) bei einer Konzentration von $0,316 \mu\text{M}$ SCH772984. In den *knockdown*-Zellen liegt die ursprüngliche EC_{50} bereits im Vergleich zu den sc-Zellen signifikant ($p=0,0269$) bei $23,4 \mu\text{M}$ ($RF=0,5$) und sensitiviert sich auf $12,8 \mu\text{M}$ ($RF=0,27$) durch $0,316 \mu\text{M}$ SCH772984. Innerhalb der *knockdown*-Zellen tritt ab $0,316 \mu\text{M}$ des ERK-Inhibitors SCH772084 ein eigener toxischer Effekt auf, der die resultierenden EC_{50} - bzw. RF-Werte aber nur minimal beeinflusst. Der Effekt bleibt auf Level der Wirkung von $0,1 \mu\text{M}$ SCH772984.

MDA-MB-231-Zellen sind in Gegenwart von COL1 sensitiver gegenüber Gefitinib ($19,3 \mu\text{M}$, $RF=0,41$), allerdings ist der zusätzliche Effekt von SCH772984 innerhalb dieses sensitiven Niveaus nur noch gering ausgeprägt. Dies wird auch durch die Berechnung der Kombinationsindices verdeutlicht (**Abb. 6.70C**). Während die sc-Zellen einen synergistischen Effekt mit einem CI kleiner 1 aufweisen, ist dieser Synergismus bei den ITGB1-kd-Zellen geringer ausgeprägt. Innerhalb der COL1-behandelten Zellen streuen die Werte dagegen um einen CI von 1, sodass dies eher als ein additiver Effekt definiert werden sollte.

Diese Kombination der Inhibitoren hat keinen Effekt auf MCF-7-Zellen, vermutlich da diese keinen EGF-Rezeptor und kein dominantes MAPK-System besitzen, (**Abb. 6.70D**).

Tab. 6.11 Tabellarische Übersicht der in **Abb. 6.70** dargestellten Messergebnisse in Form der EC_{50} und der RFs. Auf die Darstellung der Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet. Diese ist allerdings in **Abb. 6.70** als Fehlerbalken zu erkennen.

MDA-MB-231			SCH772984									
Gefitinib	PBS		0,01 μM		0,0316 μM		0,1 μM		0,316 μM		1,000 μM	
	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF
sc	47,1	1,00	36,5	0,77	36,5	0,77	23,5	0,50	14,8	0,31	14,4	0,31
sc + COL1	19,3	0,41	20,1	0,43	20,1	0,43	15,6	0,33	14,4	0,31	10,9	0,23
kd	23,4	0,50	19,6	0,42	19,6	0,42	15,9	0,34	12,8	0,27	9,3	0,20
kd + COL1	18,1	0,38	13,7	0,29	13,7	0,29	13,7	0,29	12,1	0,26	7,3	0,15

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

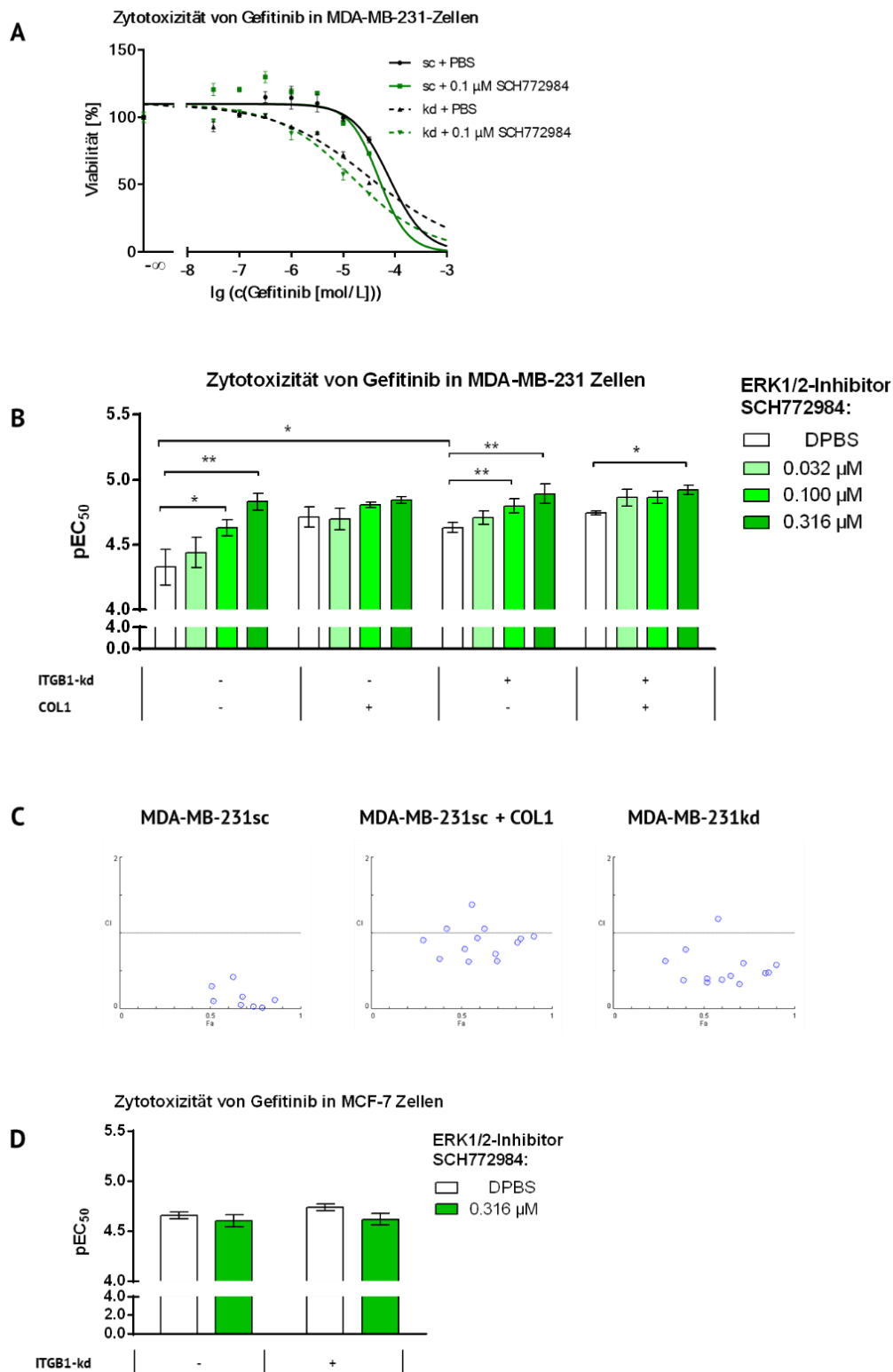


Abb. 6.70 Darstellung der Zytotoxizität der Kombination von EGFR-Rezeptor-Antagonist Gefitinib und ERK-Inhibitor SCH772984. A) Repräsentative Dosis-Wirkungskurve von Gefitinib in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von SCH772984. B) Die statistische Analyse der pEC₅₀ Werte der Zytotoxizität von Gefitinib wurde per t-test bestimmt (n=3). C) Repräsentative Verteilung der Kombinationsindizes nach Chou-Talalay für die Kombination von Gefitinib und SCH772984 in MDA-MB-231 Zellen. Die Kombination zeigt ein synergistisches Verhalten (CI-Werte <1), welches bei Anwesenheit von COL1 oder im ITGB1-knockdown weniger stark ausgeprägt ist. D) Darstellung der pEC₅₀-Werte von Gefitinib in MCF7-Zellen in Abhängigkeit von SCH772984. Es ist kein Effekt detektierbar. Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351] (D in *Supplementary Data*).

6.7.6. DDR1-Inhibition zur Chemosensitivierung

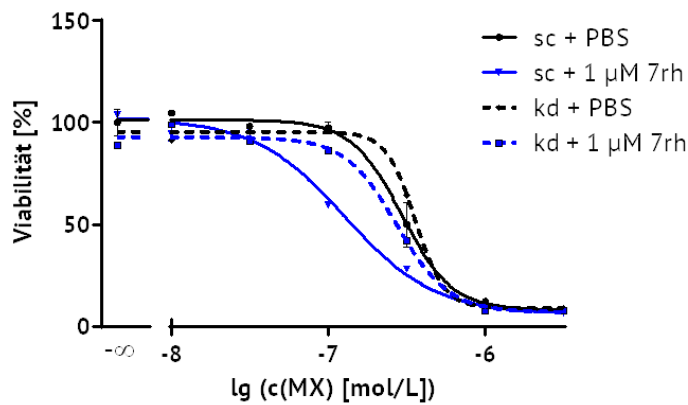
In Kapitel 6.6.5 wurde diskutiert, dass in MDA-MB-231-Zellen eine COL1-Bindung und der ITGB1-kd eine Erhöhung von DDR1 sowie pDDR1 bewirkt. Darüber hinaus zeigte sich eine verstärkte Toxizität des DDR1-Inhibitors 7rh innerhalb des MDA-MB-231-ITGB1-kd, allerdings auch Resistenzentwicklung in Gegenwart von COL1.

Um den Effekt einer DDR1-Inhibition in Kombination mit anderen antitumoralen Wirkstoffen zu untersuchen, wurde zunächst eine Konzentration von 1 μM des Inhibitors 7rh verwendet, bei der bereits durch funktionelle Untersuchungen eine Reduktion der Adhärenz und einen Effekt auf die MAPK-Signaltransduktion bestätigt wurde. Die Koinkubation dieser effektiven Konzentration bewirkt insbesondere in Kombination mit MX eine deutliche Sensitivierung (**Abb. 6.71**). Vor allem MDA-MB-231sc-Zellen demonstrieren eine Reduktion der EC_{50} von MX auf 49% (**Tab. 6.12**). Insgesamt reagieren die sc-Zellen empfindlicher auf eine DDR1-Koinhibition, was auf die niedrige Expression von DDR1 zurückzuführen ist. Nach Überschreiten von 1 μM sind die kd-Zellen allerdings sensitiver als ihre korrespondierenden sc-Kontrollzellen bei gleicher Konzentration.

Um die Ergebnisse einzuordnen, wurde auch bei diesem Wirkstoff die inhibitorische Wirkung der chemischen Substanz auf die ABC-Transporter untersucht. Der DDR1-Inhibitor 7rh weist eine gemessene IC_{50} für ABCG2 von 1,05 μM auf, während die inhibitorische Wirkung auf ABCB1 und ABCC1 vernachlässigbar ist (**Abb. 6.72**). Somit muss der sensitivierende Effekt auf die MX-Behandlung unter dem Aspekt einer direkten ABCG2-Hemmung durch das Molekül 7rh betrachtet werden. Da die sensitivierenden Effekte teilweise schon vor Erreichen der Konzentration von 1 μM auftraten, kann ein synergistischer Effekt unabhängig der ABC-Transporter-Inhibition vermutet werden. An dieser Stelle wird auf die Darstellung der Kombinationsindices verzichtet, da eine Interaktion mit dem Transporter recht wahrscheinlich ist. Insgesamt kann die Sensitivierung durch 7rh auf folgenden Einflüssen basieren:

- Hemmung der Adhärenz
- Hemmung/Modulation der *downstream*-Signaltransduktion (z.B. ERK1/2)
- direkten Interaktion mit ABC-Transportern.

Zytotoxizität von Mitoxantron in MDA-MB-231 Zellen
in Abhängigkeit von DDR1-Inhibitor 7rh



Zytotoxizität von MX auf MDA-MB-231 Zellen
in Abhängigkeit von DDR1-Inhibitor 7rh

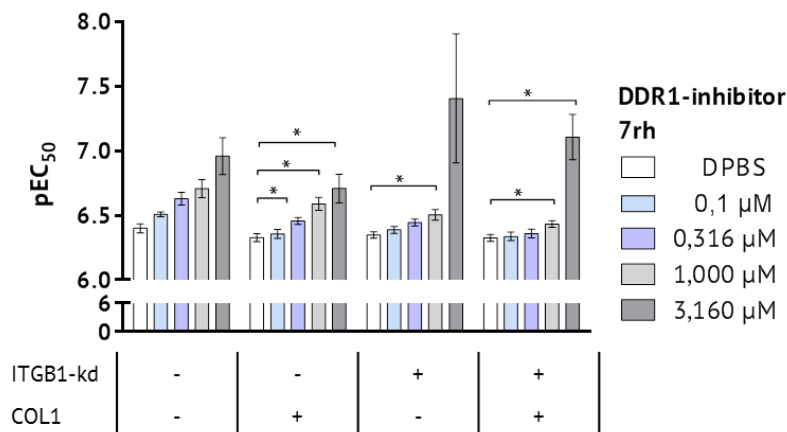


Abb. 6.71 Kombination von Mitoxantron und DDR1-Inhibitor 7rh in MDA-MB-231-Zellen. (A) Repräsentative Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination aus MX mit DDR1-Inhibitor 7rh (B) Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination aus DOX mit DDR1-Inhibitor 7rh, statistisch ausgewertet per t-Test (n=3). Grau eingefärbt sind die Konzentrationen, bei denen ein Einfluss einer ABCG2-Hemmung durch das Substrat 7rh wahrscheinlich ist. Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

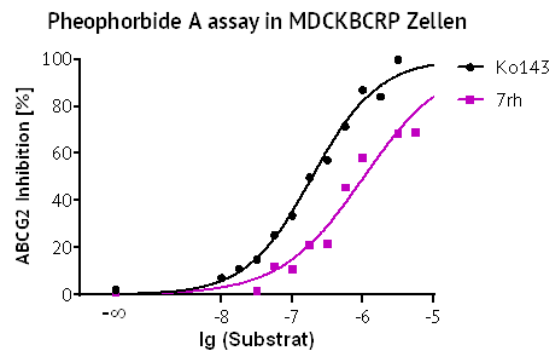
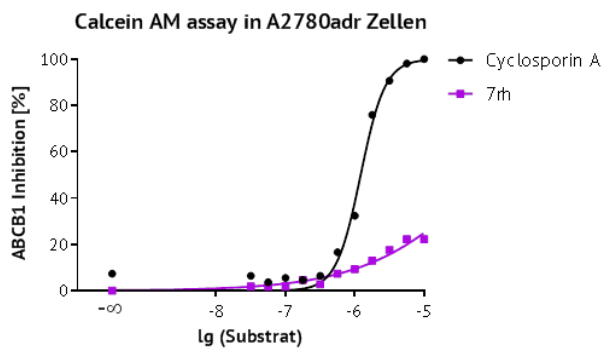


Abb. 6.72 Messung der inhibitorischen Eigenschaften des DDR1-Antagonists 7rh auf die Transporter (A) ABCB1 und ABCG2 mittels Calcein AM Assay und (B) ABCG2 mittels Pheophorbid A Assay.

Tab. 6.12 Übersicht über die EC₅₀ Werte der Kombination von 7rh DOX und MX-aus **Abb. 6.71**. Auf die Darstellung der Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet. Diese ist allerdings in **Abb. 6.71** als Fehlerbalken zu erkennen.

MDA-MB-231			7rh							
MX	PBS		0,1 µM		0,316 µM		1 µM		3,16 µM	
	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF
Sc	0,399	1,00	0,310	0,78	0,236	0,59	0,197	0,49	0,110	0,28
sc + COL1	0,471	1,18	0,441	1,10	0,351	0,88	0,258	0,65	0,196	0,49
Kd	0,450	1,13	0,410	1,03	0,360	0,90	0,314	0,79	0,039	0,10
kd + COL1	0,473	1,18	0,461	1,15	0,439	1,10	0,370	0,93	0,079	0,20
DOX			EC ₅₀		EC ₅₀		EC ₅₀		EC ₅₀	
Sc	1,022	1,00	1,032	1,01	1,030	1,01	0,882	0,86	0,575	0,56
sc + COL1	0,999	0,98	1,075	1,05	1,080	1,06	1,010	0,99	0,567	0,56
Kd	0,906	0,89	1,012	0,99	0,937	0,92	0,772	0,76	0,132	0,13
kd + COL1	0,528	0,52	0,556	0,54	0,505	0,49	0,422	0,41	0,086	0,08

Um die Kombination mit klassischen Zytostatika weiter zu charakterisieren, wurde die Kombination von 7rh mit DOX verwendet (**Tab. 6.12**). Hier sind die kd-Zellen anfälliger für den Einfluss von 7rh. Ab 3,16 µM von 7rh kann auch in Kombination mit DOX in allen Zellmodifikationen eine deutliche Sensitivierung hervorgerufen werden, die durch die mangelnde Affinität von 7rh zu ABCB1 und ABCC1 nicht auf die Inhibition der ABC-Transporter zurückzuführen ist. Hier scheint die Wirkung auf einer funktionellen Blockade von DDR1 zu beruhen.

Der Ansatz durch Kombination einer DDR1-Blockade mit klassischen Zytostatika eine Sensitivierung hervorzurufen, wurde bereits von Aguilera *et al.* verfolgt [414] und sollte auch in Zukunft weiter mit alternativen DDR1-Inhibitoren untersucht werden, die keine Affinität zu ABC-Transportern besitzen.

Interessant ist in dem Zusammenhang nicht nur die Interaktion von DDR1 Inhibition mittels 7rh und den klassischen Zytostatika, sondern auch mit anderen TKIs. Die vermutlich kompensatorisch verstärkte Phosphorylierung von pERK1/2 durch die Inkubation mit 7rh (vgl. **Abb. 6.46**) innerhalb der sc-Zellen lässt sich mechanistisch durch eine zusätzliche Koinkubation mit dem ERK-Inhibitor SCH772984 ausnutzen.

MDA-MB-231-Zellen reagieren in Anwesenheit des ERK-Inhibitors bereits ab einer Konzentration von 0,032 µM sensitiver auf den DDR1-Inhibitor 7rh, ab 0,1 µM ist die Sensitivierung deutlich ausgeprägt (**Abb. 6.73, Tab. 6.12**).

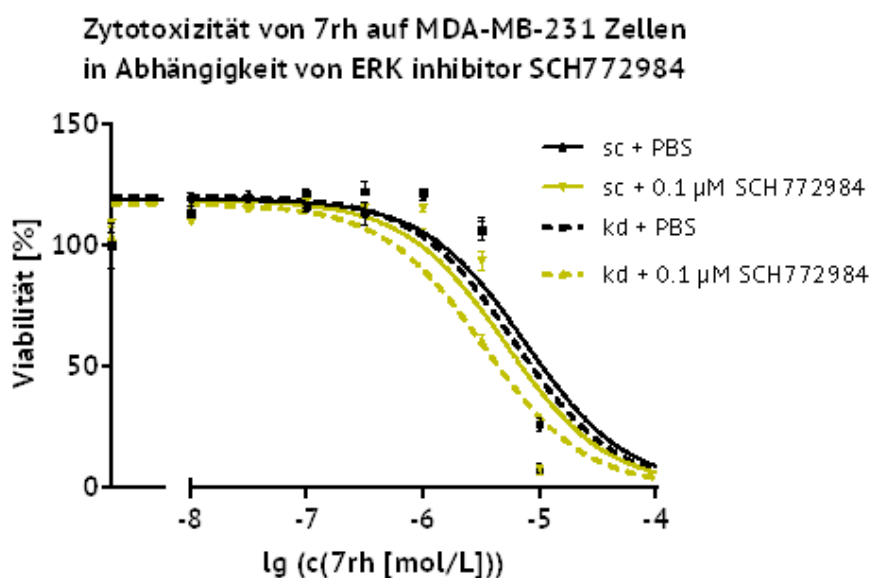


Abb. 6.73 Repräsentative Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination DDR1-Inhibitor 7rh mit ERK Inhibitor SCH772984. Die Daten sind publiziert in Baltés *et al.* [351].

Tab. 6.13 Tabellarische Übersicht der in **Abb. 6.74** dargestellten Messergebnisse in Form der EC_{50} und des RFs. Auf die Darstellung der Standardabweichung wird hier der Übersicht halber verzichtet. Diese ist allerdings in **Abb. 6.74** als Fehlerbalken zu erkennen.

MDA-MB-231 7rh	SCH772984											
	PBS		0,01 μ M		0,0316 μ M		0,1 μ M		0,316 μ M		1,000 μ M	
	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF	EC_{50}	RF
sc	5,333	1,00	4,295	0,81	4,295	0,81	3,599	0,67	2,939	0,55	3,356	0,63
sc + COL1	5,861	1,10	5,777	1,08	5,777	1,08	4,375	0,82	3,963	0,74	2,864	0,54
Kd	4,998	0,94	3,272	0,61	3,272	0,61	2,693	0,50	2,376	0,45	2,292	0,43
kd + COL1	5,977	1,12	4,058	0,76	4,058	0,76	3,339	0,63	3,251	0,61	3,449	0,65

Diese Effekte sich nicht in MCF-7-Zellen erkennbar und deuten damit auf einen spezifischen Ansatz zur Therapie von TNBC hin. Eine Erklärung für das Nichtansprechen der MCF-7-Zellen könnte in der direkten DDR1-Abhängigkeit von ERK1/2 liegen. In **Abb. 6.46** wurde deutlich, dass eine Inhibition von DDR1 mittels 7rh bereits eine Reduktion von pERK bewirkt, sodass eine Inhibition mit SCH772984 nicht erforderlich ist und keinen zusätzlichen Effekt bewirkt (**Abb. 6.74A**).

MDA-MB-231-Zellen dagegen kompensieren die DDR1-Inhibition mit einer pERK-Erhöhung, die mit dem ERK Inhibitor SCH772984 verhindert werden kann (**Abb. 6.74B**).

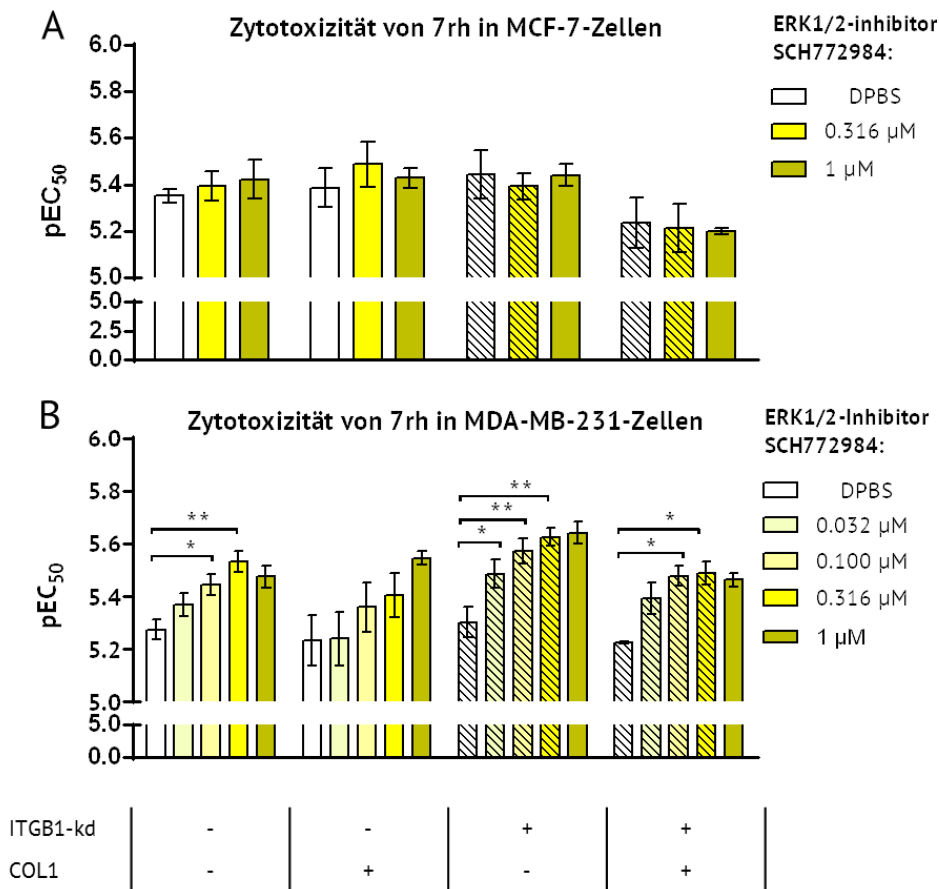


Abb. 6.74 Übersicht der pEC_{50} -Werte der Zytotoxizitätsuntersuchungen von 7rh in Abhängigkeit von ERK-Inhibitor SCH772984 in A) MCF-7-Zellen und B) MDA-MB-231-Zellen. Die Statistik ist über t-test erfolgt (n=3). Die Daten sind publiziert in Baltes *et al.* [351].

Ein synergistischer Effekt (CI < 1, bestimmt über die Chou-Talalay-Methode, Compusyn[®]) konnte sowohl in MDA-MB-231sc und deutlicher in kd Zellen unabhängig von der Anwesenheit von COL1 detektiert werden (**Abb. 6.75**).

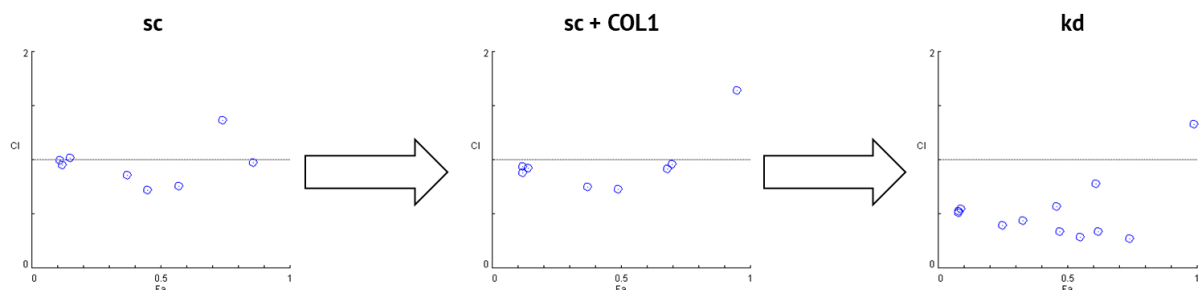


Abb. 6.75: Repräsentative Verteilung der Kombinationsindizes nach Chou-Talalay für die Kombination von 7rh und SCH772984 in MDA-MB-231 Zellen. Die Kombination zeigt ein synergistisches Verhalten (CI-Werte < 1), welches bei Anwesenheit von COL1 etwas und im ITGB1-knockdown deutlich ausgeprägter ist.

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

Die Sensitivierung durch ERK-Blockade belegt den auf Western Blot beobachteten *escape*-Mechanismus der MAPK-Aktivierung. ERK1/2 kann kanonisch über Ras-Raf-MEK oder nicht-kanonisch über diverse andere Kinasen aktiviert werden. Um die Art der Aktivierung zu untersuchen, wurden analog der Wechselwirkung zwischen ERK-Inhibitor SCH772984 und 7rh die Kombinationsexperimente mit dem MEK-Inhibitor U0126 und 7rh durchgeführt.

Die Ergebnisse der MEK-Inhibition per U0126 ähneln der ERK-Inhibition per SCH772984, was nahelegt, dass innerhalb der MDA-MB-231-Zellen die Aktivierung von ERK1/2 über die kanonische MAPK-Kaskade (Ras-Raf-MEK) verläuft (**Abb.6.76**). Interessanterweise induziert COL1 hier deutliche bzw. signifikante Sensitivierungen. Dies kann durch die direkte Aktivierung von Ras-Raf-MEK durch COL1 über ITGB1 erklärt werden. Die Effekte verstärken sich gegenseitig. Da 7rh dazu in der Lage war, die Phosphorylierung an Y513 des DDR1 Rezeptors (**Abb. 2.11**) zu reduzieren, kann das dort andockende Adaptermolekül ShcA als nachgeschaltetes Bindeglied zur Signalweiterleitung und Aktivierung von ERK ausgeschlossen werden. Alternative Aktivierungen könnten über Src-Kinasen und das FAK-Homolog PYK2 erfolgen, die GRB2 binden können, was ebenfalls als Adapterprotein ERK aktivieren kann.

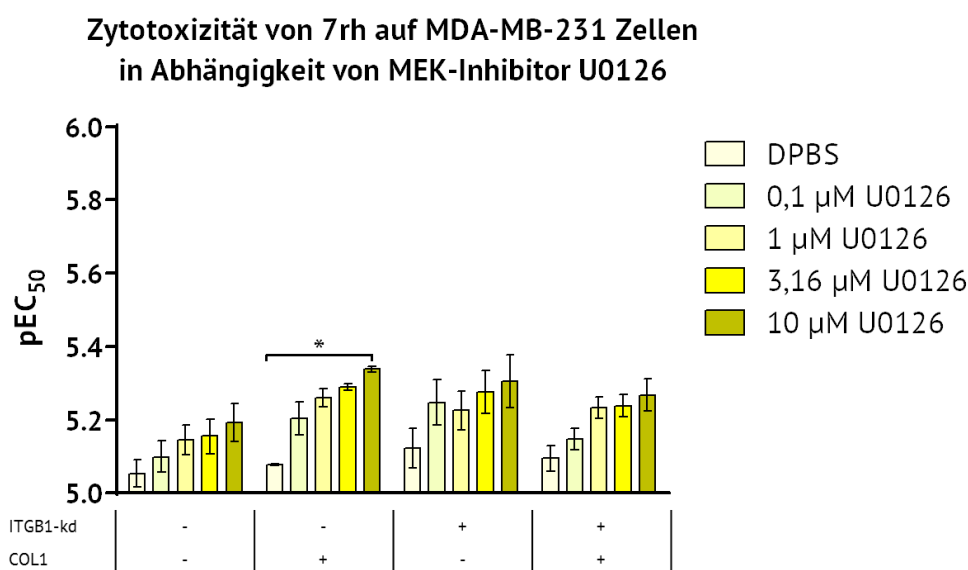


Abb. 6.76 Kombination von DDR1-Inhibitor und MEK-Inhibitor U0126. Übersicht der pEC_{50} -Daten der Zytotoxizitätsuntersuchungen des DDR1-Antagonisten 7rh in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen des MEK-Inhibitors U0126. Die statistischen Untersuchungen wurden mittels t-Test durchgeführt ($n=3$).

6.7.7. Tripel-Kombination

Anhand der synergistischen Kombinationen aus einer Hemmung von ERK einerseits mit einer Inhibition des Rezeptors DDR1 und dessen Signalwege oder andererseits der Blockade des Rezeptors EGFR, lässt sich das Potential von Kombinationstherapien darstellen. Bereits subtoxische Konzentration von Inhibitoren sind dazu in der Lage, die Zellen gegenüber anderen Zytostatika (klassische und zielgerichtete Zytostatika) zu sensitivieren. Weiterführende Versuche sollten diese Inhibitorkombinationen an artifiziell erzeugten Zelllinien mit erworbenen Resistenten gegen DOX- oder MX- untersuchen.

In dieser Arbeit wurden zweidimensionale Kombinationen von Inhibitoren verwendet, sodass insgesamt vier Parameter (Substanz A, Substanz B, ITGB1-Status und COL1) einer Zelllinie verändert wurden. Auf Basis der beiden synergistischen Kombinationen wurde zusätzlich ein Triple-Kombinations-Versuch durchgeführt, um die Kombination von 7rh, SCH772984 und Gefitinib zu untersuchen. Dabei wurde die Gefitinib-Konzentration innerhalb einer Platte konstant gehalten.

Ein signifikanter Einfluss bei Betrachtung der pEC_{50} -Werte konnte in keinem der Ansätze dargelegt werden. Dies basierte meist auf hohen Streuungen und intrinsischen zytotoxischen Effekten, die die Auswertung erschwerten. Dies demonstriert, dass der gewählte Versuchsansatz auf Grund der großen Komplexität an seine Grenzen stößt. Die Variation von zu vielen Parametern kann in einer 2D-Zellkultur und mit Hilfe einer einfachen Messung der Zellviabilität mit pEC_{50} als Messparameter nicht mehr abgebildet werden.

Nichtsdestotrotz stellt die Kombinationstherapie einen vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie dar. Neto *et al.* konnten in einem 3D- bzw. 4D-Ansatz von Inhibitorkombinationen (jeweils EC_{20}) eine komplette Blockade des MAPK-Signalwegs und der Proliferation von NSCLC-Zelllinien erreichen und sprechen in dem Zusammenhang von einer MLD (*multiple low dose*) Therapie [415]. Dabei wurde nicht wie in dieser Arbeit versucht, einen konzentrationsabhängigen Effekt über die Verschiebung der Dosis-Effekt-Kurve und damit des pEC_{50} -Wertes zu finden. Vielmehr wurden die isoliert betrachteten EC_{20} -Konzentrationen der Inhibitoren ermittelt und nach Bliss kombiniert. Diese Strategie sollte für die Kombination von mehr als zwei Inhibitoren in Zukunft verfolgt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

Aufgrund dieser Erkenntnis wurden die erhobenen Daten der Versuche zur Tripeltherapie retrospektiv nach [415] unter reiner Betrachtung der auf *scrambled* und PBS normalisierten Zellviabilität ausgewertet (Abb. 6.77, Tab. 6.14). Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dabei den EC₂₀-Werten, da sie vorher halblogarithmisch verwendet wurden. Es wird ersichtlich, dass im Gegensatz zur Auswertung über den pEC₅₀-Wert, sehr viele signifikante Unterschiede innerhalb der Zellviabilität vorliegen. Zwar sind die dualen Kombinationen aus 7rh und SCH772984, sowie Gefitinib und SCH772984 in sich schon sehr wirksam (im Gegensatz zur Kombination 7rh und Gefitinib), jedoch wird ersichtlich, dass die Tripeltherapie die einzige Kombination ist, die in allen Zellmodifikationen, d.h. auch in *sc* + COL1 eine signifikante Sensitivierung erzeugt. Somit wird das Potential der Tripeltherapie als Sensitivierungsstrategie, um zellulären Resistenzen entgegenzuwirken, deutlich.

Dieser Versuch stellt in der aktuellen Durchführung nicht die optimalen Konzentrationsverhältnisse dar. Insbesondere Gefitinib ist hier teilweise nur subtoxisch eingesetzt, sodass sich der demonstrierte Effekt sicherlich noch steigern lassen könnte. Er soll hier als Ausblick fungieren, um das Potential von Kombinationstherapien darzulegen.

Tab. 6.14 Übersicht über die Zellviabilitäten, normalisiert auf scrambled control + PBS (MW ± SD [%]), A = 7rh (3,16 µM), B = SCH772984 (0,316 µM), C = Gefitinib (3,16 µM)

	CTR	A	B	C	A + B	A + C	B + C	A + B + C
sc	100,0 ± 0,0	88,8 ± 1,8	87,1 ± 4,3	79,1 ± 21,7	54,3 ± 2,5	93,3 ± 14,7	77,2 ± 20,0	65,2 ± 6,3
sc + COL1	83,2 ± 4,6	90,2 ± 5,2	89,0 ± 5,4	86,1 ± 10,5	64,5 ± 6,6	88,0 ± 15,2	71,3 ± 5,5	51,9 ± 5,7
kd	90,8 ± 7,1	69,5 ± 0,7	70,3 ± 1,9	85,0 ± 8,6	23,9 ± 1,9	62,1 ± 8,1	49,0 ± 5,3	21,4 ± 0,9
kd + COL1	60,1 ± 10,4	57,5 ± 1,3	42,0 ± 4,9	55,9 ± 9,1	22,8 ± 3,7	57,4 ± 5,3	32,8 ± 6,2	19,0 ± 3,8

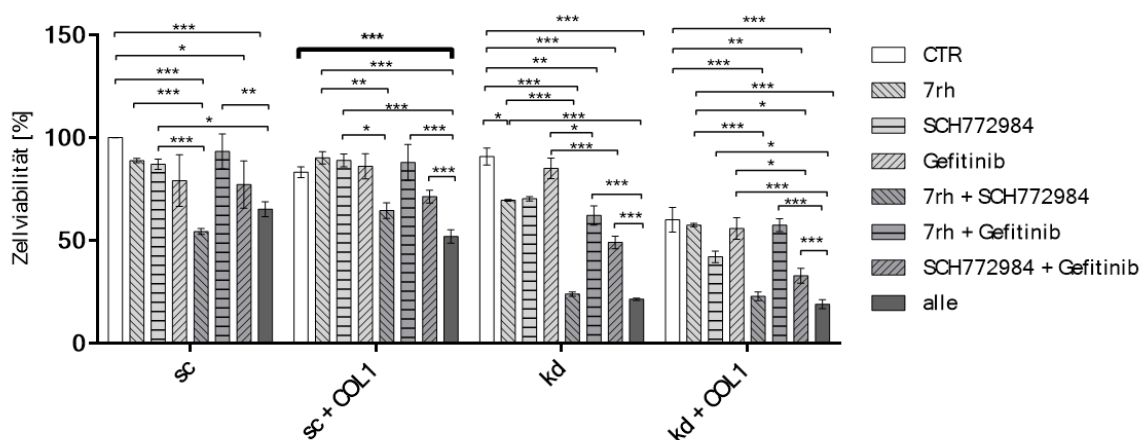


Abb. 6.77 Tripel-Inkubation von 7rh (3,16 µM), SCH772984 (0,316 µM) und Gefitinib (3,16 µM) in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und ITGB1.. Die Probenanordnung lässt sich von links nach rechts in Tab. 6.14 nachvollziehen. Die statistische Analyse wurde mittels two-way ANOVA mit post-hoc Turkey Test analysiert. (n=3 in Duplikaten).

7. Zusammenfassung

Die Wechselwirkung von Krebszellen mit ihrer Mikroumgebung ist ein *hallmark of cancer* und der Grund für zahlreiche Komplikationen während einer Krebserkrankung (Entstehung, Metastasierung, Resistenz). Dabei können die entarteten Zellen durch die Interaktion mit Matrixproteinen oder Wachstumsfaktoren eine *de novo* Resistenz gegenüber antitumoralen Wirkstoffen entwickeln, die sogenannte *environment-mediated drug resistance* (EMDR). Dieser Prozess stellt bei der Resistenzentwicklung nicht nur ein Problem für die primäre Behandlung und Rezidive dar, sondern bietet auch Angriffspunkte für eine pharmakologische Interferenz.

Ziel dieser Arbeit ist, einen Beitrag zum Verständnis der Entstehung der Resistenz in Brustkrebszellen, insbesondere des triple-negativen Brustkrebs (TNBC) zu leisten, bei dem in der klinischen Praxis zielgerichtete therapeutische Optionen fehlen. In diesem Kontext soll besonders die Rolle der kollagenbindenden Rezeptoren Integrin β_1 und DDR1 betrachtet werden.

Diese Arbeit stellt dar, dass die Anwesenheit von Extrazellulärmatrices wie Kollagen Typ 1 (COL1) oder Fibronectin in verschiedenen Brustkrebsentitäten zu einer erhöhten Chemoresistenz gegenüber den klassischen Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin und Mitoxantron führt. Diese Resistenz ist vor allem bei der TNBC Zelllinie MDA-MB-231 stärker ausgeprägt als die Östrogenrezeptor-positive Vergleichszelllinie MCF-7. Dabei bewirkt die Inkubation mit COL1 eine Veränderung der Morphologie und der metabolischen Aktivität.

Während die COL1-vermittelte Chemoresistenz bei Doxorubicin und Mitoxantron mit einer erniedrigten intrazellulären Wirkstoffkonzentration korreliert, kann im Falle des Zytostatikums Cisplatin kein Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration festgestellt werden. Erste Versuche mit ABC-Transporter-Inhibitoren wie XR9577 legen eine Involvierung der ABC-Transporter nahe.

Diese COL1-vermittelten Involvierung von ABC-Transportern wie P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1) und BCRP (ABCG2) konnte funktionell über ABC-Transporter-Assays auf Basis von Calcein AM oder Pheophorbid A Assays, auf Proteinexpressionsebene und auf mRNA-Ebene

nachgewiesen werden. Dabei erhöhen MCF-7-Zellen die ABCB1-Aktivität, während die MDA-MB-231-Zellen eine verstärkte Expression und Aktivität von ABCB1 und ABCG2 aufweisen.

Im weiteren Verlauf wurde die Regulation des COL1-bindenden Adhäsionsrezeptors Integrin $\alpha_2\beta_1$ innerhalb der Resistenzentwicklung untersucht. Als mesenchymale Krebsentität exprimieren MDA-MB-231-Zellen das Integrin deutlich stärker als die epithelialen MCF-7-Zellen. Die Adhäsionsfähigkeit lässt sich in beiden Zelllinien mittels Integrin-Aktivator Mn^{2+} verbessern sowie durch blockierende Antikörper inhibieren. Die Interaktion mit COL1 und der Einfluss von Zytostatika erzeugt eine Deregulation des COL1-bindenden Integrins auf der Zelloberfläche. Zytostatika führen zu einer vermehrten Expression des Integrins, während COL1 die extrazelluläre Lokalisation verringert. Eine sterische Blockade mittels eines extrazellulär-inhibierenden ITGB1-Antikörpers kann den COL1-vermittelten, resistenz-erhöhenden Effekt und die Aktivierung der ABC-Transporter verhindern.

Im Folgenden wurde ein lentiviraler, shRNA-basierter *knockdown* von ITGB1 der beiden Zelllinien erzeugt. In MCF-7-Zellen resultiert eine verringerte Chemoresistenz und Adhärenz an COL1. Paradoxe Weise bewirkt der ITGB1-*knockdown* bei MDA-MB-231-Zellen eine erhöhte Chemoresistenz und die Fähigkeit zu Adhäsion bleibt weitestgehend erhalten, wenngleich die Morphologie der Zellen vermehrt durch Zell-Zell-Kontakte charakterisiert ist. Die Aktivität der ABC-Transporter ist innerhalb der MCF-7-*kd*-Zellen geringer, während der ITGB1-*kd* eine deutliche Steigerung der Aktivität und Expression der Transportproteine in MDA-MB-231-Zellen induziert.

Um diese Effekte mechanistisch aufzuklären, wurde ein Screening des Phosphoproteoms durchgeführt. Auf Ebene der Signalkaskaden kann eine verstärkte Aktivierung von MAPK sowohl durch COL1 und den ITGB1-*knockdown* in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Basierend auf dieser Erkenntnis kann eine erhöhte Sensitivität gegenüber MEK- (Trametinib) und ERK1/2-Inhibitoren (SCH772984) im *knockdown* festgestellt werden. Kompensatorisch wird im ITGB1-*knockdown* von MDA-MB-231 das Protein Vimentin hochreguliert, wodurch sie sensitiver gegenüber dem Vimentin-Inhibitor FiVe1 werden.

Während in unveränderten Zellen die Aktivierung durch COL1 direkt über das Integrin β_1 verläuft, kann durch dessen *knockdown* eine kompensatorische Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Phosphorylierung von pEGFR,

die beim MDA-MB-231-Wildtyp in Gegenwart von COL1 auftritt, ist auf eine verstärkte EGF-Sezernierung zurückzuführen, während im *knockdown* die Aktivierung EGF-unabhängig verläuft. Andererseits führt der *knockdown* bei MDA-MB-231-Zellen zu einer deutlich verstärkten Expression von DDR1, das neben der Aktivierung von Signalkaskaden die Adhärenzhomöostase erklärt. Sowohl gegenüber dem DDR1-Inhibitor 7rh als auch dem EGFR-Inhibitor Gefitinib induziert der *knockdown* eine erhöhte Sensitivität. Ein Screening des Adhäsoms legt die kompensatorische Erhöhung des Integrin β_4 im ITGB1-*knockdown* dar.

Diese mechanistischen Befunde wurden anschließend in Kombinationsansätzen ausgenutzt werden, um die Zellen *in vitro* zu sensitivieren. Der gleichzeitige Einsatz von Signalinhibitoren mit klassischen Zytostatika bewirkt vor allem bei der Kombination des ERK1/2-Inhibitor mit Doxorubicin und Mitoxantron eine Sensitivierung. Da der ERK1/2-Inhibitor selbst keine Affinität zu den betrachteten ABC-Transporten besitzt, kann mit Hilfe dieses Inhibitors die ERK1/2-Abhängigkeit des ABC-Transporter-vermittelten Efflux bewiesen werden. Funktionell kann der ERK-Inhibitor den erhöhten Efflux vermittelt durch die Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2 durch COL1-Bindung oder ITGB1-*knockdown* verhindern. Auf Proteinebene kann die Expressionssteigerung von ABCG2 durch den ERK1/2-Inhibitor reduziert werden.

Der Transkriptionsfaktor CREB wird sowohl in MCF-7- als auch in MDA-MB-231-Zellen verstärkt phosphoryliert. Die Inhibition von CREB über den Inhibitor 666-15 konnte in den Östrogenrezeptor-positiven MCF-7-Zellen eine deutliche Sensitivierung gegenüber Zytostatika bewirken, die aber in den TNBC MDA-MB-231-Zellen nur bei Mitoxantron einen sensitivierenden Effekt entfalten.

Die Inhibition der Phosphorylierung von DDR1 bewirkt neben einer Verminderung der Adhäsionsfähigkeit beider Zelllinien eine kompensatorische Aktivierung von pERK1/2 in MDA-MB-231-Zellen. Folglich erzeugt eine simultane Inhibition von ERK1/2 durch SCH772984 und von DDR1 durch 7rh einen deutlichen synergistischen Effekt, vor allem in MDA-MB-231-ITGB1-*knockdown* Zellen.

Die Verwendung des EGFR-Inhibitors Gefitinib ruft als einzig verwendeter Inhibitor eine verstärkte Wirkung in Gegenwart von COL1 hervor und spiegelt damit die Aktivierung des pEGFR-*signalings* induziert durch COL1 und den ITGB1-kd wider. Die Kombination von EGFR-

Zusammenfassung

Inhibition onkogener Signalwege zur Chemosensitivierung

Hemmung mit einer ERK1/2-Inhibition veranschaulicht eine Synergie einer dualen Hemmung der MAPK-Signalkaskade an mehreren Stellen.

Insgesamt wird deutlich, dass die Wechselwirkung zwischen Mikroumgebung multifaktoriell ist. Der selektive Fokus auf eine Struktur im Rahmen einer pharmakologischen Inhibition oder ggf. gentechnischen Beeinflussung stellt keinen vielversprechenden Ansatz dar, da triple-negative Brustkrebs-Zellen diverse Kompensationsmechanismen ausbilden können. Vielmehr kann durch eine Aufklärung und Verständnis der Signalkaskaden und Mechanismen die Möglichkeit der Kombination von Wirkstoffen ausgeschöpft werden, die im Zusammenspiel synergistische antitumorale Effekte erzeugen. Denn Kombinationen von Wirkstoffen können Resistenzen überwinden und stellen ggf. neue Therapieoptionen dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Signalwege und Mechanismen sind in **Abb. 7.1** zum besseren Verständnis für MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen graphisch aufgearbeitet.

TNBC (MDA-MB-231)

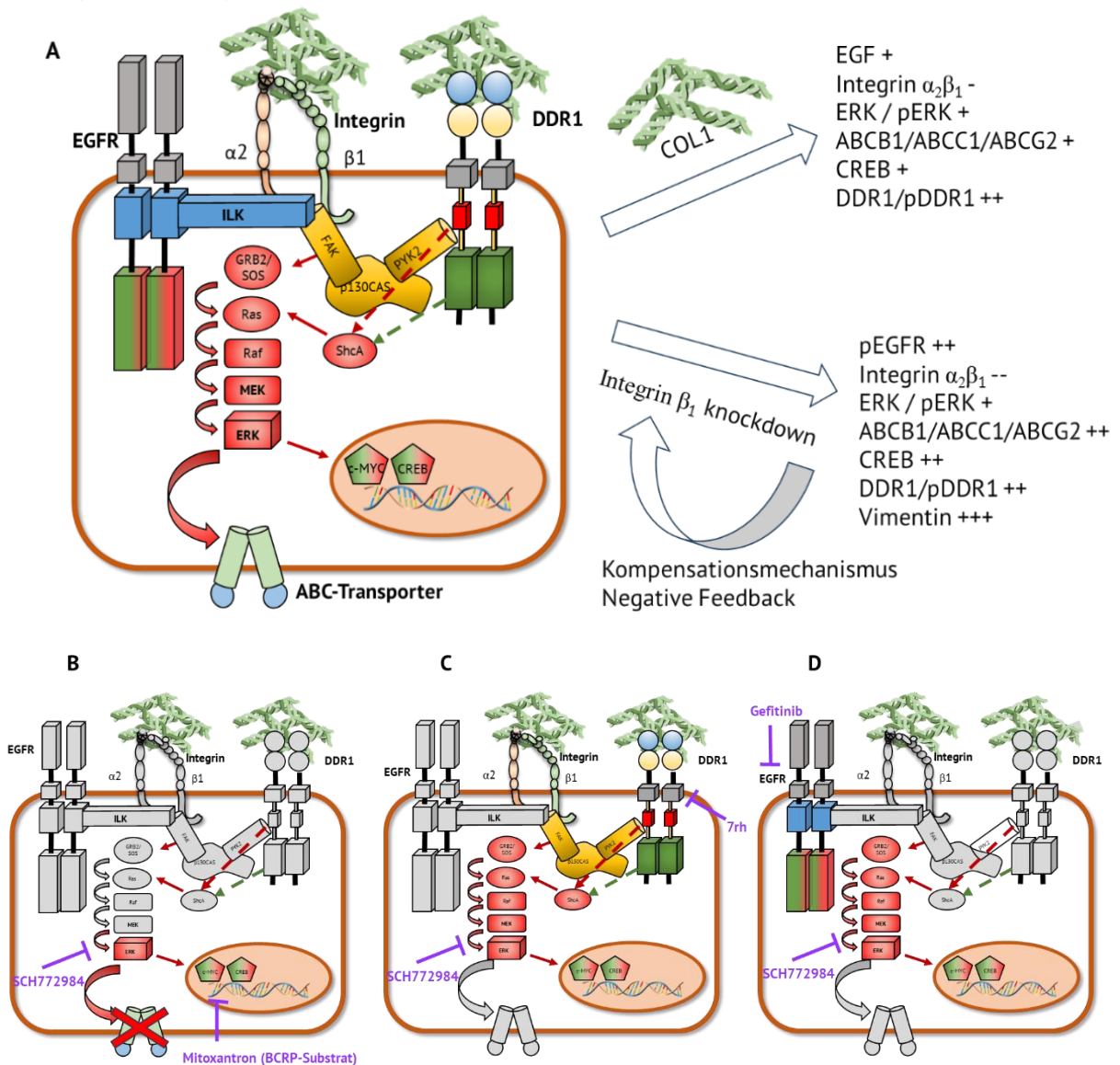


Abb. 7.1 Graphische Zusammenfassung der Arbeit. A) Darstellung der Regulationsmechanismen am Beispiel MDA-MB-231-Zellen. MCF-7-Zellen verhalten sich in vielen Regulationsmechanismen ähnlich, aber meist schwächer ausgeprägt. B) Synergistischer Effekt von ERK-Inhibitor SCH772984 und dem Zytostatikum Mitoxantron. COL1 bewirkt eine ERK-vermittelte Aktivierung bzw. Hochregulation von ABC-Transportern wie BCRP. Die Hemmung von ERK sorgt für das geringere Transporteraktivität und damit auch Ausschleusen des Zytostatikums. C) Synergistischer Effekt von SCH772984 mit DDR1-Inhibitor 7rh. Der *knockdown* und die Interaktion bewirkt eine Hochregulation von DDR1 bzw. pDDR1. Die Blockade mittels 7rh führt dagegen zu einer pERK-Aktivierung, die mit SCH772984 antagonisiert werden kann. D) Synergistischer Effekt von SCH772984 und Gefitinib als dualen Angriffspunkt an den MAP-Kinasen. Es wird sowohl der EGF-Rezeptor als auch ERK inhibiert.

8. Ausblick

Diese Arbeit legt dar, dass tripel-negativer Brustkrebs durch das Finden geeigneter Zielstrukturen für eine zielgerichtete Therapie empfänglich ist. Integrine stellen in diesem Zusammenhang ein interessantes, aber auch ambivalentes Target dar. Die sterische Inhibition mittels blockierender Antikörper konnte eine Sensitivierung gegenüber klassischer Chemotherapie bewirken, die Herabregulation von Integrin β_1 führte jedoch zu einer Erhöhung des MAPK *signalings* sowie von ABC-Transportern, was insgesamt zu einer erhöhten Resistenz gegen die ausgewählten Zytostatika führte. Dieses ambivalente Verhältnis spiegelt sich in den klinischen Studien wider. Die pauschale Aussage, dass die Expression von ITGB1 mit einem besseren oder schlechteren *outcome* einer Tumorerkrankung korreliert, lässt sich nicht einmal innerhalb der Tumorentität von Brustkrebs eindeutig klären.

In dem Zusammenhang hat die klassische *in vitro* Präklinik Bedeutung, um wirksame Inhibitor-Kombinationen innerhalb von Zellkultur-Systemen zu finden. Einige Experten gehen sogar soweit zu behaupten, dass für die meisten Zielstrukturen bereits Inhibitoren entwickelt wurden, der Fokus sich nun aber auf das Ausnutzen zellulärer Mechanismen richten sollte. Dazu sollte die Kombination von Inhibitoren verstärkt untersucht werden, um Effekte mit weiteren zellulären Parametern auch in anderer TNBC-Zelllinien zu korrelieren. Denn allein die Klasse des TNBC ist in sich schon sehr heterogen und wird nur aus Mangel an weiteren Kategorien nicht stärker unterschieden. Neben dem ITGB1 könnten diese Parameter der Status von Rezeptortyrosinkinasen wie DDR1/2 und EGFR sein.

Da die klassische zweidimensionale Zellkultur nur begrenzte Aussagekraft hat, sollte perspektivisch innerhalb der *in vitro* Forschung ein qualitatives *up-scaling* über die 3D-Zellkultur (*mammospheres*) bis zu *in vivo* Methoden verwendet werden, um die Chemoresistenz-induzierenden Effekte der Extrazellulärmatrix, sowie deren Überwindung durch die diskutierten Inhibitoren zu verifizieren.

Insgesamt kristallisieren sich in dieser Arbeit die Vorteile von Kombinationstherapien heraus, insbesondere im Rahmen der Signaltransduktionen von Adhäsionsrezeptoren und des *microenvironments*. Diese kombinatorischen Ansätze beinhalten vielfältiges Potential zur Chemoresistenz-Überwindung, werden aber bislang noch wenig klinisch angewandt.

9. Anhang

9.1. Referenzen

- 1 *Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S et al.* Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet* 2020; 395: 785 – 794
- 2 Global Cancer Observatory (17.08.2020). Im Internet: <https://gco.iarc.fr/>; Stand: 17.08.2020
- 3 *Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE et al.* Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians* 2022; 72: 7 – 33
- 4 *Jordan VC.* Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nature reviews. Drug discovery* 2003; 2: 205 – 213
- 5 *Loria R, Vici P, Di Lisa FS et al.* Cross-Resistance Among Sequential Cancer Therapeutics: An Emerging Issue. *Frontiers in oncology* 2022; 12: 877380
- 6 *Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B et al.* Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *Journal of medical genetics* 2016; 53: 465 – 471
- 7 *Mavaddat N, Rebbeck TR, Lakhani SR et al.* Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms. *Breast Cancer Research : BCR* 2010; 12: R28
- 8 *Liu J, Shen J-X, Wu H-T et al.* Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target. *Discovery medicine* 2018; 25: 211 – 223
- 9 *McCormack VA, dos Santos Silva I.* Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006; 15: 1159 – 1169
- 10 *Gail MH, Mai PL.* Comparing breast cancer risk assessment models. *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102: 665 – 668
- 11 *Brentnall AR, Harkness EF, Astley SM et al.* Mammographic density adds accuracy to both the Tyrer-Cuzick and Gail breast cancer risk models in a prospective UK screening cohort. *Breast Cancer Res* 2015; 17: 147
- 12 *Kerlikowske K, Zhu W, Tosteson ANA et al.* Identifying women with dense breasts at high risk for interval cancer: a cohort study. *Annals of internal medicine* 2015; 162: 673 – 681
- 13 *Houssami N, Abraham LA, Kerlikowske K et al.* Risk factors for second screen-detected or interval breast cancers in women with a personal history of breast cancer participating in mammography screening. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a*

- publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 2013; 22: 946 – 961
- 14 *Onkologie L*. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (Version 4.4 - Juni 2021)
 - 15 *Petrelli F, Viale G, Cabiddu M et al*. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast cancer research and treatment* 2015; 153: 477 – 491
 - 16 *Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A et al*. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015; 26: 1533 – 1546
 - 17 *Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S et al*. Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 2012; 20: 214 – 263
 - 18 *Iwamoto T, Booser D, Valero V et al*. Estrogen receptor (ER) mRNA and ER-related gene expression in breast cancers that are 1% to 10% ER-positive by immunohistochemistry. *JCO* 2012; 30: 729 – 734
 - 19 *Prabhu JS, Korlimarla A, Desai K et al*. A Majority of Low (1-10%) ER Positive Breast Cancers Behave Like Hormone Receptor Negative Tumors. *Journal of Cancer* 2014; 5: 156 – 165
 - 20 *Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al*. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 8418 – 8423
 - 21 *Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO et al*. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 95: 1482 – 1485
 - 22 *Carey L, Winer E, Viale G et al*. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nature reviews. Clinical oncology* 2010; 7: 683 – 692
 - 23 *Lehmann BD, Jovanović B, Chen X et al*. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS one* 2016; 11: e0157368
 - 24 *Chen X, Li J, Gray WH et al*. TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer informatics* 2012; 11: 147 – 156
 - 25 *Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al*. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* 2011; 121: 2750 – 2767
 - 26 *Yin L, Duan J-J, Bian X-W et al*. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research : BCR* 2020; 22: 61
 - 27 *Hickey BE, Francis DP, Lehman M*. Sequencing of chemotherapy and radiotherapy for early breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013: CD005212
 - 28 *Cortazar P, Zhang L, Untch M et al*. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet* 2014; 384: 164 – 172
-

- 29 Francis P, Crown J, Di Leo A et al. Adjuvant chemotherapy with sequential or concurrent anthracycline and docetaxel: Breast International Group 02-98 randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2008; 100: 121 – 133
- 30 Eiermann W, Pienkowski T, Crown J et al. Phase III study of doxorubicin/cyclophosphamide with concomitant versus sequential docetaxel as adjuvant treatment in patients with human epidermal growth factor receptor 2-normal, node-positive breast cancer: BCIRG-005 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29: 3877 – 3884
- 31 Eisen A, Fletcher GG, Gandhi S et al. Optimal systemic therapy for early breast cancer in women: a clinical practice guideline. *Current Oncology* 2015; 22: S67-81
- 32 Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2012: CD006243
- 33 Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in oncology* 2012; 2: 62
- 34 Nami B, Maadi H, Wang Z. Mechanisms Underlying the Action and Synergism of Trastuzumab and Pertuzumab in Targeting HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers* 2018; 10
- 35 Masuda H, Baggerly KA, Wang Y et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013; 19: 5533 – 5540
- 36 Tutt A, Tovey H, Cheang MCU et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nature medicine* 2018; 24: 628 – 637
- 37 Robson ME, Tung N, Conte P et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2019; 30: 558 – 566
- 38 Nanda R, Chow LQM, Dees EC et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2016; 34: 2460 – 2467
- 39 Traina TA, Miller K, Yardley DA et al. Results from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer (TNBC). *JCO* 2015; 33: 1003
- 40 Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 2015; 14: 769 – 778
- 41 Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52: 108 – 118
- 42 da Silva JL, Cardoso Nunes NC, Izetti P et al. Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Critical reviews in oncology/hematology* 2020; 145: 102855

- 43 Ogden A, Bhattarai S, Sahoo B et al. Combined HER3-EGFR score in triple-negative breast cancer provides prognostic and predictive significance superior to individual biomarkers. *Scientific reports* 2020; 10: 3009
- 44 Liu D, He J, Yuan Z et al. EGFR expression correlates with decreased disease-free survival in triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2012; 29: 401 – 405
- 45 Park HS, Jang MH, Kim EJ et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2014; 27: 1212 – 1222
- 46 Nakai K, Hung M-C, Yamaguchi H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *American Journal of Cancer Research* 2016; 6: 1609 – 1623
- 47 Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 2015; 161: 205 – 214
- 48 Cao Z, Liao Q, Su M et al. AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? *Cancer letters* 2019; 459: 30 – 40
- 49 Borghaei H, Langer CJ, Gadgeel S et al. 24-Month Overall Survival from KEYNOTE-021 Cohort G: Pemetrexed and Carboplatin with or without Pembrolizumab as First-Line Therapy for Advanced Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2019; 14: 124 – 129
- 50 Paz-Ares L, Luft A, Vicente D et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* 2018; 379: 2040 – 2051
- 51 Mok TSK, Wu Y-L, Kudaba I et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 2019; 393: 1819 – 1830
- 52 Rini BI, Plimack ER, Stus V et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2019; 380: 1116 – 1127
- 53 Gottesman MM, Lavi O, Hall MD et al. Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2016; 56: 85 – 102
- 54 Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature reviews. Cancer* 2009; 9: 665 – 674
- 55 Dickreuter E, Cordes N. The cancer cell adhesion resistome: mechanisms, targeting and translational approaches. *Biological Chemistry* 2017; 398: 721 – 735
- 56 Schmidmaier R, Baumann P. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Current medicinal chemistry* 2008; 15: 978 – 990
- 57 Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* 2014; 740: 364 – 378
- 58 Thorn CF, Oshiro C, Marsh S et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics* 2011; 21: 440 – 446

- 59 *Araki T, Yashima H, Shimizu K et al.* Review of the treatment of non-small cell lung cancer with gefitinib. *Clinical Medicine Insights. Oncology* 2012; 6: 407 – 421
- 60 *Fox EJ.* Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology* 2004; 63: S15-8
- 61 *Pan S-T, Li Z-L, He Z-X et al.* Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2016; 43: 723 – 737
- 62 *Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31: 1869 – 1883
- 63 *Crawford RR, Potukuchi PK, Schuetz EG et al.* Beyond Competitive Inhibition: Regulation of ABC Transporters by Kinases and Protein-Protein Interactions as Potential Mechanisms of Drug-Drug Interactions. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2018; 46
- 64 *Azad AKM, Lawen A, Keith JM.* Prediction of signaling cross-talks contributing to acquired drug resistance in breast cancer cells by Bayesian statistical modeling. *BMC systems biology* 2015; 9: 2
- 65 *Januchowski R, Świerczewska M, Sterzyńska K et al.* Increased Expression of Several Collagen Genes is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines. *Journal of Cancer* 2016; 7: 1295 – 1310
- 66 *Yeldag G, Rice A, del Río Hernández A.* Chemoresistance and the Self-Maintaining Tumor Microenvironment. *Cancers* 2018; 10
- 67 *Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA et al.* Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2015; 159: 166 – 177
- 68 *Al Tameemi W, Dale TP, Al-Jumaily RMK et al.* Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2019; 7: 4
- 69 *Katz E, Streuli CH.* The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39: 715 – 726
- 70 *Hanahan D, Weinberg RA.* The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57 – 70
- 71 *Hanahan D, Weinberg RA.* Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646 – 674
- 72 *Hanahan D.* Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery* 2022; 12: 31 – 46
- 73 *Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM.* The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO reports* 2014; 15: 1243 – 1253
- 74 *Tanabe S, Quader S, Cabral H et al.* Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies. *Frontiers in pharmacology* 2020; 11: 904
- 75 *Morris BA, Burkel B, Ponik SM et al.* Collagen Matrix Density Drives the Metabolic Shift in Breast Cancer Cells. *EBioMedicine* 2016; 13: 146 – 156
- 76 *Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørli T et al.* Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *The Journal of pathology* 2008; 214: 357 – 367
- 77 *Giussani M, Landoni E, Merlino G et al.* Extracellular matrix proteins as diagnostic markers of breast carcinoma. *Journal of cellular physiology* 2018; 233: 6280 – 6290

- 78 Wang JP, Hielscher A. Fibronectin: How Its Aberrant Expression in Tumors May Improve Therapeutic Targeting. *Journal of Cancer* 2017; 8: 674 – 682
- 79 Xu S, Xu H, Wang W et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *Journal of translational medicine* 2019; 17: 309
- 80 Xiong G, Deng L, Zhu J et al. Prolyl-4-hydroxylase α subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. *BMC Cancer* 2014; 14: 1
- 81 Penet M-F, Kakkad S, Pathak AP et al. Structure and Function of a Prostate Cancer Dissemination-Permissive Extracellular Matrix. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017; 23: 2245 – 2254
- 82 Mueller S, Sandrin L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepatic medicine : evidence and research* 2010; 2: 49 – 67
- 83 Levental KR, Yu H, Kass L et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009; 139: 891 – 906
- 84 Deville SS, Cordes N. The Extracellular, Cellular, and Nuclear Stiffness, a Trinity in the Cancer Resistome-A Review. *Frontiers in oncology* 2019; 9: 1376
- 85 Ten Y. Effects of Type I Collagen and Fibronectin on Regulation of Breast Cancer Cell Biological and Biomechanical Characteristics. *J. Med. Biol. Eng.* 2014; 34: 62
- 86 Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature reviews. Drug discovery* 2014; 13: 904 – 927
- 87 Anand M, van Meter TE, Fillmore HL. Epidermal growth factor induces matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression and invasion in glioma cell lines via the MAPK pathway. *Journal of neuro-oncology* 2011; 104: 679 – 687
- 88 Vitale D, Kumar Katakam S, Greve B et al. Proteoglycans and glycosaminoglycans as regulators of cancer stem cell function and therapeutic resistance. *The FEBS journal* 2019; 286: 2870 – 2882
- 89 Pfankuchen DB, Stölting DP, Schlesinger M et al. Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Biochemical pharmacology* 2015; 97: 147 – 157
- 90 Zeltz C, Gullberg D. The integrin-collagen connection--a glue for tissue repair? *Journal of cell science* 2016; 129: 653 – 664
- 91 Martino D de, Bravo-Cordero JJ. Collagens in Cancer: Structural Regulators and Guardians of Cancer Progression. *Cancer Res* 2023; 83: 1386 – 1392
- 92 Lambert AW, Ozturk S, Thiagalingam S. Integrin signaling in mammary epithelial cells and breast cancer. *ISRN Oncology* 2012; 2012: 493283
- 93 Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 2002; 110: 673 – 687
- 94 Ye F, Kim C, Ginsberg MH. Reconstruction of integrin activation. *Blood* 2012; 119: 26 – 33
- 95 Chen J, Salas A, Springer TA. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nature structural biology* 2003; 10: 995 – 1001
- 96 Du J, Chen X, Liang X et al. Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America 2011; 108: 9466 – 9471
- 97 *Kinashi T.* Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology* 2005; 5: 546 – 559
- 98 *Tulla M, Pentikäinen OT, Viitasalo T et al.* Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 48206 – 48212
- 99 *Knight CG, Morton LF, Peachey AR et al.* The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275: 35 – 40
- 100 *Adorno-Cruz V, Liu H.* Regulation and functions of integrin $\alpha 2$ in cell adhesion and disease. *Genes & diseases* 2019; 6: 16 – 24
- 101 *Bertucci F, Salas S, Eysteris S et al.* Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004; 23: 1377 – 1391
- 102 *Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B et al.* Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment* 2006; 97: 67 – 72
- 103 *Hofmann G, Langsenlehner U, Langsenlehner T et al.* Single nucleotide polymorphisms of integrin alpha-2 and beta-3 genes are not associated with relapse-free and overall survival in colorectal cancer patients. *Anticancer research* 2011; 31: 1373 – 1377
- 104 *Klahan S, Huang W-C, Chang C-M et al.* Gene expression profiling combined with functional analysis identify integrin beta1 (ITGB1) as a potential prognosis biomarker in triple negative breast cancer. *Pharmacological research* 2016; 104: 31 – 37
- 105 *Alday-Parejo B, Stupp R, Rüegg C.* Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-Cancer Therapy? *Cancers* 2019; 11
- 106 *Nisticò P, Di Modugno F, Spada S et al.* $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins: from breast development to clinical practice. *Breast Cancer Research : BCR* 2014; 16: 459
- 107 *Diaz LK, Cristofanilli M, Zhou X et al.* Beta4 integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2005; 18: 1165 – 1175
- 108 *Friedrichs K, Ruiz P, Franke F et al.* High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer research* 1995; 55: 901 – 906
- 109 *Stewart RL, O'Connor KL.* Clinical significance of the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in human malignancies. *Lab Invest* 2015; 95: 976 – 986
- 110 *Maya-Mendoza A, Bartek J, Jackson DA et al.* Cellular microenvironment controls the nuclear architecture of breast epithelia through $\beta 1$ -integrin. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2016; 15: 345 – 356
- 111 *Aoudjit F, Vuori K.* Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemotherapy research and practice* 2012; 2012: 283181
-

- 112 Nam K, Son S-H, Oh S et al. Binding of galectin-1 to integrin β 1 potentiates drug resistance by promoting survivin expression in breast cancer cells. *Oncotarget* 2017; 8: 35804 – 35823
- 113 Vaynberg J, Fukuda K, Lu F et al. Non-catalytic signaling by pseudokinase ILK for regulating cell adhesion. *Nat Commun* 2018; 9: 1 – 15
- 114 Górska A, Mazur AJ. Integrin-linked kinase (ILK): the known vs. the unknown and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022; 79: 100
- 115 Sakai T, Li S, Docheva D et al. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes & development* 2003; 17: 926 – 940
- 116 Beetham H, Griffith BGC, Murina O et al. Loss of Integrin-linked kinase sensitizes breast cancer to SRC inhibitors. *Cancer Res* 2021
- 117 Weis SM, Lim S-T, Lutu-Fuga KM et al. Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *Journal of Cell Biology* 2008; 181: 43 – 50
- 118 Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 598 – 610
- 119 Brami-Cherrier K, Gervasi N, Arsenieva D et al. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *The EMBO Journal* 2014; 33: 356 – 370
- 120 Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science* 2010; 123: 1007 – 1013
- 121 Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 56 – 68
- 122 Guan J-L. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB life* 2010; 62: 268 – 276
- 123 Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anokis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1833: 3481 – 3498
- 124 Provenzano PP, Keely PJ. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *Journal of cell science* 2011; 124: 1195 – 1205
- 125 Lim S-T, Chen XL, Lim Y et al. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular Cell* 2008; 29: 9 – 22
- 126 Rammal H, Saby C, Magnien K et al. Discoidin Domain Receptors: Potential Actors and Targets in Cancer. *Frontiers in pharmacology* 2016; 7: 55
- 127 Valiathan RR, Marco M, Leitinger B et al. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Reviews* 2012; 31: 295 – 321
- 128 Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E et al. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Molecular Cell* 1997; 1: 25 – 34
- 129 Vogel W, Gish GD, Alves F et al. The Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases Are Activated by Collagen. *Molecular Cell* 1997; 1: 13 – 23
- 130 Leitinger B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International review of cell and molecular biology* 2014; 310: 39 – 87
-

- 131 Yeh Y-C, Lin H-H, Tang M-J. Dichotomy of the function of DDR1 in cells and disease progression. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 2019; 1866: 118473
- 132 Gadiya M, Chakraborty G. Signaling by discoidin domain receptor 1 in cancer metastasis. *Cell Adhesion & Migration* 2018; 12: 315 – 323
- 133 Croissant C, Tuarihionoa A, Bacou M et al. DDR1 and DDR2 physical interaction leads to signaling interconnection but with possible distinct functions. *Cell Adhesion & Migration* 2018; 12: 324 – 334
- 134 Eswaramoorthy R, Wang C-K, Chen W-C et al. DDR1 regulates the stabilization of cell surface E-cadherin and E-cadherin-mediated cell aggregation. *Journal of cellular physiology* 2010; 224: 387 – 397
- 135 Wang C-Z, Yeh Y-C, Tang M-J. DDR1/E-cadherin complex regulates the activation of DDR1 and cell spreading. *American journal of physiology. Cell physiology* 2009; 297: C419-29
- 136 Chen H-R, Yeh Y-C, Liu C-Y et al. DDR1 promotes E-cadherin stability via inhibition of integrin- β 1-Src activation-mediated E-cadherin endocytosis. *Scientific reports* 2016; 6: 36336
- 137 Xu H, Bihan D, Chang F et al. Discoidin domain receptors promote α 1 β 1- and α 2 β 1- integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. *PLOS ONE* 2012; 7: e52209
- 138 Carafoli F, Hohenester E. Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1834: 2187 – 2194
- 139 Leitinger B. Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 16761 – 16769
- 140 Leitinger B, Kwan APL. The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2006; 25: 355 – 364
- 141 Ichikawa O, Osawa M, Nishida N et al. Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2. *The EMBO Journal* 2007; 26: 4168 – 4176
- 142 Abdulhussein R, McFadden C, Fuentes-Prior P et al. Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 31462 – 31470
- 143 Juskaite V, Corcoran DS, Leitinger B. Collagen induces activation of DDR1 through lateral dimer association and phosphorylation between dimers. *eLife* 2017; 6
- 144 Lu KK, Trcka D, Bendeck MP. Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2011; 20: 71 – 76
- 145 Fu H-L, Valiathan RR, Arkwright R et al. Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288: 7430 – 7437
- 146 Mehta V, Chander H, Munshi A. Complex roles of discoidin domain receptor tyrosine kinases in cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the*

- Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 2021
- 147 Hypoxia-inducible factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. *Cancer Res* (2002) 62 (12): 3387–3394
- 148 *Carafoli F, Mayer MC, Shiraishi K et al.* Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure* (London, England : 1993) 2012; 20: 688 – 697
- 149 *Fu H-L, Valiathan RR, Payne L et al.* Glycosylation at Asn211 regulates the activation state of the discoidin domain receptor 1 (DDR1). *The Journal of biological chemistry* 2014; 289: 9275 – 9287
- 150 *Lemeer S, Bluwstein A, Wu Z et al.* Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1. *Journal of proteomics* 2012; 75: 3465 – 3477
- 151 *Iwai LK, Payne LS, Luczynski MT et al.* Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *The Biochemical journal* 2013; 454: 501 – 513
- 152 *Ikeda K, Wang L-H, Torres R et al.* Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 19206 – 19212
- 153 *Ongusaha PP, Kim J, Fang L et al.* p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. *The EMBO Journal* 2003; 22: 1289 – 1301
- 154 *Das S, Ongusaha PP, Yang YS et al.* Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kappaB pathway activation. *Cancer Res* 2006; 66: 8123 – 8130
- 155 *Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K et al.* Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 15449 – 15454
- 156 *Chetoui N, El Azreq M-A, Boisvert M et al.* Discoidin domain receptor 1 expression in activated T cells is regulated by the ERK MAP kinase signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry* 2011; 112: 3666 – 3674
- 157 *Ruiz PA, Jarai G.* Collagen I induces discoidin domain receptor (DDR) 1 expression through DDR2 and a JAK2-ERK1/2-mediated mechanism in primary human lung fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286: 12912 – 12923
- 158 *Staudinger LA, Spano SJ, Lee W et al.* Interactions between the discoidin domain receptor 1 and β 1 integrin regulate attachment to collagen. *Biology Open* 2013; 2: 1148 – 1159
- 159 *Vogel W, Brakebusch C, Fässler R et al.* Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275: 5779 – 5784
- 160 *Toscani AM, Aguilera P, Coluccio Leskow F.* Discoidin domain receptor 1 regulates ErbB2/ErbB3 signaling in mammary epithelial cells. *FEBS Letters* 2022; 596: 2795 – 2807
-

- 161 Vogel WF, Aszódi A, Alves F et al. Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Molecular and cellular biology* 2001; 21: 2906 – 2917
- 162 Zhong X, Zhang W, Sun T. DDR1 promotes breast tumor growth by suppressing antitumor immunity. *Oncology reports* 2019; 42: 2844 – 2854
- 163 Wu A, Chen Y, Liu Y et al. miR-199b-5p inhibits triple negative breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting DDR1. *Oncology letters* 2018; 16: 4889 – 4896
- 164 Toy KA, Valiathan RR, Núñez F et al. Tyrosine kinase discoidin domain receptors DDR1 and DDR2 are coordinately deregulated in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2015; 150: 9 – 18
- 165 Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta* 2007; 1773: 1376 – 1387
- 166 Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 2011; 75: 50 – 83
- 167 Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 2001; 22: 153 – 183
- 168 Braicu C, Buse M, Busuioc C et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* 2019; 11
- 169 Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD et al. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* 2017; 170: 605 – 635
- 170 He Y, Sun MM, Zhang GG et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy* 2021; 6: 425
- 171 Burke JE, Perisic O, Masson GR et al. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110 α (PIK3CA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 15259 – 15264
- 172 Burke JE, Williams RL. Synergy in activating class I PI3Ks. *Trends in biochemical sciences* 2015; 40: 88 – 100
- 173 Liu S, Tang Y, Yan M et al. PIK3CA mutation sensitizes breast cancer cells to synergistic therapy of PI3K inhibition and AMPK activation. *Investigational new drugs* 2018; 36: 763 – 772
- 174 Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H et al. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; 18: 1777 – 1789
- 175 Miled N, Yan Y, Hon W-C et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science (New York, N.Y.)* 2007; 317: 239 – 242
- 176 Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014; 505: 495 – 501

- 177 *Wieland A, Strissel PL, Schorle H et al.* Brain and Breast Cancer Cells with PTEN Loss of Function Reveal Enhanced Durotaxis and RHOB Dependent Amoeboid Migration Utilizing 3D Scaffolds and Aligned Microfiber Tracts. *Cancers* 2021; 13
- 178 *DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE et al.* Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2004; 15: 1510 – 1516
- 179 *Suh HN, Han HJ.* Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through $\alpha 2 \beta 1$ integrin- and DDR1-dependent Bmi-1. *Journal of cellular physiology* 2011; 226: 3422 – 3432
- 180 *Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N et al.* Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *Journal of Cell Biology* 2008; 180: 1277 – 1289
- 181 *Yeh Y-C, Wang C-Z, Tang M-J.* Discoidin domain receptor 1 activation suppresses $\alpha 2 \beta 1$ integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity. *Journal of cellular physiology* 2009; 218: 146 – 156
- 182 *Dans M, Gagnoux-Palacios L, Blaikie P et al.* Tyrosine phosphorylation of the beta 4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 1494 – 1502
- 183 *Javadi S, Zhiani M, Mousavi MA et al.* Crosstalk between Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) and integrins in resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in solid tumors. *European journal of cell biology* 2020; 99: 151083
- 184 *Ju L, Zhou C, Li W et al.* Integrin beta1 over-expression associates with resistance to tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer. *Journal of cellular biochemistry* 2010; 111: 1565 – 1574
- 185 *Chetoui N, Gendron S, Chamoux E et al.* Collagen type I-mediated activation of ERK/MAP Kinase is dependent on Ras, Raf-1 and protein phosphatase 2A in Jurkat T cells. *Molecular immunology* 2006; 43: 1687 – 1693
- 186 *Xie J-W, Haslam SZ.* Extracellular matrix, Rac1 signaling, and estrogen-induced proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 2008; 110: 257 – 268
- 187 *Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN et al.* beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer cell* 2002; 2: 205 – 216
- 188 *Chandler C, Liu T, Buckanovich R et al.* The double edge sword of fibrosis in cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2019; 209: 55 – 67
- 189 *Mouw JK, Yui Y, Damiano L et al.* Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nature medicine* 2014; 20: 360 – 367
-

- 190 *Renshaw MW, Price LS, Schwartz MA*. Focal adhesion kinase mediates the integrin signaling requirement for growth factor activation of MAP kinase. *Journal of Cell Biology* 1999; 147: 611 – 618
- 191 *Macagno JP, Diaz Vera J, Yu Y et al*. FAK acts as a suppressor of RTK-MAP kinase signalling in *Drosophila melanogaster* epithelia and human cancer cells. *PLoS genetics* 2014; 10: e1004262
- 192 *Shi J, Wei L*. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 2007; 55: 61 – 75
- 193 *Semenza GL*. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010; 29: 625 – 634
- 194 *Rohwer N, Cramer T*. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2011; 14: 191 – 201
- 195 *Taylor CT, Cummins EP*. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1177: 178 – 184
- 196 *Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G et al*. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* 2018; 7: 10
- 197 *Wang H-Q, Man Q-W, Huo F-Y et al*. STAT3 pathway in cancers: Past, present, and future. *MedComm* 2022; 3: e124
- 198 *Vukovic V, Tannock IF*. Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *British journal of cancer* 1997; 75: 1167 – 1172
- 199 *He J, Fortunati E, Liu D-X et al*. Pleiotropic Roles of ABC Transporters in Breast Cancer. *International journal of molecular sciences* 2021; 22
- 200 *Jaramillo AC, Al Saig F, Cloos J et al*. How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *CDR* 2018; 1: 6 – 29
- 201 *Wartenberg M, Ling FC, Müschen M et al*. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003; 17: 503 – 505
- 202 *Doublier S, Belisario DC, Polimeni M et al*. HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC cancer* 2012; 12: 4
- 203 *Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H et al*. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer science* 2003; 94: 1021 – 1028
- 204 *Netti PA, Berk DA, Swartz MA et al*. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 2497 – 2503
- 205 *Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM*. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC cancer* 2018; 18: 41
- 206 *Watabe H, Furuhashi T, Tani-Ishii N et al*. Mechanotransduction activates $\alpha_5\beta_1$ integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. *Experimental cell research* 2011; 317: 2642 – 2649

- 207 Cha B, Geng X, Mahamud MR et al. Mechanotransduction activates canonical Wnt/ β -catenin signaling to promote lymphatic vascular patterning and the development of lymphatic and lymphovenous valves. *Genes & development* 2016; 30: 1454 – 1469
- 208 Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New Journal of Science* 2014; 2014: 1 – 10
- 209 Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S et al. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Molecular cancer therapeutics* 2007; 6: 2092 – 2102
- 210 El Azreq M-A, Naci D, Aoudjit F. Collagen/ β 1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner. *Molecular biology of the cell* 2012; 23: 3473 – 3484
- 211 Berrazouane S, Boisvert M, Salti S et al. Beta1 integrin blockade overcomes doxorubicin resistance in human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell death & disease* 2019; 10: 357
- 212 Xie J, Jin B, Li D-W et al. ABCG2 regulated by MAPK pathways is associated with cancer progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *American Journal of Cancer Research* 2014; 4: 698 – 709
- 213 Lin S, Hoffmann K, Xiao Z et al. MEK inhibition induced downregulation of MRP1 and MRP3 expression in experimental hepatocellular carcinoma. *Cancer cell international* 2013; 13: 3
- 214 Chen Y, Zhao Y, Wang C et al. Inhibition of p38 MAPK diminishes doxorubicin-induced drug resistance associated with P-glycoprotein in human leukemia K562 cells. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2012; 18: BR383-8
- 215 Huang Y-W, Lin C-Y, Tsai H-C et al. Amphiregulin promotes cisplatin chemoresistance by upregulating ABCB1 expression in human chondrosarcoma. *Aging* 2020; 12: 9475 – 9488
- 216 Pick A, Wiese M. Tyrosine kinase inhibitors influence ABCG2 expression in EGFR-positive MDCK BCRP cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *ChemMedChem* 2012; 7: 650 – 662
- 217 Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F et al. Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia* 2007; 21: 427 – 438
- 218 Porro A, Haber M, Diolaiti D et al. Direct and coordinate regulation of ATP-binding cassette transporter genes by Myc factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285: 19532 – 19543
- 219 Hummel I, Klappe K, Ercan C et al. Multidrug resistance-related protein 1 (MRP1) function and localization depend on cortical actin. *Molecular pharmacology* 2011; 79: 229 – 240
- 220 Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J et al. EMT in Breast Carcinoma-A Review. *Journal of clinical medicine* 2016; 5
-

- 221 Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 2009; 119: 1420 – 1428
- 222 Liu F, Gu L-N, Shan B-E et al. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncology letters* 2016; 12: 4869 – 4876
- 223 Jing H, Song J, Zheng J. Discoidin domain receptor 1: New star in cancer-targeted therapy and its complex role in breast carcinoma. *Oncology letters* 2018; 15: 3403 – 3408
- 224 Jiang Z-S, Sun Y-Z, Wang S-M et al. Epithelial-mesenchymal transition: potential regulator of ABC transporters in tumor progression. *Journal of Cancer* 2017; 8: 2319 – 2327
- 225 Li W, Liu C, Tang Y et al. Overexpression of Snail accelerates adriamycin induction of multidrug resistance in breast cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2011; 12: 2575 – 2580
- 226 Chen W-J, Wang H, Tang Y et al. Multidrug resistance in breast cancer cells during epithelial-mesenchymal transition is modulated by breast cancer resistant protein. *Chinese journal of cancer* 2010; 29: 151 – 157
- 227 Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* 2011; 5: 5 – 23
- 228 Scimeca M, Antonacci C, Colombo D et al. Emerging prognostic markers related to mesenchymal characteristics of poorly differentiated breast cancers. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016; 37: 5427 – 5435
- 229 Micalizzi DS, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer. *Future oncology (London, England)* 2009; 5: 1129 – 1143
- 230 Tachtsidis A, McInnes LM, Jacobsen N et al. Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells. *Clinical & experimental metastasis* 2016; 33: 521 – 550
- 231 Ignatiadis M, Reinholz M. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR* 2011; 13: 222
- 232 Zheng H-C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 2017; 8: 59950 – 59964
- 233 Scott LE, Weinberg SH, Lemmon CA. Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2019; 7: 135
- 234 Smith BN, Odero-Marrah VA. The role of Snail in prostate cancer. *Cell Adhesion & Migration* 2012; 6: 433 – 441
- 235 Zheng G, Lyons JG, Tan TK et al. Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *The American journal of pathology* 2009; 175: 580 – 591
- 236 Wei SC, Fattet L, Tsai JH et al. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol* 2015; 17: 678 – 688

- 237 Lee K, Chen QK, Lui C *et al.* Matrix compliance regulates Rac1b localization, NADPH oxidase assembly, and epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell* 2012; 23: 4097 – 4108
- 238 Lo U-G, Lee C-F, Lee M-S *et al.* The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *International journal of molecular sciences* 2017; 18
- 239 Long X, Ye Y, Zhang L *et al.* IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *International Journal of Oncology* 2016; 48: 5 – 12
- 240 Ramírez Moreno M, Bulgakova NA. The Cross-Talk Between EGFR and E-Cadherin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021; 9: 828673
- 241 Begicevic R-R, Falasca M. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *International journal of molecular sciences* 2017; 18
- 242 Kim M, Turnquist H, Jackson J *et al.* The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002; 8: 22 – 28
- 243 Yin L, Castagnino P, Assoian RK. ABCG2 expression and side population abundance regulated by a transforming growth factor beta-directed epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008; 68: 800 – 807
- 244 Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced drug delivery reviews* 2016; 97: 41 – 55
- 245 Islam MS, Afrin S, Singh B *et al.* Extracellular matrix and Hippo signaling as therapeutic targets of antifibrotic compounds for uterine fibroids. *Clinical and translational medicine* 2021; 11: e475
- 246 Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K *et al.* Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2012; 15: 50 – 61
- 247 Stefan SM. Multi-target ABC transporter modulators: what next and where to go? *Future medicinal chemistry* 2019; 11: 2353 – 2358
- 248 Du B, Shim JS. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2016; 21
- 249 Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2018; 18: 533 – 548
- 250 Kapp TG, Rechenmacher F, Sobahi TR *et al.* Integrin modulators: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* 2013; 23: 1273 – 1295
- 251 Raab-Westphal S, Marshall JF, Goodman SL. Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers. *Cancers* 2017; 9
- 252 Blandin A-F, Renner G, Lehmann M *et al.* β 1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Frontiers in pharmacology* 2015; 6: 279

- 253 Barkan D, Chambers AF. β 1-integrin: a potential therapeutic target in the battle against cancer recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011; 17: 7219 – 7223
- 254 Yao ES, Zhang H, Chen Y-Y et al. Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer research* 2007; 67: 659 – 664
- 255 Sun Q, Zhou C, Ma R et al. Prognostic value of increased integrin-beta 1 expression in solid cancers: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy* 2018; 11: 1787 – 1799
- 256 White DE, Kurpios NA, Zuo D et al. Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer cell* 2004; 6: 159 – 170
- 257 Huck L, Pontier SM, Zuo DM et al. beta1-integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 15559 – 15564
- 258 Moran-Jones K, Ledger A, Naylor MJ. β 1 integrin deletion enhances progression of prostate cancer in the TRAMP mouse model. *Scientific reports* 2012; 2: 526
- 259 Ramirez NE, Zhang Z, Madamanchi A et al. The $\alpha_2\beta_1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *The Journal of clinical investigation* 2011; 121: 226 – 237
- 260 Zhang L, Zou W. Inhibition of integrin β 1 decreases the malignancy of ovarian cancer cells and potentiates anticancer therapy via the FAK/STAT1 signaling pathway. *Molecular medicine reports* 2015; 12: 7869 – 7876
- 261 Park CC, Zhang H, Pallavicini M et al. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res* 2006; 66: 1526 – 1535
- 262 Danen EHJ. Integrin Signaling as a Cancer Drug Target. *ISRN Cell Biology* 2013; 2013: 1 – 14
- 263 Morello V, Cabodi S, Sigismund S et al. β 1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* 2011; 30: 4087 – 4096
- 264 Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 4995 – 5004
- 265 Hartmann TN, Burger JA, Glodek A et al. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 2005; 24: 4462 – 4471
- 266 Cruz da Silva E, Dontenwill M, Choulier L et al. Role of Integrins in Resistance to Therapies Targeting Growth Factor Receptors in Cancer. *Cancers* 2019; 11
- 267 Janouskova H, Maglott A, Leger DY et al. Integrin $\alpha_5\beta_1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res* 2012; 72: 3463 – 3470
- 268 Klobučar M, Grbčić P, Pavelić SK et al. Acid ceramidase inhibition sensitizes human colon cancer cells to oxaliplatin through downregulation of transglutaminase 2 and β 1

- integrin/FAK-mediated signalling. *Biochemical and biophysical research communications* 2018; 503: 843 – 848
- 269 Naci D, El Azreq M-A, Chetoui N et al. $\alpha 2 \beta 1$ integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *The Journal of biological chemistry* 2012; 287: 17065 – 17076
- 270 Yang D, Shi J, Fu H et al. Integrin $\beta 1$ modulates tumour resistance to gemcitabine and serves as an independent prognostic factor in pancreatic adenocarcinomas. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016; 37: 12315 – 12327
- 271 Pontiggia O, Sampayo R, Raffo D et al. The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through $\beta 1$ integrin. *Breast cancer research and treatment* 2012; 133: 459 – 471
- 272 Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474: 609 – 615
- 273 Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61 – 70
- 274 Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW et al. Mammary epithelial-specific disruption of focal adhesion kinase retards tumor formation and metastasis in a transgenic mouse model of human breast cancer. *The American journal of pathology* 2008; 173: 1551 – 1565
- 275 Lahlou H, Sanguin-Gendreau V, Zuo D et al. Mammary epithelial-specific disruption of the focal adhesion kinase blocks mammary tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 20302 – 20307
- 276 Luo M, Fan H, Nagy T et al. Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer research* 2009; 69: 466 – 474
- 277 Roy-Luzarraga M, Hodivala-Dilke K. Molecular Pathways: Endothelial Cell FAK-A Target for Cancer Treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2016; 22: 3718 – 3724
- 278 Eke I, Cordes N. Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Seminars in cancer biology* 2015; 31: 65 – 75
- 279 Murphy JM, Rodriguez YAR, Jeong K et al. Targeting focal adhesion kinase in cancer cells and the tumor microenvironment. *Experimental & molecular medicine* 2020; 52: 877 – 886
- 280 Roberts WG, Ung E, Whalen P et al. Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res* 2008; 68: 1935 – 1944
- 281 Diaz Osterman CJ, Ozmadenci D, Kleinschmidt EG et al. FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy. *eLife* 2019; 8
- 282 Mohan N, Hosain S, Zhao J et al. Atezolizumab potentiates Tcell-mediated cytotoxicity and coordinates with FAK to suppress cell invasion and motility in PD-L1+ triple negative breast cancer cells. *Oncoimmunology* 2019; 8: e1624128
- 283 Eke I, Zscheppang K, Dickreuter E et al. Simultaneous $\beta 1$ integrin-EGFR targeting and radiosensitization of human head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2015; 107

- 284 Deng Q-F, Su BO, Zhao Y-M et al. Integrin β 1-mediated acquired gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells occurs via the phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *Oncology letters* 2016; 11: 535 – 542
- 285 Kanda R, Kawahara A, Watari K et al. Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrin β 1/Src/Akt-driven bypass signaling. *Cancer Res* 2013; 73: 6243 – 6253
- 286 Huang C, Park CC, Hilsenbeck SG et al. β 1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Research : BCR* 2011; 13: R84
- 287 Frijns E, Kuikman I, Litjens S et al. Phosphorylation of threonine 1736 in the C-terminal tail of integrin β 4 contributes to hemidesmosome disassembly. *Molecular biology of the cell* 2012; 23: 1475 – 1485
- 288 Frijns E, Sachs N, Kreft M et al. EGF-induced MAPK signaling inhibits hemidesmosome formation through phosphorylation of the integrin β 4. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285: 37650 – 37662
- 289 Ramovs V, Te Molder L, Sonnenberg A. The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2017; 57-58: 213 – 243
- 290 Guo W, Pylayeva Y, Pepe A et al. Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 2006; 126: 489 – 502
- 291 Zheng C-C, Hu H-F, Hong P et al. Significance of integrin-linked kinase (ILK) in tumorigenesis and its potential implication as a biomarker and therapeutic target for human cancer. *American Journal of Cancer Research* 2019; 9: 186 – 197
- 292 Akrida I, Nikou S, Gyftopoulos K et al. Expression of EMT inducers integrin-linked kinase (ILK) and ZEB1 in phyllodes breast tumors is associated with aggressive phenotype. *Histology and histopathology* 2018; 33: 937 – 949
- 293 Qu Y, Hao C, Xu J et al. ILK promotes cell proliferation in breast cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Molecular medicine reports* 2017; 16: 5036 – 5042
- 294 Tseng P-C, Chen C-L, Shan Y-S et al. An increase in integrin-linked kinase non-canonically confers NF- κ B-mediated growth advantages to gastric cancer cells by activating ERK1/2. *Cell communication and signaling : CCS* 2014; 12: 69
- 295 Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2391 – 2399
- 296 Zhao X, Xu Z, Wang Z et al. RNA silencing of integrin-linked kinase increases the sensitivity of the A549 lung cancer cell line to cisplatin and promotes its apoptosis. *Molecular medicine reports* 2015; 12: 960 – 966
- 297 Jia Z. Role of integrin-linked kinase in drug resistance of lung cancer. *OncoTargets and therapy* 2015; 8: 1561 – 1565
- 298 Poulikakos PI, Solit DB. Resistance to MEK inhibitors: should we co-target upstream? *Science signaling* 2011; 4: pe16
- 299 Patra S, Young V, Llewellyn L et al. BRAF, KRAS and PIK3CA Mutation and Sensitivity to Trastuzumab in Breast Cancer Cell Line Model. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2017; 18: 2209 – 2213

- 300 *Giltneane JM, Balko JM*. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discovery medicine* 2014; 17: 275 – 283
- 301 *Costa R, Shah AN, Santa-Maria CA et al*. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in triple negative breast cancer: New discoveries and practical insights for drug development. *Cancer treatment reviews* 2017; 53: 111 – 119
- 302 *Lee S, Rauch J, Kolch W*. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. *International journal of molecular sciences* 2020; 21: 1102
- 303 *Jiang W, Wang X, Zhang C et al*. Expression and clinical significance of MAPK and EGFR in triple-negative breast cancer. *Oncology letters* 2020; 19: 1842 – 1848
- 304 *Changavi AA, Shashikala A, Ramji AS*. Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Triple Negative and Nontriple Negative Breast Carcinomas. *Journal of Laboratory Physicians* 2015; 7: 79 – 83
- 305 *Xiao X, Li BX, Mitton B et al*. Targeting CREB for cancer therapy: friend or foe. *Current cancer drug targets* 2010; 10: 384 – 391
- 306 *Steven A, Friedrich M, Jank P et al*. What turns CREB on? And off? And why does it matter? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2020; 77: 4049 – 4067
- 307 *Ambrogio C, Darbo E, Lee SW et al*. A putative role for Discoidin Domain Receptor 1 in cancer chemoresistance. *Cell Adhesion & Migration* 2018; 12: 394 – 397
- 308 *Reger de Moura C, Prunotto M, Sohail A et al*. Discoidin Domain Receptors in Melanoma: Potential Therapeutic Targets to Overcome MAPK Inhibitor Resistance. *Frontiers in oncology* 2020; 10: 1748
- 309 *Nokin M-J, Darbo E, Travert C et al*. Inhibition of DDR1 enhances in vivo chemosensitivity in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *JCI insight* 2020; 5
- 310 *Wantoch von Rekowski K, König P, Henze S et al*. Insight into Cisplatin-Resistance Signaling of W1 Ovarian Cancer Cells Emerges mTOR and HSP27 as Targets for Sensitization Strategies. *International journal of molecular sciences* 2020; 21
- 311 *Reger de Moura C, Battistella M, Sohail A et al*. Discoidin domain receptors: A promising target in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 2019; 32: 697 – 707
- 312 *Berestjuk I, Lecacheur M, Diazzi S, Rovera C, Prod'homme V, Mallavialle A, Larbret F, Pisano S, Audebert S, Passeron T, Gaggioli C, Girard CA, Deckert M, Tartare-Deckert S*. Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated melanoma cell adaptation to BRAF-targeted therapy; *EMBO Mol Med*. 2022,
- 313 *Gao Y, Zhou J, Li J*. Discoidin domain receptors orchestrate cancer progression: A focus on cancer therapies. *Cancer science* 2021; 112: 962 – 969
- 314 *Bae Y-H, Shin J-M, Park H-J et al*. Gain-of-function mutant p53-R280K mediates survival of breast cancer cells. *Genes Genom* 2014; 36: 171 – 178
- 315 *Alvarado-Ortiz E, La Cruz-López KG de, Becerril-Rico J et al*. Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8: 607670
- 316 *Saby C, Collin G, Sinane M et al*. DDR1 and MT1-MMP Expression Levels Are Determinant for Triggering BIK-Mediated Apoptosis by 3D Type I Collagen Matrix in Invasive Basal-Like Breast Carcinoma Cells. *Frontiers in pharmacology* 2019; 10: 462
-

- 317 Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer research* 2015; 35: 3147 – 3154
- 318 Hui L, Zheng Y, Yan Y *et al.* Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* 2006; 25: 7305 – 7310
- 319 Olivier M, Eeles R, Hollstein M *et al.* The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human mutation* 2002; 19: 607 – 614
- 320 Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JHA *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Molecular cancer research : MCR* 2007; 5: 195 – 201
- 321 Jakubzig B. Untersuchungen der durch zelluläre Adhäsion vermittelten Chemoresistenz (CAM-DR) und der ihr zugrunde liegenden Signalmechanismen in MCF-7-Mammakarzinom- und MV3-Melanomzellen: Universitäts- und Landesbibliothek Bonn; Bonn 2020
- 322 Duarte D, Vale N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery* 2022; 3: 100110
- 323 Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology research & perspectives* 2015; 3: e00149
- 324 Ryall KA, Tan AC. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. *Journal of cheminformatics* 2015; 7: 7
- 325 Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010; 70: 440 – 446
- 326 Essodaigui M, Broxterman HJ, Garnier-Suillerot A. Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* 1998; 37: 2243 – 2250
- 327 Vladlena Pfeifer. Untersuchung des Zusammenhangs einer adhäsionsvermittelten Chemoresistenz von Mammakarzinomzelllinien mit der Funktion von ABC-Transportern [Master Thesis]: Universität Bonn; 2018
- 328 Pick A, Klinkhammer W, Wiese M. Specific inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP). *ChemMedChem* 2010; 5: 1498 – 1505
- 329 Robey RW, Steadman K, Polgar O *et al.* Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer research* 2004; 64: 1242 – 1246
- 330 Köhler SC, Silbermann K, Wiese M. Phenyltetrazolyl-phenylamides: Substituent impact on modulation capability and selectivity toward the efflux protein ABCG2 and investigation of interaction with the transporter. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 124: 881 – 895
- 331 Sethi T, Rintoul RC, Moore SM *et al.* Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature medicine* 1999; 5: 662 – 668
- 332 Ponert J-M. Molekulare Mechanismen der prometastatischen Tumorzell-Thrombozyten-Interaktionen während der hämatogenen Metastasierung und ihre Inhibition durch Antikoagulantien: Universitäts- und Landesbibliothek Bonn; Bonn

- 333 *Baltes F, Pfeifer V, Silbermann K et al.* β 1-Integrin binding to collagen type 1 transmits breast cancer cells into chemoresistance by activating ABC efflux transporters. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 2020; 1867: 118663
- 334 *Wang R, Lv Q, Meng W et al.* Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *Journal of Thoracic Disease* 2014; 6: 829 – 837
- 335 *Said G, Guilbert M, Morjani H et al.* Extracellular matrix proteins modulate antimigratory and apoptotic effects of Doxorubicin. *Chemotherapy research and practice* 2012; 2012: 268681
- 336 *Joyce MH, Lu C, James ER et al.* Phenotypic Basis for Matrix Stiffness-Dependent Chemoresistance of Breast Cancer Cells to Doxorubicin. *Frontiers in oncology* 2018; 8: 337
- 337 *Fiorillo M, Ózsvári B, Sotgia F et al.* High ATP Production Fuels Cancer Drug Resistance and Metastasis: Implications for Mitochondrial ATP Depletion Therapy. *Frontiers in oncology* 2021; 11: 740720
- 338 *Zanotelli MR, Goldblatt ZE, Miller JP et al.* Regulation of ATP utilization during metastatic cell migration by collagen architecture. *Molecular biology of the cell* 2018; 29: 1 – 9
- 339 *Wantoch von Rekowski K, König P, Henze S et al.* The Impact of Integrin-Mediated Matrix Adhesion on Cisplatin Resistance of W1 Ovarian Cancer Cells. *Biomolecules* 2019; 9: 788
- 340 *Allen JD, Jackson SC, Schinkel AH.* A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance. *Cancer Res* 2002; 62: 2294 – 2299
- 341 *Jekerle V, Klinkhammer W, Scollard DA et al.* In vitro and in vivo evaluation of WK-X-34, a novel inhibitor of P-glycoprotein and BCRP, using radio imaging techniques. *International journal of cancer* 2006; 119: 414 – 422
- 342 *Muszyńska A, Wołczyński S, Pałka J.* The mechanism for anthracycline-induced inhibition of collagen biosynthesis. *European journal of pharmacology* 2001; 411: 17 – 25
- 343 *Ning Y, Buranda T, Hudson LG.* Activated epidermal growth factor receptor induces integrin alpha2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 6380 – 6387
- 344 *Piva MBR, Jakubzig B, Bendas G.* Integrin Activation Contributes to Lower Cisplatin Sensitivity in MV3 Melanoma Cells by Inducing the Wnt Signalling Pathway. *Cancers* 2017; 9
- 345 *Pfankuchen DB, Baltes F, Batool T et al.* Heparin antagonizes cisplatin resistance of A2780 ovarian cancer cells by affecting the Wnt signaling pathway. *Oncotarget* 2017; 8: 67553 – 67566
- 346 *Shimada K, Muhlich JL, Mitchison TJ.* A tool for browsing the Cancer Dependency Map reveals functional connections between genes and helps predict the efficacy and selectivity of candidate cancer drugs; 2019
- 347 *DepMap: The Cancer Dependency Map Project at Broad Institute (30.04.2021).* Im Internet: <https://depmap.org/portal/>; Stand: 30.04.2021
- 348 *Meyers RM, Bryan JG, McFarland JM, Weir BA, Sizemore AE, Xu H, Dharia NV, Montgomery PG, Cowley GS, Pantel S, Goodale A, Lee Y, Ali LD, Jiang G, Lubonja R, Harrington WF,*
-

- Strickland M, Wu T, Hawes DC, Zhivich VA, Wyatt MR, Kalani Z, Chang JJ, Okamoto M, Golub TR, Boehm JS, Vazquez F, Root DE, Hahn WC, Tsherniak A.* Computational correction of copy-number effect improves specificity of CRISPR-Cas9 essentiality screens in cancer cells; 2017
- 349 *Paplomata E, O'Regan R.* The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Therapeutic advances in medical oncology* 2014; 6: 154 – 166
- 350 *Bilancio A, Migliaccio A.* Phosphoinositide 3-kinase assay in breast cancer cell extracts. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2014; 1204: 145 – 153
- 351 *Baltes F, Caspers J, Henze S et al.* Targeting Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Signaling and Its Crosstalk with β 1-integrin Emerges as a Key Factor for Breast Cancer Chemosensitization upon Collagen Type 1 Binding. *International journal of molecular sciences* 2020; 21
- 352 *Artemenko M, Zhong SSW, To SKY et al.* p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector. *Cancer letters* 2022; 535: 215593
- 353 *Zhang J, Gao Z, Ye J.* Phosphorylation and degradation of S6K1 (p70S6K1) in response to persistent JNK1 Activation. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1832: 1980 – 1988
- 354 *Lehman JA, Calvo V, Gomez-Cambronero J.* Mechanism of ribosomal p70S6 kinase activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in neutrophils: cooperation of a MEK-related, THR421/SER424 kinase and a rapamycin-sensitive, mTOR-related THR389 kinase. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 28130 – 28138
- 355 *Hou S, Isaji T, Hang Q et al.* Distinct effects of β 1 integrin on cell proliferation and cellular signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Scientific reports* 2016; 6: 18430
- 356 *Choi Y-L, Bocanegra M, Kwon MJ et al.* LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 2296 – 2306
- 357 *Tornillo G, Knowlson C, Kendrick H et al.* Dual Mechanisms of LYN Kinase Dysregulation Drive Aggressive Behavior in Breast Cancer Cells. *Cell reports* 2018; 25: 3674-3692.e10
- 358 *Morozevich GE, Kozlova NI, Susova OY et al.* Hyperexpression of Integrin α 5 β 1 Promotes Resistance of MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells to Doxorubicin via ERK Protein Kinase Down-regulation. *Biochemistry. Biokhimiia* 2017; 82: 1017 – 1024
- 359 *Taherian A, Mazoochi T.* Different Expression of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) 1/2 and Phospho-Erk Proteins in MBA-MB-231 and MCF-7 Cells after Chemotherapy with Doxorubicin or Docetaxel. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2012; 15: 669 – 677
- 360 *Maclaine NJ, Hupp TR.* The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging* 2009; 1: 490 – 502
- 361 *Dalmases A, González I, Menendez S et al.* Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF- κ B target genes in human breast cancer. *Oncotarget* 2014; 5: 196 – 210
- 362 *Astarci E, Sade A, Cimen I et al.* The NF- κ B target genes ICAM-1 and VCAM-1 are differentially regulated during spontaneous differentiation of Caco-2 cells. *The FEBS journal* 2012; 279: 2966 – 2986

- 363 Chaikuad A, Tacconi EMC, Zimmer J et al. A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. *Nature chemical biology* 2014; 10: 853 – 860
- 364 Foda ZH, Seeliger MA. Kinase inhibitors: an allosteric add-on. *Nat Chem Biol* 2014; 10: 796 – 797
- 365 Morris EJ, Jha S, Restaino CR et al. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer discovery* 2013; 3: 742 – 750
- 366 Wong DJL, Robert L, Atefi MS et al. Antitumor activity of the ERK inhibitor SCH772984 corrected against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma. *Mol Cancer* 2014; 13: 194
- 367 Kidger AM, Munck JM, Saini HK et al. Dual-Mechanism ERK1/2 Inhibitors Exploit a Distinct Binding Mode to Block Phosphorylation and Nuclear Accumulation of ERK1/2. *Mol Cancer Ther* 2020; 19: 525 – 539
- 368 Brighton HE, Angus SP, Bo T et al. New Mechanisms of Resistance to MEK Inhibitors in Melanoma Revealed by Intravital Imaging. *Cancer Res* 2018; 78: 542 – 557
- 369 Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms (Version 3.3 - Juli 2020). Im Internet: https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-024OL1_S3_Melanom-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2020-08.pdf; Stand: 30.04.2023
- 370 Robitaille H, Simard-Bisson C, Larouche D et al. The small heat-shock protein Hsp27 undergoes ERK-dependent phosphorylation and redistribution to the cytoskeleton in response to dual leucine zipper-bearing kinase expression. *The Journal of investigative dermatology* 2010; 130: 74 – 85
- 371 Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis & tissue repair* 2012; 5: 7
- 372 Tsai W-B, Aiba I, Long Y et al. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells. *Cancer Res* 2012; 72: 2622 – 2633
- 373 Wang H, Xu J, Lazarovici P et al. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 11: 255
- 374 Leung EY, Kim JE, Askarian-Amiri M et al. Relationships between signaling pathway usage and sensitivity to a pathway inhibitor: examination of trametinib responses in cultured breast cancer lines. *PLOS ONE* 2014; 9: e105792
- 375 Duarte S, Viedma-Poyatos Á, Navarro-Carrasco E et al. Vimentin filaments interact with the actin cortex in mitosis allowing normal cell division. *Nat Commun* 2019; 10: 4200
- 376 Yu W, Yang L, Li T et al. Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Frontiers in oncology* 2019; 9: 989
- 377 Huang H, Wright S, Zhang J et al. Getting a grip on adhesion: Cadherin switching and collagen signaling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 2019; 1866: 118472
-

- 378 *Sehgal P, Kong X, Wu J et al.* Epidermal growth factor receptor and integrins control force-dependent vinculin recruitment to E-cadherin junctions. *Journal of cell science* 2018; 131
- 379 *Zhang X, Yang M, Shi H et al.* Reduced E-cadherin facilitates renal cell carcinoma progression by WNT/ β -catenin signaling activation. *Oncotarget* 2017; 8: 19566 – 19576
- 380 *Nagle AM, Levine KM, Tasdemir N et al.* Loss of E-cadherin Enhances IGF1-IGF1R Pathway Activation and Sensitizes Breast Cancers to Anti-IGF1R/InsR Inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2018; 24: 5165 – 5177
- 381 *Toda M, Kuo C-H, Borman SK et al.* Evidence that formation of vimentin mitogen-activated protein kinase (MAPK) complex mediates mast cell activation following Fc ϵ RI/CC chemokine receptor 1 cross-talk. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287: 24516 – 24524
- 382 *Virtakoivu R, Mai A, Mattila E et al.* Vimentin-ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. *Cancer Res* 2015; 75: 2349 – 2362
- 383 *Ostrowska-Podhorodecka Z, Ding I, Norouzi M et al.* Impact of Vimentin on Regulation of Cell Signaling and Matrix Remodeling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2022; 10: 869069
- 384 *Bollong MJ, Pietilä M, Pearson AD et al.* A vimentin binding small molecule leads to mitotic disruption in mesenchymal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017; 114: E9903-E9912
- 385 *Parvani JG, Galliher-Beckley AJ, Schiemann BJ et al.* Targeted inactivation of β 1 integrin induces β 3 integrin switching, which drives breast cancer metastasis by TGF- β . *Molecular biology of the cell* 2013; 24: 3449 – 3459
- 386 *Giancotti FG.* Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy. *Trends in pharmacological sciences* 2007; 28: 506 – 511
- 387 *Tai Y-L, Chu P-Y, Lai I-R et al.* An EGFR/Src-dependent β 4 integrin/FAK complex contributes to malignancy of breast cancer. *Sci Rep* 2015; 5: 16408
- 388 *Huafeng J, Deqing Z, Yong D et al.* A cross-talk between integrin β 4 and epidermal growth factor receptor induces gefitinib chemoresistance to gastric cancer. *Cancer cell international* 2018; 18: 50
- 389 *Colburn ZT, Jones JCR.* Complexes of α 6 β 4 integrin and vimentin act as signaling hubs to regulate epithelial cell migration. *Journal of cell science* 2018; 131
- 390 *Ruan S, Lin M, Zhu Y et al.* Integrin β 4-Targeted Cancer Immunotherapies Inhibit Tumor Growth and Decrease Metastasis. *Cancer Res* 2020; 80: 771 – 783
- 391 *Mahimkar RM, Visaya O, Pollock AS et al.* The disintegrin domain of ADAM9: a ligand for multiple beta1 renal integrins. *The Biochemical journal* 2005; 385: 461 – 468
- 392 *Newlaczyl AU, Yu L-G.* Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer letters* 2011; 313: 123 – 128
- 393 *MacKinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL et al.* Regulation of transforming growth factor- β 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2012; 185: 537 – 546

- 394 Tellez T, Garcia-Aranda M, Redondo M. The Role of Clusterin in Carcinogenesis and its Potential Utility as Therapeutic Target. *Current medicinal chemistry* 2016; 23: 4297 – 4308
- 395 Peng M, Deng J, Zhou S *et al.* The role of Clusterin in cancer metastasis. *Cancer Management and Research* 2019; 11: 2405 – 2414
- 396 Albany C, Hahn NM. Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian journal of andrology* 2014; 16: 359 – 363
- 397 Yang J, Isaji T, Zhang G *et al.* EpCAM associates with integrin and regulates cell adhesion in cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2019
- 398 Martowicz A, Spizzo G, Gastl G *et al.* Phenotype-dependent effects of EpCAM expression on growth and invasion of human breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 2012; 12: 501
- 399 Yao C, Lin Y, Chua M-S *et al.* Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *International journal of cancer* 2007; 121: 1949 – 1957
- 400 Koh M, Woo Y, Valiathan RR *et al.* Discoidin domain receptor 1 is a novel transcriptional target of ZEB1 in breast epithelial cells undergoing H-Ras-induced epithelial to mesenchymal transition. *International journal of cancer* 2015; 136: E508-20
- 401 Gao M, Duan L, Luo J *et al.* Discovery and optimization of 3-(2-(Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-6-yl)ethynyl)benzamides as novel selective and orally bioavailable discoidin domain receptor 1 (DDR1) inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 2013; 56: 3281 – 3295
- 402 Lu Q-P, Chen W-D, Peng J-R *et al.* Antitumor activity of 7RH, a discoidin domain receptor 1 inhibitor, alone or in combination with dasatinib exhibits antitumor effects in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncology letters* 2016; 12: 3598 – 3608
- 403 Kothiwale S, Borza CM, Lowe EW *et al.* Discoidin domain receptor 1 (DDR1) kinase as target for structure-based drug discovery. *Drug discovery today* 2015; 20: 255 – 261
- 404 Julia Caspers. Molekulare Betrachtung des Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) in Mammakarzinomzellen als Target in der Onkologie. Masterthesis; 2019
- 405 Zhang K, Corsa CA, Ponik SM *et al.* The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 677 – 687
- 406 S. Yamazaki, Youichi Higuchi, Masayuki Ishibashi *et al.* Collagen type I induces EGFR-TKI resistance in EGFR-mutated cancer cells by mTOR activation through Akt-independent pathway. *Cancer Sci.* 2018 Jun;109(6):2063-2073.
- 407 Jaaks P, Coker EA, Vis DJ *et al.* Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. *Nature* 2022; 603: 166 – 173
- 408 Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature biotechnology* 2012; 30: 679 – 692
- 409 Lopez JS, Banerji U. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. *Nature reviews. Clinical oncology* 2017; 14: 57 – 66
- 410 Jakubzig B, Baltés F, Henze S *et al.* Mechanisms of Matrix-Induced Chemoresistance of Breast Cancer Cells-Deciphering Novel Potential Targets for a Cell Sensitization. *Cancers* 2018; 10
-

- 411 Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H et al. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of translational medicine* 2018; 16: 96
- 412 Verma N, Rai AK, Kaushik V et al. Identification of gefitinib off-targets using a structure-based systems biology approach; their validation with reverse docking and retrospective data mining. *Sci Rep* 2016; 6: 33949
- 413 Steelman LS, Chappell WH, Akula SM et al. Therapeutic resistance in breast cancer cells can result from deregulated EGFR signaling. *Advances in Biological Regulation* 2020; 78: 100758
- 414 Aguilera KY, Huang H, Du W et al. Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Reduces Collagen-mediated Tumorigenicity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 2017; 16: 2473 – 2485
- 415 Fernandes Neto JM, Nadal E, Bosdriesz E et al. Multiple low dose therapy as an effective strategy to treat EGFR inhibitor-resistant NSCLC tumours. *Nat Commun* 2020; 11: 3157

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Darstellung der Inzidenz und der Mortalität der häufigsten Krebsarten in Bezug auf beide Geschlechter und auf Frauen im Jahr 2020	1
Abb. 1.2 Die globale Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen im Jahr 2020, bezogen auf den Human Development Index sowie die resultierende MIR	2
Abb. 1.3 Die Entwicklung der Krebsmedikamente, schematisiert für die Therapie des Mammakarzinoms.	4
Abb. 2.1 Vereinfachtes Behandlungsschema für Brustkrebs basierend auf der aktuellen S3-Leitlinie.	8
Abb. 2.2 Schematischer Kaplan-Meier-Plot zur Verdeutlichung der Vorteile von zielgerichteter und Immuntherapie, sowie deren Kombinationen.	9
Abb. 2.3 Darstellung der Entwicklung von der de novo Resistenz	11
Abb. 2.4 Angriffspunkt der klassischen Zytostatika und Möglichkeiten einer Resistenzbildung unterteilt in Pre-, On-, Post- und Off-Target Resistenz.	12
Abb. 2.5 Zellen stehen mit ihrer Mikroumgebung in einem empfindlichen und dynamischen Gleichgewicht.	13
Abb. 2.6 Veränderung der Tumormikroumgebung bei Krebserkrankungen.	14
Abb. 2.7 Allgemeiner Aufbau und Konformationen der Integrine anhand des <i>switchblade</i> Modells	19
Abb. 2.8 Klassifizierung der Integrine nach ihrem Bindungsverhalten.	20
Abb. 2.9 Aufbau der fokalen Adhäsionskinase (FAK) mit Darstellungen der möglichen Interaktionen mit anderen Signalproteinen.	23
Abb. 2.10: Darstellung der Integrin-Signalkaskade und deren Wechselwirkung mit RTKs. .	24
Abb. 2.11 Aufbau des Discoidin Domain Rezeptor 1 (DDR1b).	26
Abb. 2.12 Crosstalk zwischen RTKs (z.B. EGFR) sowie den Adäsionsrezeptoren DDR1 und Integrin $\alpha_2\beta_1$	31
Abb. 2.13 Zusammenhang zwischen der EZM im Bezug auf Chemoresistenzmechanismen.	34
Abb. 2.14 Übersicht zur Verteilung von Wirkstoffen innerhalb der Zellen und Mechanismen zur Reduktion von Wirkstoffkonzentrationen innerhalb der Zellen	35
Abb. 2.15 Mechanismus und Aufbau von ABC-Transportern.	36
Abb. 2.16 Proteinbiosynthese, Trafficking, Abbau und posttranslationale Modifikationen von ABC-Transportern.	37
Abb. 2.17 Übersicht zur Epithelialen –Mesenchymalen Transition	39
Abb. 5.1: Darstellung des Effekts des lentiviralen Partikels auf die Krebszelle beim <i>knockdown</i> von ITGB1.	64
Abb. 5.2 Reduktion des gelben MTT-Reagenz zum violetten Formazanpräzipitat durch die mitochondrialen Dehydrogenasen und intrazellulären Reduktionsmitteln vitaler Zellen. ...	65
Abb. 5.3 Schema des eindimensionalen MTT assays.	66
Abb. 5.4 Schema des zweidimensionalen MTT-Assays.	68

Abb. 5.5 Flow-Chart zur Auswertung des MTT-Assays.....	69
Abb. 5.6 Darstellung von additivem, synergistischem, antagonistischem Effekt nach Bliss	70
Abb. 5.7 Darstellung der Loewe-Additivität mit Hilfe eines Isobologramms, sowie des CI-Fa-Plot nach Chou-Talalay.	72
Abb. 5.8 Darstellung der Luciferase-Reaktion.....	73
Abb. 5.9 Darstellung des BCA-Assays und die Bildung des violetten Chelatkomplexes aus Cu(I) und Bicinchoninsäure.	74
Abb. 5.10 Darstellung der Luminol-Detektionsreaktion.....	77
Abb. 5.11 Auswertung der Durchflusszytometrie über die Software Guava Incyte ©.....	78
Abb. 5.12 Resultierender dot-plot eines Annexin-Assays per Durchflusszytometrie.....	80
Abb. 5.13 Schematische Darstellung der Bestimmung der ABC-Transporter-Aktivität von Zellen und Zellbehandlungen.	83
Abb. 5.14 Funktionsweise des Calcein-AM Assays	84
Abb. 5.15 Veranschaulichung des Einflusses des ABCB1-Inhibitors XR9577 auf die Steigung der Fluoreszenzentwicklung.	85
Abb. 5.16 Funktionsweise des Pheophorbid A assays.....	86
Abb. 5.17 Darstellung des durchgeführten Sandwich-ELISA zur Bestimmung von EGF.	89
Abb. 6.1 Konfokale Aufnahme der COL1-Beschichtung am Beispiel ausgesäeter MDA-MB-231 Zellen mit einer COL1-Konzentration von 10 µg/cm ²	90
Abb. 6.2 Beispiel der Berechnung des RF-Wertes anhand der Wirkung von Doxorubicin auf MDA-MB-231 Zellen in Gegenwart von COL1.....	91
Abb. 6.3 Statistische Analyse des Einflusses von COL1 auf die zytotoxische Aktivität der Wirkstoffe Cisplatin, Doxorubicin und Mitoxantron.	92
Abb. 6.4 Proliferation von MCF-7 und MDA-MB-231 in Gegenwart von COL1 und FN anhand der normalisierten Absorption von Formazan in Relation zu den unbehandelten Zellen.	95
Abb. 6.5 Morphologische Veränderung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 unter dem Einfluss von COL1 und den Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin und Mitoxantron.	96
Abb. 6.6 ATP-Menge der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit der Inkubation mit COL1 (72 h) normalisiert auf die per BCA quantifizierte Proteinmenge.	97
Abb. 6.7 Darstellung der intrazellulären Platinkonzentration in MCF-7- und MDA-MB-231 Zellen in Abhängigkeit von COL1	98
Abb. 6.8 Darstellung der intrazellulären Doxorubicin- und Mitoxantron-Konzentration in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen.	99
Abb. 6.9 Bestimmung des intrazellulären DOX (A) und MX (B) mittels Durchflusszytometrie in Abhängigkeit von COL1 und dem ABC-Inhibitor XR9577 (10 µM).	100
Abb. 6.10 A) Zytotoxizität von 10 µM XR9577 bei 72 h und 4 h. B) Statistische Analyse der pEC ₅₀ -Werte der MTT-Viabilitätsuntersuchungen der Inkubation von DOX und MX in Kombination mit dem pan-ABC-Transporter-Inhibitor XR9577 bei 10 µM nach 72 h.....	101
Abb. 6.11 Darstellung der ABC-Transporter-Aktivitäten der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231.....	103

Abb. 6.12 Pixeldichteanalyse der Proteinexpression der ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 in Anwesenheit von COL1 in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231.....	104
Abb. 6.13 Die mRNA-Analyse der Transportproteine ABCB1 und ABCG2 nach Inkubation durch COL1.....	105
Abb. 6.14 Rel. Expression der Integrine ITGB1 und ITGA2 per extrazellulärer Durchflusszytometrie, in mind. n=3 biologischen Proben.....	106
Abb. 6.15 Relative Adhäsion von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1, Integrin-Stimulation mittels Mn ²⁺ -Kationen sowie ITGB1-Inhibition durch den Antikörpers P5D2.....	107
Abb. 6.16 Darstellung der pEC ₅₀ -Werte der MTT Zellviabilitätsuntersuchungen zum Einfluss von Mangan als Integrinstimulator auf die Chemoresistenz von Mammakarzinomzelllinien gegenüber CDDP.....	108
Abb. 6.17 Relative extrazelluläre Expression der Integrinuntereinheiten ITGA2 und ITGB1 in Abhängigkeit von COL1 und den Zytostatika CDDP, DOX und MX, bestimmt mittels Durchflusszytometrie.	110
Abb. 6.18 Lichtmikroskopische Aufnahmen des Effekts des anti-ITGB1-Antikörpers P2D5 in einer Konzentration von 1,5 µg/mL abhängig von COL1 in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen.	
Abb. 6.19 Repräsentative MTT-Zellviabilitätskurven zur Darstellung des antagonisierenden Effekts des ITGB1-blockierenden Antikörpers P5D2 (1,5 µg/mL) auf die COL1-vermittelte Chemoresistenz gegenüber DOX und MX in MDA-MB-231-Zellen.	112
Abb. 6.20 Untersuchung der intrazellulären Wirkstoffkonzentration von DOX und MX in MDA-MB-231-Zellen per Durchflusszytometrie.	114
Abb. 6.21 Darstellung von repräsentativen Zytotoxizitätskurven der HPSE-überexprimierenden Zelllinien MDA-MB-231HPSE sowie deren Kontrollzelllinie.....	115
Abb. 6.22 Bestimmungen von ITGB1 zur Charakterisierung und Effektivitätsmessung des shRNA-basierten ITGB1- <i>knockdowns</i> in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen.....	116
Abb. 6.23 Repräsentative Darstellung der extrazellulären Expression von ITGA2 in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und des ITGB1-kd, bestimmt mittels Durchflusszytometrie.	117
Abb. 6.24 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit des ITGB1-Status und der Anwesenheit von COL1.....	118
Abb. 6.25 Zellviabilitätsuntersuchungen der jeweiligen ITGB1-kd-Variante der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 mit ihren jeweiligen sc-Kontrollvarianten.	119
Abb. 6.26 Bestimmung der Aktivität vom ABCB1/ABCC1 mittels Calcein AM assay und von ABCG2 mittels Pheophorbid A in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit des ITGB1-Status und von COL1.....	120
Abb. 6.27 Repräsentative Darstellung der Western Blot Analyse der ABC-Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2 in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit des ITGB1-Status sowie COL1.....	122

Abb. 6.28 Darstellung des ATP-Gehalts normalisiert auf die per BCA quantifizierte Proteinmenge von den kd-Varianten der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 im Vergleich zu ihren sc-Kontrollen.....	122
Abb. 6.29 Darstellung des Phosphoproteoms der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit von COL1 und reduzierter ITGB1-Expression (kd), analysiert mittels Proteome Profiler Array®.....	125
Abb. 6.30 Darstellung der durchflusszytometrische Analyse von ICAM-1 in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen. Gezeigt sind jeweils repräsentative Kurven.....	128
Abb. 6.31: Strukturformel des ERK1/2-Inhibitors SCH772984.....	129
Abb. 6.32 Zytotoxizität von SCH772984 in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und der Expression von ITGB1.....	130
Abb. 6.33 Strukturformel des MEK-Inhibitors Trametinib.....	131
Abb. 6.34 Zytotoxizität von Trametinib in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und der Expression von ITGB1.....	131
Abb. 6.35 Darstellung der Messung des Apoptosezustands von MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1, der Expression von ITGB1 und des ERK-Inhibitors SCH772984 mittels Annexin-V / Propidiumiodid Assay.....	133
Abb. 6.36 Darstellung der Western Blot Analyse von pERK1/2, sowie den pERK-assozierten downstream Signalmolekülen unter dem Einfluss des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 in einer Konzentration von 1 µM für 24 h.....	134
Abb. 6.37 Extrazelluläre Expression von E-Cadherin in MCF-7-Zellen, bestimmt per Durchflusszytometrie.....	137
Abb. 6.38 Vimentin-Expression in MDA-MB-231-Zellen mittels Western Blot.....	137
Abb. 6.39 Chemische Struktur des Vimentin-Inhibitors FiVe1.....	138
Abb. 6.40 Repräsentative Zytotoxizitätskurven des Vimentin Inhibitors FiVe1 in MDA-MB-231- und MCF-7- Zellen.....	138
Abb. 6.41 Änderung des Adhäsoms im ITGB1-kd.....	139
Abb. 6.42 Darstellung der Veränderung extrazellulärer Strukturen in Abhängigkeit des ITGB1, gemessen per Proteome Profiler array (n=1).....	141
Abb. 6.43 Chemische Struktur des DDR1-Inhibitors 7rh.....	143
Abb. 6.44 Zytotoxizität von 7rh.....	144
Abb. 6.45 Messung der Adhäsionsfähigkeit an COL1 in Abhängigkeit von ITGB1 und DDR1.....	145
Abb. 6.46 Darstellung von DDR1 und pDDR1 (Y513) in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen in Anwesenheit von COL1, ITGB1 und 7rh (n = mind. 3).....	146
Abb. 6.47 Darstellung von ERK und pERK in Anwesenheit von COL1, ITGB1 und 7rh.....	147
Abb. 6.48 Darstellung von pCREB (Ser133) in MCF-7 und MDA-MB-231 in Anwesenheit von COL1, ITGB1 und 7rh.....	148
Abb. 6.49 Regulation des EGFR in Gegenwart von COL1 und im ITGB1- <i>knockdown</i>	149
Abb. 6.50 Strukturformel von Gefitinib.....	151

Abb. 6.51 Repräsentative Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination DDR1-Inhibitor 7rh mit dem ERK Inhibitor SCH772984.	151
Abb. 6.52 Inhibition der fokalen Adäsionskinase durch den Inhibitor FAK14 in MCF-7-Zellen in Abhängigkeit der Inkubation mit COL1.....	152
Abb. 6.53 Screening verschiedener Inhibitoren auf einen chemosensitivierenden Effekt bzgl. der Wirkung klassischer Zytostatika in MCF-7-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und ITGB1- <i>knockdown</i>	153
Abb. 6.54 MAPK-Proteome Profiler array nach Inkubation mit COL1 und einer EC ₅₀ der Zytostatika CDDP, DOX und MX.....	155
Abb. 6.55 Screening verschiedener Inhibitoren auf einen chemosensitivierenden Effekt bzgl. der Wirkung klassischer Zytostatika in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1.	156
Abb. 6.56 Messung des inhibitorischen Potentials der verwendeten MAPK- und downstream-Inhibitoren auf ABCB1 und ABCC1.	157
Abb. 6.57. Messung des inhibitorischen Potentials der verwendeten MAPK- und downstream-Inhibitoren auf ABCG2.....	158
Abb. 6.58 Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination aus Doxorubicin mit SCH772984 in MDA-MB-231.....	159
Abb. 6.59 Kombination von Mitoxantron und SCH772984 in MDA-MB-231-Zellen.....	161
Abb. 6.60 Repräsentative Verteilung der Kombinationsindices nach Chou-Talalay für die Kombination von SCH772984 und DOX bzw. MX in MDA-MB-231 Zellen.	161
Abb. 6.61 Kombination von Mitoxantron und U0126 in MDA-MB-231-Zellen.	163
Abb. 6.62 Wirkung der Inhibition durch SCH772984 (1 µM, 24 h) auf die ABC-Transporteraktivität in MDA-MB-231-Zellen.	164
Abb. 6.63 Western Blot Analyse von den ABC-Transportern ABCB1 (P-Gp) und ABCG2 (BCRP) in Abhängigkeit von COL1 und ITGB1- <i>knockdown</i> , sowie der ERK-Inhibition per SCH772984 mit Pixeldichtenanalyse.....	165
Abb. 6.64 Testung der funktionellen Aktivität von ABC-Transporter ABCG2 und ABCB1/ABCC1 in Abhängigkeit einer MEK-Inhibition durch U0126 oder einer CREB-Inhibition durch 666-15	166
Abb. 6.65 Strukturformel von CREB-Inhibitor 666-15.....	167
Abb. 6.66 Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination aus MX bzw. DOX mit CREB Inhibitor 666-15 in MDA-MB-231-Zellen.	167
Abb. 6.67 Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombinationsbehandlung aus MX mit Gefitinib in MDA-MB-231-Zellen.	168
Abb. 6.68 Repräsentative Verteilung der Kombinationsindices nach Chou-Talalay für die Kombination von Gefitinib und MX in MDA-MB-231 Zellen.....	169
Abb. 6.69 Darstellung der pEC ₅₀ -Wert von Doxorubicin und Mitoxantron unter der Koinkubation von jeweils 1 µM Gefitinib.	170
Abb. 6.70 Darstellung der Zytotoxizität der Kombination von EGFR-Rezeptor-Antagonist Gefitinib und ERK-Inhibitor SCH772984.....	172
Abb. 6.71 Kombination von Mitoxantron und DDR1-Inhibitor 7rh in MDA-MB-231.....	174

Abb. 6.72 Messung der inhibitorischen Eigenschaften des DDR1-Antagonists 7rh auf die Transporter ABCB1 und ABCC1 mittels Calcein AM und ABCG2 mittels Pheophorbid A ...	174
Abb. 6.73 Repräsentative Zytotoxizitätsuntersuchungen zu der Kombination DDR1-Inhibitor 7rh mit ERK Inhibitor SCH772984.....	176
Abb. 6.74 Übersicht der pEC ₅₀ -Werte der Zytotoxizitätsuntersuchungen von 7rh in Abhängigkeit von ERK-Inhibitor SCH772984.....	177
Abb. 6.75: Repräsentative Verteilung der Kombinationsindices nach Chou-Talalay für die Kombination von 7rh und SCH772984 in MDA-MB-231 Zellen.....	177
Abb. 6.76 Kombination von DDR1-Inhibitor und MEK-Inhibitor U0126.	178
Abb. 6.77 Tripel-Inkubation von 7rh, SCH772984 und Gefitinib in MDA-MB-231-Zellen in Abhängigkeit von COL1 und ITGB1.	180
Abb. 7.1 Graphische Zusammenfassung der Arbeit.	185

9.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Klassifizierung der Mammakarzinome nach St. Gallen-Konsensus-Empfehlung	5
Tab. 2.2 Die Entwicklung der <i>hallmarks of cancer</i> nach Hanahan und Weinberg.....	15
Tab. 2.3 Vorhandensein der jeweiligen ITGB1-Heterodimere.	21
Tab. 4.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten des Proteoms der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231	48
Tab. 4.2 Verwendete Varianten der MCF-7 Zelllinien.	49
Tab. 4.3 ABC-Transporter überexprimierende Zelllinien.....	49
Tab. 4.4 Verwendete primäre Antikörper	50
Tab. 4.5 Übersicht der sekundären Antikörper	51
Tab. 4.6 Verwendete Inhibitoren.....	51
Tab. 4.7 Verwendete Stimulantien für Oberflächenrezeptoren.....	52
Tab. 4.8 Verwendete Kits.....	52
Tab. 4.9 Verwendete Nährmedien.....	53
Tab. 4.10 Verwendete Stamm – und Arbeitslösungen.....	54
Tab. 4.11 Hergestellte Western Blot Medien	55
Tab. 4.12 Hergestellte Antikörper-Lösungen.....	56
Tab. 4.13 Verbrauchsmaterialien	57
Tab. 4.14 Verwendete Software	60
Tab. 6.1 Übersicht der in Abb. 6.3 dargestellten pEC ₅₀ -Werte	92
Tab. 6.2 Übersicht der Ergebnisse zum Einfluss von XR9577 (10 µM) aus Abb. 6.10	101
Tab. 6.3: Übersicht der Ergebnisse von Abb. 6.16 mit Bildung des RF.	108
Tab. 6.4 Übersicht der Daten aus Abb. 6.19 bei der Antagonisierung von ITGB1 durch Antikörper P5D2. Die Tabelle ist ergänzt um den jeweiligen RF-Wert, sowie die Daten zum P2D5-basierten antagonisierenden Effekt gegenüber der COL1-vermittelten CDDP-Chemoresistenz.	113
Tab. 6.5 Tabellarische Übersicht der in Abb. 6.58 dargestellten Messergebnisse in Form der EC ₅₀ -Werte und des RFs.	159
Tab. 6.6 Tabellarische Übersicht der in Abb. 6.59 dargestellten Messergebnisse in Form der EC ₅₀ und des RFs.	160
Tab. 6.7 Tabellarische Übersicht der Messergebnisse von MCF-7-Zellen in Form von EC ₅₀ und RFs.	162
Tab. 6.8 Übersicht der Messwerte der Koinkubation von MX bzw. DOX mit U0126.....	163
Tab. 6.9 Übersicht der EC ₅₀ Werte der Koinkubation von MX und Gefitinib.....	169
Tab. 6.10 Übersicht der EC ₅₀ Werte der Koinkubation von DOX und Gefitinib.....	170
Tab. 6.11 Tabellarische Übersicht der in Abb. 6.70 dargestellten Messergebnisse	171
Tab. 6.12 Übersicht über die EC ₅₀ Werte der Kombination von 7rh DOX und MX-aus Abb. 6.71	175
Tab. 6.13 Tabellarische Übersicht der in Abb. 6.74 dargestellten Messergebnisse	176
Tab. 6.14 Übersicht über die Zellviabilitäten, normalisiert auf scrambled control + PBS ...	180

9.4. Wissenschaftliche Beiträge

Gockel LM, Pfeifer V, Baltes F, Bachmaier RD, Wagner KG, Bendas G, Gütschow M, Sosič I, Steinebach C. Design, synthesis, and characterization of PROTACs targeting the androgen receptor in prostate and lung cancer models. Arch Pharm (Weinheim). 2022 May;355(5):e2100467.. Epub 2022 Feb 7. PMID: 35128717.
doi:10.1002/ardp.202100467

Silbermann K, Li J, Namasivayam V, Baltes F, Bendas G, Stefan SM, Wiese M. Superior Pyrimidine Derivatives as Selective ABCG2 Inhibitors and Broad-Spectrum ABCB1, ABCC1, and ABCG2 Antagonists. J Med Chem. 2020 Sep 24;63(18):10412-10432.
doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00961

Baltes F, Caspers J, Henze S, Schlesinger M, Bendas G. Targeting Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Signaling and Its Crosstalk with β 1-integrin Emerges as a Key Factor for Breast Cancer Chemosensitization upon Collagen Type 1 Binding. Int J Mol Sci. 2020 Jul 13;21(14):4956.
doi:10.3390/ijms21144956

Baltes F, Pfeifer V, Silbermann K, Caspers J, Wantoch von Rekowski K, Schlesinger M, Bendas G. β 1-Integrin binding to collagen type 1 transmits breast cancer cells into chemoresistance by activating ABC efflux transporters. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020. 867(5):118663.
doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118663

Jakubzig B*, Baltes F*, Henze S, Schlesinger M, Bendas G. Mechanisms of Matrix-Induced Chemoresistance of Breast Cancer Cells-Deciphering Novel Potential Targets for a Cell Sensitization. Cancers (Basel). 2018. 10(12):495
doi:10.3390/cancers10120495

* beide Autoren haben in gleichem Maße beigetragen (“contributed equally”)

Pfankuchen DB, Baltes F, Batool T, Li JP, Schlesinger M, Bendas G. Heparin antagonizes cisplatin resistance of A2780 ovarian cancer cells by affecting the Wnt signaling pathway. Oncotarget. 2017 Jun 28;8(40):67553-67566.
doi:10.18632/oncotarget.18738

9.5. Konferenzbeiträge

Integrin β 1 downregulation increases ABC transporter activity in breast cancer,

Fabian Baltes, Julia Caspers, Martin Schlesinger, Gerd Bendas, CESAR, **2019**, Oldenburg, Vortrag

Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) is a potential target for breast cancer sensitizing strategies,

Julia Caspers, Fabian Baltes, Martin Schlesinger, Gerd Bendas, CESAR, **2019**, Oldenburg, Poster

Integrin beta1 enhances chemoresistance in breast cancer cells by a negative feedback mechanism of MAPK signaling and activating ABC transport proteins

Fabian Baltes, Martin Schlesinger, Gerd Bendas, FEBS Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer, Spetses, Griechenland, **2019**, Poster

Is environment-mediated drug resistance (EM-DR) of breast cancer cell lines driven by ABC-transporters?

Fabian Baltes; Vladlena Pfeifer; Katja Silbermann; Michael Wiese; Martin Schlesinger; Gerd Bendas, FEBS ABC-Transporter, Innsbruck, Österreich, **2018**, Poster + Vortrag

Do ABC-transporters contribute to development of environment mediated drug resistance in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231?

Baltes, F.; Pfeifer, V.; Silbermann, K.; Wiese, M.; Bendas, G, DpHG Jahrestagung **2017**, Saarbrücken, Poster

Investigation of integrins' contributions to environment-mediated drug resistance (EM-DR) in breast cancer cells

Baltes, F.; Schlesinger, M.; Bendas, G., Deutsche Gesellschaft für Matrixbiologie, Köln, **2017**, Poster

Integrin activation leads to increased chemoresistance against cisplatin, doxorubicin and mitoxantrone in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231

Baltes, F.; Piva, B.M.R.; Schlesinger, M.; Bendas, G., DpHG-Jahrestagung, **2016**, München, Poster