

Einfluss stromaler Faktoren auf die Differenzierung humaner Mammaepithelzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Inke Lühr

Kiel, 2012

Referent/in: Prof. Dr. Thomas, Kunze

Korreferent/in: Prof. Dr. Susanne Sebens

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2012

Zum Druck genehmigt: Kiel, 04.02.2013

Der Dekan

Zusammenfassung

Hintergrund: Das Stroma hat einen regulierenden Einfluss auf die Entwicklung des normalen Brustgewebes. Aberrante stromal-epitheliale Interaktionen können die Entstehung und das Wachstum von Tumoren induzieren. Mammastromafibroblasten spielen dabei eine bedeutende Rolle sowohl für die Regulation von Wachstum und Differenzierung der normalen Brustdrüse als auch für die Kontrolle von Tumorentstehung und -progression. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von Mammastromafibroblasten auf das Wachstumsverhalten von normalen und neoplastischen Brustepithelzellen in einer 3D-Matrix zu untersuchen.

Methoden: Phänotypisch normale menschliche Brustepithelzellen (S1-Zellen) wurden in 3D-Collagen-I-Gelen als Monokultur und als Cokultur mit Zellen einer normalen Mammafibroblastenzelllinie (HMF), mit primären tumorassoziierten und mit primären normalen Mammafibroblasten kultiviert. Um die Fähigkeit von Fibroblasten zur Kontrolle der Malignität zu analysieren, wurden tumorigene Epithelzellen (T4-2-Zellen) verwendet. Mit Hilfe frei schwimmender Gele und Gelen unterschiedlicher Festigkeit wurde der Einfluss der fibroblasten-induzierten Matrixbeschaffenheit auf die epitheliale Morphogenese untersucht. Das Wachstum der Epithelzellen wurde jeweils durch Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Mit 1D-SDS-PAGE und nano-HPLC-ESI-MS/MS wurden lösliche stromale Faktoren identifiziert, die an der Zelldifferenzierung beteiligt sind. Weiterhin wurden mit dem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip Genexpressionsprofile von S1-Zellen aus Mono- und Cokulturen erstellt und verglichen. Veröffentlichte Genexpressionsprofile von 295 menschlichen Brusttumoren mit zugehörigen klinischen Daten wurden verwendet, um mit Hilfe von t-Tests, Kaplan-Meier- und hierarchischen Cluster-Analysen die Fähigkeit der gefundenen Genexpressionsprofile der S1-Zellen als prognostische Marker zu überprüfen.

Ergebnisse: S1-Zellen wiesen in 3D-Kollagen-I-Monokulturen zu 80 % ein progressives und unstrukturiertes krebsähnliches Wachstum auf. In Cokultur mit HMF kam es hingegen zu einem Wachstumsarrest der S1-Zellen. Sie bildeten wie normale Epithelzellen in vivo überwiegend azinusähnliche Strukturen mit polarisierter Ausrichtung der Zellachse (60 %). Ein Vergleich normaler und tumorassoziierten Fibroblasten zeigte, dass die Induktion der Differenzierung unabhängig vom Ursprung der Stromazellen war. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl die von Fibroblasten induzierte Matrixbeschaffenheit als auch die von Fibroblasten produzierten löslichen Faktoren die Morphogenese der Epithelzellen regulieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Korrektur der Matrixbeschaffenheit durch Fibroblasten sogar eine phänotypische Reversion von Brustkrebszellen induzieren kann. Genchip-Analysen belegten die beobachteten Wachstumsunterschiede der S1-Zellen in Mono- und Cokulturen mit HMF auch in den Genexpressionsprofilen der Epithelzellen. Für die überwiegende Zahl der Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Monokultur werden Funktionen im Bereich der Zellzyklusregulation beschrieben. Der größte Teil der Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Cokultur hingegen ist im Funktionsbereich der

Differenzierung und der Extrazellulärmatrix-Konstitution anzusiedeln. Des Weiteren konnte basierend auf dem verwendeten 3D-Zellkulturmodell eine 20 Gene umfassende Genexpressions-signatur identifiziert werden, die prognostische Informationen liefert.

Schlussfolgerung: Fibroblasten spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Morphogenese normaler Brustepithelzellen und der Kontrolle des Tumorwachstums. Die Korrektur der Gewebshomöostase durch Fibroblasten ist hierbei ein entscheidender Prozess. Die gefundenen Ergebnisse liefern neue Einblicke in stromal-epitheliale Interaktionen und bieten eine vielversprechende Basis zur Entwicklung neuer Strategien für die Behandlung von Brustkrebs.

Abstract

Background: The tissue microenvironment plays a critical role in the regulation of normal mammary gland development and tissue homeostasis. Mammary stromal fibroblasts contribute to tissue-specific form and function, and altered stromal-epithelial interactions induce malignant transformation and tumor progression. The aim of this study was to investigate the influence of mammary fibroblasts on growth behavior and morphogenesis of normal and neoplastic mammary epithelial cells grown in a 3D environment.

Methods: Normal human mammary epithelial cells (S1 cells) were cultured in 3D collagen I gels as monoculture and as coculture with normal mammary fibroblasts (HMF), primary cancer associated fibroblasts or primary normal mammary fibroblasts. Tumorigenic human mammary epithelial cells (T4-2 cells) were used to assess the ability of fibroblasts to control malignancy. With floating gels and gels of varying stiffness the influence of fibroblast-induced changes in matrix compliance on epithelial cell morphogenesis was evaluated. Morphogenesis and growth of epithelial cells were analyzed by immunofluorescence staining. 1D-SDS-PAGE and nano-HPLC-ESI-MS/MS were performed to identify soluble factors produced by fibroblasts involved in cell differentiation. Furthermore, gene expression profiles of normal epithelial cells from co- and monocultures were analyzed using the Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip. Using published microarray profiles of 295 human breast tumors with associated clinical data, t-tests, Kaplan-Meier and hierarchical cluster analysis were performed to stratify the patients according to the generated gene expression profiles.

Results: Nearly 80 % of S1 cells demonstrated progressive carcinoma-like growth in 3D collagen I monocultures. In contrast, 60 % of S1 cells in coculture with HMF arranged themselves into growth-arrested polarized acinus-like structures in coculture with HMF as known from normal epithelial cells in vivo. A comparison of primary normal and cancer-associated fibroblasts demonstrates that the induction of differentiation is independent of the original stromal background. Increasing matrix stiffness results in progressive disorganization of the tissue architecture, which can be reversed by the presence of fibroblasts. Both soluble factors secreted by fibroblasts and fibroblast-derived modifications of the matrix compliance contribute to the regulation of epithelial cell morphogenesis. Readjustment of matrix tension by fibroblasts can even induce a phenotypic reversion of breast carcinoma cells. Gene chip analysis proved these differences in gene expression profiles of epithelial cells as well. Consistent with our observations in cell culture transcripts upregulated in S1 cells from coculture mainly relate to extracellular matrix constitution and differentiation. Transcripts upregulated in S1 cells from monoculture are predominantly involved in cell cycle regulation. Kaplan Meier and hierarchical cluster analysis showed that 20 selected genes were highly informative in identifying patients with poor or good outcome.

Conclusion: Stromal fibroblasts play a significant role in the regulation of normal mammary epithelial morphogenesis and the control of tumor growth. Remodeling the tensional homeo-

stasis is an important mechanism by which fibroblasts trigger acinar differentiation of normal and neoplastic mammary epithelial cells. These data provide new insights into stromal-epithelial interactions in the mammary gland and offer a basis to develop new strategies for the normalization of the tumor stroma.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	5
Inhaltsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	14
1 Einleitung	15
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	15
1.2 Anatomie und Zellbiologie der Brust	15
1.3 Tumorstroma als therapeutisches Target	21
1.4 Genexpressionsprofile in der Tumorthherapie	23
1.5 Zellkulturmodelle	24
1.6 Zielstellung	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte, Software.....	27
2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterial	28
2.1.3 Zellen	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Zellkultur	33
2.2.2 Zellisolierungen.....	37
2.2.3 Dreidimensionale Collagen-I-Kultur	38
2.2.4 Variationen des dreidimensionalen Zellkulturmodells.....	40
2.2.5 Gelfixierung.....	40
2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen in Collagengelen.....	41
2.2.7 Auswertung der dreidimensionalen Collagen-I-Mono- und Cokulturen	42
2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Objektträgern	43
2.2.9 Apoptose-Assay.....	43

2.2.10 Zellpräparation für die Zellsortierung mittels FACS	44
2.2.11 Zellzyklusanalysen.....	44
2.2.12 Genexpressionsanalysen	45
2.2.13 Überstandsanalysen	46
3 Ergebnisse	48
3.1 Einfluss der Cokultivierung mit Mammastromafibroblasten auf benigne und maligne Mammaepithelzellen	49
3.1.1 Quantitative Analysen des Wachstumsverhaltens benigner Mammaepithelzellen.	49
3.1.2 Qualitative Analysen des Wachstumsverhaltens benigner Mammaepithelzellen...	52
3.1.3 Quantitative und qualitative Analysen des Wachstumsverhaltens maligner Mammaepithelzellen.....	56
3.1.4 Quantitative und qualitative Analysen des Wachstumsverhaltens benigner Mammaepithelzellen in Cokultur mit primären Fibroblasten.....	59
3.1.5 Analyse der Genexpressionsprofile benigner Mammaepithelzellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.....	64
3.2 Einfluss mechanischer Signale auf das Wachstumsverhalten benigner und maligner Mammaepithelzellen	71
3.2.1 Analyse des Einflusses der Matrixfestigkeit auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen.....	71
3.2.2 Analyse des Einflusses der Zellkontraktilität auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen.....	74
3.2.3 Analyse des Einflusses der Zellkontraktilität auf das Wachstumsverhalten maligner Mammaepithelzellen.....	76
3.3 Einfluss parakriner Signale auf das Wachstumsverhalten benigner und maligner Mammaepithelzellen	78
3.3.1 Analyse des Einflusses stromal produzierter löslicher Faktoren auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen	79
3.3.2 Analyse des Einflusses stromal produzierter löslicher Faktoren auf das Wachstumsverhalten maligner Mammaepithelzellen	81
4 Diskussion	83
4.1 Mammastromafibroblasten induzieren die Differenzierung benigner, nicht aber maligner Mammaepithelzellen	83

4.1.1 Mammastromafibroblasten bestimmen das Wachstumsverhalten benigner und maligner Mammaepithelzellen	83
4.1.2 Mammastromafibroblasten regulieren die Genexpression benigner Mammaepithelzellen.....	86
4.2 Eine adäquate Matrixbeschaffenheit induziert sowohl die Differenzierung benigner als auch maligner Mammaepithelzellen.....	88
4.3 Lösliche stromale Faktoren können die Differenzierung benigner, nicht aber maligner Mammaepithelzellen induzieren.....	89
4.4 Fazit	91
5 Ausblick	92
Anhang	93
A1: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Monokultur.....	93
A2: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Cokultur	94
A3: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Monokultur und ihre Korrelation mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen.....	96
A4: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Cokultur und ihre Korrelation mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen.....	98
A5: Biologische Funktionen der 20 Gene der <i>mono-high-signature</i>	99
A6: Proteine produziert von normalen Mammastromafibroblasten (HMF).....	103
Literaturverzeichnis	112
Danksagung	121
Eigene Publikationen	123
Lebenslauf	125
Ehrenwörtliche Erklärung.....	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Brustgewebes.	16
Abbildung 1.2: Anatomie und Histologie der gesunden weiblichen Brust.	17
Abbildung 1.3: Stromaler Einfluss auf Tumorentstehung und -wachstum.....	19
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Basalmembran.	20
Abbildung 1.5: Das Tumorstroma als therapeutisches Target.	22
Abbildung 2.1: Historie der HMT-3522-Zelllinie.....	33
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung 3D-Collagen-Kultur-Modell.	40
Abbildung 3.1: Morphologisches Wachstum von S1-Zellen in einer dreidimensionalen Matrix aus Matrigel®.....	48
Abbildung 3.2: Projektaufbau der vorliegenden Forschungsarbeit.....	49
Abbildung 3.3: Evaluation des Wachstums von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.	51
Abbildung 3.4: Morphogenese von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.	53
Abbildung 3.5: Charakterisierung der Morphogenese von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.	54
Abbildung 3.6: Milchgangähnliche Strukturen gebildet von S1- Zellen in Standard-Monokultur.	55
Abbildung 3.7: Mesenchymale Charakteristika in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.	56
Abbildung 3.8: Quantitatives und qualitatives Wachstumsverhalten von T4-2-Zellen in dreidimensionaler Mono- und Cokultur mit HMF.....	57
Abbildung 3.9: Charakterisierung der Morphogenese von T4-2-Zellen in Mono- und Cokultur.	58
Abbildung 3.10: Mesenchymale Charakteristika in T4-2-Monokultur und T4-2-Cokultur mit HMF.	59
Abbildung 3.11: Charakterisierung der Fibroblasten.	61
Abbildung 3.12: Azinäre Morphogenese von S1-Zellen in Cokultur mit NF, CAF und HMF. ...	64
Abbildung 3.13: Biologische Funktion der Gene mit überexprimierter Expression in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.	66

Abbildung 3.14: Korrelation der mono-high-signature mit der Prognose von Brustkrebspatientinnen.	70
Abbildung 3.15: Evaluation des Einflusses der Matrixfestigkeit auf das quantitative und qualitative Wachstumsverhalten von S1-Zellen in Monokultur.....	72
Abbildung 3.16: Einfluss der Matrixbeschaffenheit auf das morphologische Wachstumsverhalten von S1-Zellen.	73
Abbildung 3.17: Evaluation des Einflusses der Matrixfestigkeit auf das quantitative und qualitative Wachstumsverhalten von S1-Zellen in Cokultur.	74
Abbildung 3.18: Azinäre Morphogenese der S1-Zellen in frei schwimmenden 3D-Collagen-I-Gelen.....	75
Abbildung 3.19: Azinäre Morphogenese von T4-2 Zellen in frei schwimmenden 3D-Collagen-I-Gelen.....	77
Abbildung 3.20: Charakterisierung der Morphogenese von T4-2-Zellen in frei schwimmenden Mono- und Cokulturen.....	77
Abbildung 3.21: Mesenchymale Charakteristika in frei schwimmender T4-2-Monokultur und T4-2-Cokultur mit HMF.....	78
Abbildung 3.22: Einfluss von konditioniertem Medium auf Wachstum und Morphogenese von S1-Zellen in Standard-Monokultur.	79
Abbildung 3.23: Einfluss von konditioniertem Medium auf das Wachstum und die Morphogenese von T4-2-Zellen.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Geräte.....	27
Tabelle 2.2: Software	28
Tabelle 2.3: Substanzen.....	28
Tabelle 2.4: Kits.....	29
Tabelle 2.5: Mediumzusätze	30
Tabelle 2.6: Primärantikörper	30
Tabelle 2.7: Sekundärantikörper	31
Tabelle 2.8: Laborverbrauchsmaterial.....	31
Tabelle 2.9: Zelltypspezifische Medien	34
Tabelle 2.10: Stammlösungen.....	35
Tabelle 2.11: Arbeitslösungen.....	36
Tabelle 2.12: Pipettierschema zur Herstellung der Collagenlösung für eine Standard-Monokultur und eine Standard-Cokultur auf einer 12-Well-Platte.....	38
Tabelle 2.13: Im 3D-Kulturmodell eingesetzte Zellzahlen.....	39
Tabelle 2.14: Pipettierschema zum Ansetzen einer Standard-Monokultur und einer Standard-Cokultur auf einer 12-Well-Platte.....	39
Tabelle 3.1: Quantifizierung des Wachstums von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur mittels FACS nach 9 Tagen Kulturdauer.....	52
Tabelle 3.2: Expression von Differenzierungsmarkern in S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.....	54
Tabelle 3.3: Expression von Differenzierungsmarkern in T4-2-Zellen in Monokultur und Cokultur mit HMF.....	59
Tabelle 3.4: Klinische und histologische Charakteristika der Patientinnen.....	60
Tabelle 3.5: α -SMA-Expression in primären normalen Mammastromafibroblasten.....	62
Tabelle 3.6: α -SMA-Expression in primären tumorassoziierten Mammastromafibroblasten....	62
Tabelle 3.7: Einfluss primärer normaler Mammastromafibroblasten auf Wachstum und Morphogenese von S1-Zellen in einer 3D-Collagen-I-Matrix.....	63
Tabelle 3.8: Einfluss primärer tumorassoziiertes Mammastromafibroblasten auf Wachstum und Morphogenese von S1-Zellen in einer 3D-Collagen-I-Matrix.....	63

Tabelle 3.9: Gene aus Standard-Cokultur mit hochregulierter Expression in S1-Zellen, die auch im Rosetta-Datensatz enthalten sind (co-high-group).....	67
Tabelle 3.10: Gene aus Standard-Monokultur mit hochregulierter Expression in S1-Zellen, die auch im Rosetta-Datensatz enthalten sind (mono-high-group).....	68
Tabelle 3.11: Expression von Differenzierungsmarkern in T4-2-Zellen in frei schwimmender Monokultur und Cokultur mit HMF.	78
Tabelle 3.12: Einfluss von Nidogen-1 und Laminin auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen.	81

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
BM	Basalmembran
CAF	<i>cancer associated fibroblasts</i> (tumorassoziierte Fibroblasten)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (Deoxyribonucleic acid)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGRF	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAP	<i>fibroblast activation protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HMF	<i>human mammary fibroblasts</i>
HRG	<i>histidine-rich glycoprotein</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
NF	<i>normal fibroblasts</i> (normale Fibroblasten)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RNA	Ribonucleic acid
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist weltweit der bei Frauen am häufigsten auftretende bösartige Tumor [1]. In Deutschland stand Brustkrebs im Jahr 2008 mit ca. 72.000 Neuerkrankungen an erster Stelle der Krebsneuerkrankungen, 1980 waren es etwa halb so viele [2]. Ab 2005 ist ein rasanter Anstieg der Krebsinzidenz in Deutschland zu verzeichnen. Dieser lässt sich vermutlich auf die Etablierung neuer Screening-Methoden zurückführen [2].

Auch die in Deutschland sinkende Mortalitätsrate bei Brustkrebs lässt sich durch bemerkenswerte Fortschritte sowohl in der Früherkennung als auch in der Therapieentwicklung erklären [2]. Allerdings ist die Mortalität durch Brustkrebs trotz aller Fortschritte in Screening-Verfahren, Operation, Bestrahlung und Systemtherapie noch immer hoch. Für das Jahr 2008 wurden in Deutschland 17.209 Sterbefälle in Folge von Brustkrebs registriert [2]. Eine stetige Verbesserung der Früherkennungsmethoden und der Therapie ist daher auch weiterhin von großer Bedeutung. Für die onkologische Forschung sind die Aufklärung molekularer Mechanismen der Krebsentstehung sowie die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien folglich von großem Interesse.

1.2 Anatomie und Zellbiologie der Brust

Menschliche Organe entwickeln sich überwiegend während der Embryogenese und bleiben für die gesamte Lebensdauer in ihren grundlegenden Strukturen unverändert. Die Brustdrüse hingegen entwickelt sich hauptsächlich nach der Geburt unter dem Einfluss von Peptid- und Steroidhormonen [3]. Sie unterliegt ständigen hormonbedingten Veränderungen und durchläuft abwechselnd Zyklen der Proliferation, der funktionalen Differenzierung und der Apoptose [4]. In ihrer Funktion voll entwickelt ist die Brustdrüse nur während der Schwangerschaft und der Stillzeit [3, 5].

Die weibliche Brust setzt sich aus Drüsengewebe und Stroma zusammen (siehe unten). Histologisch gesehen handelt es sich um ein komplexes Netzwerk, das aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, einschließlich Endothelzellen, Adipozyten, infiltrierenden Immunzellen, Fibroblasten, löslichen Proteinen, wie z. B. Wachstumsfaktoren, und Matrixkomponenten besteht. Im Folgenden werden die für das Verständnis dieser Arbeit notwendigen Begrifflichkeiten zur Anatomie und Zellbiologie der weiblichen Brust erläutert. Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über die Anordnung der in diesem Zusammenhang relevanten Elemente in vivo.

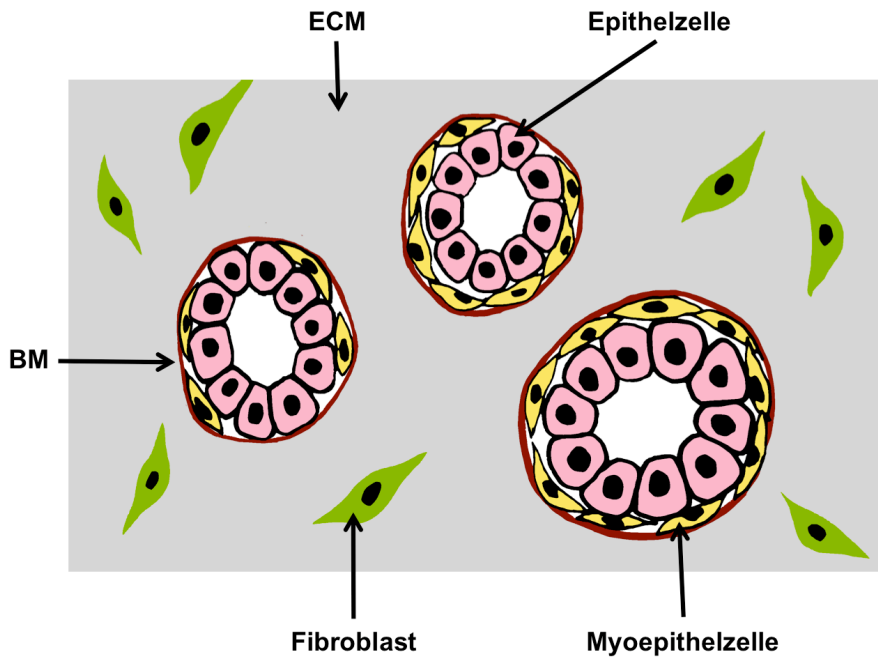


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Brustgewebes.

Die Abbildung stellt vereinfacht den Aufbau des Brustgewebes dar. Das Brustgewebe besteht aus epithelialen Komponenten (Epithelzellen und Myoepithelzellen) und dem Stroma (Extrazellulärmatrix (ECM), Basalmembran (BM) und Fibroblasten). Abbildung nach Nelson und Bissell, modifiziert [6].

Brustdrüse

Die Brustdrüse setzt sich aus 10-20 Drüsenlappen (*Lobus glandulae mammariae*) zusammen. Aus ihnen führt jeweils ein großer Milchgang (*Ductus lactifer colligens*) zur Brustwarze [Abb. 1.2]. Ein Drüsenlappen wiederum besteht aus mehreren Drüsenläppchen (*Lobulus glandulae mammariae*), deren Endstücke als Azini bezeichnet werden [Abb. 1.2]. In ihnen kann Milch produziert werden, welche über einen Ausführungsgang (*Ductus terminalis*) in den Sammelgang (*Ductus lactifer*) geleitet wird [Abb. 1.2] [7]. Die Drüsenläppchen zeigen eine zweischichtige Zellstruktur [Abb. 1.2] mit polarisierter Ausrichtung der Zellachse [8, 9]. Die apikale Schicht besteht aus luminalen Epithelzellen, von denen ca. 20 % in direktem Kontakt mit der sogenannten Basalmembran (siehe unten) stehen [10]. Der Hauptteil der luminalen Epithelzellen ist unmittelbar mit der basalen Schicht, welche von Myoepithelzellen gebildet wird, verbunden [Abb. 1.1] [10]. Myoepithelzellen sind maßgeblich für die korrekte Polarität der luminalen Epithelzellen verantwortlich und produzieren Proteine der Basalmembran [11-13].

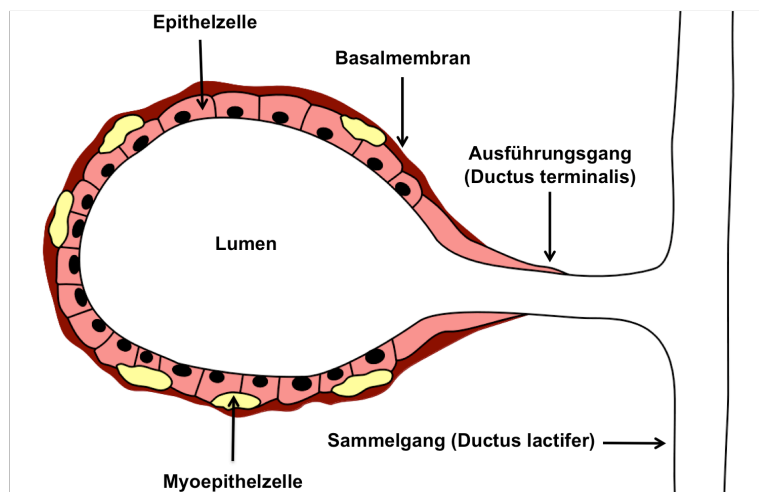
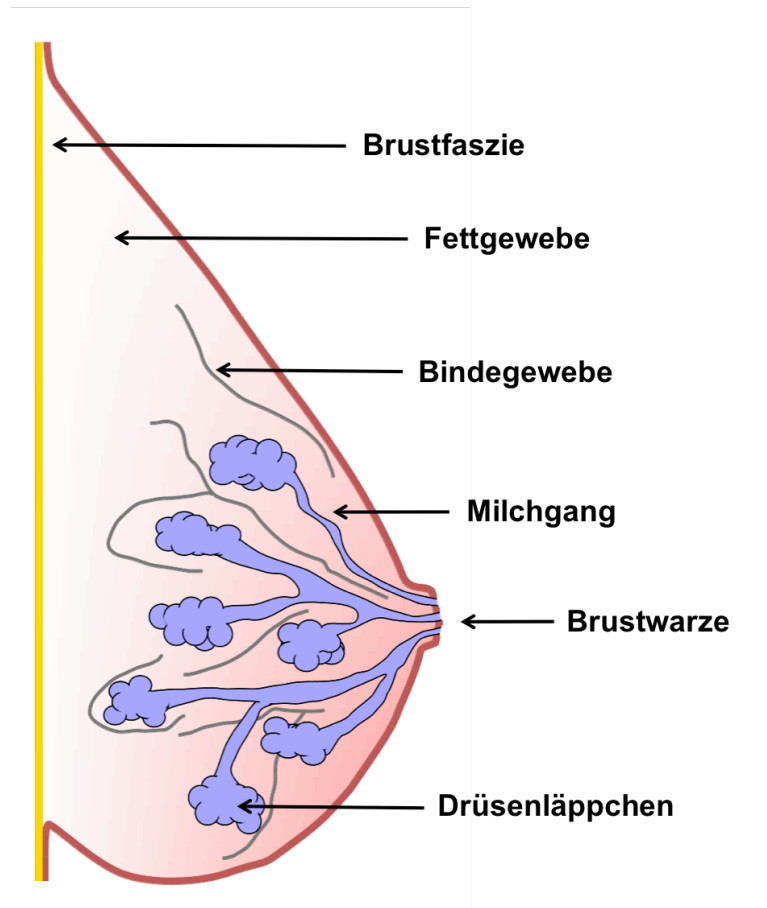


Abbildung 1.2: Anatomie und Histologie der gesunden weiblichen Brust.
 Schematische Darstellung der Anatomie der gesunden weiblichen Brust (oben) und der Histologie eines Azinus (unten). Das Lumen des Azinus hat einen Ausführungsgang, der in einem kleinen Sammelgang endet.

Stroma

Das Brustepithel ist in das Bruststroma eingebettet. Dieses macht mehr als 80 % des gesamten Brustvolumens aus und setzt sich aus Fettgewebe, Bindegewebe und Blutgefäßen zusammen [[14] und darin zitierte Literatur].

Das Stroma hat einen regulierenden Einfluss auf die Differenzierung und Morphogenese der normalen Brustdrüse. Petersen *et al.* zeigten dies bereits 1992 anhand der Bildung differenzierter Azini von normalen Epithelzellen durch Kultivierung in einer rekonstruierten Basalmembran [15]. Im Verlauf der malignen Transformation kommt es zu zahlreichen Veränderungen im Stroma und somit auch in Prozessen der stromal-epithelialen Interaktionen [16, 17]. Rozenchan *et al.* konnten dies durch Variationen in den genomischen Profilen von Mammaryfibroblasten und -epithelzellen in gemeinsamer Kultur zeigen [18]. Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über Faktoren, die im normalen Stroma die Entwicklung der normalen Brustdrüse fördern bzw. eine Tumorentstehung verhindern und über Veränderungen stromaler Faktoren, die im Zusammenhang mit der Genese und Progression von Tumoren beschrieben werden. Beliveau *et al.* zeigten beispielsweise, dass ein erhöhtes Vorkommen von MMP-9 zu einem Verlust der Wachstumskontrolle führt [19]. Ein weiteres Beispiel ist die VEGF-bedingte Extravasation von Plasmaproteinen im Rahmen der malignen Transformation. Diese führt zu einer gesteigerten Invasion von Fibroblasten sowie von Entzündungs- und Endothelzellen [20]. Es kommt zu einer Aktivierung von TGF- β 1, gefolgt von einer Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten (siehe unten). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind besonders die Aktivierung von Fibroblasten und Modifikationen der Extrazellulärmatrix (ECM) von Interesse.

Trotz zahlreicher neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der stromal-epithelialen Interaktionen konnten die zugrundeliegenden Mechanismen der Veränderungen des Stromas während der Tumorigenese bislang noch nicht hinreichend geklärt werden. Erkenntnisse hierüber könnten wegweisend für neue Ansätze in der Tumorthherapie sein.

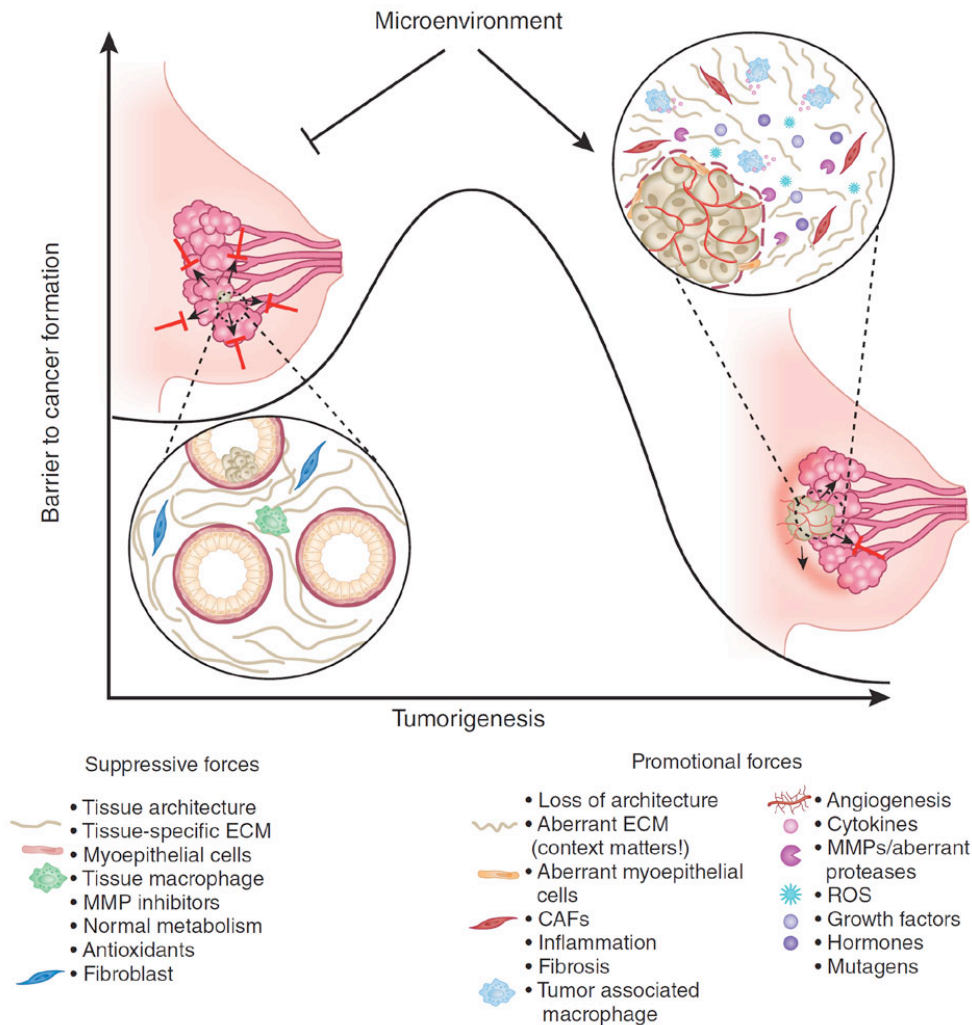


Abbildung 1.3: Stromaler Einfluss auf Tumorentstehung und -wachstum.

Normalerweise verhindern stromale Faktoren die Tumorentstehung sowie das Wachstum okkulten Tumoren (*suppressive force*). Im Rahmen der Tumorigenese geht diese Barrierefunktion verloren und aberrante stromale Faktoren fördern das Tumorwachstum (*promotional force*). Abbildung übernommen von Mina J Bissell und William C Hines [17].

Extrazellulärmatrix

Als Extrazellulärmatrix bezeichnet man die Gesamtheit aller nicht zellulären Bestandteile im Interzellularraum [Abb. 1.1]. Sie setzt sich aus den zwei Komponenten Grundsubstanz und Fasern zusammen. Die Grundsubstanz besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen und die dominierenden Faserproteine stellen Collagen, Elastin und Fibronectin dar [[21] und darin zitierte Literatur]. Neben der reinen mechanischen Stützfunktion gehören zu den Funktionen der Extrazellulärmatrix die Regulation der funktionalen und morphologischen Differenzierung der Brustepithelzellen sowie die Induktion gewebespezifischer Genexpression [15, 21, 22].

Basalmembran

Die Basalmembran umgibt die Myoepithelzellen und grenzt so den Azinus vom umgebenden Stroma ab [Abb. 1.1] [23]. Sie besteht im Wesentlichen aus Collagen-IV, Laminin, Nidogen (Entactin) und Heparansulfat-Proteoglycanen [23]. Nidogen vernetzt Laminin und Collagen-IV. Laminin stellt über Integrinrezeptoren die Verbindung zur Zelle her [24] [Abb. 1.4]. Die anderen Komponenten der Basalmembran interagieren mit Laminin und Collagen-IV und tragen so zur Bildung einer funktionsfähigen Basalmembran bei.

Neben ihrer mechanischen Funktion beeinflusst die Basalmembran maßgeblich das Zellverhalten [25, 26]. Der Basalmembran kommt sowohl in der Differenzierung der normalen Brustdrüse als auch im malignen Prozess eine entscheidende Bedeutung zu. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine aberrante Komposition der Basalmembran mit der Entstehung und Progression von Tumoren in der Brust assoziiert ist [25, 26]. Die Basalmembran ist aufgrund ihrer regulierenden Funktion zu einem interessanten Target der Krebstherapie geworden.

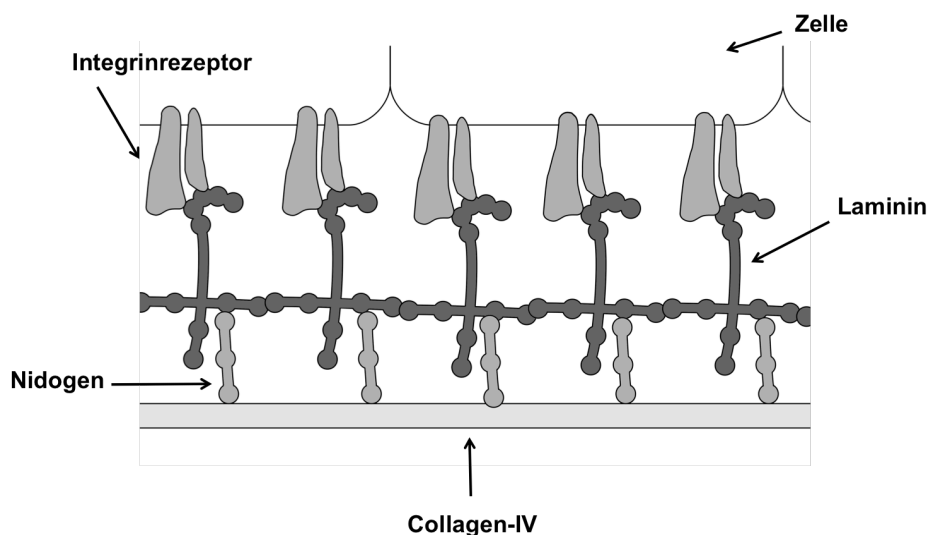


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Basalmembran.
Die Abbildung stellt vereinfacht den Aufbau der Basalmembran dar.

Fibroblasten

Fibroblasten sind Zellen mesenchymaler Herkunft und stellen den dominierenden Zelltyp des Bindegewebes der Brust dar. Zu den wichtigsten Funktionen der Fibroblasten gehört die Produktion von ECM-Bestandteilen wie Collagen und Fibronectin. Sie spielen eine bedeutende Rolle im Rahmen der epithelialen Differenzierung und Entzündungsreaktion und sind maßgeblich an der Wundheilung beteiligt [27, 28]. In gesundem Gewebe befinden sich Fibroblasten in einem inaktiven Ruhezustand. Im Tumorstroma hingegen weisen sie einen modifizierten Phä-

notyp auf und werden als aktivierte Fibroblasten, tumorassoziierte Fibroblasten oder Myofibroblasten bezeichnet [[29] und darin zitierte Literatur]. Beim Mammakarzinom sind ca. 80 % der stromalen Fibroblasten aktiviert [30], wobei die Mechanismen, die eine derartige Aktivierung induzieren, noch nicht vollständig bekannt sind. Es werden unter anderem folgende Faktoren im Zusammenhang mit der Aktivierung diskutiert: *transforming growth factor-β* (TGF-β), *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor 2* (FGF2) sowie eine modifizierte ECM [[29] und darin zitierte Literatur].

Aktivierte Fibroblasten unterscheiden sich sowohl in der Morphologie als auch in ihrer Funktionalität von Fibroblasten im Ruhezustand. Normalerweise haben Fibroblasten einen niedrigen Proliferationsindex und produzieren Komponenten einer physiologischen ECM. Im Gegensatz dazu proliferieren aktivierte Fibroblasten stark, sezernieren höhere Mengen an ECM-Komponenten und zeigen kontraktile Eigenschaften [[31, 32] und darin zitierte Literatur]. Bauer *et al.* zeigten weiterhin, dass tumorassoziierte Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten ein aberrantes Genexpressionsprofil aufweisen [33].

Anders als normale Fibroblasten initiieren tumorassoziierte Fibroblasten die maligne Transformation und Invasion von Tumorzellen [34-37]. Unter Verwendung eines dreidimensionalen Zellkulturmodells konnten Shekhar *et al.* zeigen, dass im Gegensatz zu Fibroblasten aus gesundem Mammagewebe tumorassoziierte Fibroblasten das Wachstum von normalen und präneoplastischen Mammaepithelzellen induzieren [38]. Als mögliche beteiligte Faktoren werden von Fibroblasten produziert TGF-β, Matrix-Metalloproteasen (MMP), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF) beschrieben [[29] und darin zitierte Literatur, [39]].

Obwohl sich das Verständnis über die Rolle von Fibroblasten im Rahmen der Tumorigenese in den letzten Jahren verbessert hat, besteht dringender Bedarf, die Funktion der Stromafibroblasten in malignen Geweben systematisch und umfassend zu charakterisieren. Eine gezielte Unterbindung der beschriebenen nachteiligen Interaktionen zwischen Stromazellen und Karzinomzellen durch Normalisierung des Tumorstromas könnte einen innovativen Therapieansatz in der Behandlung des Mammakarzinoms darstellen.

1.3 Tumorstroma als therapeutisches Target

Die Methoden der klassischen Krebstherapie konzentrieren sich überwiegend auf die Krebszellen an sich. Auf Grund zahlreicher stromal-epithelialer Interaktionen liegt es allerdings nahe, dass Tumoren nicht separat betrachtet werden dürfen, sondern gemeinsam mit ihrem Stroma als komplexe Organsysteme verstanden werden müssen [40]. Da diese komplexen Systeme eine Vielzahl potenzieller Ansatzpunkte neuer Therapiemethoden in der Behandlung des Mammakarzinoms bieten [Abb. 1.5], ist das Interesse am Tumorstroma als therapeutisches Target in den letzten Jahren enorm gestiegen [[41] und darin zitierte Literatur]. Weaver

et al. zeigten beispielsweise, dass durch Manipulation des Tumorstromas mittels β 1-Integrin-Antikörpern eine Reversion des malignen Phänotyps induziert werden kann [42].

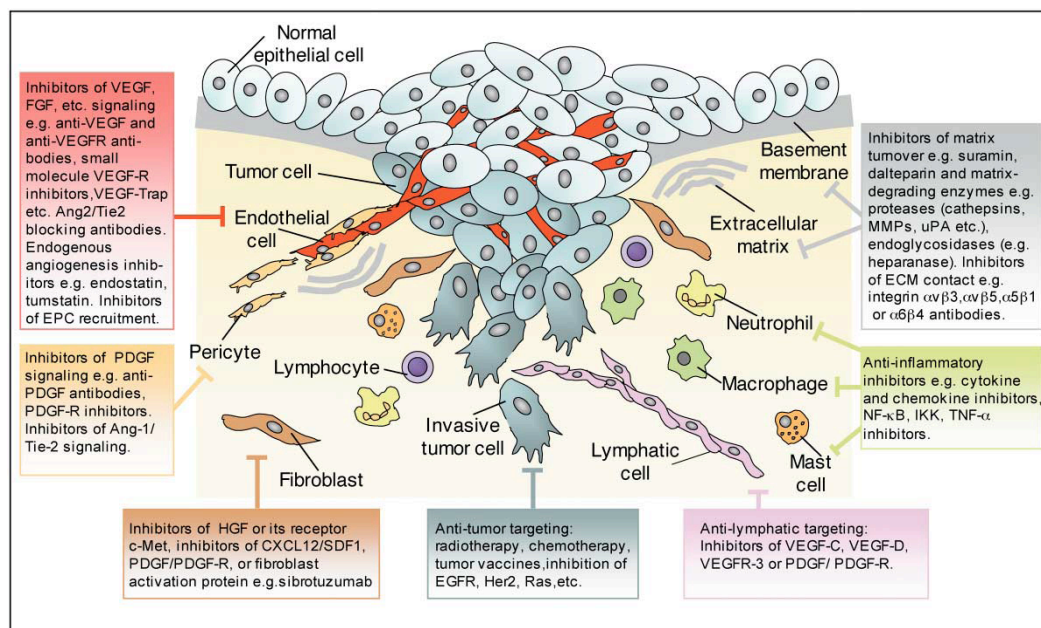


Abbildung 1.5: Das Tumorstroma als therapeutisches Target.

Die Abbildung gibt einen Überblick über ausgewählte stromale Ansatzpunkte der Tumorthherapie. Abbildung übernommen von Joyce [41].

Einige Therapiemethoden im Zusammenhang mit dem Tumorstroma haben sich bereits im Klinikalltag in der Brustkrebstherapie etabliert. Zu ihnen gehören:

- Angiogenese modulierende Substanzen (Bevacizumab)

Vom Stroma produzierte Proteine wie VEGF können die durch Tumoren bewirkte Angiogenese induzieren [43]. Antikörper gegen angiogenese-induzierende Faktoren können die Gefäßneubildung durch Tumoren und somit das Tumorwachstum und die Metastasierung inhibieren.

- Her2neu-Inhibitoren (Trastuzumab)

Her2neu wird von stromal produzierten Wachstumsfaktoren stimuliert und induziert so die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. Durch den Einsatz von Her2neu-Inhibitoren bei Her2neu-positiven Brustkrebspatientinnen wird die Wirkung stromaler Wachstumsfaktoren unterbunden und so das Wachstum der Tumorzellen gehemmt [44, 45].

Neben bereits etablierten Methoden befinden sich zahlreiche Substanzen und Wirkmechanismen potenzieller Tumorthapeutika in der Entwicklung bzw. Erforschung. In den Reviews

von Joyce, Kenny *et al.*, Liotta *et al.*, Place *et al.* und Bissell *et al.* wird ausführlich darüber berichtet [17, 41, 44, 46, 47]. Im Folgenden werden einige der dort beschriebenen Beispiele aufgeführt.

- Fibroblasten als Target

Sibrotuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen *fibroblast activation protein* (FAP). FAP wird selektiv von tumorassoziierten Fibroblasten produziert und fördert das Tumorwachstum [48].

- ECM als Target

Integrine stellen die Verbindung zwischen Zellen und der ECM dar. Der humanisierte Antikörper gegen Integrin $\alpha v \beta 3$ (Vitaxin) hemmt das Tumorwachstum und die Angiogenese [49, 50].

- Makrophagen als Target

Rolny *et al.* zeigten im Mausmodell, dass die Überexpression von Histidine-rich glycoprotein (HRG) eine Normalisierung von tumorassoziierten Makrophagen induziert, welche mit einer Verminderung des Wachstums von Brusttumoren einhergeht [51].

Das Tumorstroma wird weiterhin mit der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht. Rolny *et al.* zeigten eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika im Zusammenhang mit einer Überexpression von HRG [51]. Die Erhöhung der Chemosensitivität stellt eine Möglichkeit dar, die Dosen der Chemotherapie zu verringern und damit Nebenwirkungen zu minimieren.

Das Tumorstroma stellt folglich sowohl in der Prävention als auch in der Behandlung von primären Tumoren sowie von rezidierten und disseminierten Erkrankungen ein vielversprechendes therapeutisches Target dar.

1.4 Genexpressionsprofile in der Tumorthherapie

Therapieentscheidungen bei Brustkrebserkrankungen basieren weitgehend auf klinisch-pathologischen Kriterien wie Alter der Patientinnen, Tumorgroße, histologischem Grad, Lymphknotenmetastasen, lymphovaskuläre Invasion, Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus und Her2neu-Status. Die Identifizierung von Patientinnen mit günstiger Prognose, bei denen gegebenenfalls auf eine adjuvante Therapie verzichtet oder eine weniger aggressive Therapieoption gewählt werden könnte, stellt allerdings noch immer eine große Herausforderung im Klinikalltag dar. Derzeit erhält ein Großteil aller Patientinnen mit Brustkrebs im Frühstadium eine Chemotherapie, von der allerdings nur eine Minderheit profitiert [[52, 53]

und darin zitierte Literatur]. Forschungsergebnisse aus dem Gebiet der Genexpressionsanalysen deuten darauf hin, dass Genexpressionssignaturen ein leistungsstarkes Hilfsmittel bei derartigen Therapieentscheidungen sein können. Bei diesen Analysen werden gleichzeitig die Über- oder Unterregulation der Expression tausender Gene untersucht und so individuelle molekulare Profile von Patientinnen erstellt. Die identifizierten Profile werden auch als Genexpressions- bzw. Gensignaturen bezeichnet. Es konnten bereits Gensignaturen aus Tumoren entwickelt werden, die Aussagen über Prognose und Therapieansprechen erlauben [54-56]. Mello-Grand *et al.* identifizierten eine Genexpressionssignatur, die Voraussagen über das Therapieansprechen östrogenrezeptor-positiver Patientinnen auf eine neoadjuvante Behandlung mit Anastrozol ermöglicht [54]. Zwei Signaturen (OncotypeDX[®] und MammaPrint[®] [57-60]) werden bereits in der Klinik eingesetzt, um das individuelle Rezidivrisiko und die Erfolgchancen einer adjuvanten Chemotherapie zu bestimmen.

Im Rahmen der Tumorigenese kommt es im Stroma zu erheblichen molekularen Veränderungen [61, 62]. Auch aus dem Tumorstroma konnten bereits Genexpressionssignaturen mit prognostischem Charakter identifiziert werden [63, 64]. Finak *et al.* identifizierten beispielsweise eine Gensignatur aus Stromazellen, die Voraussagen über den klinischen Verlauf bei Brustkrebs erlaubt [65].

1.5 Zellkulturmodelle

Der überwiegende Teil der in der Literatur beschriebenen Zellkulturexperimente wird mithilfe von zweidimensionalen Kulturmodellen durchgeführt. In diesen Modellen werden Zellen zweidimensional auf unterschiedlichen Oberflächen kultiviert. Eine Erweiterung dieser Modelle stellen Kulturen mit sogenannten Zellkultureinsätzen dar. Hierbei werden innerhalb einer Kultur verschiedene Zelltypen zweidimensional, durch eine Membran voneinander getrennt, kultiviert. Auf diese Weise kann der Einfluss von Zellen produzierter löslicher Faktoren auf das Zellwachstum untersucht werden.

In vivo befinden sich Zellen allerdings in einem dreidimensionalen Gewebeverband. Untersuchungen haben ergeben, dass es gravierende Unterschiede zwischen Zellen in zwei- und dreidimensionalen Kulturen gibt, z. B. im Bereich der Genexpression [66, 67], der Zellpolarität [68] und -proliferation [42]. Aus diesem Grund ist das Interesse an dreidimensionalen Zellkulturmodellen in den letzten Jahren stark gestiegen. Die Verwendung von dreidimensionalen Zellkulturmodellen ermöglicht es, durch Manipulation des Mediums, der Matrixbeschaffenheit und -konstitution sowie durch Cokultivierung verschiedener Zelltypen in-vivo-nahe Bedingungen des benignen und malignen Gewebes zu simulieren.

Das einfachste Modell einer dreidimensionalen Kultur stellt die sogenannte *overlay*-Kultur dar. Bei dieser Methode wird die Oberfläche, beispielsweise von Objektträgern, mit einer Matrix-

substanz überzogen. Hat sich die Matrix verfestigt, wird sie mit einer Suspension, die die gewünschten Zellen enthält, beschichtet [69].

Bei dem am häufigsten verwendeten dreidimensionalen Kulturmodell werden die Zellen direkt in der gewünschten Matrix suspendiert kultiviert. Als Matrix werden oft Acrylamid und Collagene verwendet. Die gängigste unter den in dreidimensionalen Zellkulturmodellen als Matrix verwendete Substanz ist allerdings Matrigel®. Hierbei handelt es sich um eine aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom gewonnene solubilisierte Basalmembran-Zubereitung, die als Hauptbestandteile Laminin, Collagen-IV, Heparansulfat-Proteoglycan und Nidogen-1 (Entactin) [70] enthält. Die Verwendung von Matrigel® als Matrix bringt allerdings einige Nachteile mit sich. Matrigel® enthält neben den Hauptbestandteilen viele weitere Komponenten, die sich auf das Zellverhalten auswirken und deshalb die Untersuchung des Einflusses einzelner Faktoren störend beeinflussen können. Ein weiterer Nachteil ist die Gewinnung aus Tumoren. Durch den malignen Ursprung ist die Eignung zur Simulation benignen in-vivo-Bedingungen fraglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Kultivierung der Zellen ebenfalls ein dreidimensionales Modell gewählt. Um die genannten Nachteile von Matrigel® zu vermeiden, wurde eine reine Collagen-I-Matrix verwendet. Collagen-I stellt in vivo eine der Hauptkomponenten der interstiellen Matrix dar [71]. Das verwendete Kulturmodell erlaubt es, den Einfluss einzelner Faktoren auf das Wachstumsverhalten von Zellen unter möglichst in-vivo-nahen Kulturbedingungen zu untersuchen.

1.6 Zielstellung

Während die Krebsforschung sich ursprünglich hauptsächlich auf die Tumorzellen selbst konzentrierte, stellen neuere Forschungsarbeiten direkte Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen und der umliegenden Mikroumgebung in den Fokus. Wie zuvor erläutert, konnte gezeigt werden, dass stromale Faktoren in der Lage sind, die Differenzierung und Morphogenese der normalen Brustdrüse sowie das Tumorwachstum und die Tumorprogression zu beeinflussen. Neueste Erkenntnisse implizieren eine Schlüsselfunktion der Fibroblasten in der Tumorentstehung (siehe Kapitel 1.2). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch nicht hinlänglich bekannt.

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, den Effekt normaler Mammastromafibroblasten als dominierenden Stromazelltyp auf die Differenzierung, Proliferation und Genexpression von Mammaepithelzellen in einem geeigneten Kulturmodell zu untersuchen und deren Korrelation mit klinischen Daten zu evaluieren. Die Zellen sollten hierfür unter möglichst in-vivo-nahen Bedingungen kultiviert werden.

Das Projekt gliederte sich in folgende Teile:

- Einfluss normaler Mammastromafibroblasten auf die Differenzierung und Proliferation normaler und neoplastischer Mammaepithelzellen
- Einfluss stromaler Faktoren auf die Genexpression normaler Mammaepithelzellen
- Einfluss primärer normaler und tumorassoziierter Mammastromafibroblasten auf die Differenzierung und Proliferation normaler Mammaepithelzellen
- Einfluss löslicher stromaler Faktoren auf die Differenzierung und Proliferation normaler und neoplastischer Mammaepithelzellen
- Einfluss verschiedener Matrixeigenschaften auf die Differenzierung und Proliferation normaler und neoplastischer Mammaepithelzellen

Die aus diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse können bedeutende Grundkenntnisse für die Aufklärung molekularer Wirkmechanismen der Fibroblasten im Rahmen der epithelialen Differenzierung liefern. Das Verständnis dieser Mechanismen kann dazu beitragen, Strategien zur Normalisierung des Tumorstromas zu entwickeln.

Das übergeordnete Ziel dieser Forschungsarbeit ist es, einen Beitrag für die Entwicklung von innovativen Therapieansätzen bei der Behandlung des Mammakarzinoms durch die Normalisierung des Tumorstromas zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Software

Tabelle 2.1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Forma Scientific CO ₂ Water Jacketed Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACSAria	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioscope	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, USA
Invertiertes Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kolbenhubpipetten (0,5-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laserscanmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Millipore Elix 5	Millipore, Billerica, USA
Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Plattformschüttler, rotierend, Heidolph Uni-max 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Plattformschüttler, reziprok, Heidolph Pro-max 1020	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schüttelwasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Sterilbank, NuAire Class II	NuAire Laboratory Equipment Supply, Minnesota, USA
Sunrise Absorbance Reader	Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
Ultrospec™ 3100 pro UV/Visible Spectrophotometer	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Rotina 48RC	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.2: Software

Bezeichnung	Hersteller
AmiGO	http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi
DAVID Bioinformatics Resources 6.7	http://david.abcc.ncifcrf.gov/
Excel® 2008 für Mac; Version 12.2.8	Microsoft, Redmond, USA
FACSDiva software	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
GeneChip® Operating Software (GCOS)	Affymetrix, Santa Clara, USA
NIH ImageJ 1.40g	http://rsb.info.nih.gov/ij/
XFluor™	Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
Zeiss AxioVision Software Rel.4.6.3	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.3: Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BD Matrigel Matrix, Basement Membran	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Collagen I rat tail	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Collagen I rat tail High Conc.	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Collagenase Typ1	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Collagenase Typ8	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Phama AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
DC Protein Assay Reagent A, B, S	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DME/F12	Hyclone (Perbio science) Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
DMEM	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
GeneChip® Expression 3' Amplification Reagents - Hybridization Controls sufficient for 30 reactions	Affymetrix, Santa Clara, USA
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FCS	Invitrogen, Californien, USA

Hank's Buffered Salt Solution 1x, liquid Invitrogen, Californien, USA

Bezeichnung	Hersteller
Hyaluronidase	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Laminin 1 mg (1 ml)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+ Co.KG, Karlsruhe; Deutschland
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd 16 %	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml /10.000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1x ohne CaCl ₂ oder MgCl ₂	Gibco Invitrogen, Californien, USA Corporation, Grand Island, NY, USA
Propidiumiodid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Recomb. Human Nidogen-1/Entactin	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
RNAse	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Tissue Tek O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Deutschland GmbH, Staufen, Deutschland
Trypsin 0,25 %	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton-X	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin neutralizing solution	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vectashield	Axxora Deutschland GmbH, Lörrach, Deutschland
Ziegenerum	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.4: Kits

Bezeichnung	Hersteller
GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit sufficient for approx. 100 reactions	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit sufficient for 30 reactions	Affymetrix, Santa Clara, USA
In Situ Cell Death Detection Kit (POD)	Roche Phama AG, Mannheim, Deutschland
MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Single Round aRNA Amplification Kit	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.5: Mediumzusätze

Bezeichnung	Hersteller
apo-Transferrin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
beta-Estradiol	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGF	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydrocortison	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Insulin (≥ 27 USP units per mg)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Prolactin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Sodium selenite	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.6: Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
<i>monoclonal mouse anti actin, smooth muscle</i>	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:100
<i>monoclonal mouse anti beta 1-Integrin</i>	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:200
<i>monoclonal mouse anti beta 4-Integrin</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:50-1:200
<i>polyclonal rabbit anti beta-catenin</i>	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:25-1:50
<i>monoclonal mouse anti cytokeratin</i>	Medac GmbH, Wedel, Deutschland	1:100
<i>polyclonal rabbit anti cytokeratin wide spectrum</i>	abcam, Berlin, Deutschland	1:100
<i>monoclonal mouse anti golgin-97</i>	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland	1:100
<i>monoclonal rabbit anti Ki-67</i>	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:100
<i>polyclonal rabbit anti vimentin</i>	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:100
<i>polyclonal rabbit anti ZO-1</i>	New England Biolabs GmbH, Ipswich Massachusetts, USA	1:25

Tabelle 2.7: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor ® 488 <i>goat anti rabbit</i>	Invitrogen, Californien, USA	1:500
Alexa Fluor ® 555 <i>goat anti rat</i>	Invitrogen, Californien, USA	1:500
Alexa Fluor ® 594 <i>goat anti mouse</i>	Invitrogen, Californien, USA	1:500

Tabelle 2.8: Laborverbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Chamberslide	Nunc GmbH & Co.KG, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Cryovials	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Facsröhrchen, BD Falcon™	BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford, USA
falcon cell strainer 40 µm/100 µm	BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford, USA
Gewebekulturplatten	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Objektträger	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Objektträgersystem	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Rotilabo Probenfläschchen/Schraubkappen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter CA 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zellkulturflaschen T75/T25	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatten Cellstar 6-, 12-, 24- und 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Zellen

S1-Zellen: Bei den S1-Zellen handelt es sich um Zellen der spontan immortalisierten normalen humanen Mammaepithelzelllinie HMT-3522 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von O.W. Petersen (Department of Cellular and Molecular Medicine, Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark; [72]). Isoliert wurden die Zellen ursprünglich von einer Patientin (50 Jahre, Kaukasierin) mit fibrös-zystischer Mastopathie. Zellverhalten bzw. genomische Veränderungen der S1-Zellen wurden über mehrere hundert Passagen hinweg charakterisiert [Abb. 2.1]. Der Chromosomensatz dieser Zellen ist teilweise hypertriploid. In Mäusen sind sie auch nach 400 Passagen nicht tumorigen [Abb. 2.1].

T4-2-Zellen: Aus den im vorherigen Absatz beschriebenen S1-Zellen sind unter definierten Kulturbedingungen die sogenannten T4-2-Zellen entstanden [Abb. 2.1]. Die Zellen dieser Zelllinie wachsen unabhängig von EGF und sind in Mäusen tumorigen [Abb. 2.1] [73].

HMF (human mammary fibroblasts): Bei den HMF handelt es sich um Zellen einer immortalisierten humanen Mammastromafibroblastenzelllinie. Diese Stromazellen stammen aus einer Mammareduktionsplastik und wurden durch retrovirale Transduktion mit humaner Telomerase (hTERT) immortalisiert. Zusätzlich exprimieren die Zellen *green fluorescent protein* (GFP) als Transgen [74].

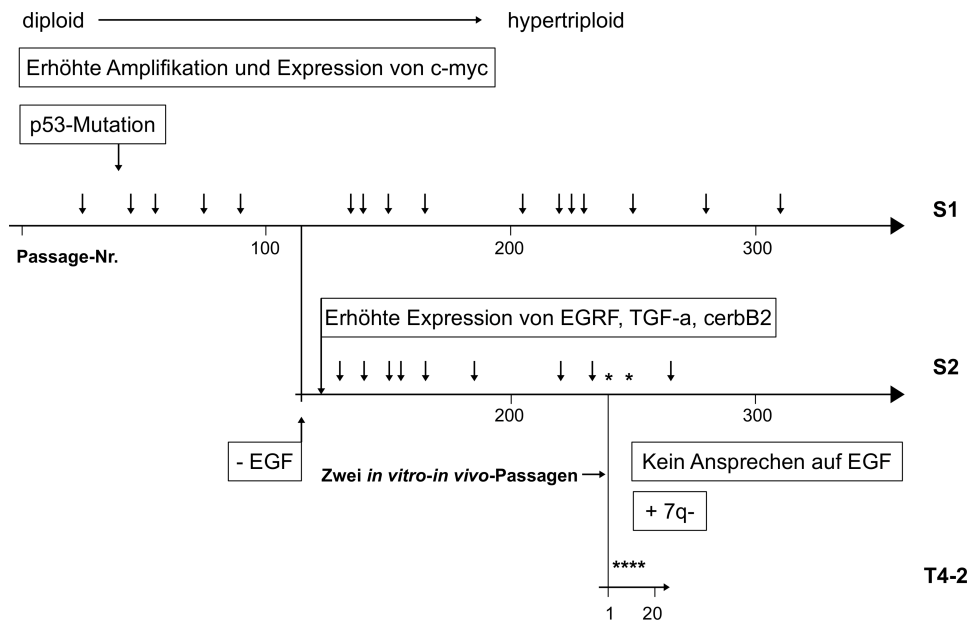


Abbildung 2.1: Historie der HMT-3522-Zelllinie.

Die primären spontan immortalisierten S1-Zellen der HMT3522-Zelllinie sind in Mäusen nicht tumorigen. Durch Kultivierung in EGF-freiem Medium entstand aus S1-Zellen die Zelllinie S2. Nach weiteren 120 Passagen bildeten S2-Zellen in Mäusen teilweise kleine Tumoren. Aus einem dieser Tumoren wurde durch in-vitro-in-vivo-Passagierung die in Mäusen hochgradig tumorigene Zelllinie T4-2 entwickelt. Abbildung nach Briand und Lykkesfeldt, modifiziert [75].
 Pfeil: subkutane Inokulation in Nacktmäuse; Stern: Tumorbildung in Nacktmäusen

Primärzellen: Aus Operationspräparaten von Patientinnen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel wurden Mammostromafibroblasten isoliert. Bei den operativen Maßnahmen handelte es sich um Segmentektomien, Mastektomien oder Reduktionsplastiken. Keine der Patientinnen erhielt eine neoadjuvante Behandlung. Aus benignem Gewebe wurden normale Fibroblasten (NF = *normal fibroblasts*) und aus malignem Gewebe tumorassoziierte Fibroblasten (CAF = *cancer associated fibroblasts*) isoliert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit 9 ml bzw. 5 ml des für sie geeigneten Mediums in T75- bzw. T25-Zellkulturflaschen [Tab. 2.9]. Für die Kultivierung der T4-2-Zellen mussten die Zellkulturflaschen mindestens 24 h vor dem Aussäen der Zellen mit einer Collagen-I-Lösung (siehe unten) beschichtet und bei 2-8 °C gelagert werden. Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 75 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 95 % Luft kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage begutachtet und der Situation entsprechend bearbeitet.

Tabelle 2.9: Zelltypspezifische Medien

Zelltyp	Medium
S1	H14
T4-2	H14 (ohne EGF und Natriumselenit)
HMF	Fibroblastenmedium
CAF, NF	Fibroblastenmedium

Herstellung Collagen-I-Lösung

5,97 µl Collagen-I wurden mit 45 ml PBS (1×) gemischt.

Herstellung der Medien

H14-Medium (Epithelzellmedium): Die Herstellung des H14-Mediums und der Mediumzusätze erfolgte wie von Blaschke *et al.* beschrieben [76]. Als Grundmedium wurde DME/F12 eingesetzt, welches mit den entsprechenden Arbeitslösungen versetzt wurde. Die genauen Mischungsverhältnisse werden in Tabelle 2.5 beschrieben. T4-2-Zellen wurden in H14-Medium ohne Zusatz von EGF und Natriumselenit kultiviert. Die Haltbarkeit des H14-Mediums betrug sieben Tage und die des H14-Mediums ohne EGF und Natriumselenit einen Monat.

Fibroblastenmedium: 500 ml DMEM wurden mit 50 ml FCS und 3 ml Penicillin/Streptomycin gemischt und steril filtriert.

Einfriermedien: 50 ml des für S1- und T4-2-Zellen eingesetzten Einfriermediums bestanden aus 5 ml Glycerol, 7,5 ml FCS und 37,5 ml DME/F12. 50 ml des Einfriermediums für HMF, NF und CAF setzten sich zusammen aus 45 ml FCS und 5 ml DMSO. Die Lösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

Herstellung der Mediumzusätze:

Es wurden zunächst Stammlösungen (Tab. 2.10) und anschließend Arbeitslösungen (Tab. 2.11), welche als Mediumzusätze dienen, hergestellt.

Tabelle 2.10: Stammlösungen

Substanz	Herstellung	Haltbarkeit
Insulin	20 mg Insulin wurden in 10 ml HCl (5 mM) gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -80 °C gelagert.	mehrere Jahre
Hydrocortison	50 mg Hydrocortison wurden in 10 ml Ethanol gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -80 °C gelagert.	1 Jahr
β -Estradiol	25 mg β-Estradiol wurden in 3,125 ml Ethanol gelöst (8 mg/ml). 0,1 ml dieser Lösung wurden mit 3 ml Ethanol verdünnt (1 mM). Um eine 10 μM Lösung zu erhalten, wurden 20 μl der 1 mM Lösung mit 1,98 ml Ethanol verdünnt. Die Lösungen wurden bei -20 °C vor Licht geschützt in braunen Probenfläschchen aus Glas gelagert.	1 Jahr
Natriumselenit	100 mg Natriumselenit wurden in 5 ml Millipore gelöst und die Lösung steril filtriert. 1 ml dieser Lösung wurde mit 39 ml Millipore verdünnt und bei -80 °C gelagert.	mehrere Jahre

Tabelle 2.11: Arbeitslösungen

Substanz	Herstellung	Haltbarkeit	Menge
Transferrin	100 mg Transferrin wurden in 5 ml Millipore gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	3 Monate	250 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Prolactin	250 IU Prolactin wurden in 8,33 ml NaHCO ₃ (pH 8) gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	6 Monate	2500 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Insulin	1 ml der Stammlösung wurde mit 19 ml Millipore verdünnt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	6 Monate	1250 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Hydrocortison	1 ml der Stammlösung wurde mit Ethanol verdünnt und bei -20 °C gelagert.	6 Monate	500 µl Lösung in 500 ml DME/F12
β-Estradiol	20 µl der Stammlösung (10 mol/l) wurden mit 1,98 ml Ethanol weiter verdünnt (0,1 µmol/l). Die Lösung wurde bei -20 °C vor Licht geschützt in braunen Probenfläschchen aus Glas gelagert.	6 Monate	500 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Penicillin/ Streptomycin	---		3 ml Lösung in 500 ml DME/F12
EGF	100 µg EGF wurden in 5 ml Millipore gelöst, steril filtriert und zum alsbaldigen Verbrauch bei -20 °C	3 Monate	100 µl Lösung in 200 ml DME/F12
	oder zur längeren Lagerung bei -80 °C gelagert.	mehrere Jahre	
Natriumselenit	52 µl Stammlösung wurden mit 10 ml Millipore verdünnt, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	1 Monat	200 µl Lösung in 200 ml DME/F12

Teilung von Zellen

Die Zellen in den Zellkulturflaschen wurden einmal mit PBS gespült und dann mit ca. 0,5 ml bzw. ca. 1,0 ml Trypsin beschichtet und bei 37 °C inkubiert. Wenn alle Zellen sich vom Boden gelöst hatten, wurde das Trypsin entweder mit Trypsininhibitor oder FCS-haltigem Medium inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (S1/T4-2: 10 min bei 1350 rpm; HMF: 6 min bei 3000 rpm), in geeignetem Medium resuspendiert und auf die gewünschte Anzahl an Flaschen verteilt.

Einfrieren/Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren in dem für sie geeigneten Einfriermedium resuspendiert und in Kryovials eingefroren (die ersten 24 h bei -80 °C; danach in N₂ bei -196 °C). Es wurden pro Milliliter $1,5 \times 10^6$ S1-Zellen und $0,75 \times 10^6$ T4-2-Zellen bzw. HMF eingefroren. Diese Mengen entsprachen den nach dem Auftauen benötigten Zellmengen. Zum Auftauen wurden die Kryovials mit den Zellen aus dem Stickstofftank entnommen, im Was-

serbad bei 38 °C möglichst schnell aufgetaut und dann in passendem Medium kultiviert [Tab. 2.9].

2.2.2 Zellisolierungen

Gewebeproben

Als Gewebeproben dienten frische Operationspräparate von Patientinnen, die an der Universitätsfrauenklinik Kiel operiert wurden. Eine Genehmigung zur Probengewinnung und -prozessierung durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein sowie eine Einverständniserklärung der Patientinnen wurden im Vorfeld der Isolierungen eingeholt. CAF wurden direkt aus primären, invasiven Mammakarzinomen isoliert. NF wurden im Rahmen von Reduktionsplastiken oder Mastektomien aus benignem Mammagewebe gewonnen, dabei wurde auf einen sicheren Abstand zum Tumor geachtet.

Isolierung

Die Entnahmen des Gewebes erfolgten durch einen Pathologen. Die entnommenen Proben wurden auf Eis in das Labor transportiert, wo unter sterilen Bedingungen die Isolierung der Fibroblasten (CAF/NF) erfolgte. Das Brustdrüsengewebe wurde von Fett befreit und in ca. 1 mm große Stücke zerteilt. In einer Lösung von Collagenase I (2 mg/ml) und Hyaluronidase (2 mg/ml) in DMEM wurde das Gewebe für mindestens 2 h unter konstanter Bewegung bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gewebe bei Raumtemperatur für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Alle folgenden Zentrifugationen wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Pellet wurde mit ca. 20 ml *Hank's Buffered Salt Solution* gewaschen und erneut für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde je nach gewünschtem Zelltyp wie im Folgenden beschrieben verfahren.

Isolierung von tumorassoziierten Fibroblasten: Um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen, wurde das Pellet im 10fachen Volumen Trypsin resuspendiert und für ca. 5 min unter konstanter Bewegung bei 37 °C inkubiert. Nach Stoppen der Trypsinreaktion mit dem 5fachen Volumen an eiskaltem DMEM wurden die Zellen mit Hilfe von Filtration durch 100 µm- und 40 µm-Filter von Geweberesten getrennt. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min wurden die Zellen in Fibroblastenmedium kultiviert.

Isolierung von normalen Fibroblasten: Das Pellet wurde in ca. 20 ml HBSS resuspendiert und das Gewebe mit Hilfe von Filtration durch 100 µm- und 40 µm-Filter in Fibroblasten und Epithelzellverbände getrennt. Das die Fibroblasten enthaltende Filtrat wurde für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und die normalen Fibroblasten anschließend in Fibroblastenmedium kultiviert.

Bei beiden Zelltypen wurden in den ersten Kulturtagen durch Waschen mit PBS Erythrozyten und Gewebereste entfernt.

2.2.3 Dreidimensionale Collagen-I-Kultur

Im Folgenden sind die Mengen für einen Ansatz auf einer 12-Well-Platte angegeben. Bei Verwendung von 6- oder 24-Well-Platten wurden die Mengen entsprechend der Größe der Wells angepasst.

Herstellung der Collagenlösung (Matrix)

Aus Collagen-I, PBS (4x) und H14-Medium (ggf. ohne EGF und Natriumselenit) wurde eine Collagenlösung der Konzentration 1,625 mg/ml hergestellt [Tab. 2.12]. Für die Untersuchung des Einflusses der Matrixkonsistenz wurden zusätzlich Konzentrationen von 1,25 mg/ml, 1,875 mg/ml, 2,5 mg/ml und 3,75 mg/ml verwendet. Der pH-Wert der Suspensionen wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Alle folgenden Schritte mit Collagen-I erfolgten auf Eis, da das Collagen bei Raumtemperatur polymerisieren würde.

Tabelle 2.12: Pipettierschema zur Herstellung der Collagenlösung für eine Standard-Monokultur und eine Standard-Cokultur auf einer 12-Well-Platte.

Rechenschritt	Beispiel
Gesamtvolumen Collagenlösung +25 % Pipettierverlust (V [ml])	$2 \times 0,6 \text{ ml} \times 1,25 = 1,5 \text{ ml}$
benötigte Collagenmenge (K [mg]) $K = \text{gewünschte Collagenendkonzentration} \times V$	$1,625 \text{ mg/ml} \times 1,5 \text{ ml} = 2,438 \text{ mg}$
benötigtes Volumen Collagen $C = K / \text{vorhandene Collagenstammkonzentration}$	$2,438 \text{ mg} / 3,35 \text{ mg/ml} = 0,728 \text{ ml}$
benötigtes Volumen PBS (P [ml]) $P = 0,5 \times C$	$0,5 \times 0,728 = 0,364 \text{ ml}$
benötigtes Volumen Medium (M [ml]) $M = V - C - P$	$1,5 \text{ ml} - 0,728 \text{ ml} - 0,364 \text{ ml} = 0,407 \text{ ml}$

Vorbereitung der Zellen

Die gewünschten Zellen wurden trypsinisiert und wenn nötig filtriert, um störende Zellaggregate zu entfernen. Mit Hilfe der Neubauerkammer wurden die Zellzahlen bestimmt und die Zellsuspensionen mit H14-Medium (ggf. ohne EGF und Natriumselenit) auf die gewünschte Zellzahl eingestellt [Tab. 2.13]. Fibroblasten, insbesondere CAF, weisen kontraktile Eigenschaften auf und können so das Collagengel kontrahieren. Aus diesem Grund wurde in Cokulturen mit CAF die Fibroblastenzahl geringfügig verringert. Es konnte gezeigt werden, dass diese geringfügige Veränderung der Fibroblastenzahl keinen Einfluss auf das quantitative und qualitative Wachstumsverhalten der Epithelzellen hat. Zum besseren Vergleich wurde die Zellzahl der benignen Fibroblasten (NF und HMF) bei direkten Vergleichskulturen ebenfalls angepasst.

Tabelle 2.13: Im 3D-Kulturmodell eingesetzte Zellzahlen.

Zelltypen	Zellverhältnis	Zellzahlen pro Well ($\times 10^6$)
S1:HMF	1 : 2 oder 1 : 1,6	0,07 : 0,14 oder 0,07 : 0,11
S1:NF	1 : 2 oder 1 : 1,6	0,07 : 0,14 oder 0,07 : 0,11
S1:CAF	1 : 1,6	0,07 : 0,11
T4-2:HMF	1 : 2	0,05 : 0,10

Ansetzen der Kulturen

Es wurde eine Collagensuspension aus der gewünschten Anzahl Epithel- und Stromazellen und der oben beschriebenen Collagenlösung hergestellt. Die verwendeten Volumina sind in Tabelle 2.14 am Beispiel einer S1/HHF-Kultur angegeben. Die endgültige Collagenkonzentration in den Gelen betrug 1,3 mg/ml. Für die Durchführung der Versuche mit erhöhter oder erniedrigter Matrixkonsistenz wurden zusätzlich Endkonzentrationen von 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml und 3,0 mg/ml verwendet. In die gewünschte Anzahl Wells einer 12-Well-Platte wurden pro Well 750 μ l Collagensuspension pipettiert und die Platte umgehend für etwa 1 h in den Brutschrank gestellt. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es pro Well mit 1 ml H14-Medium (ggf. ohne EGF und Natriumselenit) beschichtet [Abb. 2.2]. Die Zellen wurden in den Gelen für ca. 9 Tage (S1-Zellen) bzw. 4-8 Tage (T4-2-Zellen) im Brutschrank inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Medium gewechselt.

Tabelle 2.14: Pipettierschema zum Ansetzen einer Standard-Monokultur und einer Standard-Cokultur auf einer 12-Well-Platte.

Bestandteil	Volumen [μ l]	
	Monokultur	Cokultur
S1	50	50
HMF	---	100
H14 (ggf. ohne EGF und Natriumselenit)	100	---
Collagen-Suspension	600	600
Gesamtvolumen/Well	750	750

Pro Pipettierschritt wurden zusätzlich 10 % Pipettierverlust berechnet.

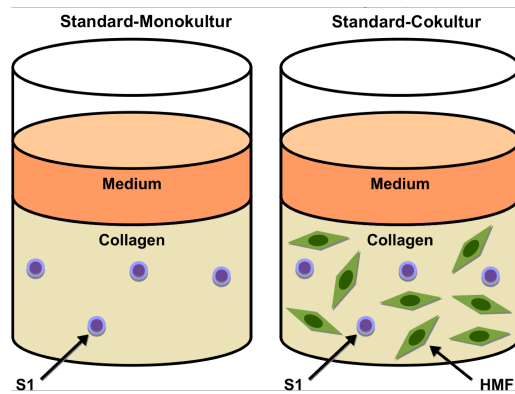


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung 3D-Collagen-Kultur-Modell.
S1-Zellen in dreidimensionaler Mono- und Cokultur mit HMF.

2.2.4 Variationen des dreidimensionalen Zellkulturmodells

Dreidimensionale Kultur mit konditioniertem Medium

Bei den Versuchen mit konditioniertem Medium wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll Monokulturen aufgesetzt. Diese wurden allerdings nicht mit normalem H14-Medium, sondern mit konditioniertem Medium der HMF (siehe unten) beschichtet. Als Kontrolle wurden zusätzlich eine Mono- und Cokultur mit normalem H14-Medium (ggf. ohne EGF und Natriumselenit) angesetzt.

Für die Gewinnung des konditionierten Mediums wurden HMF nach den gängigen Methoden in H14-Medium (ggf. ohne EGF und Natriumselenit) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % wachsen gelassen. Vor Versuchsbeginn blieb das Medium für mindestens 48 h in Kontakt mit den Fibroblasten. Bevor es auf die Kulturen gebracht wurde, wurde es zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellbestandteile zu entfernen.

Dreidimensionale Kultur mit rekonstruierter Basalmembran

Für die Kultivierung normaler Epithelzellen in einer Matrix, die reich an Proteinen der extrazellulären Matrix ist, wurde Matrigel® verwendet. Aus S1-Zellen, Matrigel® und PBS (1×) wurde eine Suspension hergestellt, in der Matrigel® 1 : 2 verdünnt ist. Diese wurde auf eine 24-Well-Platte pipettiert. Hierbei betrug die Zellzahl $0,07 \times 10^6$ /Well und das Gesamtvolumen an Zell-Matrigel®-Suspension 365,4 µl/Well. In den weiteren Schritten wurden die Kulturen analog den Collagenkulturen kultiviert.

2.2.5 Gelfixierung

Das Collagengel wurde zweimal mit PBS (20x) gewaschen und mit 500 µl Paraformaldehyd-Lösung pro Well für 20 min unter konstanter Bewegung bei Raumtemperatur fixiert. Anschlie-

ßend wurde das Gel dreimal mit PBS (1×) für 5 min unter konstanter Bewegung gewaschen. Das Gel in jedem Well wurde mit 1 ml 0,1 M Glycin in PBS (1×) beschichtet und über Nacht bei 2-8 °C gelagert. Am folgenden Tag wurde die Glycin-Lösung entfernt und das Gel weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Bearbeitung mit PBS (1×) beschichtet bei 2-8 °C gelagert.

Herstellung verwendeter Lösungen:

PBS (20x): Es wurden 160 g NaCl, 4 g KCl, 4,8 g KH_2PO_4 und 33,59 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 800 ml Millipore gelöst und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt.

Paraformaldehyd-Lösung (4%): Es wurden 2 ml 20faches PBS, 20 ml Millipore und 10 ml 16%iger Paraformaldehyd-Lösung gemischt. Die Lösung wurde mit Millipore auf 40 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Glycin-Lösung (0,1 mol/l): 3,75 g Glycin wurden in 475 ml Millipore gelöst. Die Lösung wurde mit PBS (20x) auf 500 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen in Collagengelen

Erster Tag

Es wurden dem Versuchsaufbau entsprechend aus dem zu untersuchenden Gel Stücke herausgeschnitten, die dickeren Ränder entfernt und die Gelstücke in Wells einer 12-Well-Platte, gefüllt mit PBS, überführt. Das PBS wurde entfernt und die Gelstücke durch Inkubation mit 500 μl 0,02%iger Triton-X-100-Lösung für 40 min unter konstanter Bewegung bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend wurde die Triton-X-100-Lösung abgesaugt und die Gelstücke für ca. 15 min unter konstanter Bewegung bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Gelstücke mit Blockierlösung für mindestens 2 h (konstante Bewegung, Raumtemperatur). Die gewünschten Primärantikörper wurden mit Blockierlösung entsprechend verdünnt [Tab. 2.6]. Die Gelstücke wurden in 400 μl dieser Antikörperlösungen pro Well in einer Feuchtkammer über Nacht bei 2-8 °C inkubiert.

Zweiter Tag

Die Primärantikörper wurden abpipettiert und die Gelstücke dreimal mit PBS (1×) für 10 min unter konstanter Bewegung bei Raumtemperatur gewaschen. Die benötigten Sekundärantikörper wurden mit Blockierlösung entsprechend verdünnt [Tab. 2.7]. Auf Grund der Lichtempfindlichkeit der Sekundärantikörper erfolgten alle weiteren Schritte unter Lichtausschluss. Die Inkubation mit Sekundärantikörpern erfolgte für 60 min unter konstanter Bewegung bei 37 °C in einer Feuchtkammer. Anschließend wurden die Gelstücke dreimal für 10 min mit PBS (1x) und zweimal für 5 min mit Millipore unter konstanter Bewegung bei Raumtemperatur gewaschen. Nach Abpipettieren der Sekundärantikörper wurden die Gelstücke für die Kernfärbung 30 min mit DAPI (0,125 $\mu\text{g/ml}$) unter konstanter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden sie nochmals mit PBS (1x) für 10 min unter konstanter Bewegung bei Raumtemperatur gewaschen. Die Gelstücke wurden auf Objektträger überführt, die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Gelstücke mit Vectashield eingedeckelt. Die Deckgläser wurden mit Nagellack befestigt. Die gefärbten Gelstücke wurden bis zur Auswertung bei 2-8 °C gelagert.

Herstellung verwendeter Lösungen:

0,02%iges Triton-X-100: 20 µl Triton-X-100 und 5 ml PBS (20x) wurden gemischt und die Lösung wurde mit 95 ml Millipore aufgefüllt.

Blockierlösung: 2,5 ml PBS (20x), 1,5 ml Ziegenserum und 46 ml Millipore wurden gemischt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.7 Auswertung der dreidimensionalen Collagen-I-Mono- und Cokulturen

Nach 9 bis 12 Kulturtagen wurden die Gele fixiert und gefärbt (s.o.). Die Analysen der Gelstücke erfolgten mit Hilfe von Fluoreszenz- und Laserscanning-Mikroskopie.

Quantitative Analyse des Zellwachstums

Um das quantitative Wachstumsverhalten der Zellen zu analysieren, wurden die Zellen in den fixierten Collagengelen mit dem Epithelzellmarker Pancytokeratin gefärbt. Es wurden pro Gelstück zehn Gesichtsfelder in 100facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop und der Zeiss AxioVision fotografiert. Mit Hilfe der NIH-ImageJ-Software wurde das Gesamtwachstum der Zellen evaluiert. Bauer *et al.* zeigten, dass bei dieser Art der Auswertung die Größe der Zellareale signifikant mit der Anzahl an Zellen korreliert [77]. Diese Erkenntnis erlaubt es, durch Bildung des Quotienten aus der in Pixel angegebenen Summe aller Pancytokeratin-positiven Flächen eines Bildes und der ebenfalls in Pixel angegebenen absoluten Bildgröße das Gesamtwachstum der Zellen zu ermitteln. Um signifikante Unterschiede zwischen den gefundenen Werten zu ermitteln, wurden mit Hilfe von Excel zweiseitige T-Tests durchgeführt und so p-Werte erzeugt. Werte $p \leq 0,05$ galten als statistisch signifikant.

Qualitative Analyse des Zellwachstums

Für die qualitative Analyse des Zellwachstums wurden pro Gelstück Gesichtsfelder in 250facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop in Hinblick auf die Morphologie der Zellcluster begutachtet. Einzelne Zellen und Cluster aus zwei oder drei Zellen wurden vernachlässigt. Die Zellcluster wurden eingeteilt in polarisierte Azini und unstrukturierte Zellaggregate. Polarisierte Azini bestanden aus einer einzelligen Schicht Epithelzellen, welche ein kleines Lumen umgaben. Die Polarisation wurde charakterisiert durch eine apikale Expression von Golgin-97. Unstrukturierte Zellcluster wurden charakterisiert durch 4 oder mehr Zellen mit irregulärer Aggregatform (Länge > 2x Breite) und unstrukturierte Expression von Golgin-97. Es

wurden, wie im vorherigen Absatz erwähnt, mit Hilfe von Excel zweiseitige T-Tests durchgeführt und so p-Werte erzeugt, um signifikante Unterschiede zwischen den ermittelten Werten zu identifizieren. p-Werte $\leq 0,05$ galten als statistisch signifikant.

Zur weiteren Charakterisierung der Polarisation der Azini wurden die Gele weiterhin mit Golgin-97, β 4-Integrin, β 1-Integrin, β -Catenin, ZO-1 und Vimentin gefärbt und ihre Expression am Laserscanmikroskop beurteilt.

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Objektträgern

Erster Tag

Die Zellen wurden auf Objektträgern im Brutschrank kultiviert. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 20 min mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS (1x) gewaschen und für weitere 30 min mit Glycin inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS (1x) und 20-minütiger Permeabilisierung mit Triton-X-100 wurden die Zellen nochmals für 10 min PBS (1x) gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit Blockierlösung bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den gewünschten Primärantikörpern bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer. Die Antikörper wurden mit Blockierlösung verdünnt.

Zweiter Tag

Am folgenden Tag wurden die Primärantikörper abpipettiert und die Zellen viermal für 10 min mit PBS (1x) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den gewünschten Sekundärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Die Sekundärantikörper wurden zuvor mit Blockierlösung verdünnt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Sekundärantikörper erfolgten alle folgenden Schritte soweit umsetzbar unter Lichtausschluss. Nach der Inkubation wurden die Zellen viermal für 10 min mit PBS (1x) und zweimal für 5 min mit Aqua dest. gewaschen. Für die Kernfärbung wurden die Zellen für 15 min mit DAPI-Blockierlösung (0,125 μ g/ml) inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit *Vectashield* eingedeckelt und die Deckgläser mit Nagellack befestigt.

2.2.9 Apoptose-Assay

Um die Apoptoserate normaler Brustepithelzellen in 3D-Mono- und Cokultur untersuchen zu können, wurden die Kulturen nach 10 Tagen Kulturdauer fixiert und unter Verwendung des eines *In Situ Cell Death Detection Kits* analysiert. Zur Identifizierung der Epithelzellen wurden die Gele zuvor wie unter 2.2.6 mit Pancytokeratin gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Zur Quantifizierung der Apoptose wurden die Gele mit dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und der Apoptose-Index ermittelt.

2.2.10 Zellpräparation für die Zellsortierung mittels FACS

Die GFP-Expression der Fibroblasten ermöglicht die Sortierung von Fibroblasten und Epithelzellen aus Kokulturen mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*). Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde das im Folgenden beschriebene Prozedere sowohl mit den Zellen aus Co- als auch mit den Zellen aus Monokulturen durchgeführt.

Für die Zellsortierung mittels FACS wurden die Kulturen auf 6-Well-Platten angesetzt. Die Collagengele wurden mit PBS (1x) gewaschen und durch Inkubation mit 1,5 ml Collagenase-TypVIII-Lösung (2 mg/ml in PBS (1x)) pro Well für 20 min bei 37 °C aufgelöst. Die Platten wurden gelegentlich per Hand geschüttelt und durch Auf- und Abpipettieren das restliche Collagen gelöst. Bei Bedarf wurden weitere 0,5 ml Collagenase pro Well ergänzt und nochmals für 15 min inkubiert. Nach möglichst vollständiger Auflösung der Gele wurde die erhaltene Zell-Collagen-Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und die Wells mit PBS (1x) gewaschen. Die erhaltenen Zell-Kollagen-Suspensionen wurden anschließend für 5 min bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet mit PBS (1x) gewaschen.

Damit die Zellen so weit wie möglich als Einzelzellen vorliegen, wurden die Zellaggregate für 5 min mit 0,2 ml Trypsin (0,25 %) inkubiert. Anschließend wurden 0,8 ml Medium hinzugegeben und die Zellen gezählt. Die ungefähre Anzahl der Zellen ist für die Einstellung des FACS-Gerätes hilfreich. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert und in 1 ml PBS (1x) resuspendiert. Kurz vor der Sortierung wurde durch eine Gaze filtriert, um noch vorhandene Aggregate und Gelreste zu entfernen.

2.2.11 Zellzyklusanalysen

Die Zellen wurden wie im vorherigen Absatz beschrieben mittels FACS getrennt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und zweimal mit PBS/EDTA (5 mM) gewaschen. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml PBS/EDTA resuspendiert. Es wurde gevortext und währenddessen langsam 1 ml Ethanol hinzugeträufelt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert (4°C, 8 min, 1500 rpm) und der Überstand abgekippt. Das Zellpellet wurde in 100 µl der folgenden Lösung gelöst: 80 µl PBS/EDTA (5 mM) + 20 µl RNase A (1 mg/ml) + 500 µl PBS/EDTA/Propidiumiodid (100 µg/ml). Nach einer Mindestinkubationszeit von 30 min bei 4°C (lichtgeschützt) wurde mittels FACS der Zellzyklus der Zellen analysiert.

2.2.12 Genexpressionsanalysen

RNA-Extraktion

Nach der Zellsortierung mittels FACS wurde RNA von S1-Zellen aus Mono- und Cokultur extrahiert. Hierfür wurde das RNeasy Micro kit nach Herstellerangaben verwendet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Genchips

Für die Erstellung der Genchips wurde RNA aus vier voneinander unabhängigen Cokulturexperimenten verwendet. Drei RNA-Proben wurden gepoolt und eine RNA-Probe separat eingesetzt. Die Herstellung erfolgte im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel nach den dort gängigen Methoden. Für die Herstellung von Genchips musste eine ausreichende Menge an RNA (3 µg) vorhanden sein. Es wurde nur RNA mit einer 260-nm/280-nm-Ratio von über 1,8 verwendet. Aus diesem Grund wurden zunächst qualitative Analysen der RNA mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit und dem Agilent BioAnalyzer durchgeführt. Die quantitative Analyse der RNA erfolgte mittels Spektralphotometrie. Die Genchips wurden mit Hilfe des Amino Allyl MessageAMP™ aRNA Kit hergestellt. In einem ersten Schritt wurde hierbei die RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese wurden gereinigt, mit aaUTP (Biotin) markiert und amplifiziert. Bevor die entstandene Aminoallyl-RNA (aRNA) für 16 h bei 45 °C mit dem Human Genome U133 Plus 2.0 Genchips hybridisiert wurde, wurde sie aufgereinigt und wiederum mit Hydroxysuccinimid (NHS)-Esther markiert. Nach Herstellerangaben wurde abschließend gewaschen, mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt und die Signale gescannt.

Statistische Analysen

Alle folgenden statistischen Analysen der Genchipdaten wurden im Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum durchgeführt. Die Signalwerte von allen 54675 auf dem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip enthaltenen Transkripten wurden mittels der RMA-Methode (*Robust Multiarray Average*) mit Hilfe der auf R basierenden Bioconductor 2.4-Software berechnet und anschließend log₂ transformiert [78]. Alle Transkripte mit einer *log-ratio* $\geq \pm 1,5$ galten als differenziell exprimiert. Aufgrund der geringen Anzahl von Proben wurden nur solche Transkripte in die weiteren Analysen einbezogen, welche in der separaten und den gepoolten Proben übereinstimmende Werte zeigten.

Um die Korrelation der gefundenen Daten mit klinischen Daten zu untersuchen, wurden sie mit bekannten Microarray-Profilen von 295 humanen Mammakarzinomen mit assoziierten klinischen Daten verglichen [79]. Der Datensatz wurde über Rosetta Inpharmatics (<http://www.rii.com/publications/2002/nejm.html>) bezogen. Die Patientinnen wurden anhand der relativen Expression bestimmter Gene in den Tumoren in Quartile eingeteilt. Dann wurden

Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt und mit Hilfe von Wald-Tests p-Werte ermittelt. p-Werte $\leq 0,01$ wurden als signifikant angesehen.

Um die Fähigkeit der gefundenen Genexpressionssignatur als prognostischen Marker zu testen, wurde mit bestimmten Genen eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt.

2.2.13 Überstandsanalysen

Um die Zusammensetzung des konditionierten Mediums von HMF zu analysieren, wurde es mittels Zentrifugation durch eine Membran in eine Fraktion > 3 kDa und eine Fraktion <3 kDa getrennt. Beide Fraktionen wurden als Zellkulturmedium in 3D-Monokulturen genutzt. In Monokulturen mit der Fraktion ≤ 3 kDa konnte kein Wachstum der S1-Zellen beobachtet werden. Die Kultivierung von S1-Zellen mit der Fraktion > 3 kDa lieferte hingegen vergleichbare Ergebnisse zur Cokultivierung mit HMF und wurde daher für die weiteren Untersuchungen verwendet. In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe des Bradford-Tests [80] die Proteinkonzentration der Fraktion > 3 kDa bestimmt. Hierfür wurden jeweils 5 μ l Probe, 7 BSA-Standards und normales Fibroblastenmedium zweifach auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und nach Herstellerangaben mit DC Protein-Assay Reagenz A, B, S verdünnt. Nach einer Inkubation von 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung wurde am Sunrise Absorbance Reader die Proteinkonzentration der Probe gemessen.

Im Folgenden werden die sich anschließenden Verfahren zur Überstandsanalyse beschrieben. Diese wurden im Institut für Experimentelle Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt.

1D-SDS-PAGE

Jeweils 60 μ g der Probe und des Kontrollmediums (herkömmliches H14-Medium) wurden mittels 1D-SDS-PAGE (12 %iges Gel) getrennt und mit Coomassie gefärbt [81]. Die Bahn der Fraktion > 3 kDa wurde in 9 identische Gelbanden (jeweils 10 mm x 2,3 mm) geschnitten. Nach Reduktion mit Dithiothreitol und Alkylierung mit Iodacetamid wurden die Gelbanden tryptisch in-Gel-verdaut. Der tryptische Verdau erfolgte mit Trypsin in Acetonitril/Ammoniumbicarbonat über Nacht bei 37 °C. Die Peptide wurden mittels Trifluoressigsäure und Acetonitril eluiert, die Peptideluate am Mikrokonzentrator vollständig eingengt.

Nano-LC-ESI-MSMS

Die Proben wurden in Acetonitril/Trifluoressigsäure gelöst und an einer Ultimate 3000 nano-HPLC mittels Umkehrphasen-Chromatographie separiert. 10 μ l der gelösten Peptide wurden auf einer PepMap C18 Vorsäule aufkonzentriert und über eine PepMap RSLC analytische Säule nach einem 90-min-Gradienten mit einem Lösemittelfluss von 250 nl/min aufgetrennt.

MS- und MSMS-Aquisition und -Prozessierung

Die Analyse der separierten Peptide erfolgte mittels Massenspektrometrie online an einem LTQ Velos Orbitrap mit ETD-Massenspektromter, ausgerüstet mit einer nano-*electro-spray*-Quelle. Die 15 intensivsten Signale eines Fullscans mit einer Signalintensität ≥ 500 und einer Ladung ≥ 2 , wurden über CID (*collision induced dissociation*) fragmentiert. Die Fragmentspektren wurden in der linearen Ionenfalle (LTQ-Velos) detektiert.

Datenbanksuche und Dateninterpretation

Die Interpretation der Fragmentspektren erfolgte über den Proteom Discoverer V 1.1 (Thermo Scientific) und den darin implementierten Sequest-Algorithmus. Die für die Proteinidentifizierung verwendete Datenbank wurde über www.uniprot.org bezogen. Es wurden alle Proteinsequenz-Einträge für die Taxonomy human [9606] verwendet und über uniprot in eine FASTA-Datei exportiert (Erstellungsdatum der Datenbank 17.02.2011, 97.060 Einträge). Um als identifiziert zu gelten, mussten mindestens zwei Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,01$) oder mindestens drei Peptide mit mäßiger Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$) einem Protein zugeordnet werden können.

3 Ergebnisse

Benigne Mammaepithelzellen bilden im gesunden Gewebe polarisierte Azini [82]. Unter anderem Bissell *et al.* konnten zeigen, dass unter Verwendung eines dreidimensionalen Basalmembran-Zellkulturmodells benigne Mammaepithelzellen (S1-Zellen) *in vitro* ein morphologisch ähnliches Wachstumsverhalten zeigen wie normale Mammaepithelzellen *in vivo* [83]. Diese Erkenntnis stellt eine wesentliche Grundlage für die vorliegende Forschungsarbeit dar. Aus diesem Grund wurde zu Beginn die Reproduzierbarkeit der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse im Labor geprüft. Die Kultivierung der im Labor verwendeten S1-Zellen in einer dreidimensionalen Matrix aus Matrigel® führte zu vergleichbaren Wachstumsmustern wie in der Literatur beschrieben [Abb. 3.1].

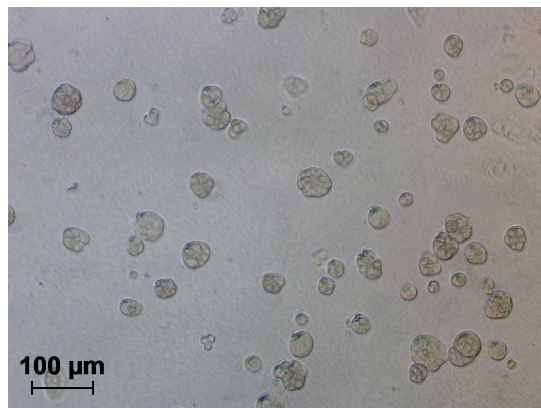


Abbildung 3.1: Morphologisches Wachstum von S1-Zellen in einer dreidimensionalen Matrix aus Matrigel®.

Mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie konnte für S1-Zellen in einer dreidimensionalen Matrix aus Matrigel® ein Wachstum in sphärischen Strukturen beobachtet werden.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss stromaler Faktoren auf Wachstum und Differenzierung von S1-Zellen und malignen humanen Mammaepithelzellen (T4-2-Zellen) in einem dreidimensionalen Kulturmodell untersucht. Abbildung 3.2 gibt einen Überblick über den Projektaufbau.

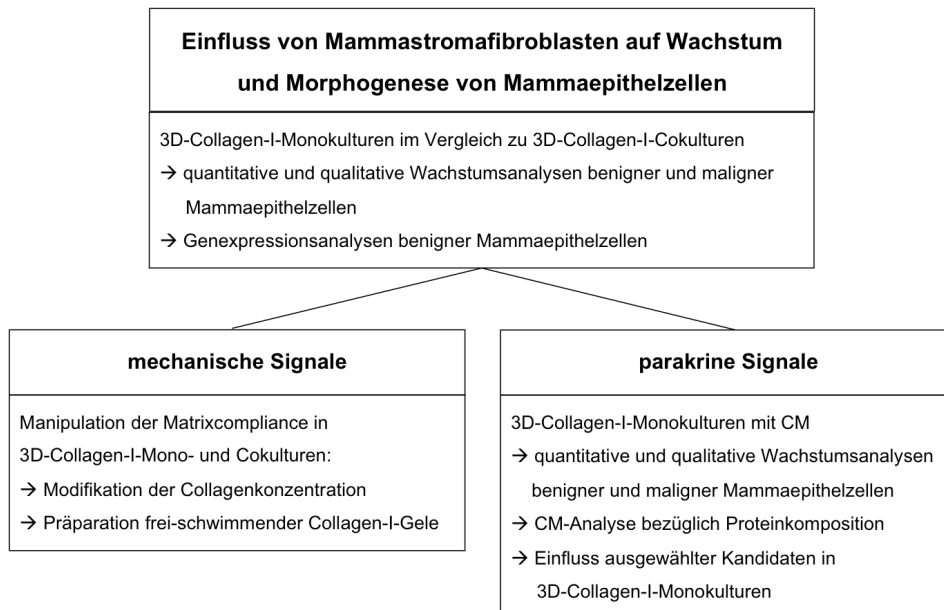


Abbildung 3.2: Projektaufbau der vorliegenden Forschungsarbeit.
CM: konditioniertes Medium (produziert von Fibroblasten)

3.1 Einfluss der Cokultivierung mit Mammastromafibroblasten auf benigne und maligne Mammaepithelzellen

Fibroblasten sind als stromale Faktoren in der Lage, Tumorwachstum und -progression zu beeinflussen [83]. Um den Einfluss normaler Mammafibroblasten als dominierenden Stromazelltyp auf das Wachstumsverhalten normaler Mammaepithelzellen zu analysieren, wurden die phänotypisch normalen S1-Zellen in einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix als Monokultur und als Cokultur mit normalen Mammafibroblasten (HMF) kultiviert. Im Folgenden werden diese Kulturen als Standard-Monokulturen bzw. als Standard-Cokulturen bezeichnet. Es wurde sowohl das quantitative (auch als Wachstum bezeichnet) als auch das qualitative (auch als Morphogenese bezeichnet) Wachstumsverhalten der S1-Zellen unter beiden Kulturbedingungen evaluiert. Unter Verwendung des gleichen Kulturmodells wurde weiterhin auch das Wachstumsverhalten der tumorigenen T4-2-Zellen untersucht.

3.1.1 Quantitative Analysen des Wachstumsverhaltens benigner Mammaepithelzellen

Das quantitative Wachstum der S1-Zellen in Standard-Monokultur und in Cokultur wurde an Tag 1, 4, 7 und 10 mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Pancytokeratin analysiert. Tag 1 entspricht hierbei dem ersten Tag nach Versuchsbeginn. Bis Tag 7 konnten keine signifikanten

Unterschiede hinsichtlich des quantitativen Wachstums der S1-Zellen unter den gegebenen Kulturbedingungen beobachtet werden. In Standard-Cokultur kam es nach Tag 7 zu einem Wachstumsarrest der S1-Zellen, wohingegen die S1-Zellen in der Standard-Monokultur weiterhin ein progressives Wachstumsverhalten zeigten. Nach etwa 10 Tagen Kulturdauer war das Gesamtwachstum der S1-Zellen in Standard-Monokultur etwa doppelt so hoch wie in Standard-Cokultur ($p < 0,01$) [Abb. 3.3 A].

Das Proliferationsverhalten der S1-Zellen wurde zusätzlich durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 analysiert. Hierbei zeigte sich an Tag 9 eine signifikant erhöhte Proliferation der S1-Zellen in Standard-Monokultur im Vergleich mit S1-Zellen in Standard-Cokultur ($p < 0,01$) [Abb. 3.3 B].

Auch im Rahmen von FACS-Analysen bestätigte sich die stärkere Proliferation der S1-Zellen in Standard-Monokultur. Nach einer Kulturdauer von 9 Tagen war die Gesamtzahl der S1-Zellen in Standard-Monokultur etwa doppelt so hoch wie in Standard-Cokultur [Tab. 3.1].

Um zu untersuchen, ob das geringere Wachstum der Epithelzellen in 3D-Cokultur durch eine Erhöhung der Apoptoserate begründet ist, wurde mit Hilfe der TUNEL-Methode sowohl in Standard-Monokultur als auch in Standard-Cokultur der Apoptose-Index der Epithelzellen bestimmt. Der Anteil an apoptotischen Epithelzellen betrug in Monokultur 11,2 % und in Cokultur 9,95 % ($p > 0,05$) [Abb. 3.3 C]. Es konnte also kein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen beobachtet werden. Somit kann eine verstärkte Apoptose als Ursache für das geringere Wachstum der S1-Zellen in der 3D-Cokultur ausgeschlossen werden.

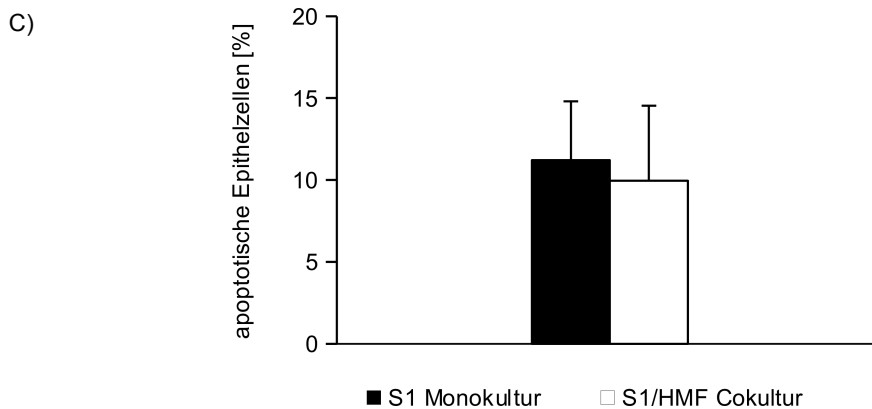
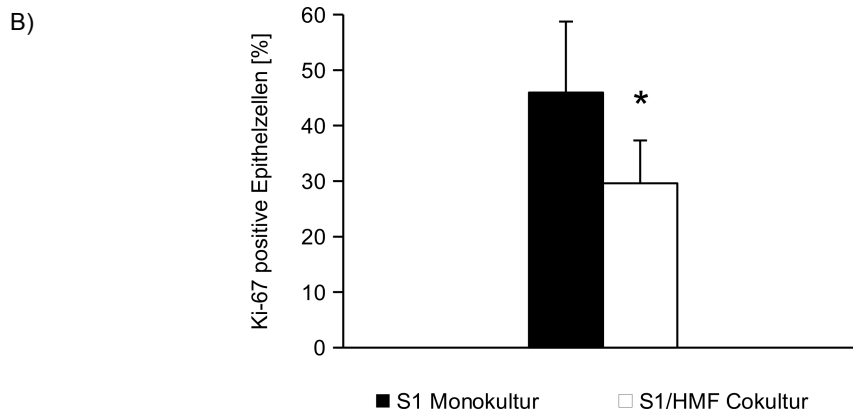
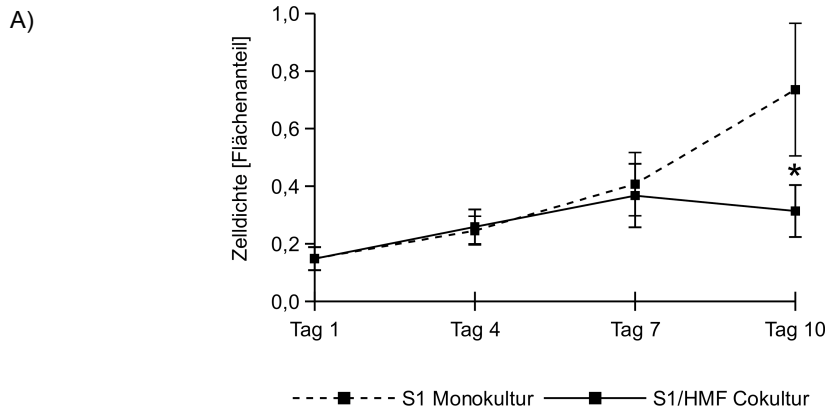


Abbildung 3.3: Evaluation des Wachstums von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.

A) Innerhalb einer Zeitspanne von 10 Kulturtagen wurde an Tag 1, 4, 7 und 10 das Wachstum der S1-Zellen untersucht. Die S1-Zellen wurden mit Pancytokeratin gefärbt. Mittels Immunfluoreszenz und der ImageJ Software wurden pro Probe zehn Gesichtsfelder analysiert (Verhältnis zwischen Pancytokeratin-positiver Fläche [Pixel] und Gesamtbildfläche [Pixel]). In Monokultur war das Wachstum der Epithelzellen an Tag 10 signifikant höher als in Cokultur ($p < 0,01$) (inverses Mikroskop, Vergrößerung: 100 \times). B) Nach 9 Tagen Kulturdauer ergaben Färbungen mit Ki67 für S1-Zellen in Standard-Monokultur einen signifikant höheren Proliferationsindex als für S1-Zellen in Standard-Cokultur ($p < 0,01$) (inverses Mikroskop, Vergrößerung: 100 \times). C) Mit Hilfe der TUNEL-Methode wurde nach 10 Tagen Kulturdauer der Apoptoseindex von S1-Zellen in 3D-Mono- und Cokultur mit HMF bestimmt. Es wurden 14 Gesichtsfelder mit jeweils mindestens 50 Epithelzellen analysiert (inverses Mikroskop, Vergrößerung 630 \times).

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur Standard-Monokultur

Tabelle 3.1: Quantifizierung des Wachstums von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur mittels FACS nach 9 Tagen Kulturdauer.

Experiment	Anzahl S1-Zellen ($\times 10^6$) nach Sortierung		Standard-Monokultur/ Standard-Cokultur
	Standard-Monokultur	Standard-Cokultur	
1	2,19	0,85	2,58
2	1,53	0,74	2,07
3	1,47	0,64	2,30
4	0,97	0,44	2,20
5	0,70	0,36	1,94
6	1,45	0,58	2,50

3.1.2 Qualitative Analysen des Wachstumsverhaltens benigner Mammaepithelzellen

Neben den im vorherigen Abschnitt beschriebenen quantitativen Unterschieden des Wachstumsverhaltens von S1-Zellen in Standard-Monokultur und -Cokultur ließen sich auch morphologische Unterschiede beobachten.

In Standard-Monokultur bildeten die S1-Zellen nach 9 bis 10 Kulturtagen überwiegend große, unstrukturierte Aggregate oder wuchsen als Einzelzellen [Abb. 3.4 und 3.5]. In Standard-Cokultur hingegen bildete die Mehrzahl der S1-Zellen regelmäßige azinusähnliche Sphäroide. Diese bestanden aus einer Einzelschicht von Epithelzellen, die ein kleines Lumen umgaben [Abb. 3.4 und 3.5]. Dieses Wachstumsmuster entspricht dem Wachstum normaler Epithelzellen *in vivo*. Insgesamt bildeten in Monokultur lediglich 20 % der S1-Zellen strukturierte Zellaggregate im Gegensatz zu 60 % in Cokultur ($p < 0,01$) [Abb. 3.4].

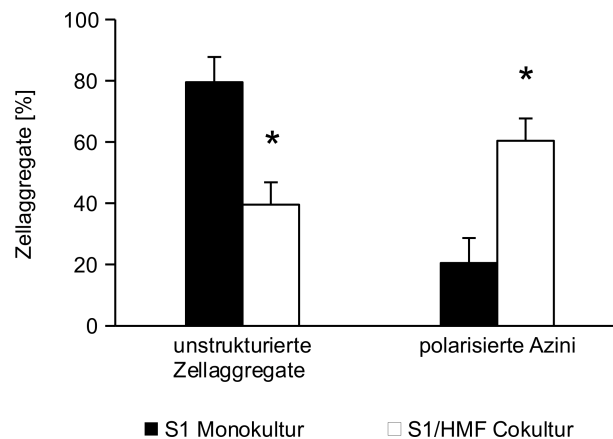


Abbildung 3.4: Morphogenese von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.

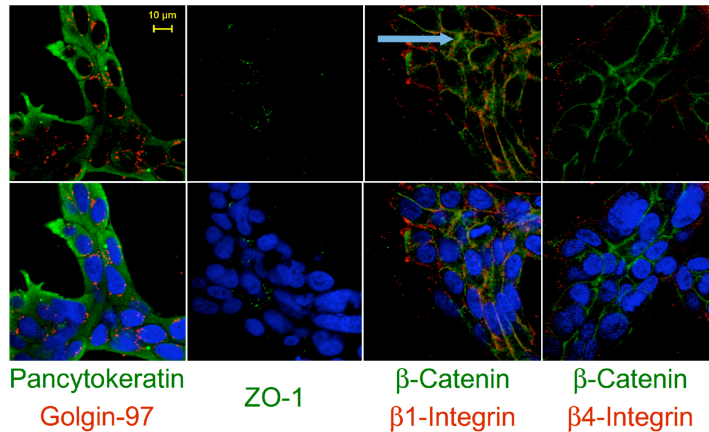
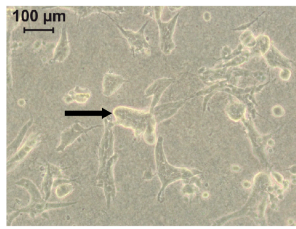
Es wurde die Anordnung der S1-Zellen unter beiden Kulturbedingungen beurteilt und die Anzahl unstrukturierter Zellaggregate und polarisierter Azini ermittelt. In Standard-Cokultur wiesen S1-Zellen überwiegend eine strukturierte Anordnung auf, wohingegen sie in Standard-Monokultur größtenteils unstrukturierte Zellaggregate bildeten.

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur Standard-Monokultur ($p < 0,01$)

Zur genaueren Charakterisierung der Morphogenese der S1-Zellen wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen unterschiedlicher Differenzierungsmarker die Polarisation der Zellaggregate untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Sphäroide in Standard-Cokultur wie in vivo eine apikobasale Polarisation der Zellachse aufwiesen. Gezeigt werden konnte diese Polarisation durch apikale Expression von Golgin-97, eine basale Expression von β 4-Integrin. β 1-Integrin zeigte eine basolaterale Lokalisation. Des Weiteren waren die spärlichen Cluster durch eine apicolaterale Lokalisation von β -Catenin und eine schwache apikale Expression von ZO-1 charakterisiert. Abbildung 3.5 und Tabelle 3.2 geben einen genaueren Überblick über Lokalisation und Intensität der Differenzierungsmarker in Standard-Cokultur.

Die unstrukturierten Zellaggregate der Standard-Monokultur hingegen zeigten eine diffuse Expression der Differenzierungsmarker Golgin-97, β 1- und β 4-Integrin. Die Intensität der Integrin-Expression war im Vergleich zur Cokultur verringert. Auch die β -Catenin-Intensität war in Monokulturen im Vergleich zur Cokultur erniedrigt. Lokalisiert war β -Catenin in Monokulturen an der kortikalen Seite der unstrukturierter Zellaggregate. Für β -Catenin ließ sich in Monokulturen teilweise auch eine zytoplasmatische Expression beobachten, wie sie in der Literatur mit einer ungünstigen Prognose bei Brustkrebspatientinnen assoziiert wird [84]. Die ZO-1-Expression in der Monokultur war unstrukturiert und wie in Cokultur schwach. Weitere Angaben zur Expression der Differenzierungsmarker sind in Tabelle 3.2 und Abbildung 3.5 dargestellt.

S1 Monokultur



S1/HMF Cokultur

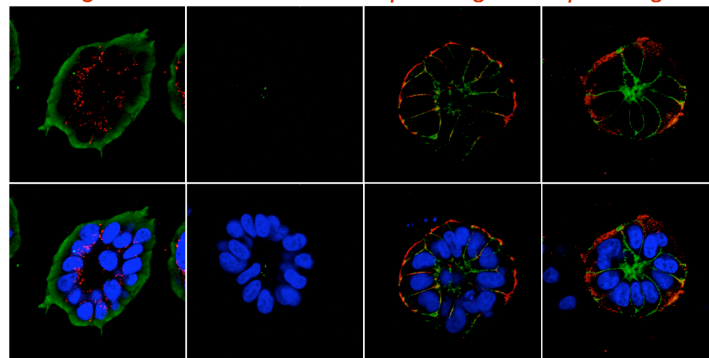
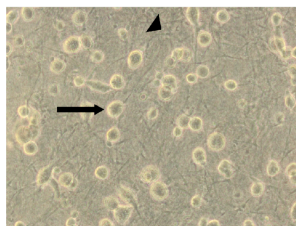


Abbildung 3.5: Charakterisierung der Morphogenese von S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.

Mit Hilfe von Phasenkontrast-Mikroskopie (Spalte 1) und Immunfluoreszenzfärbungen (Spalten 2-5) wurde die Morphologie von S1-Zellen (schwarzer Pfeil) in Standard-Monokultur (oben) und Standard-Cokultur (unten; Pfeilspitze: HMF) verglichen. Die Zellen wurden mit apikalen (Golgin-97 (rot) und ZO-1 (grün)), basalen (β4-Integrin (rot)) basolateralen (β1-Integrin (rot)) und lateralen (β-Catenin (grün)) Differenzierungsmarkern sowie mit einem Epithelzellmarker (Pancytokeratin (grün)) gefärbt. Eine Kernfärbung mit DAPI (blau) verdeutlicht die Kernanordnung innerhalb der Zellcluster. In Standard-Cokultur bildeten die S1-Zellen überwiegend azinusähnliche Strukturen mit polarisierter Ausrichtung der Zellachse. In Standard-Monokultur zeigte sich überwiegend eine diffuse Expression der Differenzierungsmarker.

blauer Pfeil: zytoplasmatische Expression von β-Catenin in Monokultur

Tabelle 3.2: Expression von Differenzierungsmarkern in S1-Zellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.

Differenzierungsmarker	Standard-Monokultur		Standard-Cokultur	
	Lokalisation	Intensität	Lokalisation	Intensität
Golgin-97	Diffus	++	apikal	++
β4-Integrin	diffus	+	basal	++
β1-Integrin	diffus	+	basolateral	++
β-Catenin	kortikal	+	apikolateral	++
ZO-1	diffus	+	apikal	+

+ schwache bis mäßige Expression

++ starke Expression

Das in Standard-Monokultur beobachtete Wachstum in unstrukturierten Zellaggregaten oder Einzelzellen erinnert stark an das Wachstumsverhalten maligner Zellen [85]. Allerdings wiesen einige der Aggregate in Monokultur auch Strukturen auf, die morphologisch an Milchgänge erinnern [Abb. 3.6]. Diese Strukturen wiesen aber im Gegensatz zu Milchgängen in benignem Gewebe kein Lumen auf.

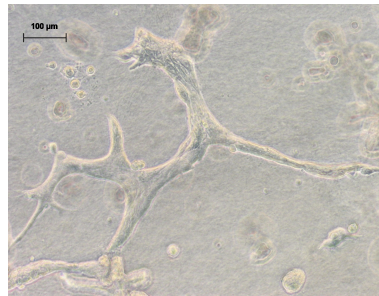
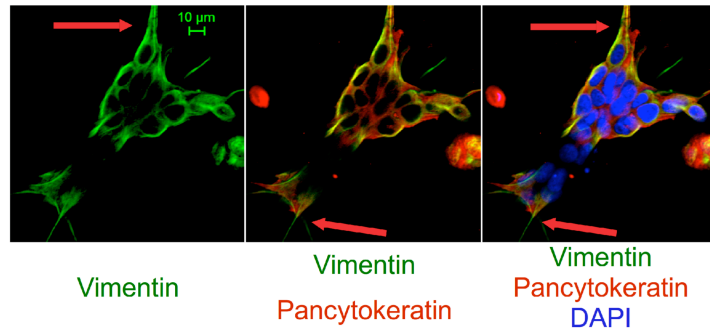


Abbildung 3.6: Milchgangähnliche Strukturen gebildet von S1-Zellen in Standard-Monokultur.

Weiterhin zeigten viele S1-Zellen in Standard-Monokultur längliche Zellfortsätze, durch die sie mesenchymalen Zellen ähnelten. Aufgrund des beschriebenen Wachstums der S1-Zellen in Monokultur ließ sich vermuten, dass in Monokultur *epithelial mesenchymal Transition* (EMT) stattfindet, wie es häufig bei Karzinomzellen zu beobachten ist [86]. Als EMT wird der Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften bezeichnet. Um das zu untersuchen, wurden die S1-Zellen der Standard-Monokultur und Standard-Cokultur mit Vimentin, einem bekannten Marker für EMT, gefärbt [87, 88]. Hierbei muss beachtet werden, dass in der Literatur für S1-Zellen in zweidimensionaler Zellkultur eine positive Vimentinexpression beschrieben wird [73]. Die Analysen ergaben eine fast 100%ige Vimentinexpression der S1-Zellen in Standard-Monokultur [Abb. 3.7]. Interessanterweise wiesen S1-Zellen polarisierter Azini in Standard-Cokultur keine oder lediglich eine schwache Vimentinexpression auf, wohingegen S1-Zellen in unstrukturierten Aggregaten vimentin-positiv waren [Abb. 3.7].

Die gewonnenen Daten der quantitativen und qualitativen Wachstumsanalysen belegen, dass normale humane Mammaepithelzellen in einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix bei Anwesenheit normaler Fibroblasten ein Wachstumsmuster ähnlich dem von benignen Mammaepithelzellen *in vivo* zeigen, während in Monokulturen ein karzinomähnliches Wachstum zu beobachten ist.

S1 Monokultur



S1/HMF Cokultur

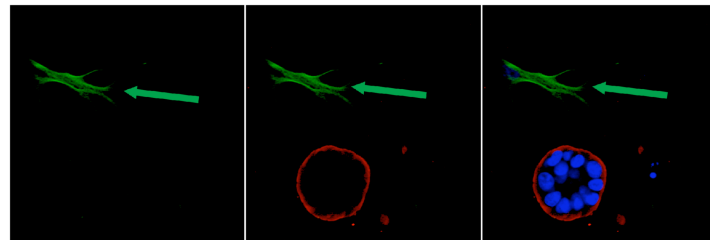


Abbildung 3.7: Mesenchymale Charakteristika in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.

In S1-Zellen der Standard-Monokultur (obere Reihe) ist die Vimentinexpression (grün) im Vergleich zur Standard-Cokultur (untere Reihe) hochreguliert, und die S1-Zellen bilden Zellausläufer (roter Pfeil).

Pancytokeratin (rot), vimentin-positiver Fibroblast (grüner Pfeil), Kernfärbung: DAPI (blau)

3.1.3 Quantitative und qualitative Analysen des Wachstumsverhaltens maligner Mammaepithelzellen

In Anbetracht der Tatsache, dass HMF das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen regulieren, wurde im Folgenden der Einfluss dieser Fibroblasten auf das Wachstumsverhalten tumorigener Zellen getestet. Hierfür wurden die als malignes Gegenstück der S1-Zellen beschriebenen T4-2-Zellen für 4-8 Tage in Mono- und in Cokultur mit HMF kultiviert und entsprechend den S1-Analysen das quantitative und qualitative Wachstumsverhalten untersucht. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zu den oben beschriebenen Beobachtungen bei den S1-Kulturen sowohl im quantitativen als auch im qualitativen Wachstumsverhalten der Epithelzellen.

Das quantitative Wachstum der T4-2-Zellen in Cokultur mit HMF war um ca. 30 % höher als in Monokultur ($p < 0,05$) [Abb. 3.8 A]. Qualitative Unterschiede im Wachstumsverhalten der T4-2-Zellen in Mono- und Cokultur konnten nicht beobachtet werden. Unter beiden Kulturbedingungen bildeten T4-2-Zellen überwiegend unstrukturierte und kontinuierlich wachsende Aggregate aus. Weniger als 20 % der Zellaggregate formten azinusähnliche Strukturen [Abb. 3.8 B und 3.9].

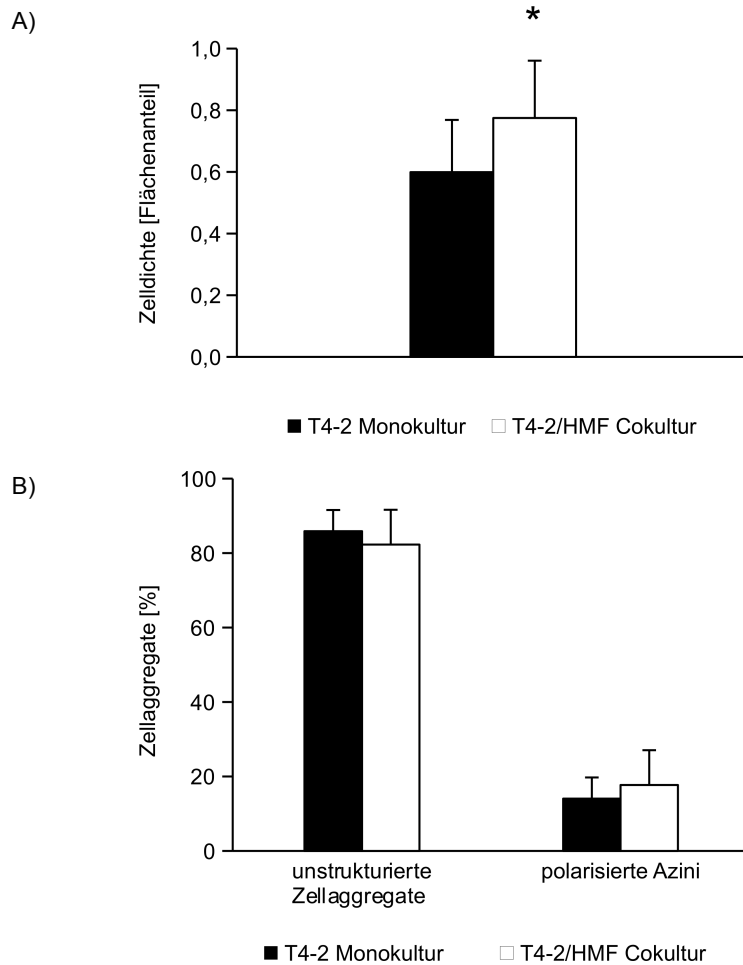


Abbildung 3.8: Quantitatives und qualitatives Wachstumsverhalten von T4-2-Zellen in dreidimensionaler Mono- und Cokultur mit HMF.

A) Das Wachstum der T4-2-Zellen war in Cokultur im Vergleich zur Monokultur nach 6 Tagen Kulturdauer signifikant erhöht ($p < 0,05$). B) Unter beiden Kulturbedingungen bildeten T4-2-Zellen überwiegend unstrukturierte Zellaggregate.

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur Monokultur

Zur näheren Charakterisierung der Zellkluster wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Differenzierungsmarkern durchgeführt, wie schon für S1-Zellen beschrieben. Unter beiden Kulturbedingungen ließ sich keine Zelldifferenzierung beobachten. Für Golgin-97 und ZO-1 konnte unter beiden Kulturbedingungen eine diffuse Verteilung beobachtet werden, wobei die Intensität dieser beiden Differenzierungsmarker in Monokultur im Vergleich zur Cokultur reduziert war. Sowohl in Monokultur als auch in Cokultur zeigten β 1- und β 4-Integrin eine membranständige und β -Catenin eine kortikale Expression. Wie bei S1-Zellen beobachtet war die β -Catenin-Intensität in Cokultur im Vergleich zur Monokultur erhöht. In Abbildung 3.9 und Tabelle 3.3 werden Lokalisation und Intensität der einzelnen Differenzierungsmarker verdeutlicht.

Interessanterweise zeigten sich allerdings in der Vimentinexpression deutliche Unterschiede zwischen Mono- und Cokultur. Trotz des tumorähnlichen Zellwachstums unter beiden Kulturbedingungen konnte nur in Monokultur eine deutliche Vimentinexpression beobachtet werden [Abb. 3.10].

Zusammenfassend zeigen diese Analysen, dass HMF das Wachstum von tumorigenen T4-2-Zellen stimulieren, nicht aber deren Differenzierung.

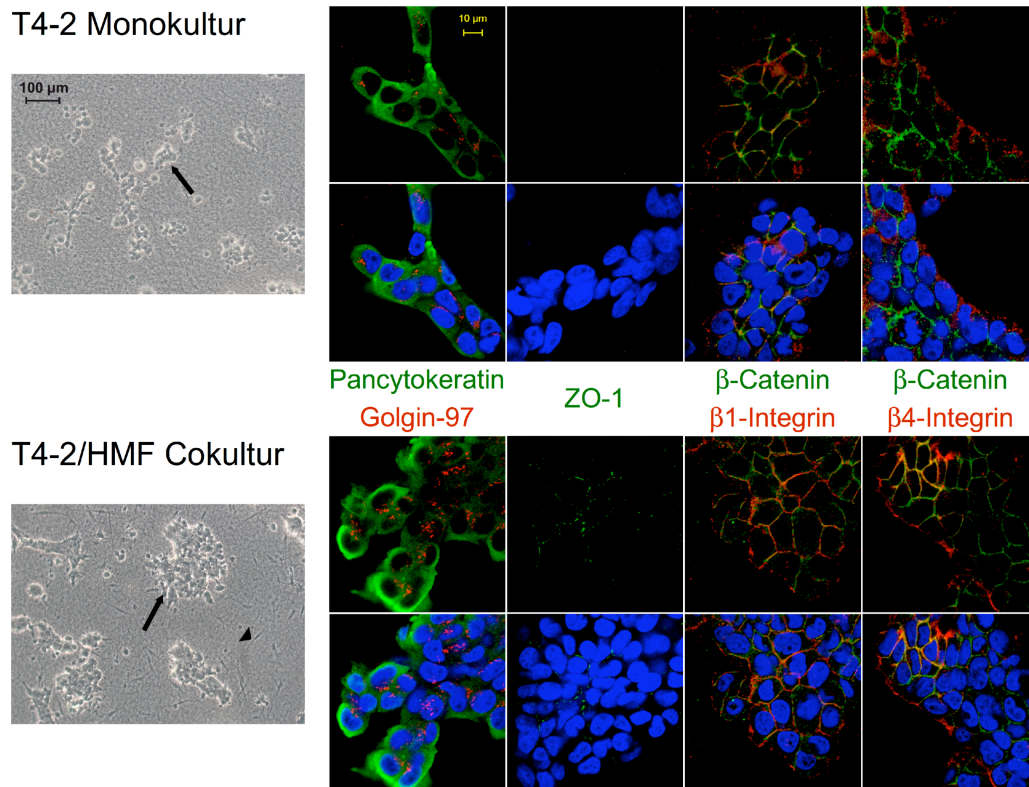


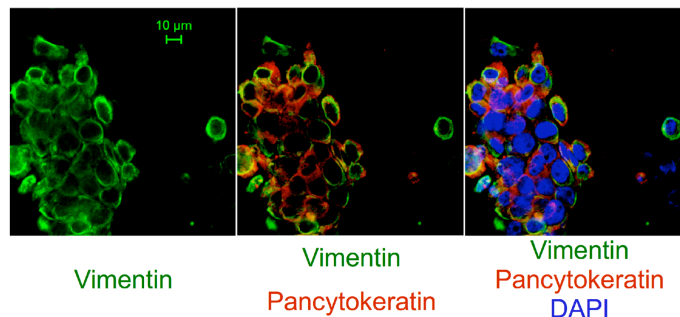
Abbildung 3.9: Charakterisierung der Morphogenese von T4-2-Zellen in Mono- und Cokultur. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Expression von apikalen (Golgin-97 (rot) und ZO-1 (grün)), basalen (β4-Integrin (rot)), basolateralen (β1-Integrin (rot)) und lateralen (β-Catenin (grün)) Differenzierungsmarkern sowie einem Epithelzellmarker (Pancytokeratin (grün)) in T4-2-Zellen in Monokultur (oberen) und T4-2-Zellen in Cokultur (unten) mit HMF (Pfeilspitze) mit Hilfe von Phasenkontrast-Mikroskopie (Spalte 1) und Immunfluoreszenzfärbungen (Spalten 2-5). Kernfärbung: DAPI (blau)

Tabelle 3.3: Expression von Differenzierungsmarkern in T4-2-Zellen in Monokultur und Cokultur mit HMF.

Differenzierungsmarker	Monokultur		Cokultur	
	Lokalisation	Intensität	Lokalisation	Intensität
Golgin-97	diffus	+	diffus	++
β 4-Integrin	membranständig	++	membranständig	++
β 1-Integrin	membranständig	++	membranständig	++
β -Catenin	kortikal	+	kortikal	++
ZO-1	diffus	+	diffus	++

+ schwache bis mäßige Expression
 ++ starke Expression

T4-2 Monokultur



T4-2/HMF Cokultur

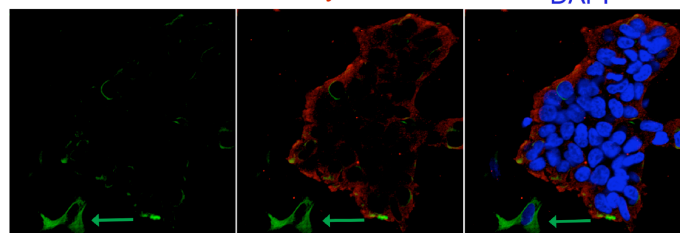


Abbildung 3.10: Mesenchymale Charakteristika in T4-2-Monokultur und T4-2-Cokultur mit HMF.

Die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin (grün) durch T4-2-Zellen war in Cokultur mit HMF (unten) im Vergleich zur Monokultur (oben) stark verringert. Pancytokeratin (rot); Kernfärbung: DAPI (blau); vimentin-positiver Fibroblast (grüner Pfeil)

3.1.4 Quantitative und qualitative Analysen des Wachstumsverhaltens benigner Mammapithelzellen in Cokultur mit primären Fibroblasten

Um einen HMF-spezifischen Effekt ausschließen zu können, wurden S1-Zellen ebenfalls mit primären humanen normalen Mammafibroblasten [89] unter den beschriebenen Kulturbedingungen kultiviert. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Herkunft der Fibroblasten aus benignem oder malignem Gewebe eine Rolle bei der Differenzierung normaler Epithelzellen durch Stromafibroblasten spielt. Hierfür wurden S1-Zellen weiterhin mit primären tumorassozii-

ierten Mammastromafibroblasten (CAF) kokultiviert. Als Vergleichskulturen dienten die Standard-Monokultur sowie die Standard-Cokultur.

Die für diese Untersuchungen benötigten NF und CAF stammten von Patientinnen des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein und wurden, wie unter 2.2.2 beschrieben, isoliert. Gewebeproben von 4 Patientinnen erlaubten die Isolierung von beiden Zelltypen (Patientinnen-ID A^{NF/CAF}, B^{NF/CAF}, C^{NF/CAF}, D^{NF/CAF}). NF oder CAF konnten zusätzlich aus jeweils vier weiteren Proben isoliert werden (NF: Patientinnen-ID E^{NF}, F^{NF}, G^{NF}, H^{NF}; CAF: Patientinnen-ID I^{CAF}, J^{CAF}, K^{CAF}, L^{CAF}) [Tab. 3.4].

Tabelle 3.4: Klinische und histologische Charakteristika der Patientinnen.

Patienten ID	OP	isolierter Zelltyp	Histologie	T	N	G	ER IRS/ PR IRS	Her2neu	M	Menopausenstatus
A ^{NF/CAF}	Ma	NF, CAF	i-d	pT2	pN3a (17/47)	G3	6/4	0	M0	post.
B ^{NF/CAF}	Ma	NF, CAF	i-d	pT2+pTis	pN1a (2/10)	G3	8/8	0	M0	prä.
C ^{NF/CAF}	Ma	NF, CAF	i-d	pT2	pN1a (2/13)	G2	0/0	3+	M0	post.
D ^{NF/CAF}	Ma	NF, CAF	i-d	pT3	pN3a (12/18)	G2	12/12	2+	M0	post.
E ^{NF}	Ma	NF	i-d	pT2+pTis	pN1a (1/12)	G3	2/1	0	M0	prä.
F ^{NF}	R	NF	n	---	---	---	---	---	---	post.
G ^{NF}	R	NF	n	---	---	---	---	---	---	---
H ^{NF}	R	NF	n	---	---	---	---	---	---	post.
I ^{CAF}	Ma	CAF	i-d	pT2	pN1a (2/19)	G2	12/8	0	M0	post.
J ^{CAF}	S	CAF	i-d	pT2+pTis	pN1 (1/30)	G2	1/1	0	M0	prä.
K ^{CAF}	S	CAF	i-d	pT2	pN[64]0 (0/1)	G2	12/9	1	0	post.
L ^{CAF}		CAF	m	pT1c	pN[64]0 (0/2)	G3	0/0	0	0	post.

---- nicht zutreffend bzw. unbekannt, A Anpassungsreduktion, ER Östrogenrezeptor[§], G Grading*, Her2 *human epidermal growth factor receptor*, i-d invasiv-duktales Mammakarzinom, m medulläres Mammakarzinom, M Metastasen*, Ma Mastektomie, n Normalgewebe, N Lymphknotenstatus*, post. postmenopausal, PR Progesteronrezeptor[§], prä. prämenopausal, R Reduktionsplastik, S Segmentektomie, T Tumorgröße* * gemäß aktueller TNM-Klassifikation [90], § gemäß Remmele-Score (auch immunreaktiver Score, IRS) [91].

Um die Reinheit der primären Fibroblastenkulturen zu sichern, wurden die Kulturen mit Vimentin und dem Epithelzellmarker Pancytokeratin gefärbt. Alle Kulturen waren annähernd zu

100% negativ für Pancytokeratin und zu 100 % vimentin-positiv [Abb. 3.11]. Deshalb konnte eine epitheliale Kontamination ausgeschlossen werden. NF und HMF erschienen morphologisch schlank und monomorph. CAF hingegen zeigten im Vergleich zu NF eine größere Heterogenität [Abb. 3.11].

Zur weiteren Charakterisierung der Fibroblastenkulturen wurden die Zellen mit dem Myofibroblastenmarker α -smooth muscle actin (α -SMA) gefärbt [Abb. 3.11]. Im Durchschnitt war der Anteil α -SMA-positiver Zellen in den CAF-Kulturen höher als in den NF-Kulturen [Tab. 3.5, 3.6]. Darüber hinaus war auch die Intensität der α -SMA-Expression in CAF-Kulturen deutlich höher als in NF-Kulturen. Zum Vergleich wurden zusätzlich HMF auf Objektträgern kultiviert und nach den beschriebenen Methoden analysiert. HMF waren 100 % negativ für Pancytokeratin und 100 % positiv für Vimentin und α -SMA [Abb. 3.11].

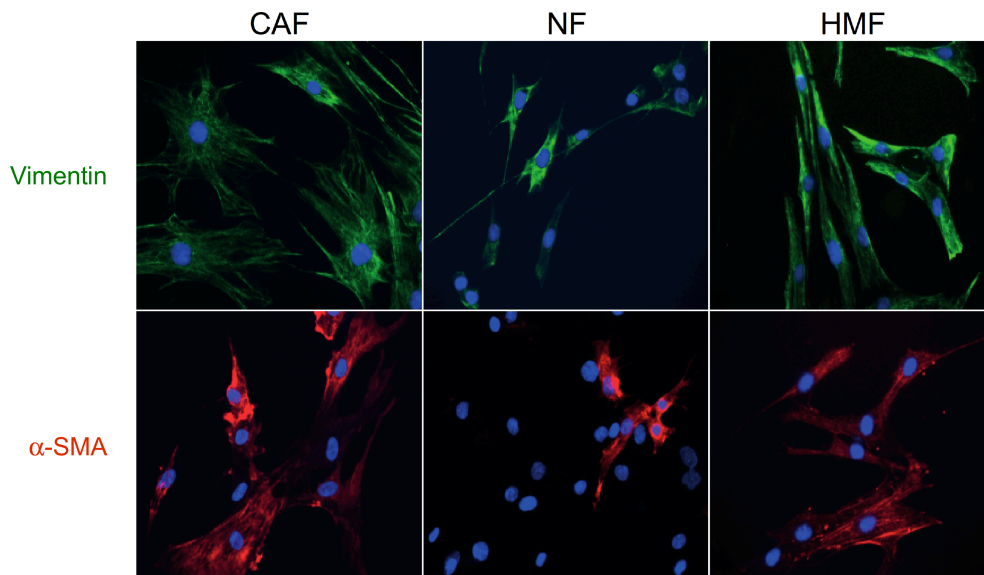


Abbildung 3.11: Charakterisierung der Fibroblasten.

Aus Brust-OP-Präparaten isolierte Fibroblasten und HMF wurden auf Objektträgern kultiviert und mit dem mesenchymalen Marker Vimentin (oben (grün)) und dem Myofibroblasten-Marker α -SMA (unten (rot)) gefärbt.

Kernfärbung: DAPI (blau); Original-Vergrößerung: 250x

Tabelle 3.5: α -SMA-Expression in primären normalen Mammastromafibroblasten.

Patientinnen ID	α -SMA positive Zellen [%]
A ^{NF/CAF}	1
B ^{NF/CAF}	26
C ^{NF/CAF}	5
D ^{NF/CAF}	30
E ^{NF}	10
F ^{NF}	0

fett: Probe mit vorhandener korrespondierender CAF-Probe

Tabelle 3.6: α -SMA-Expression in primären tumorassoziierten Mammastromafibroblasten.

Patienten ID	α -SMA positive Zellen [%]
A ^{NF/CAF}	33
B ^{NF/CAF}	89
C ^{NF/CAF}	17
D ^{NF/CAF}	NA
I ^{CAF}	100
J ^{CAF}	11

fett: Probe mit vorhandener korrespondierender NF-Probe

NA: kein Material für die α -SMA-Färbung vorhanden

Die Cokultivierung von S1-Zellen mit NF und CAF führte in den meisten Fällen sowohl quantitativ als auch qualitativ zu einem Wachstumsverhalten der S1-Zellen ähnlich dem in Cokultur mit HMF. Nach 9 Tagen Kulturdauer ergaben quantitative Analysen in 6 von 8 Fällen in Cokultur mit NF und 5 von 8 Fällen in Cokultur mit CAF ein reduziertes Wachstum der S1-Zellen im Vergleich zur Standard-Monokultur [Tab. 3.7 und 3.8]. Interessanterweise wurde in zwei Fällen das Wachstum der S1-Zellen weder durch NF noch durch CAF derselben Patientinnen (C^{NF/CAF}, D^{NF/CAF}) beeinflusst.

Es wurde weiterhin die Morphogenese der S1-Zellen in Cokulturen mit NF und CAF analysiert. In 7 von 8 Fällen bildeten die S1-Zellen in Cokultur mit NF überwiegend azinusähnliche Strukturen [Abb. 3.12] und zeigten lediglich in einem Fall ein unstrukturiertes Wachstumsverhalten wie in Standard-Monokultur [Abb. 3.12 und Tab. 3.7]. S1-Zellen in Cokultur mit CAF zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie S1-Zellen in Cokultur mit HMF und NF [Abb. 3.12 und Tab. 3.8]. Lediglich in einem Fall der Cokultivierung mit CAF ließ sich keine Induktion einer azinären Morphogenese von S1-Zellen beobachten. Bemerkenswerterweise stammen CAF

und NF, die weder einen Wachstumsarrest noch eine azinäre Morphogenese induzieren, von derselben Patientin.

Tabelle 3.7: Einfluss primärer normaler Mammastromafibroblasten auf Wachstum und Morphogenese von S1-Zellen in einer 3D-Collagen-I-Matrix.

Patienten ID	Wachstumsarrest in Cokultur mit NF	Polarisierte Azini in Cokultur mit NF [%]	Polarisierte Azini in Cokultur mit HMF [%]	Polarisierte Azini in Monokultur [%]
A ^{NF/CAF}	+	59 *	50 *	22
B ^{NF/CAF}	+	64 *	67 *	30
C ^{NF/CAF}	-	26	54 *	24
D ^{NF/CAF}	-	52 *	55 *	23
E ^{NF}	+	72 *	51 *	20
F ^{NF}	+	65 *	70 *	41
G ^{NF}	+	44 *	44 *	16
H ^{NF}	+	59 *	60 *	20

+ NF induzieren einen Wachstumsarrest der S1-Zellen in Cokultur im Vergleich zur Monokultur
 - NF beeinflussen das quantitative Wachstum der S1-Zellen in Cokultur im Vergleich zur Monokultur nicht

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur Monokultur ($p < 0.01$)

fett: Probe mit vorhandener korrespondierender CAF-Probe

Tabelle 3.8: Einfluss primärer tumorassoziierter Mammastromafibroblasten auf Wachstum und Morphogenese von S1-Zellen in einer 3D-Collagen-I-Matrix.

Patienten ID	Wachstumsarrest in Cokultur mit CAF	Polarisierte Azini in Cokultur mit CAF [%]	Polarisierte Azini in Cokultur mit HMF [%]	Polarisierte Azini in Monokultur [%]
A ^{NF/CAF}	+	65 *	54 *	28
B ^{NF/CAF}	+	60 *	67 *	30
C ^{NF/CAF}	-	28	54 *	24
D ^{NF/CAF}	-	60 *	55 *	23
I ^{CAF}	-	54 *	54 *	26
J ^{CAF}	+	70 *	56 *	30
K ^{CAF}	+	81 *	62 *	17
L ^{CAF}	+	53 *	59 *	33

+ CAF induzieren einen Wachstumsarrest der S1-Zellen in Cokultur im Vergleich zur Monokultur

- CAF beeinflussen das quantitative Wachstum der S1-Zellen in Cokultur im Vergleich zur Monokultur nicht

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur Monokultur ($p < 0.01$)

fett: Probe mit vorhandener korrespondierender NF-Probe

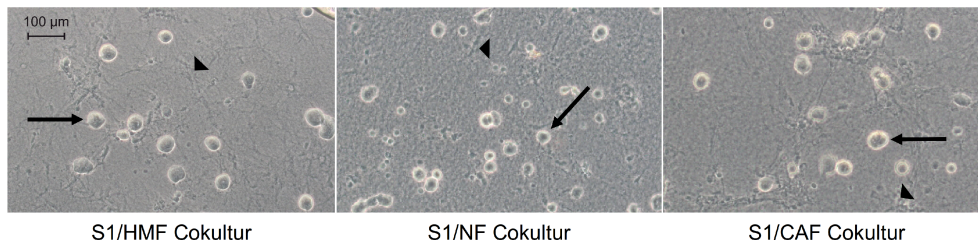


Abbildung 3.12: Azinäre Morphogenese von S1-Zellen in Cokultur mit NF, CAF und HMF.
 Im Phasenkontrastmikroskop zeigte die Cokultivierung von S1-Zellen mit NF und CAF ein ähnliches morphologisches Erscheinungsbild wie in Cokultur mit HMF.
 Pfeil: glanduläre Strukturen gebildet von S1-Zellen, Pfeilspitze: Fibroblasten

Überraschenderweise zeigte sich, dass sowohl CAF als auch NF einen Wachstumsarrest sowie die Differenzierung normaler Epithelzellen induzieren können. Bei der Regulierung der epithelialen Morphogenese durch stromale Fibroblasten scheint die Herkunft der Fibroblasten aus benignem oder malignem Gewebe also unerheblich zu sein. Es lässt sich daher vermuten, dass vielmehr generell durch Fibroblasten induzierte Effekte, wie beispielsweise die mechanische Modifikationen der ECM, eine Rolle spielen. Die gefundenen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass interindividuelle Charakteristika eine Rolle spielen. Eine Korrelation zu klinischen Parametern konnte allerdings nicht gefunden werden. Um eine sichere Aussage treffen zu können, müsste das untersuchte Patientinnenkollektiv deutlich vergrößert werden.

3.1.5 Analyse der Genexpressionsprofile benigner Mammaepithelzellen in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur

Um den Einfluss von Fibroblasten als stromale Faktoren auf die Genexpression von S1-Zellen analysieren zu können, wurden S1-Zellen in Standard-Monokultur und -Cokultur mit HMF kultiviert, nach 9 Tage Kulturdauer durch FACS von einander getrennt (siehe Kapitel 2.2.10) und mittels DNA-Microarray-Analyse Genexpressionsprofile der Epithelzellen erstellt und verglichen.

Unter den beschriebenen Bedingungen konnten 135 unterschiedlich exprimierte Transkripte (repräsentativ für 119 Gene) gefunden werden. 36 Transkripte (repräsentativ für 32 Gene) waren in den S1-Zellen aus Standard-Monokultur überexprimiert und 99 Transkripte (repräsentativ für 87 Gene) in denen aus Standard-Cokultur [Tab. A1 und A2]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zellkultur ist die überwiegende Zahl der überexprimierten Gene der Standard-Monokultur dem Funktionsbereich der Zellzyklusregulation (z.B. BUB1, TPX2, CDC6) und der größte Teil der überexprimierten Gene der Standard-Cokultur dem Funktionsbereich der Differenzierung (z.B. KRT15, DCN, GREM1) und der Extrazellulär-Matrix-Konstitution (z. B. COL1A, FN1, LUM) zuzuordnen [Abb. 3.13].

Um die Korrelation zwischen den gefundenen Gensignaturen und der Prognose von Krebspatientinnen evaluieren zu können, wurden die gefundenen Genexpressionsprofile mit publizier-

ten Microarray-Profilen von 295 humanen Mammakarzinomen mit assoziierten klinischen Daten (Rosetta Inpharmatics) verglichen [79]. Der Begriff Prognose bezieht sich dabei lediglich auf das Überleben der Patientinnen.

Alle einbezogenen Patientinnen waren jünger als 53 Jahre. Bei allen Frauen wurde Brustkrebs im Stadium I oder II diagnostiziert. Bei 151 der Patientinnen waren die Lymphknoten negativ und bei 144 Patientinnen positiv. Die Frauen erhielten entweder eine modifizierte radikale Mastektomie oder wurden brusterhaltend operiert. Wenn indiziert, folgte der Operation eine Bestrahlung. 130 der Patientinnen erhielten adjuvant eine systemische Therapie bestehend aus Chemotherapie (90 Patientinnen), endokriner Therapie (20 Patientinnen) oder beiden Therapieformen (20 Patientinnen).

Von den 119 zwischen Mono- und Cokultur differenziell exprimierten Genen ($\log \text{ ratio} \geq \pm 1.5$) konnten 61 Gene (entsprechend 76 Transkripten) in dem verwendeten Datensatz gefunden werden [Tab. 3.9 und 3.10]. 30 dieser Gene (entsprechend 34 Transkripte) waren in Monokultur und 31 Gene (entsprechend 42 Transkripte) in Cokultur überexprimiert [Tab. 3.9 und 3.10]. Diese 61 Gene wurden für die weiteren Analysen verwendet. Im Folgenden werden die 31 Gene aus Cokultur unter dem Begriff *co-high-group* und die 30 Gene aus Monokultur unter dem Begriff *mono-high-group* zusammengefasst.

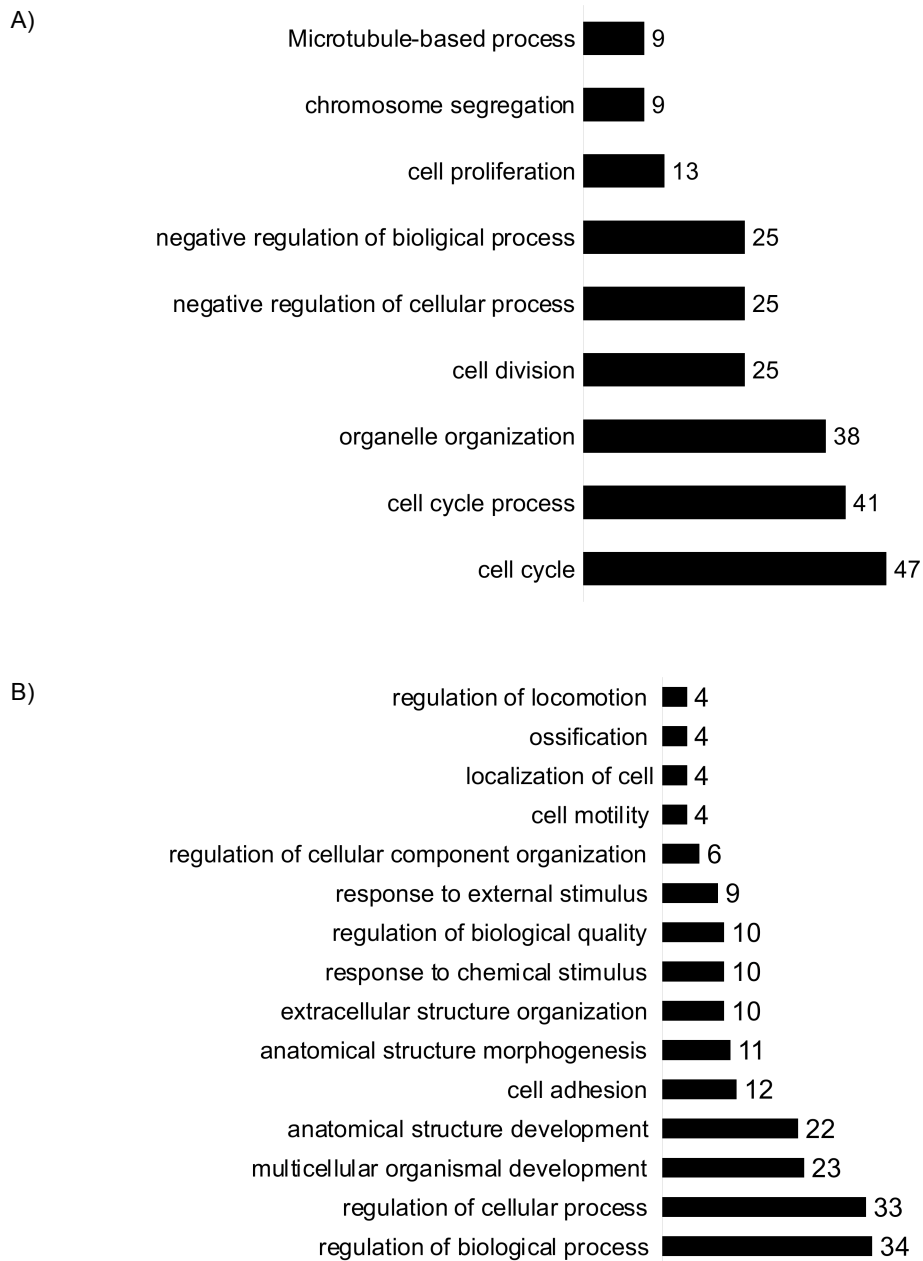


Abbildung 3.13: Biologische Funktion der Gene mit überexprimierter Expression in Standard-Monokultur und Standard-Cokultur.

Mit Hilfe der Software DAVID Bioinformatics Resources 6.7 wurden die biologischen Funktionen der Gene mit überexprimierter Expression in S1-Zellen der Standard-Monokultur (A) und Standard-Cokultur (B) ermittelt. In den Abbildungen wird die absolute Verteilung der analysierten Gene auf verschiedene Funktionsbereiche dargestellt. 13 Gene aus Standard-Monokultur und 22 Gene aus Standard-Cokultur waren unbekannt und sind nicht mit abgebildet.

Tabelle 3.9: Gene aus Standard-Cokultur mit hochregulierter Expression in S1-Zellen, die auch im Rosetta-Datensatz enthalten sind (co-high-group).

<i>Affymetrix ID</i>	<i>Rosetta ID</i>	<i>gene symbol</i>	<i>log-ratio</i>	<i>gene name</i>
227260_at	NM_017664	ANKRD10	-2.64	<i>Ankyrin repeat domain 10, mRNA (cDNA clone IMAGE:5752308)</i>
222549_at	NM_021101	CLDN1	-1.69	<i>claudin 1</i>
202404_s_at	NM_000089	COL1A2	-5.93	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>
215076_s_at	NM_000090	COL3A1	-4.62	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>
221729_at	NM_000393	COL5A2	-1.79	<i>Collagen, type V, alpha 2</i>
209156_s_at	M20777	COL6A2	-1.51	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>
201438_at	NM_004369	COL6A3	-3.88	<i>Collagen, type VI, alpha 3</i>
209101_at	NM_001901	CTGF	-2.17	<i>connective tissue growth factor</i>
218002_s_at	NM_004887	CXCL14	-1.60	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>
220999_s_at	AL136549	CYFIP2	-1.65	<i>cytoplasmic FMR1 interacting protein 2</i>
201893_x_at	NM_001920	DCN	-2.04	<i>decorin</i>
213071_at	NM_001937	DPT	-1.64	<i>dermatopontin</i>
1565254_s_at	AF157562	ELL	-2.17	<i>elongation factor RNA polymerase II</i>
203184_at	NM_001999	FBN2	-2.10	<i>fibrillin 2</i>
211719_x_at	X02761	FN1	-1.89	<i>fibronectin 1</i>
211074_at	NM_000802	FOLR1	-1.61	<i>folate receptor 1 (adult)</i>
218468_s_at	NM_013372	GREM1	-2.13	<i>gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)</i>
220777_at	Contig38433_RC	KIF13A	-1.55	<i>kinesin family member 13A</i>
204734_at	NM_002275	KRT15	-1.76	<i>keratin 15</i>
201744_s_at	NM_002345	LUM	-3.18	<i>lumican</i>
202007_at	NM_002508	NID1	-1.62	<i>nidogen 1</i>
203131_at	NM_006206	PDGFRA	-1.93	<i>platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>
233314_at	NM_000314	PTEN	-1.51	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
206157_at	NM_002852	PTX3	-2.17	<i>pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta</i>
242121_at	NM_016120	RNF12	-1.71	<i>Full length insert cDNA clone ZD86G12</i>
200665_s_at	NM_003118	SPARC	-3.17	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>
233555_s_at	AB033073	SULF2	-1.82	<i>sulfatase 2</i>
219934_s_at	NM_005420	SULT1E1	-1.74	<i>sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1</i>
230193_at	Contig40337_RC	WDR66	-1.60	<i>WD repeat domain 66</i>
230332_at	Contig43825_RC	ZCCHC7	-1.53	<i>Zinc finger, CCHC domain containing 7 (ZCCHC7), mRNA</i>
239243_at	NM_014497	ZNF638	-1.61	<i>Putative NP220 nuclear protein isoform (NP220) mRNA, complete cds; alternatively spliced</i>

Tabelle 3.10: Gene aus Standard-Monokultur mit hochregulierter Expression in S1-Zellen, die auch im Rosetta-Datensatz enthalten sind (*mono-high-group*).

<i>Affymetrix ID</i>	<i>Rosetta ID</i>	<i>gene symbol</i>	<i>log-ratio</i>	<i>gene name</i>
222108_at	Contig49079_RC	AMIGO2	1.81	<i>adhesion molecule with Ig-like domain 2</i>
222608_s_at	NM_018685	ANLN	1.55	<i>anillin, actin binding protein</i>
209642_at	NM_004336	BUB1	1.68	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)</i>
203418_at	NM_001237	CCNA2	1.53	<i>cyclin A2</i>
228729_at	Contig56843_RC	CCNB1	1.52	<i>cyclin B1</i>
202870_s_at	NM_001255	CDC20	1.68	<i>cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)</i>
203967_at	NM_001254	CDC6	1.55	<i>cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)</i>
218542_at	NM_018131	CEP55	1.57	<i>centrosomal protein 55kDa</i>
211343_s_at	NM_005203	COL13A1	2.19	<i>Collagen, type XIII, alpha 1</i>
227702_at	Contig38520_RC	CYP4X1	1.74	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1</i>
232278_s_at	NM_017779	DEPDC1	1.70	<i>DEP domain containing 1</i>
226980_at	AK001166	DEPDC1B	1.62	<i>DEP domain containing 1B</i>
203764_at	NM_014750	DLGAP5	1.95	<i>discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5</i>
221911_at	Contig27451_RC	ETV1	2.19	<i>ets variant 1</i>
203348_s_at	NM_004454	ETV5	1.62	<i>ets variant 5</i>
228069_at	Contig50841_RC	FAM54A	1.61	<i>family with sequence similarity 54, member A</i>
202580_x_at	U74612	FOXM1	1.53	<i>forkhead box M1</i>
204318_s_at	NM_016426	GTSE1	1.55	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i>
1556037_s_at	Contig64457_RC	HHIP	2.37	<i>hedgehog interacting protein</i>
218726_at	NM_018410	HJURP	1.57	<i>Holliday junction recognition protein</i>
208937_s_at	NM_002165	ID1	2.39	<i>inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
201565_s_at	NM_002166	ID2	2.63	<i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
220651_s_at	NM_018518	MCM10	1.56	<i>minichromosome maintenance complex component 10</i>
219975_x_at	NM_018324	OLAH	1.64	<i>oleoyl-ACP hydrolase</i>
209773_s_at	NM_001034	RRM2	1.57	<i>ribonucleotide reductase M2 polypeptide</i>
219493_at	Contig34952	SHCBP1	1.59	<i>SHC SH2-domain binding protein 1</i>
209891_at	NM_020675	SPC25	1.81	<i>SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)</i>
227480_at	NM_019601	SUSD2	1.51	<i>sushi domain containing 2</i>
210052_s_at	AB024704	TPX2	1.50	<i>TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)</i>
204822_at	NM_003318	TTK	1.69	<i>TTK protein kinase</i>

Die Korrelation zwischen den gefundenen Genexpressionsprofilen (*mono-high-group* und *co-high-group*) und dem Überleben erfolgte mit Hilfe von Kaplan-Meier-Analysen. Die Patientinnen wurden hierfür anhand der relativen Genexpressionen in den entsprechenden Tumoren in Quartile eingeteilt und die Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigten sich die folgenden Zusammenhänge [A3 und A4]:

- Gene der *mono-high-group* mit hochregulierter Expression in Patientinnen mit ungünstiger Prognose:

FOXM1, CDC20, CCNA2, DLGAP5, CDC6, GTSE1, TTK, BUB1, RRM2, SPC25, TPX2, CEP55, HJURP, SHCBP1, MCM10, ANLN, DEPDC1, DEPDC1B, FAM54A, CCNB1

- Gene der *mono-high-group* mit hochregulierter Expression in Patientinnen mit günstiger Prognose:

CYP4X1

- Gene der *co-high-group* mit hochregulierter Expression in Patientinnen mit ungünstiger Prognose:

keine

- Gene der *co-high-group* mit hochregulierter Expression in Patientinnen mit günstiger Prognose:

DCN, ZCCHC7

Aus der *co-high-group* korrelierten also lediglich 3 Transkripte (repräsentativ für 2 Gene) signifikant mit dem Überleben der Patientinnen. Aus der *mono-high-group* zeigten 24 Transkripte (repräsentativ für 21 Gene) eine signifikante Korrelation mit dem Überleben der Patientinnen. Lediglich für CYP4X1 wurde hierbei eine signifikant erhöhte Expression bei Patientinnen mit günstiger Prognose beobachtet. Die erhöhte Expression der 20 anderen Gene ließ sich hingegen bei Patientinnen mit ungünstiger Prognose finden. Diese 20 Gene wurden als *mono-high-signature* definiert und für die folgenden Analysen verwendet. Interessanterweise sind fast alle in der *mono-high-signature* enthaltenen Gene im Prozess der Zellzyklusregulation involviert [A5].

Um zu testen, ob sich die gefundene *mono-high-signature* als prognostischer Marker eignet, wurde mit den 20 Genen dieser Gruppe eine hierarchische Cluster-Analyse durchgeführt. Bei der Auswertung wurden nur Patientinnen mit einer Überlebensdauer < 5 Jahre und Patientinnen mit einer Überlebensdauer > 10 Jahre berücksichtigt. Basierend auf der Expression der Gene der *mono-high-signature* konnten diese Patientinnen in zwei Gruppen eingeteilt werden. In Gruppe 1 waren die 20 betrachteten Gene weitgehend unter-, in Gruppe 2 hingegen weitgehend überexprimiert [Abb. 3.14].

Eine Analyse der Überlebensdauer der Patientinnen in den jeweiligen Gruppen ergab, dass in Gruppe 1 87 % (52 von 60) der Patientinnen eine Überlebensrate von mehr als 10 Jahren aufweisen und lediglich 13 % (8 von 60) eine Überlebensrate von weniger als 5 Jahren. In Gruppe 2 überlebten 39 % (26 von 66) der Patientinnen mehr als 10 Jahre und 61 % (40 von 66) weniger als 5 Jahre. Patientinnen der Gruppe 1 haben also größtenteils eine günstige und Patientinnen der Gruppe 2 hingegen überwiegend eine ungünstige Prognose.

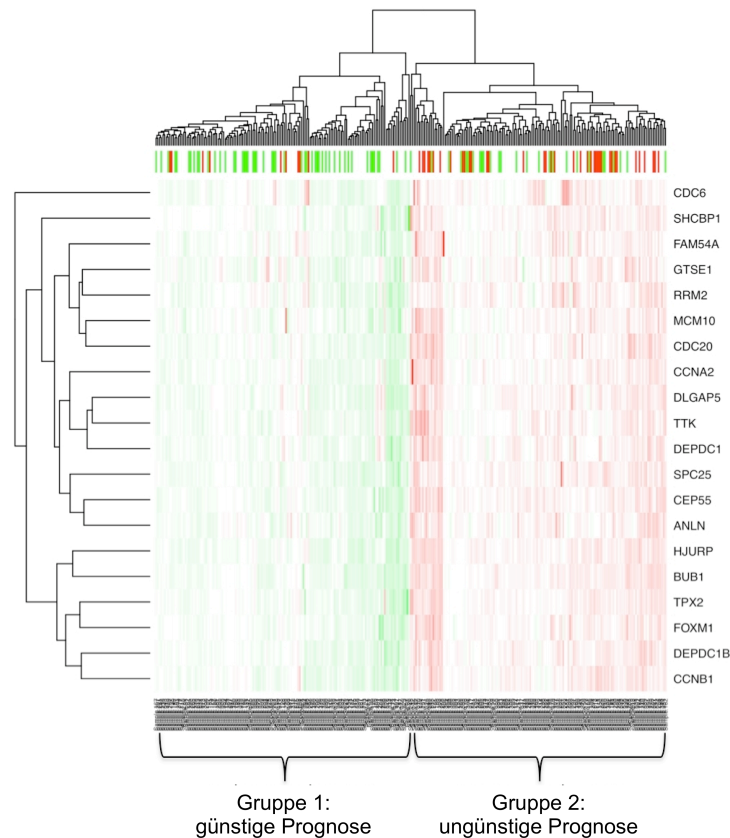


Abbildung 3.14: Korrelation der *mono-high-signature* mit der Prognose von Brustkrebspatientinnen.

Basierend auf der 20 Gene umfassenden *mono-high-signature* konnte durch eine hierarchische Cluster-Analyse eindeutig eine Gruppe mit günstiger (Gruppe 1) und eine Gruppe mit ungünstiger Prognose (Gruppe 2) identifiziert werden. Jede Zeile der *heat map* repräsentiert dabei ein Gen und jede Spalten eine Patientin. Es wurden nur Patientinnen mit einer Überlebenszeit von <5 Jahren (Zeile oben: rot) und Patientinnen mit einer Überlebenszeit von > 10 Jahren (Zeile oben: grün) eingeschlossen. Alle anderen Patientinnen sind in der Abbildung (Zeile oben) weiß markiert.

rechts: Anordnung der 20 Gene der *mono-high-signature*; links: Dendrogramm für die 20 Gene der *mono-high-signature*; unten: Anordnung der 295 Patientenproben; rechts: Dendrogramm für die 295 Patientinnen

Die vorliegenden Daten belegen, dass basierend auf dem beschriebenen 3D-Collagen-I-Kulturmodell eine Genexpressionssignatur erstellt werden konnte, die außerhalb von klassi-

schen Prognosemarkern und bekannten Genexpressionssignaturen prognostische Informationen liefert.

3.2 Einfluss mechanischer Signale auf das Wachstumsverhalten benigner und maligner Mammaepithelzellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Risiko an Brustkrebs zu Erkranken mit zunehmender Dichte des Brustgewebes ansteigt [92]. Eine hohe Dichte des Brustgewebes ist mit einem Anstieg der extrazellulären Matrixkomponenten wie Collagen assoziiert [93]. Roeder *et al.* konnten zeigen, dass erhöhte Collagenkonzentrationen zu einer erhöhten Festigkeit der Collagen-Matrix *in vitro* führt [94]. Unter Nutzung dieses Effektes zeigten Paszek *et al.*, dass die Erhöhung der Matrixfestigkeit das Wachstum von Brustepithelien fördert, deren Differenzierung hingegen aber hemmt [95].

3.2.1 Analyse des Einflusses der Matrixfestigkeit auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen

Um die oben beschriebenen Erkenntnisse auf S1-Zellen übertragen zu können, wurden S1-Zellen in Monokultur für 10 Tage in 3D-Collagen-I-Gelen mit Collagenkonzentrationen von 1,0 mg/ml bis 3,0 mg/ml kultiviert. Standard-Monokulturen (Collagenkonzentration 1,3 mg/ml) dienten als Vergleich.

Das quantitative Wachstum der S1-Zellen in Collagengelen geringer Festigkeit ($c = 1,0$ mg/ml) war im Vergleich zur Standard-Monokultur um den Faktor 1,4 verringert [Abb. 3.15 A]. 65 % der Zellaggregate stellten polarisierte azinusähnliche Strukturen dar [Abb. 3.15 B und 3.16]. Eine Erhöhung der Collagenkonzentration auf 1,5 mg/ml führte nicht zu einer Änderung des quantitativen und qualitativen Wachstumsverhaltens der S1-Zellen. Die weitere Erhöhung der Collagenkonzentration auf 2,0 mg/ml induzierte allerdings ein unstrukturiertes und progressives Wachstum der S1-Zellen [Abb. 3.15 A und B]. In diesen Kulturen zeigten lediglich 28 % der Zellaggregate eine polarisierte azinusähnliche Struktur. Das quantitative Wachstum der S1-Zellen war im Vergleich zur Standard-Monokultur um etwa den Faktor 1,3 signifikant erhöht. Zwischen den Collagenkonzentrationen 2,0 mg/ml und 3,0 mg/ml ließen sich sowohl qualitativ als auch quantitativ keine signifikanten Unterschiede beobachten [Abb. 3.15 A und B].

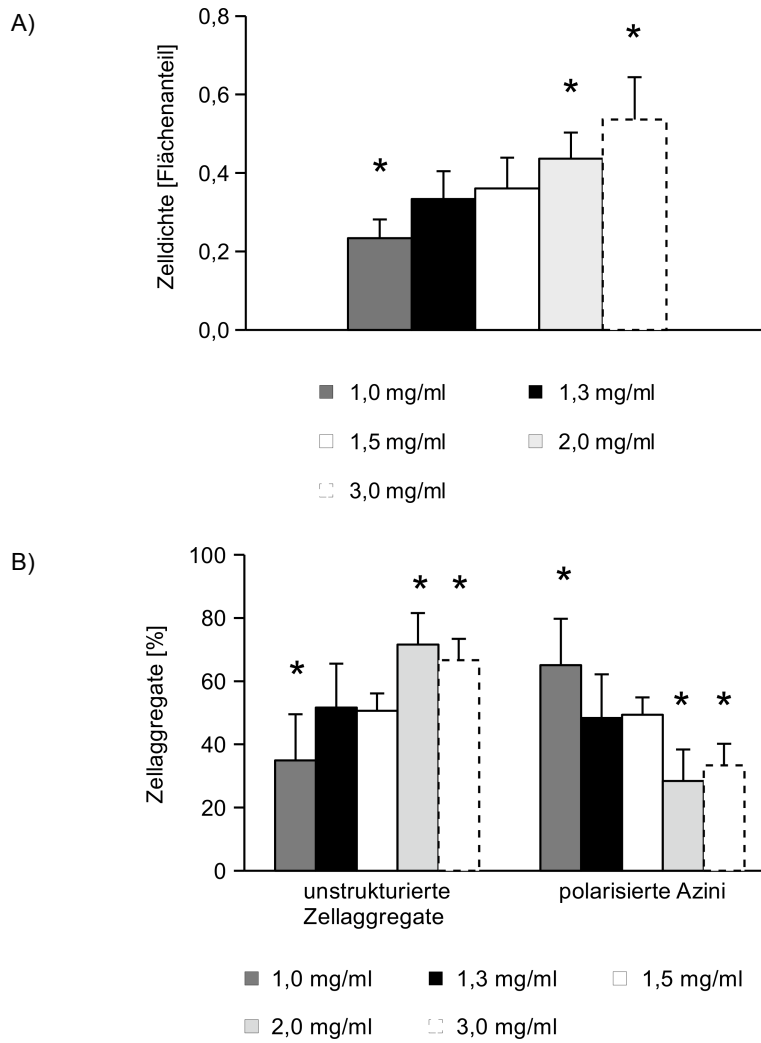


Abbildung 3.15: Evaluation des Einflusses der Matrixfestigkeit auf das quantitative und qualitative Wachstumsverhalten von S1-Zellen in Monokultur.

Es wurden das Wachstum (A) und die Morphogenese (B) von S1-Zellen in 3D-Monokultur in Collagengelen verschiedener Collagenkonzentrationen nach 10 Tagen Kulturdauer analysiert.

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur Collagenkonzentration 1,3 mg/ml ($p < 0,05$)

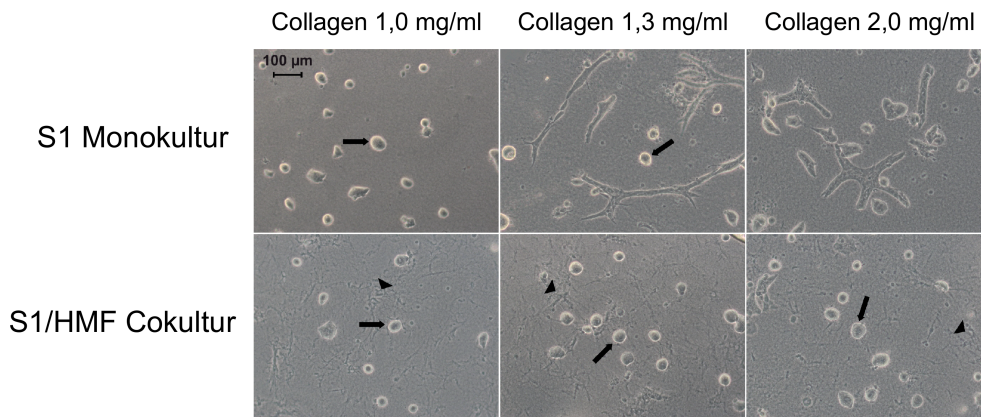


Abbildung 3.16: Einfluss der Matrixbeschaffenheit auf das morphologische Wachstumsverhalten von S1-Zellen.

Mit steigender Collagenkonzentration nimmt die Festigkeit der Matrix zu. In Monokultur führt dies zu unstrukturiertem Wachstum der S1-Zellen (oben). In Cokultur antagonisieren die Fibroblasten den Einfluss der Matrixfestigkeit (unten).

Pfeil: glanduläre Strukturen gebildet von S1-Zellen, Pfeilspitze: Fibroblast

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass S1-Zellen in der Lage sind, Modifikationen der mechanischen Gewebshomöostase ihrer Mikroumgebung zu registrieren und darauf zu reagieren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Paszek *et al.* [95] zeigten die gefundenen Ergebnisse, dass eine zunehmende Matrixfestigkeit zu einer Erhöhung der Proliferation von S1-Zellen, aber zu einer Hemmung ihrer Differenzierung führt.

Im folgenden Schritt wurde der Effekt der Fibroblasten in Cokulturen unterschiedlicher Collagenkonzentrationen untersucht. Hierfür wurden S1-Zellen in Cokultur mit HMF in Collagengelen der bereits beschriebenen Collagenkonzentrationen (siehe oben) kultiviert. In Cokulturen niedriger Matrixfestigkeit ($c = 1,0$ mg/ml) zeigte sich kein Einfluss der Fibroblasten auf die Differenzierung der S1-Zellen [Abb. 3.16]. Sowohl in Mono- als auch in Cokultur betrug der Anteil der polarisierten Sphäroide etwa 65 %. Das quantitative Wachstum der S1-Zellen war allerdings in Cokulturen geringer Festigkeit um etwa das 1,8 fache verringert im Vergleich zu Monokulturen geringer Festigkeit [Abb. 3.15 A und 3.17 A]. Interessanterweise führte die Cokultivierung der S1-Zellen mit HMF in Gelen hoher Festigkeit ($c = 2,0$ mg/ml) zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an polarisierten Azini im Vergleich zu Monokulturen hoher Festigkeit von 28 % auf 57 % ($p < 0,01$) [Abb. 3.17 B]. Bemerkenswert ist, dass das Wachstum der S1-Zellen in Cokulturen mit steigender Festigkeit der Gele zunahm, wohingegen der Vergleich der Cokulturen von hoher und niedriger Festigkeit keinen Unterschied in der Morphogenese der S1-Zellen ergab [Abb. 3.16 und 3.17 B].

Diese Ergebnisse zeigen, dass Mammafibroblasten in der Lage sind, Störungen der mechanischen Gewebshomöostase zu antagonisieren und so auch in Collagengelen von hoher Festigkeit die Differenzierung normaler Mammaepithelzellen zu induzieren.

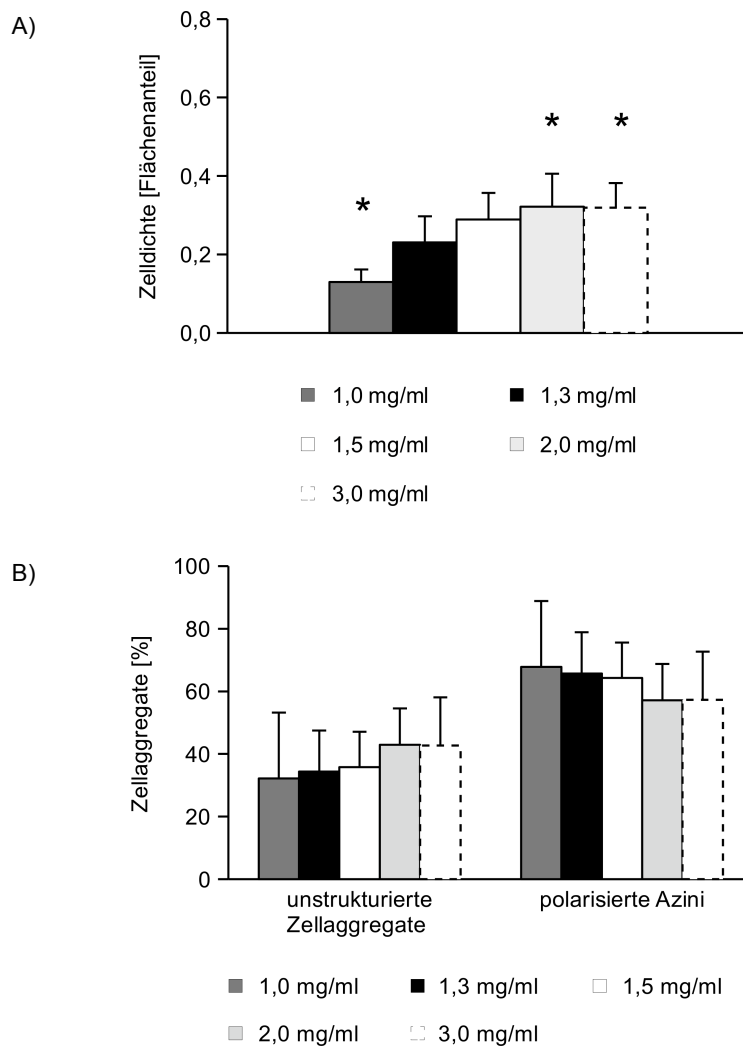


Abbildung 3.17: Evaluation des Einflusses der Matrixfestigkeit auf das quantitative und qualitative Wachstumsverhalten von S1-Zellen in Cokultur.

Bewertung des Wachstums (A) und der Morphogenese (B) von S1-Zellen in Cokultur mit HMF in Collagengelen verschiedener Collagenkonzentration nach 10 Kulturtagen.

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur Collagenkonzentration 1,3 mg / ml ($p < 0,05$)

3.2.2 Analyse des Einflusses der Zellkontraktilität auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen

Neben der Matrixfestigkeit beschrieben Wozniak *et al.* die Zellkontraktilität als einen wichtigen Faktor für die Fähigkeit einer Zelle, die Matrixbeschaffenheit zu verändern oder auf Änderungen in der Matrixbeschaffenheit zu reagieren [96]. Um zu prüfen, ob benigne Mammaepithelzellen die Fähigkeit besitzen, eine Collagen-I-Matrix zu kontrahieren, wurden S1-Zellen in frei schwimmenden Collagen-I-Gelen kultiviert. Hierzu wurden die 3D-Collagen-Kulturen an Tag 1 von der Kulturschale abgelöst und anschließend frei schwimmend im Kulturmedium kultiviert.

Dadurch reduziert sich die Spannung im Gel, und kontraktile Zellelemente können gegebenenfalls das Gel kontrahieren. Unter dieser Kulturbedingung konnte in S1-Monokulturen keine bemerkenswerte sichtbare Kontraktion des Gels beobachtet werden. Passend zu dieser Beobachtung erwiesen sich S1-Zellen bei Immunfluoreszenzfärbung als negativ für α -SMA, einem kontraktilem Protein. In Hinblick auf die qualitative Analyse des Wachstumsverhaltens der S1-Zellen konnte kein Unterschied zwischen dem Anteil polarisierter Azini in frei schwimmenden und in Standard-Monokulturen festgestellt werden [Abb. 3.18]. Folglich sind S1-Zellen nicht in der Lage, durch Kontraktion der Gele ihre Differenzierung zu induzieren.

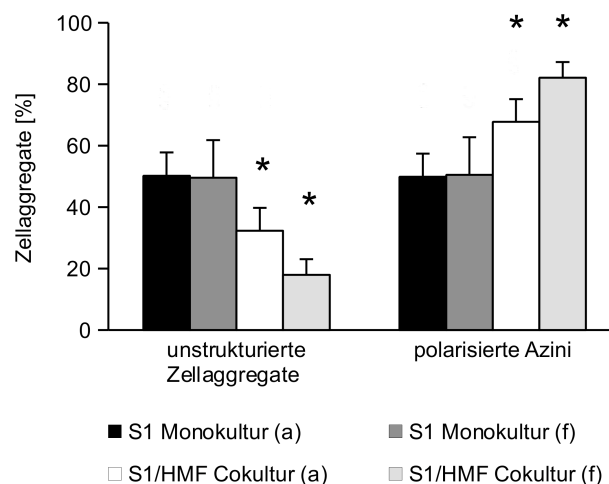


Abbildung 3.18: Azinäre Morphogenese der S1-Zellen in frei schwimmenden 3D-Collagen-I-Gele.

S1-Zellen wurden als Standard-Monokultur und -Cokultur (a) sowie in frei schwimmenden Mono- und Cokulturen (f) kultiviert. In Monokultur lässt sich kein Unterschied zwischen beiden Kulturbedingungen beobachten. In Cokultur erhöhte sich unter frei schwimmenden Kulturbedingungen die Anzahl polarisierter Azini.

* Signifikanz im Vergleich zur Standard-Monokultur ($p < 0,01$)

Da gezeigt werden konnte, dass Fibroblasten kontraktile Eigenschaften besitzen [97] und HMF, CAF und NF nachweislich das kontraktile Protein α -SMA exprimieren [Abb. 3.11], wurde die Hypothese aufgestellt, dass in Cokulturen die Kontraktilität der Fibroblasten mit einer Induktion der Differenzierung benigner Mammaepithelien einhergeht. Um das zu untersuchen, wurden S1-Zellen in Cokultur mit HMF ebenfalls in frei schwimmenden Gelen kultiviert. Unter diesen Bedingungen ließ sich in Cokultur eine sichtbare Kontraktion der Gele beobachten. Die qualitative Analyse des Wachstumsverhaltens der S1-Zellen ergab, dass die durch Fibroblasten bewirkte Gelkontraktion den Anteil an polarisierten Azini im Vergleich zur Standard-Cokultur deutlich um 15 bis 20 % erhöht ($p < 0,01$) [Abb. 3.18]. Eine quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens der S1-Zellen in frei schwimmenden Kulturen war aufgrund der unterschiedlich stark ausgeprägten Gelkontraktion mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden der quantitativen Wachstumsanalyse nicht möglich.

Die gefundenen Ergebnisse belegen, dass Fibroblasten durch Kontraktion der Gele in der Lage sind, die Matrixspannung zu beeinflussen und so die Differenzierung benigner Mammaepithelzellen zu induzieren.

3.2.3 Analyse des Einflusses der Zellkontraktilität auf das Wachstumsverhalten maligner Mammaepithelzellen

Da die oben aufgeführten Daten belegen, dass das quantitative Wachstumsverhalten und die Morphogenese phänotypisch normaler Brustepithelzellen durch Modifikationen in der Matrixbeschaffenheit beeinflusst werden, wurde in einem nächsten Schritt die Auswirkung stromal induzierter Veränderungen der Matrix auf tumorogene Brustepithelzellen untersucht. Hierfür wurden die tumorigenen T4-2-Zellen wie oben beschrieben als Mono- und Cokulturen mit HMF in frei schwimmenden Gelen kultiviert und ebenfalls die Morphologie der Epithelzellen analysiert.

Ähnlich ihrem benignen Pendant kontrahierten T4-2-Zellen frei schwimmende Collagen-I-Gele nicht. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigten auch T4-2-Zellen keine positive Reaktion auf die Färbung mit α -SMA.

In Gegensatz dazu konnte in frei schwimmenden Cokulturen eine starke Kontraktion der Gele beobachtet werden, was auch hier eine quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens mit den beschriebenen Methoden unmöglich machte. Die qualitative Analyse des Wachstumsverhaltens der T4-2-Zellen ergab, dass unter frei schwimmenden Bedingungen die durch Fibroblasten verursachte Gelkontraktion den Anteil polarisierter Azini im Vergleich zur Standard-T4-2-Cokultur um fast 40 % erhöht ($p < 0,01$) [Abb. 3.19]. Anzumerken ist, dass trotz fehlender sichtbarer Kontraktion der Gele auch in der frei schwimmenden Monokultur der Anteil an polarisierten Azini erhöht war [Abb. 3.19]. Die Polarisation der Sphäroide konnte wie zuvor beschrieben mittels Immunfluoreszenzfärbungen belegt werden. Wie bei S1-Zellen konnte für Golgin-97 und ZO-1 eine apikale, für β 4-Integrin eine basale, für β 1-Integrin eine basolaterale und β -Catenin eine apicolaterale Expression beschrieben werden [Tab. 3.11, Abb. 3.20]. Interessanterweise zeigten T4-2-Zellen in frei schwimmender Cokultur, ähnlich den S1-Zellen in Cokultur, lediglich eine geringe bzw. keine Expression von Vimentin im Vergleich zu einer starken Vimentinexpression in frei schwimmenden Monokulturen [Abb. 3.21].

Die aufgeführten Ergebnisse implizieren, dass eine durch Fibroblasten induzierte Gelkontraktion zu Veränderungen der Matrixcompliance und somit zu einer Reversion des malignen Phänotyps von Brustkrebszellen führt.

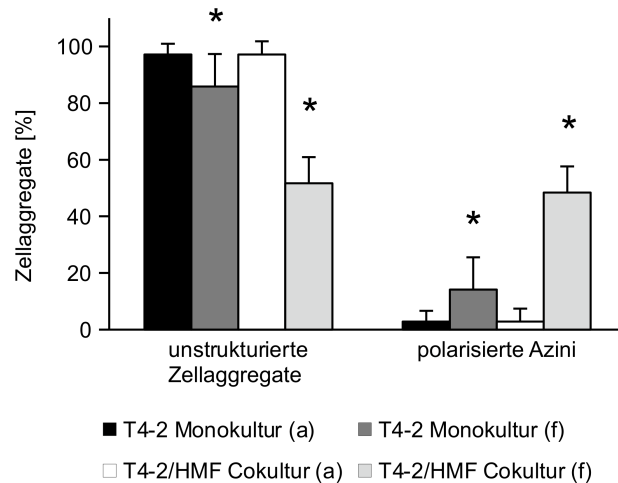
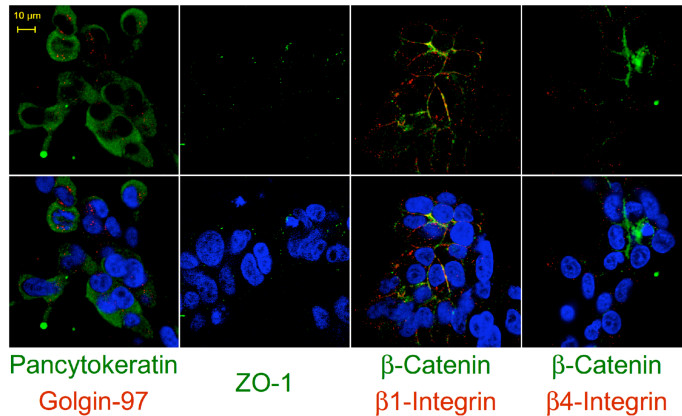
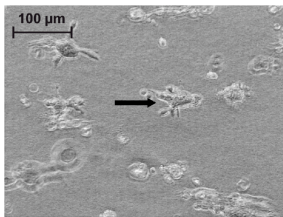


Abbildung 3.19: Azinäre Morphogenese von T4-2 Zellen in frei schwimmenden 3D-Collagen-I Gelen.

T4-2-Zellen wurden in normalen (a) und frei schwimmenden (f) Mono- und Cokulturen kultiviert und die Morphologie der Zellcluster analysiert.

* signifikanter Unterschied im Vergleich zur normalen Monokultur (p < 0,01)

T4-2 Monokultur
(Gel frei schwimmend)



T4-2/HMF Cokultur
(Gel frei schwimmend)

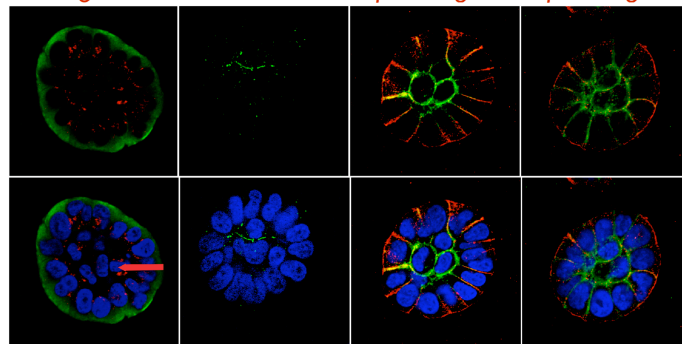
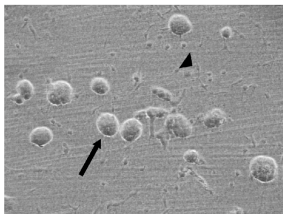


Abbildung 3.20: Charakterisierung der Morphogenese von T4-2-Zellen in frei schwimmenden Mono- und Cokulturen.

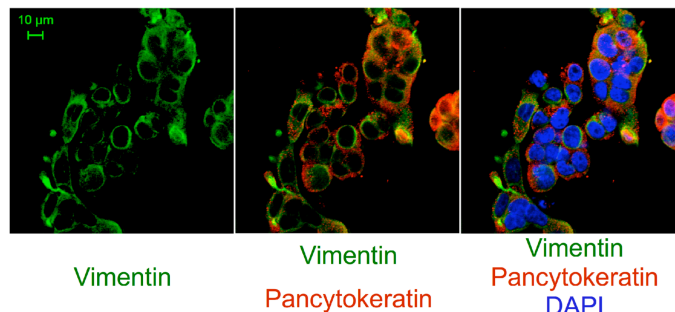
T4-2-Zellen (schwarzer Pfeil) in frei schwimmender Monokultur (oberes Bild) wurden mit T4-2-Zellen in frei schwimmender Cokultur (unteres Bild) mit HMF (Pfeilspitze) mit Hilfe der Phasenkontrast-Mikroskopie (Spalte 1) und Immunfluoreszenzfärbung (Spalten 2-5) verglichen. Die Zellen wurden mit apikalen Differenzierungsmarkern und einem Epithelzellmarker (Pancytokeratin (grün)) gefärbt (Kernfärbung: DAPI (blau)). In Cokultur bilden die T4-2-Zellen polarisierte Azini aus. Allerdings lassen einzelne Zellen im Lumen einiger Azini (roter Pfeil) vermuten, dass die Differenzierung noch unvollständig ist.

Tabelle 3.11: Expression von Differenzierungsmarkern in T4-2-Zellen in frei schwimmender Monokultur und Cokultur mit HMF.

Differenzierungsmarker	frei schwimmende Monokultur		frei schwimmende Cokultur	
	Lokalisation	Intensität	Lokalisation	Intensität
Golgin-97	diffus	+	apikal	++
β 4-Integrin	diffus	+	basal	++
β 1-Integrin	diffus	+	basolateral	++
β -Catenin	kortikal	+	apikolateral	++
ZO-1	diffus	+	apikal	+

+ schwache bis mäßige Expression
++ starke Expression

T4-2 Monokultur
(Gel frei schwimmend)



T4-2/HMF Cokultur
(Gel frei schwimmend)

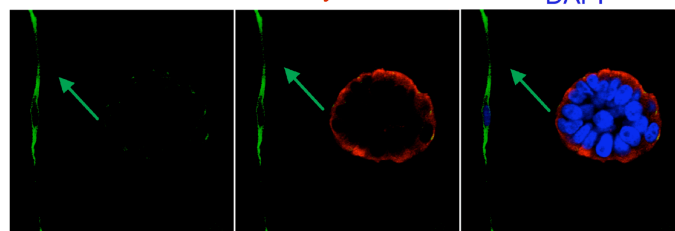


Abbildung 3.21: Mesenchymale Charakteristika in frei schwimmender T4-2-Monokultur und T4-2-Cokultur mit HMF.

Der mesenchymale Marker Vimentin (grün) war bei T4-2-Zellen in der frei schwimmenden Monokultur (oben) deutlich stärker exprimiert als bei T4-2-Zellen der Cokultur mit HMF (unten). Pancytokeratin (rot), Kernfärbung: (DAPI (blau), vimentin-positiver Fibroblast (grüner Pfeil)

3.3 Einfluss parakriner Signale auf das Wachstumsverhalten benigner und maligner Mammaepithelzellen

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass durch direkten Kontakt der Fibroblasten mit der ECM eine Veränderung der Matrixbeschaffenheit und damit eine Regulation der Differenzierung von Brustepithelzellen induziert werden kann. Es stellte sich die Frage, ob auch lösliche stromale Faktoren die Bildung polarisierter Azini induzieren können.

3.3.1 Analyse des Einflusses stromal produzierter löslicher Faktoren auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen

Um den Einfluss der durch HMF produzierten löslichen Faktoren zu untersuchen, wurden die S1-Zellen in Monokultur mit konditioniertem Medium (CM) von HMF kultiviert. Nach 10 Tagen Kultur zeigten S1-Zellen in Monokultur mit konditioniertem Medium ein ähnliches Wachstum wie S1-Zellen in Standard-Cokultur. Das Wachstum der S1-Zellen in Monokulturen mit CM war etwa um den Faktor 1,3 niedriger als in Standard-Monokulturen [Abb. 3.22 A]. Qualitative Wachstumsanalysen zeigten, dass 40 % der Zellaggregate in Monokultur mit CM eine azinus-ähnliche Struktur aufwiesen ($p < 0,01$) [Abb. 3.22 B].

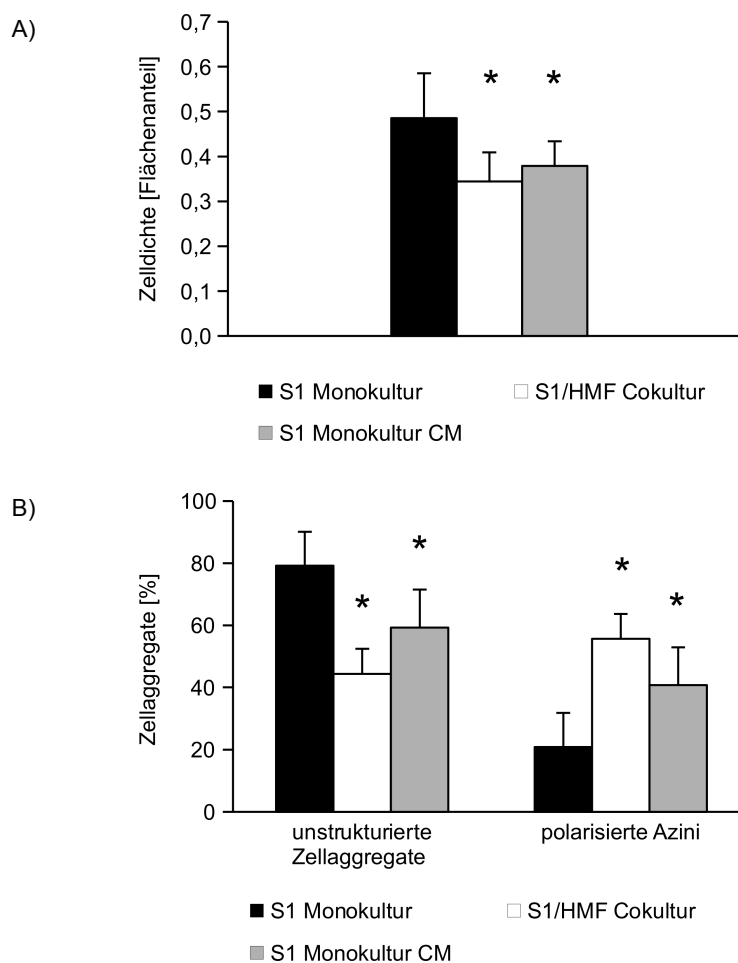


Abbildung 3.22: Einfluss von konditioniertem Medium auf Wachstum und Morphogenese von S1-Zellen in Standard-Monokultur.

A) Im Vergleich zur Standard-Monokultur war das Wachstum der S1-Zellen in Monokultur mit konditioniertem Medium (CM) signifikant verringert ($p < 0,01$). B) Die Kultivierung von S1-Zellen in Monokultur mit konditioniertem Medium (CM) induzierte eine Differenzierung der S1-Zellen vergleichbar der Differenzierung in Standard-Cokultur. ($p < 0,01$).

* Signifikanz gegenüber der Standard-Monokultur.

Diese Daten zeigen, dass zusätzlich zur direkten Interaktion zwischen Fibroblasten, ECM und Epithelzellen auch lösliche stromale Faktoren eine Rolle in der Regulation der Morphogenese von Brustepithelzellen spielen.

Um einen ersten Hinweis auf mögliche, für die Zelldifferenzierung verantwortliche Faktoren zu erhalten, wurde das konditionierte Medium von HMF mittels 1D-SDS-PAGE, einem tryptischen in-Gel-Verdau und Nano-LC-ESI-MS/MS analysiert. Mit einer FDR (*false discovery rate*) von 1 % Fragmentspektren wurden mithilfe einer Datenbank von www.uniprot.org 6591 PSM (*peptide spectrum matches*) identifiziert. Eine FDR von 5 % Fragmentspektren ergab 7985 PSM, und es konnten insgesamt 401 Proteine identifiziert werden [A6].

Unter ihnen befanden sich die Hauptkomponenten der Basalmembran Nidogen-1, Laminin und Collagen-IV, die essenziell für die Differenzierung von Mammaepithelien sind [9, 98]. Weiterhin konnten beispielsweise die Glykoproteine Decorin, Lumican und Dystroglykan, welchen eine Rolle in der korrekten ECM-Komposition und des Tumorwachstums zukommt, identifiziert werden [99-102] sowie Filamin A, Vinculin und Actin, welche die Gewebshomöostase regulieren [95, 96, 103].

Weaver *et al.* zeigten, dass S1-Zellen in Form von polarisierten Azini wachsen, wenn sie in Matrigel[®] kultiviert werden [Abb. 3.1, [42]]. Die Hauptkomponenten des Matrigels[®] sind Collagen-IV, Laminin und Nidogen-1. Aus der Literatur ist eine Produktion von Collagen-IV durch S1-Zellen bekannt [9]. Wie im vorherigen Absatz festgestellt, konnte durch Analyse des konditionierten Mediums von HMF eine Produktion von Nidogen-1 und Laminin nachgewiesen werden. Daher wurde im nächsten Schritt die Wirkung von rekombinantem Nidogen-1 und Laminin auf S1-Zellen in einer dreidimensionalen Collagen-Monokultur untersucht. Als Matrix wurde Collagen-I in einer Konzentration von 1,3 mg/ml verwendet. Vorarbeiten unseres Arbeitskreises zeigten keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie der S1-Zellen unter alleiniger Zugabe von Nidogen-1. Aus diesem Grund wurde die alleinige Zugabe von Nidogen-1 in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Unter Zugabe von lediglich Laminin in Monokultur zeigten S1-Zellen unorganisiertes Zellwachstum, wie es auch in Standard-Monokultur beobachtet wurde. Dieser Effekt war unabhängig von der eingesetzten Lamininkonzentration [Tab. 3.12].

Die Zugabe von Nidogen-1 und Laminin im Verhältnis 1 : 1 mit Konzentrationen von 10 µg/ml führte ebenfalls zu unstrukturiertem Zellwachstum. Eine Steigerung auf 50 µg/ml bei gleichbleibendem Verhältnis führte zu Nekrose der S1-Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden.

Da gemäß Hersteller für Matrigel[®] ein Nidogen-Laminin-Verhältnis von 1 : 7 beschrieben wird, wurde in den folgenden Versuchen das Nidogen-Laminin-Verhältnis ebenfalls auf 1 : 7 geändert. Unter Verwendung einer Nidogen-Konzentration von 20 µg/ml und einer Lamininkonzentration von 140 µg/ml zeigten sich vermehrt Einzelzellen, von denen etliche Anzeichen einer beginnenden Nekrose aufwiesen [Tab. 3.12]. Niedrigere Konzentrationen von Nidogen und Laminin bei gleichem Verhältnis 1 : 7 führten zu unstrukturiertem Wachstum. In keinem

der durchgeführten Experimente konnte eine Differenzierung der Epithelzellen induziert werden. Es ist möglich, dass die gesuchte Konzentration zwischen denen des unstrukturierten Wachstums (Nidogen : Laminin = 10 µg/ml : 70 µg/ml) und des beginnenden Zelltods (Nidogen : Laminin = 20 µg/ml : 140 µg/ml) liegt.

Tabelle 3.12: Einfluss von Nidogen-1 und Laminin auf das Wachstumsverhalten benigner Mammaepithelzellen.

Nidogenkonzentration [µg/ml]	Lamininkonzentration [µg/ml]	Verhältnis Nidogen:Laminin	Zellwachstum
34	240	1:7	Nekrose innerhalb von 24 Stunden
----	240	----	unstrukturiert
20	140	1:7	beginnende Nekrose
----	140	----	unstrukturiert
100	100	1:1	Nekrose innerhalb von 24 Stunden
----	100	----	unstrukturiert
10	70	1:7	unstrukturiert
----	70	----	unstrukturiert
50	50	1:1	Nekrose innerhalb von 24 Stunden
----	50	----	unstrukturiert
10	10	1:1	unstrukturiert
----	10	----	unstrukturiert

3.3.2 Analyse des Einflusses stromal produzierter löslicher Faktoren auf das Wachstumsverhalten maligner Mammaepithelzellen

Da die Ergebnisse in Kapitel 3.2.3 zeigten, dass HMF den malignen Phänotyp von T4-2-Zellen lediglich unter frei schwimmenden Bedingungen revertierten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass für die Reversion eher mechanische als lösliche Faktoren verantwortlich sind. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden T4-2-Zellen in Monokultur mit CM von HMF sowohl unter Standard- als auch unter frei schwimmenden Bedingungen kultiviert.

Sowohl unter Standardbedingungen als auch unter frei schwimmenden Kulturbedingungen war das Wachstum der T4-2-Zellen in Monokultur mit CM um etwa das 1,5- bis 1,7fache im Vergleich zur Standard-T4-2-Monokultur erhöht ($p < 0,01$) [Abb. 3.23 A]. In frei schwimmender 3D-Monokultur zeigte sich eine leichte, aber signifikante Zunahme des Wachstums der T4-2-Zellen im Vergleich zur Standard-T4-2-Monokultur. Eine starke Gelkontraktion in Cokulturen unter frei schwimmenden Kulturbedingungen verhinderte auch hier die quantitative Analyse

des Wachstums der T4-2-Zellen und somit auch den Vergleich mit dem Wachstum der T4-2-Zellen in Monokultur mit CM.

Qualitative Wachstumsanalysen zeigten, dass in Monokultur mit konditioniertem Medium sowohl unter Standardbedingungen als auch unter frei schwimmenden Bedingungen keine Differenzierung der malignen Epithelzellen zu beobachten war. Unter beiden Kulturbedingungen wiesen mehr als 95 % der Zellcluster eine unstrukturierte Zellkernanordnung mit diffuser Golgi-97-Expression auf [Abb. 3.23].

Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass lösliche stromale Faktoren das Wachstum von tumorigenen Mammaepithelzellen stimulieren, sie aber keine Funktion bei der Differenzierung maligner Mammaepithelzellen einnehmen. Um eine Reversion des malignen Phänotyps von Karzinomzellen zu induzieren, ist also eine durch Fibroblasten induzierte Gelkontraktion erforderlich.

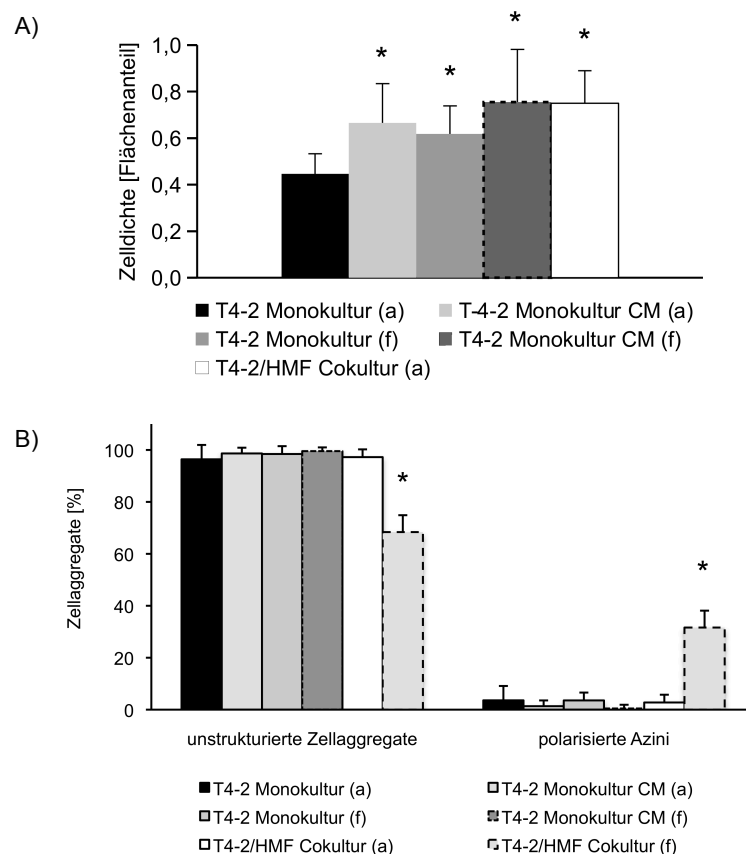


Abbildung 3.23: Einfluss von konditioniertem Medium auf das Wachstum und die Morphogenese von T4-2-Zellen.

A) Das Wachstum von T4-2-Zellen wurde sowohl in Standard-T4-2-Monokulturen als auch in frei schwimmenden Monokulturen durch konditioniertes Medium von HMF verstärkt. B) Die Morphogenese von T4-2-Zellen wurde durch HMF in Cokultur (a) und durch CM in Monokultur nicht beeinflusst. Auch unter frei schwimmenden Kulturbedingungen (f) konnte durch CM keine Reversion des malignen Phänotyps induziert werden.

* Signifikanz im Vergleich zur normalen Monokultur ($p < 0,01$)

4 Diskussion

Bereits 1918 konnte Hans Spemann zeigen, dass die Gewebeentwicklung nicht nur zellautonom reguliert wird, sondern dass auch das umgebende Mikromilieu einen entscheidenden Einfluss auf die korrekte Entwicklung hat [104]. Auch im Rahmen der Tumorentstehung und des Tumorwachstums konnte die Beteiligung des Stromas gezeigt werden [34]. Daher richtet sich das Augenmerk der onkologischen Forschung seit einigen Jahren verstärkt auf das den Tumor umgebende Stroma. Dieses setzt sich aus verschiedensten Matrixkomponenten und Zelltypen zusammen, zwischen denen sich vielfältige Interaktionen abspielen. Einige Komponenten des Tumorstromas werden in der Literatur bereits als vielversprechende potenzielle Targets der Krebstherapie diskutiert (siehe Kapitel 1.3). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich speziell auf die Rolle der Fibroblasten im Prozess der normalen Morphogenese sowie der Kontrolle des Tumorwachstums.

Als Kulturmodell diente ein 3D-Collagen-I-Kulturmodell in dem benigne und tumorigene Mammaepithelzellen entweder in Monokultur oder in Cokultur mit Mammastromafibroblasten kultiviert wurden. Bei den verwendeten Epithelzellen handelt es sich um Zellen der HMT-3522-Zelllinie (siehe Kapitel 2.1.3). Bei dieser Zelllinie entstanden aus spontan immortalisierten nicht tumorigenen Mammaepithelzellen (S1-Zellen) durch definierte Kulturbedingungen tumorigene Mammaepithelzellen (T4-2-Zellen). Es handelt sich also um ein Zellmodell bei dem benigne und maligne Epithelzellen einen identischen genetischen Ursprung haben. Dies ermöglicht es, den Einfluss verschiedener Kulturbedingungen optimal zu untersuchen bzw. zu vergleichen. Ein weiterer Vorteil des eingesetzten Zellmodells ist die in der Literatur ausführlich beschriebene Charakterisierung des Auftretens von Veränderungen der Zellen über mehrere hundert Passagen [75].

4.1 Mammastromafibroblasten induzieren die Differenzierung benigner, nicht aber maligner Mammaepithelzellen

4.1.1 Mammastromafibroblasten bestimmen das Wachstumsverhalten benigner und maligner Mammaepithelzellen

Während der normalen Organogenese bilden Epithelzellen in vivo kugelförmige Aggregate mit einem zentralen Lumen [105]. Die korrekte Polarisation der apikal-basalen Achse dieser als Azini bezeichneten Strukturen ist für die Funktion von Geweben essenziell [83]. Unter Verwendung von dreidimensionalen Kulturmodellen konnten in den letzten Jahren bereits wertvolle Einblicke in grundlegende molekulare Mechanismen der Morphogenese gewonnen werden [106-108]. In dem überwiegenden Teil dieser Arbeiten wurde Matrigel[®] als Matrix verwendet. Hierbei handelt es sich um eine lösliche rekonstituierte Basalmembran, die als Hauptbestandteile Laminin, Collagen-IV und Nidogen-1 beinhaltet [109]. Zahlreiche mit Matrigel[®] durchge-

fürte Studien zeigten für dreidimensional kultivierte normale Brustepithelzelllinien und primäre normale Brustepithelzellen phänotypisch Merkmale benigner Brustepithelzellen in vivo [15, 22]. In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass das Wachstum phänotypisch normaler Brustepithelzellen (S1-Zellen) in einem 3D-Collagen-I-Cokulturmodell mit normalen Mammastromafibroblasten (HMF) ebenfalls durch ein in-vivo-ähnliches Wachstum charakterisiert ist. Die Zellen unterlagen einem Wachstumsarrest und bildeten azinusähnliche Strukturen mit polarisierter Ausrichtung der Zellachse. Das beobachtete Wachstum der S1-Zellen in Monokultur hingegen wies deutliche Merkmale des Wachstums von Brustkrebszellen auf, wie eine morphologische Desorganisation und den Verlust der kontrollierten Zellproliferation [110]. In Monokultur konnte ein progressives und unstrukturiertes Wachstum beobachtet werden, das durch eine diffuse Lokalisation der Differenzierungsmarker β 4-Integrin, Golgin-97 und ZO-1 gekennzeichnet war. Eine diffuse Expression von β -Catenin verdeutlichte eine Destabilisierung der adhärennten Zellverbindungen. Wie ebenfalls bei Tumoren häufig vorkommend, wiesen S1-Zellen in Monokultur Eigenschaften mesenchymaler Zellen auf (EMT). Sie bildeten zelluläre Ausläufer aus und zeigten eine starke Vimentinexpression [111, 112]. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese von einem karzinomähnlichen Wachstum in Monokultur.

Im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen zeigten Howlett *et al.* und Gudjonsson *et al.* die Bildung strukturierter Zellaggregate von S1-Zellen und normalen primären Brustepithelzellen in 3D-Collagen-I Monokulturen. Beide Arbeiten beschreiben allerdings neben einer strukturierten Zellanordnung auch die fehlende Differenzierung der Epithelzellen unter den gegebenen Kulturbedingungen [12, 112]. Während Howlett *et al.* das Fehlen der Differenzierung bei S1-Zellen aus dem Fehlen eines Lumens und einer endogenen Basalmembran ableiten, beschreiben Gudjonsson *et al.* für MEC sogar eine *inside-out*-Polarisation [12, 112]. Begründet werden könnte die Diskrepanz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen mit der Verwendung höherer Zellzahlen und unterschiedlichen Collagenkonzentrationen. Beide Faktoren führen zu einer Variabilität der Matrixbeschaffenheit und können somit zu einer Beeinflussung der Morphogenese und des Wachstums führen. Da Gudjonsson *et al.* für primäre normale Brustepithelzellen ein zu den S1-Zellen divergierendes Wachstum beschreiben, sollte in folgenden Experimenten weiterhin die Übertragbarkeit der hier für S1-Zellen beschriebenen Ergebnisse auf primäre Epithelzellen geprüft werden. Erste 3D-Kulturen mit primären normalen Brustepithelzellen unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Kulturbedingungen wurden bereits von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und deuten auf ein den S1-Zellen ähnliches Wachstumsverhalten hin.

Durch Cokultivierung von S1-Zellen mit primären normalen humanen Mammastromafibroblasten in 3D-Cokulturen konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Induktion der Differenzierung von S1-Zellen durch Mammastromafibroblasten um einen HMF-spezifischen Effekt handelt. Interessanterweise zeigte sich, dass auch durch Cokultivierung mit CAF eine Differenzierung normaler Epithelzellen induziert werden konnte und kein Unterschied zwi-

schen dem Wachstumsverhalten von S1-Zellen in Cokultur mit NF oder CAF zu beobachten war. In Übereinstimmung hiermit zeigten Sadlonova *et al.*, dass sowohl NF als auch CAF das Wachstum der nicht tumorigenen Brustepithelzelllinie MCF10A inhibieren, wenn sie in Matrigel[®] kokultiviert werden [113]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Mechanismus, der zur Induktion der Differenzierung von Epithelzellen führt, nicht durch zellspezifische Eigenschaften kontrolliert wird. Stattdessen scheinen Fibroblasten eher einen allgemeinen Einfluss auf die mechanischen und biochemischen Eigenschaften der ECM zu haben, welcher letztendlich zur Differenzierung normaler Milchdrüsenepithelzellen führt.

Die gefundenen Ergebnisse lassen, neben einem zelltyp-unabhängigen Effekt, jedoch einen interindividuellen Einfluss vermuten. Auch dies wird von Sadlonova *et al.* beschrieben. Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten eine Variabilität zwischen NF und CAF verschiedener Individuen in ihrer Fähigkeit, die Proliferation von MCF10A Zellen in 3D-Matrigel[®]-Kulturen zu inhibieren [113]. Allerdings ist sowohl in der vorliegenden als auch in der Arbeit von Sadlonova *et al.* der Probenumfang relativ gering. Zur Bestätigung unserer Vermutung müssten daher entsprechende Analysen mit einem erheblich größeren Probenumfang durchgeführt werden. Da für die Isolierung primärer Fibroblasten nur eine begrenzte Anzahl an OP-Präparaten zur Verfügung stand und die Isolierung der primären Fibroblasten nicht aus allen Präparaten gelang, war dies im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich.

Während die Kokultivierung mit normalen Fibroblasten (HMF) die Differenzierung normaler Brustepithelzellen induzierte, zeigten tumorigene T4-2-Zellen unter denselben Kulturbedingungen ein progressives und unstrukturiertes Wachstum. Die Proliferation der T4-2-Zellen in Cokultur mit HMF war sogar im Vergleich zur Monokultur signifikant erhöht. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten Su *et al.* auch für die Brustkrebszelllinie T47D eine Stimulierung des Wachstums durch HMF [114]. Die erhöhte Proliferation der Karzinomzellen in Cokultur mit HMF unterstützt die Annahme, dass die Wachstumshemmung von S1-Zellen in Cokultur mit HMF nicht durch einen erhöhten Mediumverbrauch durch Fibroblasten verursacht sein kann.

In der Literatur wird beschrieben, dass T4-2-Zellen auch in einer Matrigel[®]-Matrix große, unstrukturierte und kontinuierlich wachsende Kolonien bilden [15]. Weaver *et al.* zeigten ein ähnliches Verhalten auch für MCF-7-Zellen in Matrigel[®] [115]. Es kann folglich die Hypothese aufgestellt werden, dass tumorigene Zellen die Fähigkeit verloren haben, auf stromale Faktoren zu reagieren, die normalerweise zur Differenzierung führen würden. Ergebnisse von Howlett *et al.* stützen diese Hypothese. Sie zeigten eine Abhängigkeit der Differenzierung normaler Epithelzellen von der Verbindung der Zellen zur ECM über β -1-Integrin-Rezeptoren sowie eine Störung dieses Signalweges in Tumoren [112]. Weaver *et al.* konnten diese Ergebnisse auf S1- und T4-2-Zellen übertragen, und darüber hinaus eine Reversion des malignen Phänotyps der T4-2-Zellen durch Blockierung der aberrant hohen β 1-Integrin-Rezeptor-Zahl induzieren [42].

Krause *et al.* zeigten, dass eine Matrix, die sowohl Collagen-I, rekonstituierte Basalmembranbestandteile sowie primäre normale Mammastromafibroblasten enthält, interessanterweise eine nahezu vollständige Umkehrung des malignen Phänotyps von MCF7-Zellen in 3D-Kultur induziert [116]. Shekhar *et al.* zeigten Vergleichbares für präneoplastische MCF10AT1-EIII8-Zellen [38]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht alle Brustkarzinomzellen die Fähigkeit verloren haben, auf stromale Differenzierungsfaktoren zu reagieren. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe stützen diese Hypothese. Durch Cokultur mit HMF konnte gezeigt werden, dass sich primäre humane Mammakarzinomzellen in ein Kollektiv revertierbarer und ein Kollektiv nicht revertierbarer Karzinome einteilen lassen. Die genauere Charakterisierung dieser Kollektive sollte Gegenstand folgender Untersuchungen sein.

4.1.2 Mammastromafibroblasten regulieren die Genexpression benigner Mammaepithelzellen

In einem weiteren Projektabschnitt wurde der Einfluss von HMF auf die Genexpression von S1-Zellen analysiert. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Genexpressionsprofilen in S1-Zellen aus Mono- und Cokultur. Interessanterweise haben viele Gene mit hochregulierter Expression in Cokultur ihren Funktionsbereich in der ECM-Konstitution und der Zelldifferenzierung. Zum Beispiel kodieren die Gene NID1, DPT und FN1 für die ECM-Proteine Nidogen-1, Dermopontin und Fibronectin [117, 118]. Ferner reguliert Decorin, kodiert durch DCN, eine geordnete Matrixanordnung und ist bekannt dafür, ein potenter Inhibitor von Brustkrebszellwachstum zu sein [119-122]. Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Monokultur hingegen sind überwiegend in der Regulation des Zellzyklus anzusetzen. Beispielsweise spielen TPX2 und Bub1 eine zentrale Rolle im Prozess der Spindelanzordnung [123, 124] und Cyclin B1 reguliert den Übergang von der G2-Phase in die Mitose [125]. Diese Ergebnisse bestätigen die in den vorherigen Absätzen diskutierten Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Wachstumsanalysen der 3D-Zellkultur.

In der Literatur werden bemerkenswerterweise viele Gene mit hochregulierter Expression in Monokultur mit Brustkrebs (z.B. ID1, HJURP, FOXM1, ANLN, CDC6) assoziiert. Zum Beispiel beschrieben Singh *et al.* und Tobin *et al.*, dass ID1 mit Aggressivität und Invasivität von menschlichen Brustkrebszellen [126, 127] verbunden ist. Weiterhin identifizierten Sadi *et al.* unter Verwendung zweier unabhängiger Microarray-Datenbanken eine Korrelation zwischen der Überexpression von ANLN mit einem schlechten *Outcome* bei Brustkrebspatientinnen [128]. Auch dieses Erkenntnis korreliert also mit der Annahme eines karzinomähnlichen Wachstums der S1-Zellen in Monokultur. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass einige Gene mit hochregulierter Expression in Cokultur ebenfalls mit Brustkrebs assoziiert werden. Dazu gehört beispielsweise PDGFR, für das eine biologische Aggressivität bei Brustkrebs beschrieben wird [129, 130]. Unsere Ergebnisse lassen also vermuten, dass S1-Zellen in Cokultur genotypisch zwar auch tumorogene Merkmale zeigen,

sich phänotypisch aber wie normale Epithelzellen verhalten. Somit weisen sie voraussichtlich auch phänotypisch dominierte Eigenschaften maligner Zellen, wie die Metastasierung, nicht mehr auf.

Genexpressionsanalysen werden als vielversprechende Methode angesehen, um Aussagen über klinische Ereignisse und Therapieansprechen im Rahmen von Brustkrebskrankungen zu erhalten [56, 65, 79]. Unter anderem konnten Wang *et al.* zeigen, dass mit Hilfe einer Genexpressionssignatur Patientinnen mit hohem Risiko für Fernmetastasen identifiziert werden können [60]. Zwei prädiktive Gensignaturen wurden bereits von der FDA genehmigt (OncotypeDX[®] und MammaPrint[®] [57-60]). Diese Signaturen wurden weitgehend aus kompletten Gewebeproben oder voneinander getrennten epithelialen und stromalen Komponenten aus Tumorgewebe gewonnen. Fournier *et al.* erstellten zwei Genexpressionsprofile (19 und 249 Gene umfassend), die Gene beinhalten, die während des Übergangs von einem proliferativen zu einem differenzierten Phänotyp von S1-Zellen in dreidimensionaler Matrigel[®]-Kultur herunterreguliert sind. Diese Genexpressionsprofile können verwendet werden, um Brustkrebspatientinnen in prognostische Gruppen einzuteilen [131]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte basierend auf einem 3D-Zellkulturmodell mit Hilfe von Kaplan-Meier-Analysen und einer hierarchischen Clusteranalyse eine 20-Gen-Signatur entwickelt werden. Diese Gensignatur ermöglicht es, Brustkrebspatientinnen in eine Gruppe mit günstiger und eine Gruppe mit ungünstiger Prognose einzuteilen. Diese 20 Gene umfassende Signatur überlappt aber lediglich in nur 2 Genen (FOX M1 und RRM2) mit Fourniers 19-Gen-Signatur und 5 Genen mit Fourniers 249-Gen-Signatur (FOX M1, RRM2, TTK, CDC6, DEPDC1) [131].

Der Vergleich der hier gefundenen Ergebnisse mit vielen der zuvor beschriebenen Genexpressionssignaturen ist schwierig, da in den meisten Fällen Brustkrebsgewebe als Ursprung diente. Allerdings werden viele Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Monokultur auch in diesen Signaturen beschrieben und deren Überexpression mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Hierzu gehören beispielsweise Bub1 und CDC 6, die auch in der von van't Veer *et al.* gefundenen Signatur beschrieben werden [56, 132], sowie ANLN, RRM2, CEP55 und CDC20 aus dem Gen-Expressionsprofil von Pawitan *et al.* Auch diese Ergebnisse unterstützen unsere Beobachtung von krebsähnlichem Wachstum von S1-Zellen in Monokultur.

Die 10-Jahres-Überlebensrate der gefundenen 20-Gen-Signatur betrug 87 % für die Gruppe mit günstiger Prognose und 39 % für die Gruppe mit ungünstiger Prognose. Vant Veer *et al.* beschrieben für ihre 70-Gen-Signatur aus Brustkrebsgewebe eine 10-Jahres-Überlebensrate von 95% für die Gruppe mit günstiger und 55 % für die Gruppe mit ungünstiger Prognose [56]. Fournier *et al.* erhielten mit ihrer 249-Gen-Signatur, die in 3D-Zellkultur in einem Zeitverlauf [131] erzeugt wurde, eine 10-Jahres-Überlebensrate von 90 % in der Gruppe mit günstiger und 59 % in der Gruppe mit ungünstiger Prognose. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte Gensignatur ist also im Vergleich mit anderen Profilen informativ bei der Identifizierung von Patientinnen mit gutem und schlechtem *Outcome*. In weiteren Studien

sollte die gefundene 20-Gen-Signatur mit weiteren unabhängigen Datensätzen validiert werden.

4.2 Eine adäquate Matrixbeschaffenheit induziert sowohl die Differenzierung benigner als auch maligner Mammaepithelzellen

S1-Zellen zeigten in Monokulturen unterschiedlicher Matrixfestigkeit divergente Wachstumsmuster. In Kulturen hoher Dichte lässt sich ein krebsartiges, in Kulturen niedriger Dichte ein azinusähnliches Wachstum beobachten. Diese Ergebnisse kongruieren mit einer aberrant hohen GewebestEIFigkeit in Tumoren und einem weichen Fettgewebe der normalen Brustdrüse *in vivo* [95, 133]. S1-Zellen sind somit in der Lage, die Steifigkeit ihrer Mikroumgebung zu erkennen und darauf zu reagieren. Die Differenzierung normaler Zellen scheint also zumindest teilweise auch mechanisch gesteuert zu werden. Diese Annahme wird durch mehrere Studien unterstützt, die zeigen, dass das Zellverhalten durch die mechanische Beschaffenheit der Mikroumgebung beeinflusst wird [95, 96]. Levental *et al.* beschrieben beispielsweise, dass die Erhöhung der Matrixdichte zu einer gesteigerten Integrin-Aktivität führt, die die Tumorprogression fördert [134]. Im Gegensatz zu Monokulturen hoher Festigkeit ließ sich in Cokulturen mit HMF von hoher Festigkeit eine Differenzierung der S1-Zellen beobachten. Folglich sind Mammastromafibroblasten in der Lage, Störungen der Morphogenese, die durch eine erhöhte Matrixfestigkeit verursacht wurden, zu antagonisieren.

In der Literatur findet man zahlreiche Arbeiten, die eine Beziehung zwischen der Zelldifferenzierung und der Fähigkeit einer Zelle postulieren, die ECM zu kontrahieren [96, 103]. Zum Beispiel beschreiben Gehler *et al.*, dass Gele von hoher Festigkeit nicht angemessen von Zellen kontrahiert werden können und so eine korrekte duktaLe Morphogenese behindern [103]. Es lässt sich also die Hypothese aufstellen, dass Fibroblasten durch Kontraktion der Gele die Matrixbeschaffenheit verändern und so die Differenzierung normaler Epithelzellen regulieren. Dies wurde im nächsten Schritt anhand von frei schwimmenden Gelen getestet. Bereits 1977 wurden schwimmende Collagengele verwendet, um zu zeigen, dass normale Brustepithelzellen eine deformierbare 3D-ECM zur Differenzierung benötigen [135].

Streuli *et al.* postulierten die *de-novo*-Synthese einer Basalmembran von Mauszellen in frei schwimmenden und somit eher flexiblen Collagen-I-Gelen [136]. Wozniak *et al.* zeigten, dass nicht tumorigene MCF10A-Brustepithelzellen keine differenzierten Strukturen bilden, wenn sie in normalem 3D-Collagengel kultiviert werden. In frei schwimmenden 3D-Collagen-I-Gelen hingegen sind sie in der Lage, das Gel zusammenzuziehen und eine fehlerfreie Morphogenese zu durchlaufen [96]. Die im Rahmen dieser Dissertation gefundenen Ergebnisse zeigen, dass S1-Zellen selbst nicht imstande sind, Collagengele zu kontrahieren und auch in frei schwimmenden Monokulturen ein unstrukturiertes Wachstum aufweisen. Im Gegensatz hierzu führt die Cokultivierung von S1-Zellen und HMF unter frei schwimmenden Bedingungen zu

einer sichtbaren Gel-Kontraktion und erhöhten Zelldifferenzierung. Diese Ergebnisse kongruieren mit der aufgestellten Hypothese, dass Fibroblasten in der Lage sind, die Matrixbeschaffenheit durch Kontraktion von Gelen zu verändern und so die Zelldifferenzierung zu beeinflussen. Die fehlende Korrektur der Matrixbeschaffenheit durch Zell-Matrix-Kontakte könnte ein Faktor sein, der das Ausbleiben einer Differenzierung der S1-Zellen unter direkter Zugabe von Laminin bzw. Laminin/Nidogen-1 mit begründet. Diese Vermutung wird gestützt von Alcaraz *et al.* Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass die β -Casein-Produktion normaler Epithelzellen sowohl von Laminin als auch von der Matrixbeschaffenheit abhängig ist. [89]. In folgenden Experimenten sollte daher der Einfluss von Laminin bzw. Laminin/Nidogen-1 in frei schwimmenden Monokulturen untersucht werden.

Interessanterweise differenzierten T4-2-Zellen in frei schwimmenden Cokulturen mit HMF in polarisierte Azini im Gegensatz zu T4-2-Zellen in frei schwimmenden Mono- und Cokulturen unter Standardbedingungen. Gehler *et al.* zeigten, dass menschliche Mammakarzinomzellen (T47D-Zellen) eine korrekte duktaile Morphogenese durchlaufen, wenn sie in frei schwimmenden Collagen-I-Gelen von geringer Dichte kultiviert werden [103]. Im Gegensatz zu T4-2-Zellen sind T47D-Zellen bemerkenswerterweise in der Lage Gele ähnlich wie HMF zu kontrahieren. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Gelkontraktion durch Fibroblasten zu Veränderungen in der Matrix führt und so die Differenzierung von tumorigenen T4-2-Zellen in frei schwimmenden Cokulturen induziert.

Die aus den Versuchen zur Matrixbeschaffenheit gewonnen Erkenntnisse werden gestützt von Larsen *et al.*, die erläuterten, dass die Fähigkeit einer Zelle zur Kontraktion und Umgestaltung der Matrix durch ein Gleichgewicht zwischen der Steifigkeit der Matrix und der Zellkontraktilität reguliert wird [137]. Als möglichen molekularen Mechanismus postulieren Wozniak *et al.* die von der mechanischen Matrixbeschaffenheit abhängige ROCK vermittelte Kontraktilität sowie eine anschließende Herunterregulierung der Rho- und FAK-Funktion [96]. Durch Blockierung von β 1-Integrin, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) und ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) konnten sie den malignen Phänotyp der T4-2-Zellen in einer 3D-Matrix aus Basalmembranbestandteilen revertieren [95].

4.3 Lösliche stromale Faktoren können die Differenzierung benigner, nicht aber maligner Mammaepithelzellen induzieren

Aus der Literatur ist bekannt, dass Fibroblasten parakrine Wachstumsfaktoren sezernieren, die das Tumorwachstum fördern [138]. In Übereinstimmung hiermit war auch in T4-2-Monokulturen mit CM von HMF die Proliferation höher als in Standard-T4-2-Monokulturen. Bei S1-Zellen in Collagen-I-Monokulturen hingegen induzierten von normalen Mammastromafibroblasten produzierte lösliche Faktoren wie in vivo einen Wachstumsarrest sowie die Differenzierung. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigten Sadlonova *et al.*, dass NF

das Wachstum der präneoplastischen Zelllinie MCF10AT sowohl in direktem Kontakt als auch in Kulturen, in denen die Zellen durch eine Membran voneinander getrennt kultiviert wurden, hemmen [139]. Epithelzellen weisen also unter bestimmten Kulturbedingungen auch in Abwesenheit von Fibroblasten einen Wachstumsarrest auf. Die verringerte Proliferation der S1-Zellen in Standard-Cokultur kann also nicht lediglich durch einen durch proliferierende Fibroblasten bedingten Mediumverbrauch verursacht sein. Diese Annahme wird durch Ergebnisse von Zellzyklusanalysen mittels FACS gestützt die ergaben, dass sich nach einer Kulturdauer von 9 Tagen ca. 95% der Fibroblasten in der G1/G0-Phase befanden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf einen Wachstumsarrest der Fibroblasten unter den beschriebenen Kulturbedingungen hin.

Interessanterweise stimuliert die Exposition mit löslichen stromalen Faktoren (CM) das Wachstum von T4-2-Zellen in Standard-T4-2-Monokulturen und frei schwimmenden Monokulturen, hemmt aber in frei schwimmenden Monokulturen nicht die Morphogenese. Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass eine Korrektur der Gewebshomöostase für die Reversion des malignen Phänotyps erforderlich und zudem ausreichend ist, die durch lösliche stromale Faktoren geförderte Proliferation zu antagonisieren.

Die in der Literatur beschriebene Differenzierung epithelialer Zellen in Matrigel[®] impliziert, dass Basalmembran-Komponenten für das Wachstum und Differenzierung normaler Brustepithelzellen unerlässlich sind, wobei besonders Laminin bzw. eine Kombination von Laminin und Nidogen-1 als obligat beschrieben werden [98, 140]. Die Zugabe von Laminin-1 induziert beispielsweise eine Reversion der von Gudjonsson *et al.* beschriebenen *inside-out*-Polarisation normaler Epithelzellen in Collagen-I-Gelen. In vivo wird Laminin von Myoepithelzellen gebildet, für die ebenfalls die Fähigkeit zur Induktion der beschriebenen Reversion gezeigt werden konnte [12]. Tumorigene Myoepithelzellen hingegen sind durch die Unfähigkeit der Lamininproduktion gekennzeichnet und induzieren diese Reversion nicht [12]. Analysen des durch HMF produzierten konditionierten Mediums ergaben, dass Mammastromafibroblasten wesentliche Bestandteile der Basalmembran wie Laminin, Nidogen-1 und Collagen-IV produzierten. Es lässt sich daher die Hypothese aufstellen, dass die Produktion von Basalmembran-Komponenten durch Fibroblasten in 3D-Collagen-I-Cokulturen zur Bildung wachstumsgehemmter polarisierter Azini führt. Allerdings zeigte sich, dass die Bildung differenzierter Azini in direkten Cokulturen signifikant höher war als in Monokulturen mit konditioniertem Medium.

Die direkte Zugabe von Basalmembran-Komponenten zu Collagen-I-Monokulturen induzierte keine Differenzierung der S1-Zellen, sondern führte in einigen Fällen sogar zur Nekrose. Das Fehlen von direkten Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten könnte ein Faktor sein, der das Ausbleiben einer Differenzierung der S1-Zellen unter direkter Zugabe von Laminin bzw. Laminin/Nidogen-1 mit begründet. Dies impliziert, dass sowohl lösliche stromale Faktoren als auch direkte Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte die Differenzierung von Epithelzellen regulieren. Weitere Faktoren für das Ausbleiben der Differenzierung der S1-Zellen könnten eine falsche La-

minin- bzw. Nidogen-Konzentration oder die fehlende Zugabe von Collagen IV sein. In der Annahme der Produktion von Collagen IV durch S1-Zellen wurde auf eine Zugabe verzichtet [9]. Eventuell ist der von den S1-Zellen produzierte Anteil aber zu gering, um eine Differenzierung zu induzieren. Da eine Collagen IV-Produktion durch Fibroblasten nachgewiesen werden konnte, sollte in folgenden Experimenten eine zusätzlich Zugabe von Collagen IV erfolgen. Der bei Zugabe höherer Konzentrationen an Laminin und Nidogen beobachtete Zelltod ist vermutlich mit einer durch einen Überschuss an Basalmembran-Komponenten bedingten fehlerhaften Vernetzung zu erklären.

Neben den für die Differenzierung obligaten Bestandteilen der Basalmembran konnten weitere lösliche durch Fibroblasten sezernierte Faktoren identifiziert werden, die bekanntermaßen in Zusammenhang mit der Morphogenese von Epithelzellen stehen. Zur vollständigen Charakterisierung grundlegender molekularer Mechanismen der epithelialen Morphogenese sollte in folgenden Experimenten der Einfluss ausgewählter Bestandteile des konditionierten Mediums genauer untersucht werden.

4.4 Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass Mammastromafibroblasten die Morphogenese von normalen Brustepithelzellen in einer Matrix, die frei von Basalmembran-Bestandteilen ist, induzieren, während die Abwesenheit von Fibroblasten ein krebsähnliches Wachstum bewirkt. Die gezeigten Ergebnisse belegen, dass die Regulation der Morphogenese von Brustepithelzellen auf einem komplexen Zusammenspiel von Zell-Matrix-Interaktionen, Zell-Zell-Kontakten und Matrixbeschaffenheit beruht. Fibroblasten nehmen innerhalb dieses Netzwerkes eine Schlüsselrolle ein. Als möglicher Wirkmechanismus kann basierend auf den gewonnenen Ergebnissen die Produktion von Basalmembran-Komponenten durch Fibroblasten und eine durch Fibroblasten vermittelte Variation der Matrixbeschaffenheit postuliert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Korrektur der Matrixspannung sogar eine phänotypische Reversion von Brustkrebszellen induzieren kann.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das in den Zellkulturen beobachtete Wachstum der Epithelzellen auch in den Genexpressionsprofilen der Epithelzellen widerspiegelt. Weiterhin konnte basierend auf dem 3D-Collagen-I-Kultur-Modell eine Gen-signatur identifiziert werden, die unabhängig von klassischen Prognosefaktoren und veröffentlichten molekularen Signaturen prognostische Informationen bei Brustkrebs liefert.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse die bedeutende Rolle von Fibroblasten sowohl in der Regulation der Differenzierung normaler Epithelzellen als auch in der Kontrolle des Tumorwachstums. Sie unterstreichen somit die Bedeutung des Stromas als vielversprechendes innovatives therapeutisches Target in der Behandlung von Brustkrebs.

5 Ausblick

Die gefundenen Ergebnisse belegen die bedeutsame Rolle der Fibroblasten im Rahmen der stromalen Kontrolle der epithelialen Differenzierung und stellen eine vielversprechende Basis für weiterführende Forschungsprojekte auf dem Gebiet der Brustkrebstherapie bzw. -prävention durch stromale Faktoren dar. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeiten sollte die präzise Charakterisierung molekularer Mechanismen sein, welche die Differenzierung normaler und tumorigener Mammaepithelzellen auf stromaler Ebene induzieren. Folgende Aspekte sollten hierbei Berücksichtigung finden:

- Übertragbarkeit der für Zelllinien beschriebenen Ergebnisse auf Primärzellen und gegebenenfalls Charakterisierung von sich daraus ergebender Patientenkollektive
- Identifizierung löslicher Stromafaktoren, die ohne zelluläre Kontakte die Morphogenese normaler Mammaepithelzellen induzieren
- Charakterisierung fibroblasten-induzierter Modifikationen der Matrixbeschaffenheit
- Identifizierung der durch stromale Faktoren regulierten Signaltransduktionskaskaden in normalen Epithelzellen
- Übertragbarkeit der für normale Epithelzellen gefundenen Ergebnisse auf Tumorzellen sowie Identifizierung und Charakterisierung möglicher Fehlfunktionen

Zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen könnten die so gewonnenen Erkenntnisse unter Anwendung sich ergänzender Forschungsansätze dazu beitragen, Strategien zur Normalisierung des Tumorstromas zu entwickeln und somit neue Strategien der Brustkrebsprävention und -therapie zu ermöglichen.

Anhang

A1: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Monokultur

<i>Affymetrix probe set</i>	<i>gene symbol</i>	<i>log- ratio</i>	<i>gene name</i>
201565_s_at	ID2*	2.63	<i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
202580_x_at	FOXM1*	1.53	<i>forkhead box M1</i>
202870_s_at	CDC20*	1.68	<i>cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)</i>
203348_s_at	ETV5*	1.62	<i>ets variant 5</i>
203418_at	CCNA2*	1.53	<i>cyclin A2</i>
203764_at	DLGAP5*	1.95	<i>discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5</i>
203967_at	CDC6*	1.55	<i>cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)</i>
204318_s_at	GTSE1*	1.55	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i>
204822_at	TTK*	1.69	<i>TTK protein kinase</i>
208937_s_at	ID1*	2.39	<i>inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
209642_at	BUB1*	1.68	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)</i>
209773_s_at	RRM2*	1.57	<i>ribonucleotide reductase M2 polypeptide</i>
210052_s_at	TPX2*	1.50	<i>TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)</i>
211343_s_at	COL13A1*	2.19	<i>Collagen, type XIII, alpha 1</i>
218542_at	CEP55*	1.57	<i>centrosomal protein 55kDa</i>
218726_at	HJURP*	1.57	<i>Holliday junction recognition protein</i>
219493_at	SHCBP1*	1.59	<i>SHC SH2-domain binding protein 1</i>
219975_x_at	OLAH*	1.64	<i>oleoyl-ACP hydrolase</i>
221911_at	ETV1*	2.19	<i>ets variant 1</i>
222108_at	AMIGO2*	1.81	<i>adhesion molecule with Ig-like domain 2</i>
1556037_s_at	HHIP*	2.37	<i>hedgehog interacting protein</i>
222608_s_at	ANLN*	1.55	<i>anillin, actin binding protein</i>
226980_at	DEPDC1B*	1.62	<i>DEP domain containing 1B</i>
227480_at	SUSD2*	1.51	<i>sushi domain containing 2</i>
227702_at	CYP4X1*	1.74	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1</i>
228069_at	FAM54A*	1.61	<i>family with sequence similarity 54, member A</i>
228281_at	C11orf82	1.53	<i>chromosome 11 open reading frame 82</i>
228729_at	CCNB1*	1.52	<i>cyclin B1</i>
232278_s_at	DEPDC1*	1.70	<i>DEP domain containing 1</i>
240633_at	DOK7	1.57	<i>docking protein 7</i>
209891_at	SPC25*	1.81	<i>SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)</i>
220651_s_at	MCM10*	1.56	<i>minichromosome maintenance complex component 10</i>

A2: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Cokultur

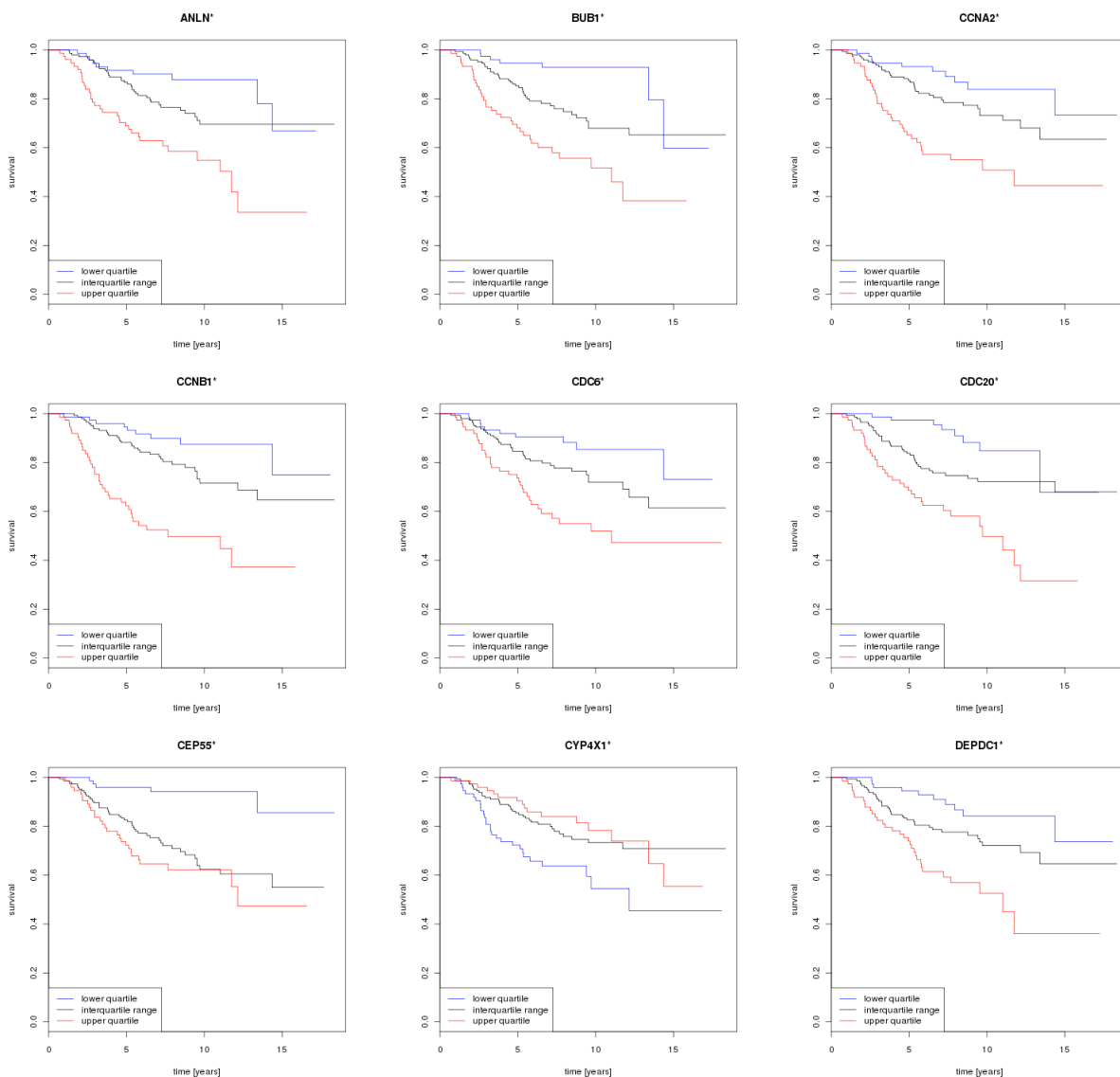
<i>Affymetrix probe set</i>	<i>gene symbol</i>	<i>log ratio</i>	<i>gene name</i>
229130_at	LOC285535	-1.50	<i>hypothetical protein LOC285535</i>
1558854_a_at	NA	-1.51	NA
233314_at	PTEN*	-1.51	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
244010_at	NA	-1.51	NA
209156_s_at	COL6A2*	-1.51	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>
242110_at	NA	-1.53	NA
230332_at	ZCCHC7*	-1.53	<i>Zinc finger, CCHC domain containing 7 (ZCCHC7), mRNA</i>
243450_at	NA	-1.53	NA
233330_s_at	NA	-1.53	NA
242637_at	NA	-1.53	NA
232889_at	NA	-1.54	NA
238363_at	NA	-1.54	NA
1558714_at	NA	-1.54	NA
236474_at	NA	-1.54	NA
238774_at	NA	-1.55	NA
202311_s_at	COL1A1	-1.55	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>
1570329_at	NA	-1.55	NA
220777_at	KIF13A*	-1.55	<i>kinesin family member 13A</i>
237483_at	NA	-1.56	NA
215268_at	KIAA0754	-1.56	<i>hypothetical LOC643314</i>
239409_at	NA	-1.57	NA
243003_at	NA	-1.57	NA
233867_at	NA	-1.57	NA
242471_at	NA	-1.58	NA
242055_at	NA	-1.58	<i>proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 4</i>
1552622_s_at	LOC100134053 /// LO	-1.58	<i>similar to POLR2J4 protein /// PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)-like /// post-meiotic segregation increased 2-like protein 12 /// polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J2 /// polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide</i>
1556347_at	NA	-1.60	NA
239432_at	FLJ31306	-1.60	<i>hypothetical protein FLJ31306</i>
218002_s_at	CXCL14*	-1.60	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>
230193_at	WDR66*	-1.60	<i>WD repeat domain 66</i>
211074_at	FOLR1*	-1.61	<i>folate receptor 1 (adult)</i>
239243_at	ZNF638*	-1.61	<i>Putative NP220 nuclear protein isoform (NP220) mRNA, complete cds; alternatively spliced</i>
239571_at	NA	-1.61	NA
202007_at	NID1*	-1.62	<i>nidogen 1</i>
1554948_at	NA	-1.62	NA
213071_at	DPT*	-1.64	<i>dermatopontin</i>
1557738_at	NA	-1.64	NA
206548_at	hCG_1776259	-1.65	<i>hypothetical protein FLJ23556</i>
238967_at	NA	-1.65	NA
220999_s_at	CYFIP2*	-1.65	<i>cytoplasmic FMR1 interacting protein 2</i>
235028_at	NA	-1.66	NA
1561167_at	NA	-1.66	NA
239619_at	NA	-1.68	NA
231644_at	NA	-1.69	NA
222549_at	CLDN1*	-1.69	<i>claudin 1</i>

<i>Affymetrix probe set</i>	<i>gene symbol</i>	<i>log ratio</i>	<i>gene name</i>
232459_at	NA	-1.70	NA
233280_at	NA	-1.70	NA
235008_at	NA	-1.71	NA
242121_at	RNF12*	-1.71	<i>Full length insert cDNA clone ZD86G12</i>
235821_at	NA	-1.71	NA
227949_at	PHACTR3	-1.73	<i>phosphatase and actin regulator 3</i>
228235_at	MGC16121	-1.73	<i>hypothetical protein MGC16121</i>
234604_at	NA	-1.73	NA
228623_at	NA	-1.74	NA
219934_s_at	SULT1E1*	-1.74	<i>sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1</i>
222371_at	NA	-1.75	NA
1569477_at	NA	-1.76	NA
204734_at	KRT15*	-1.76	<i>keratin 15</i>
232565_at	NA	-1.77	NA
221729_at	COL5A2*	-1.79	<i>Collagen, type V, alpha 2</i>
235138_at	NA	-1.80	NA
238341_at	NA	-1.82	NA
233555_s_at	SULF2*	-1.82	<i>sulfatase 2</i>
239131_at	NA	-1.83	NA
232628_at	NA	-1.84	NA
239946_at	NA	-1.84	NA
238918_at	NA	-1.86	NA
1559020_a_at	NA	-1.87	NA
211719_x_at	FN1*	-1.90	<i>fibronectin 1</i>
232742_at	NA	-1.91	NA
203131_at	PDGFRA*	-1.93	<i>platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>
229802_at	NA	-1.96	NA
232882_at	NA	-2.03	NA
201893_x_at	DCN*	-2.04	<i>decorin</i>
203184_at	FBN2*	-2.10	<i>fibrillin 2</i>
218468_s_at	GREM1*	-2.13	<i>gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)</i>
215318_at	CG012	-2.15	<i>hypothetical gene CG012</i>
1565254_s_at	ELL*	-2.17	<i>elongation factor RNA polymerase II</i>
206157_at	PTX3*	-2.17	<i>pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta</i>
209101_at	CTGF*	-2.17	<i>connective tissue growth factor</i>
1559156_at	NA	-2.18	NA
235060_at	LOC100190986	-2.30	<i>hypothetical LOC100190986</i>
227260_at	ANKRD10*	-2.64	<i>Ankyrin repeat domain 10, mRNA (cDNA clone IMAGE:5752308)</i>
200665_s_at	SPARC*	-3.17	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>
201744_s_at	LUM*	-3.18	<i>lumican</i>
201438_at	COL6A3*	-3.88	<i>Collagen, type VI, alpha 3</i>
215076_s_at	COL3A1*	-4.62	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>
202404_s_at	COL1A2*	-5.93	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>

NA not annotated

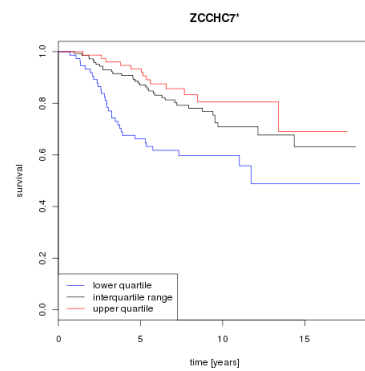
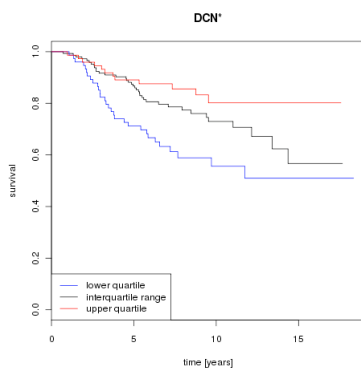
A3: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Monokultur und ihre Korrelation mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen

Kaplan-Meier-Analysen zeigten für 21 Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Monokultur eine signifikante Korrelation ($p \leq 0,01$) mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen. Die p-Werte wurden zwischen den Quartilen hoher (rote Linie) und niedriger Expression (blaue Linie) berechnet. In der Abbildung werden nur die Ergebnisse dieser 21 Gene gezeigt. Bei der Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven für alle 30 Gene der *mono-high-group* wurden Gene deren Expression signifikant mit dem Überleben korreliert durch * gekennzeichnet.



A4: Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Cokultur und ihre Korrelation mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen

Lediglich für 2 Gene mit hochregulierter Expression in S1-Zellen aus Standard-Cokultur ergaben Kaplan-Meier-Analysen eine signifikante Korrelation ($p \leq 0,01$) mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen. Die p-Werte wurden zwischen den Quartilen hoher (rote Linie) und niedriger Expression (blaue Linie) berechnet. In der Abbildung werden nur die Ergebnisse dieser 2 Gene gezeigt. Bei der Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven für alle 31 Gene der *co-high-group* wurden Gene deren Expression signifikant mit dem Überleben korreliert durch * gekennzeichnet.



A5: Biologische Funktionen der 20 Gene der *mono-high-signature*

Mit Hilfe des der Software *AmiGO* wurden die biologischen Funktionen der 20 Gene der *mono-high-signature* analysiert. Bei nicht vorhandenen Angaben zur biologischen Funktion wurden zusätzlich Pubmed-Recherchen durchgeführt.

<i>gene symbol</i>	<i>biological process</i>
ANLN	GO:0000910: cytokinesis
	GO:0007067: mitosis
	GO:0007096: regulation of exit from mitosis
	GO:0000921: septin ring assembly
BUB1	GO:0006915: apoptotic process
	GO:0008283: cell proliferation
	GO:0051301: cell division
	GO:0007059: chromosome segregation
	GO:0000087: M phase of mitotic cell cycle
	GO:0000278: mitotic cell cycle
	GO:0007093: mitotic cell cycle checkpoint
	GO:0051983: regulation of chromosome segregation
	GO:0007063: regulation of sister chromatid cohesion
	GO:0071173: spindle assembly checkpoint
GO:0019048: virus-host interaction	
CCNA2	GO:0051301: cell division
	GO:0000086: G2/M transition of mitotic cell cycle
	GO:0007067: mitosis
	GO:0000278: mitotic cell cycle
	GO:0007095: mitotic cell cycle G2/M transition DNA damage checkpoint
	GO:0045893: positive regulation of transcription, DNA-dependent
	GO:0007265: Ras protein signal transduction
GO:0000079: regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	
CCNB1	GO:0007049: cell cycle
	GO:0051301: cell division
	GO:0000079: regulation of cyclin-dependent protein kinase activity
CDC20	GO:0051301: cell division
	GO:0051488: activation of anaphase-promoting complex activity
	GO:0031145: anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process
	GO:0007049: cell cycle
	GO:0000075: cell cycle checkpoint
	GO:0030154: cell differentiation
	GO:0051301: cell division
	GO:0000087: M phase of mitotic cell cycle
	GO:0000278: mitotic cell cycle
	GO:0007094: mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint
GO:0000236: mitotic prometaphase	

<i>gene symbol</i>	<i>biological process</i>
	GO:0051436: <i>negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle</i>
	GO:0007399: <i>nervous system development</i>
	GO:0008284: <i>positive regulation of cell proliferation</i>
	GO:0090129: <i>positive regulation of synapse maturation</i>
	GO:0031915: <i>positive regulation of synaptic plasticity</i>
	GO:0051437: <i>positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle</i>
	GO:0050773: <i>regulation of dendrite development</i>
	GO:0051439: <i>regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle</i>
CDC6	GO:0000075: <i>cell cycle checkpoint</i>
	GO:0051301: <i>cell division</i>
	GO:0006260: <i>DNA replication</i>
	GO:0000076: <i>DNA replication checkpoint</i>
	GO:0000082: <i>G1/S transition of mitotic cell cycle</i>
	GO:0000216: <i>M/G1 transition of mitotic cell cycle</i>
	GO:0007067: <i>mitosis</i>
	GO:0000278: <i>mitotic cell cycle</i>
	GO:0008285: <i>negative regulation of cell proliferation</i>
	GO:0008156: <i>negative regulation of DNA replication</i>
	GO:0071777: <i>positive regulation of cell cycle cytokinesis</i>
	GO:0051984: <i>positive regulation of chromosome segregation</i>
	GO:0000079: <i>regulation of cyclin-dependent protein kinase activity</i>
	GO:0090007: <i>regulation of mitotic anaphase</i>
	GO:0000083: <i>regulation of transcription involved in G1/S phase of mitotic cell cycle</i>
	GO:0000084: <i>S phase of mitotic cell cycle</i>
	GO:0007089: <i>traversing start control point of mitotic cell cycle</i>
CEP55	GO:0000910: <i>cytokinesis</i>
	GO:0007067: <i>mitosis</i>
DEPDC1	GO:0035556: <i>intracellular signal transduction</i>
	GO:0045892: <i>negative regulation of transcription, DNA-dependent</i>
	GO:0006351: <i>transcription, DNA-dependent</i>
DEPDC1B	GO:0051056: <i>regulation of small GTPase mediated signal transduction</i>
	GO:0007264: <i>small GTPase mediated signal transduction</i>
DLGAP5	GO:0008283: <i>cell proliferation</i>
	GO:0007267: <i>cell-cell signaling</i>
	GO:0000087: <i>M phase of mitotic cell cycle</i>
	GO:0007079: <i>mitotic chromosome movement towards spindle pole</i>
	GO:0045842: <i>positive regulation of mitotic metaphase/anaphase transition</i>
FAM54A	n.a.
	Pubmed: "These data show that, in murine testis, <i>Dufd1</i> and <i>Mtfr1</i> have redundant functions related to mitochondrial physiology and represent genes with a potential role in testicular function." [141]
FOXM1	GO:0007049: <i>cell cycle</i>
	GO:0006978: <i>DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in transcription of p21 class mediator</i>
	GO:0006281: <i>DNA repair</i>
	GO:0009790: <i>embryo development</i>
	GO:0000086: <i>G2/M transition of mitotic cell cycle</i>
	GO:0001889: <i>liver development</i>
	GO:0090344: <i>negative regulation of cell aging</i>
	GO:0032873: <i>negative regulation of stress-activated MAPK cascade</i>
	GO:0000122: <i>negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>
	GO:0045892: <i>negative regulation of transcription, DNA-dependent</i>
	GO:0007389: <i>pattern specification process</i>
	GO:0008284: <i>positive regulation of cell proliferation</i>
	GO:2000781: <i>positive regulation of double-strand break repair</i>

<i>gene symbol</i>	<i>biological process</i>
	GO:0045944: positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
	GO:0045893: positive regulation of transcription, DNA-dependent
	GO:0071156: regulation of cell cycle arrest
	GO:0001558: regulation of cell growth
	GO:0042127: regulation of cell proliferation
	GO:0046578: regulation of Ras protein signal transduction
	GO:2000377: regulation of reactive oxygen species metabolic process
	GO:0051090: regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity
	GO:0006355: regulation of transcription, DNA-dependent
	GO:0009888: tissue development
	GO:0006366: transcription from RNA polymerase II promoter
	GO:0001570: vasculogenesis
GTSE1	GO:0006977: DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest
	GO:0000085: G2 phase of mitotic cell cycle
	GO:0007017: microtubule-based process
HJURP	GO:0007049: cell cycle
	GO:0034080: CenH3-containing nucleosome assembly at centromere
	GO:0034509: centromeric core chromatin assembly
	GO:0007059: chromosome segregation
	GO:0006334: nucleosome assembly
	GO:0051101: regulation of DNA binding
	GO:0043254: regulation of protein complex assembly
MCM10	GO:0000075: cell cycle checkpoint
	GO:0006260: DNA replication
	GO:0000082: G1/S transition of mitotic cell cycle
	GO:0000216: M/G1 transition of mitotic cell cycle
	GO:0000278: mitotic cell cycle
RRM2	GO:0009186: deoxyribonucleoside diphosphate metabolic process
	GO:0009263: deoxyribonucleotide biosynthetic process
	GO:0006260: DNA replication
	GO:0000082: G1/S transition of mitotic cell cycle
	GO:0000278: mitotic cell cycle
	GO:0015949: nucleobase-containing small molecule interconversion
	GO:0055086: nucleobase-containing small molecule metabolic process
	GO:0051290: protein heterotetramerization
	GO:0000083: regulation of transcription involved in G1/S phase of mitotic cell cycle
	GO:0044281: small molecule metabolic process
SHCBP1	n.a.
	Pubmed: "This pattern, and timing of mPAL expression and its association with the Shc adaptor molecule suggests a role for this protein in signaling pathways governing cell cycle progression." [142]
SPC25	GO:0051301: cell division
	GO:0007059: chromosome segregation
	GO:0000087: M phase of mitotic cell cycle
	GO:0000278: mitotic cell cycle
	GO:0000236: mitotic prometaphase
	GO:0007052: mitotic spindle organization
TPX2	GO:0032147: activation of protein kinase activity
	GO:0006915: apoptotic process
	GO:0007049: cell cycle
	GO:0051301: cell division
	GO:0008283: cell proliferation
	GO:0007067: mitosis
	GO:0060236: regulation of mitotic spindle organization

<i>gene symbol</i>	<i>biological process</i>
<i>TTK</i>	<i>GO:0007094: mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint</i> <i>GO:0007052: mitotic spindle organization</i> <i>GO:0008284: positive regulation of cell proliferation</i> <i>GO:0010862: positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation</i> <i>GO:0007051: spindle organization</i>

n.a. not annotated
GO Geneontology

A6: Proteine produziert von normalen Mammastromafibroblasten (HMF)

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
B5BU24	42.28	17	10	61.04	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=2 SV=1 - [B5BU24_HUMAN]
P62258	69.8	28	20	102.33	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1 - [1433E_HUMAN]
Q04917	27.24	11	6	31.99	14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4 - [1433F_HUMAN]
P61981	47.37	18	10	59.93	14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2 - [1433G_HUMAN]
P27348	28.16	13	7	42.34	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1 - [1433T_HUMAN]
P63104	72.24	29	15	115.59	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]
P42126	11.92	4	3	12.51	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DCI PE=1 SV=1 - [D3D2_HUMAN]
O95336	24.03	7	5	18.77	6-phosphogluconolactonase OS=Homo sapiens GN=PGLS PE=1 SV=2 - [6PGL_HUMAN]
P08253	23.48	12	10	56.89	72 kDa type IV Collagenase OS=Homo sapiens GN=MMP2 PE=1 SV=2 - [MMP2_HUMAN]
P11021	14.68	9	7	43.35	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]
O15144	13.33	4	4	13.43	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1 - [ARPC2_HUMAN]
P68032	25.73	21	9	84.28	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1 - [ACTC_HUMAN]
P60709	43.47	27	12	118.27	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]
A0AVL1	7.3	7	5	25.49	ADAM9 protein OS=Homo sapiens GN=ADAM9 PE=2 SV=1 - [A0AVL1_HUMAN]
P14550	20.92	6	6	19.65	Alcohol dehydrogenase [NADP+] OS=Homo sapiens GN=AKR1A1 PE=1 SV=3 - [AK1A1_HUMAN]
P15121	9.18	4	3	12.59	Aldose reductase OS=Homo sapiens GN=AKR1B1 PE=1 SV=3 - [ALDR_HUMAN]
P12814	46.19	44	33	170.71	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=2 - [ACTN1_HUMAN]
O43707	52.03	48	39	182.25	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2 - [ACTN4_HUMAN]
P06733	59.68	24	19	117.88	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]
P15144	25.23	21	19	70.49	Aminopeptidase N OS=Homo sapiens GN=ANPEP PE=1 SV=4 - [AMPN_HUMAN]
P04083	29.77	8	8	33.05	Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2 - [ANXA1_HUMAN]
P07355	71.39	30	25	117.39	Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2 - [ANXA2_HUMAN]
P08758	23.44	6	6	23.16	Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2 - [ANXA5_HUMAN]
P02647	35.96	8	8	28.73	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 - [APOA1_HUMAN]
Q8NCW5	17.01	3	3	13.15	Apolipoprotein A-I-binding protein OS=Homo sapiens GN=APOA1BP PE=1 SV=2 - [AIBP_HUMAN]
P02652	22	2	2	7.13	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1 - [APOA2_HUMAN]
P05090	39.15	9	8	28.94	Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1 - [APOD_HUMAN]
Q07812	23.96	3	3	10.39	Apoptosis regulator BAX OS=Homo sapiens GN=BAX PE=1 SV=1 - [BAX_HUMAN]
P02730	12.18	17	6	60.1	Band 3 anion transport protein OS=Homo sapiens GN=SLC4A1 PE=1 SV=3 - [B3AT_HUMAN]
P98160	2.94	15	10	62.41	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Homo sapiens GN=HSPG2 PE=1 SV=4 - [PGBM_HUMAN]
Q59EG0	5.53	15	10	64.02	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q59EG0_HUMAN]
P61769	30.25	13	4	54.99	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1 - [B2MG_HUMAN]
Q562R1	11.7	13	4	49.97	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2 - [ACTBL_HUMAN]
P07686	18.53	11	10	41.01	Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Homo sapiens GN=HEXB PE=1 SV=3 - [HEXB_HUMAN]
Q13867	11.21	3	3	13.06	Bleomycin hydrolase OS=Homo sapiens GN=BLMH PE=1 SV=1 - [BLMH_HUMAN]
P19022	4.08	5	3	17.99	Cadherin-2 OS=Homo sapiens GN=CDH2 PE=1 SV=4 - [CADH2_HUMAN]
O43852	37.14	12	9	59.84	Calumenin OS=Homo sapiens GN=CALU PE=1 SV=2 - [CALU_HUMAN]
B1AK87	25.77	6	6	20.16	Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta OS=Homo sapiens GN=CAPZB PE=4 SV=1 - [B1AK87_HUMAN]
P16152	14.08	3	3	14.32	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens GN=CBR1 PE=1 SV=3 - [CBR1_HUMAN]
P07858	62.83	52	21	200.02	Cathepsin B OS=Homo sapiens GN=CTSB PE=1 SV=3 - [CATB_HUMAN]
P07339	19.17	8	7	33.55	Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1 - [CATD_HUMAN]
A5PLM9	15.32	7	5	17.95	Cathepsin L1 OS=Homo sapiens GN=CTSL1 PE=2 SV=1 - [A5PLM9_HUMAN]
Q5U000	12.87	4	3	15	Cathepsin Z OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q5U000_HUMAN]
Q6YHK3	13.49	17	17	82.53	CD109 antigen OS=Homo sapiens GN=CD109 PE=1 SV=2 - [CD109_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
P13987	19.53	5	3	16.2	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens GN=CD59 PE=1 SV=1 - [CD59_HUMAN]
P60033	18.22	3	2	13.91	CD81 antigen OS=Homo sapiens GN=CD81 PE=1 SV=1 - [CD81_HUMAN]
Q9H7Z5	16.03	3	3	9.15	cDNA FLJ14048 fis, clone HEMBA1006650, weakly similar to ARP2/3 COMPLEX 20 KD SUBUNIT OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q9H7Z5_HUMAN]
B3KNF2	22.18	9	6	26.86	cDNA FLJ14484 fis, clone MAMMA1002485, highly similar to Stanniocalcin-2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KNF2_HUMAN]
B3KV49	16.94	4	4	14.46	cDNA FLJ16128 fis, clone BRACE2038269, moderately similar to Bombyx mori cytosolic juvenile hormone binding protein 36 kDa subunit (cJHBP) mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KV49_HUMAN]
B3KPS3	20.19	6	5	24.25	cDNA FLJ32131 fis, clone PEBLM2000267, highly similar to Tubulin alpha-ubiquitous chain OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KPS3_HUMAN]
B3KR42	20.42	6	5	22.08	cDNA FLJ33643 fis, clone BRAMY2023786, highly similar to Carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KR42_HUMAN]
B3KS70	31.74	15	6	46.62	cDNA FLJ35660 fis, clone SPLEN2017538, highly similar to Dickkopf-related protein 3 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KS70_HUMAN]
B3KSI4	4.44	2	2	11.11	cDNA FLJ36348 fis, clone THYMU2007025, highly similar to TRANSKETOLASE (EC 2.2.1.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KSI4_HUMAN]
B3KTA3	9.96	3	3	13.9	cDNA FLJ37935 fis, clone CTONG2005290, highly similar to FASCIN OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KTA3_HUMAN]
B3KTQ2	29.02	10	9	40.99	cDNA FLJ38589 fis, clone HCHON2010074, highly similar to LACTADHERIN OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KTQ2_HUMAN]
B3KUZ8	14.02	5	5	20.49	cDNA FLJ40994 fis, clone UTERU2015640, highly similar to Aspartate aminotransferase, mitochondrial (EC 2.6.1.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KUZ8_HUMAN]
B3KX39	4.84	3	2	13.71	cDNA FLJ44690 fis, clone BRACE3013418, highly similar to Homo sapiens ankyrin 1, erythrocytic (ANK1), transcript variant 2, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KX39_HUMAN]
B3KXC3	32.79	10	7	33.27	cDNA FLJ45147 fis, clone BRAWH3041804, highly similar to Ferritin heavy chain OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KXC3_HUMAN]
B7Z2X9	13.55	4	3	23.5	cDNA FLJ50150, highly similar to Gamma-enolase (EC 4.2.1.11) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z2X9_HUMAN]
B4DGD0	11.76	7	7	23.3	cDNA FLJ50491, highly similar to Amyloid beta A4 protein [30] (ABPP)(Alzheimer disease amyloid protein) (Cerebral vasculopathy peptide) (CVAP) (Protease nexin-II) (PN-II)[30] (PreA4) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DGD0_HUMAN]
B4DJZ8	8.21	5	5	18.25	cDNA FLJ50552, highly similar to Low-density lipoprotein receptor OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DJZ8_HUMAN]
B4DQJ6	6.71	7	4	26.99	cDNA FLJ51276, highly similar to Secretogranin-2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DQJ6_HUMAN]
B4DU58	15.6	4	4	17.06	cDNA FLJ51488, highly similar to Macrophage capping protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DU58_HUMAN]
B7Z544	15.32	33	13	120.48	cDNA FLJ51742, highly similar to Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z544_HUMAN]
B4DDV0	26.04	4	4	16.53	cDNA FLJ51791, highly similar to Lactoylglutathione lyase (EC 4.4.1.5) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DDV0_HUMAN]
B4DMR3	10.78	3	3	8.62	cDNA FLJ51896, highly similar to Glia-derived nexin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DMR3_HUMAN]
B4DIC4	20	4	2	12.44	cDNA FLJ52195, highly similar to LIM and SH3 domain protein 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DIC4_HUMAN]
B4DUN2	42.45	13	9	47.77	cDNA FLJ52206, highly similar to Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DUN2_HUMAN]
B4DDF9	15.19	3	3	9.72	cDNA FLJ52218, highly similar to Annexin A4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DDF9_HUMAN]
B7Z1N6	9.23	2	2	6.93	cDNA FLJ52222, highly similar to Fructose-bisphosphate aldolase C (EC4.1.2.13) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z1N6_HUMAN]
B4DNW7	12.01	4	4	14.38	cDNA FLJ52340, highly similar to Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DNW7_HUMAN]
B4DN87	9.57	2	2	9.63	cDNA FLJ52569, highly similar to Collagen-binding protein 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DN87_HUMAN]
B4DHX4	17.27	6	6	24.77	cDNA FLJ52902, highly similar to Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DHX4_HUMAN]
B4DHR1	37.26	12	7	64.89	cDNA FLJ53009, highly similar to Calreticulin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DHR1_HUMAN]
B4DUV1	50.55	41	23	185.57	cDNA FLJ53207, highly similar to Homo sapiens fibulin 1 (FBLN1), transcript variant C, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DUV1_HUMAN]
B4DTK1	67.75	146	43	637.42	cDNA FLJ53292, highly similar to Homo sapiens fibronectin 1 (FN1), transcript variant 5, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DTK1_HUMAN]
B4DE36	12.64	5	5	23.93	cDNA FLJ53303, highly similar to Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DE36_HUMAN]
B7Z1V9	9.3	4	4	21.14	cDNA FLJ53310, highly similar to Puromycin-sensitive aminopeptidase (EC 3.4.11.-) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z1V9_HUMAN]
B7Z2X4	7.52	6	5	25.48	cDNA FLJ53327, highly similar to Gelsolin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z2X4_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
B4DRT3	7.05	3	3	8.67	cDNA FLJ53645, highly similar to Pyruvate kinase isozyme M1 (EC 2.7.1.40) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DRT3_HUMAN]
B4E1B2	79.35	1933	87	7992.21	cDNA FLJ53691, highly similar to Serotransferrin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E1B2_HUMAN]
B7Z1I2	13.11	3	3	12.49	cDNA FLJ53826, highly similar to Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (EC 2.6.1.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z1I2_HUMAN]
B4DI57	87.74	1666	75	6898.69	cDNA FLJ54111, highly similar to Serotransferrin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DI57_HUMAN]
B4DQF8	24.4	11	7	51.39	cDNA FLJ54375, highly similar to Protein-lysine 6-oxidase (EC 1.4.3.13) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DQF8_HUMAN]
B4E342	7.62	4	3	14.13	cDNA FLJ54405, highly similar to Homo sapiens steroid sensitive gene 1 (URB), transcript variant 2, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E342_HUMAN]
B4DIR1	12.29	3	2	8.05	cDNA FLJ55068, highly similar to Glial fibrillary acidic protein, astrocyte OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DIR1_HUMAN]
B4DQ98	9.42	3	3	8.58	cDNA FLJ55135, highly similar to Di-N-acetylchitobiase (EC 3.2.1.-) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DQ98_HUMAN]
B4DWHO	9.41	2	2	12.56	cDNA FLJ55670, highly similar to EGF-containing fibulin-like extracellularmatrix protein 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DWHO_HUMAN]
B4DJQ8	16.82	5	5	19.29	cDNA FLJ55694, highly similar to Dipeptidyl-peptidase 1 (EC 3.4.14.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DJQ8_HUMAN]
B4DTV1	7.26	3	3	10.26	cDNA FLJ55927, highly similar to Amyloid-like protein 2 (CDEIbox-binding protein) (CDEBP) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DTV1_HUMAN]
B4E0N9	13.88	6	6	19.19	cDNA FLJ56193, highly similar to Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (EC 1.4.1.3) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E0N9_HUMAN]
B4DW11	12.73	2	2	13.66	cDNA FLJ57622, highly similar to Clusterin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DW11_HUMAN]
B7Z254	19.91	7	5	29.15	cDNA FLJ58502, highly similar to Protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z254_HUMAN]
B4DTU0	11.58	8	6	27.98	cDNA FLJ59249, highly similar to CD166 antigen OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DTU0_HUMAN]
B4DUP0	16.5	3	3	16.27	cDNA FLJ59433, highly similar to Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DUP0_HUMAN]
B7Z1F4	10.68	3	3	13.82	cDNA FLJ59466, highly similar to Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic (EC 1.8.1.9) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z1F4_HUMAN]
B4DQ27	30.6	6	5	17.74	cDNA FLJ59949, highly similar to Homo sapiens sulfatase modifying factor 2 (SUMF2), transcript variant 4, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DQ27_HUMAN]
B4E1W8	3.06	2	2	7.93	cDNA FLJ60213, highly similar to Tenascin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E1W8_HUMAN]
B4DF70	27.32	5	4	21.52	cDNA FLJ60461, highly similar to Peroxiredoxin-2 (EC 1.11.1.15) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DF70_HUMAN]
B4DP17	16.88	2	2	8.28	cDNA FLJ61146, highly similar to Cellular nucleic acid-binding protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DP17_HUMAN]
B4E2A0	2.81	7	4	23.23	cDNA FLJ61543, highly similar to Desmoplakin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E2A0_HUMAN]
B4E3Q1	15.9	12	12	54.4	cDNA FLJ61580, highly similar to Calsyntenin-1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E3Q1_HUMAN]
A8K5J8	41.7	45	18	180.66	cDNA FLJ75066, highly similar to Homo sapiens complement component 1, r subcomponent (C1R), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K5J8_HUMAN]
A8K050	4.34	2	2	6.06	cDNA FLJ75376, highly similar to Homo sapiens peptidoglycan recognition protein L (PGLYRP) mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K050_HUMAN]
A8K5T0	4.79	5	5	25	cDNA FLJ75416, highly similar to Homo sapiens complement factor H (CFH), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K5T0_HUMAN]
A8K0T9	8.74	2	2	6.26	cDNA FLJ75422, highly similar to Homo sapiens capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K0T9_HUMAN]
A8K2Q6	17.45	5	4	17.32	cDNA FLJ76246, highly similar to Homo sapiens peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C) (PPIC), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K2Q6_HUMAN]
A8K335	26.42	8	7	29.47	cDNA FLJ76254, highly similar to Homo sapiens gamma-glutamyl hydrolase (GGH), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K335_HUMAN]
A8K3S1	10.73	3	3	8.32	cDNA FLJ76269, highly similar to Homo sapiens glucosamine-6-phosphate deaminase 1 (GNPDA1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K3S1_HUMAN]
A8K6H1	11.8	9	9	33.76	cDNA FLJ76662, highly similar to Homo sapiens type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K6H1_HUMAN]
A8K6A5	2.29	2	2	7.63	cDNA FLJ77742, highly similar to Homo sapiens integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K6A5_HUMAN]
A8K7Q1	22.99	17	10	64.19	cDNA FLJ77770, highly similar to Homo sapiens nucleobindin 1 (NUCB1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K7Q1_HUMAN]
A8K2H9	7.86	9	4	36.54	cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K2H9_HUMAN]
A8K477	26.32	22	14	96.37	cDNA FLJ78571, highly similar to Homo sapiens sulfhydryl oxidase mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K477_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
B3KQT9	46.88	21	20	85.31	cDNA PSEC0175 fis, clone OVARC1000169, highly similar to Protein disulfide-isomerase A3 (EC 5.3.4.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KQT9_HUMAN]
B2R5Q0	7.36	5	4	21.4	cDNA, FLJ92562, highly similar to Homo sapiens lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R5Q0_HUMAN]
B2R983	16.18	5	4	20.34	cDNA, FLJ94267, highly similar to Homo sapiens glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R983_HUMAN]
B2R9V7	12.08	2	2	8.9	cDNA, FLJ94575, highly similar to Homo sapiens superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R9V7_HUMAN]
B2RDW0	46.98	8	5	36.02	cDNA, FLJ96792, highly similar to Homo sapiens calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta) (CALM2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2RDW0_HUMAN]
Q8N126	7.54	2	2	7.27	Cell adhesion molecule 3 OS=Homo sapiens GN=CADM3 PE=1 SV=1 - [CADM3_HUMAN]
Q2TNB3	13.81	3	3	9.48	Cell migration-inducing protein 22 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q2TNB3_HUMAN]
Q9UNM1	41.24	5	4	18.07	Chaperonin 10-related protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=EPPF1 PE=2 SV=1 - [Q9UNM1_HUMAN]
O00299	44.4	8	8	27.6	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 - [CLIC1_HUMAN]
Q6UVK1	5.38	9	9	36.2	Chondroitin sulfate proteoglycan 4 OS=Homo sapiens GN=CSPG4 PE=1 SV=2 - [CSPG4_HUMAN]
Q14019	23.24	4	4	22.37	Coactosin-like protein OS=Homo sapiens GN=COTL1 PE=1 SV=3 - [COTL1_HUMAN]
P23528	52.41	10	8	38.04	Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3 - [COF1_HUMAN]
Q9Y281	31.93	5	4	20.4	Cofilin-2 OS=Homo sapiens GN=CFL2 PE=1 SV=1 - [COF2_HUMAN]
B7ZW00	48.83	145	106	609.68	COL6A3 protein OS=Homo sapiens GN=COL6A3 PE=2 SV=1 - [B7ZW00_HUMAN]
A2NB45	17.7	2	2	10.13	Cold agglutinin FS-1 L-chain (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A2NB45_HUMAN]
P02452	53.42	95	47	380.12	Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=5 - [CO1A1_HUMAN]
P02461	18.83	34	20	117.68	Collagen alpha-1(III) chain OS=Homo sapiens GN=COL3A1 PE=1 SV=4 - [CO3A1_HUMAN]
P02462	5.57	5	5	19.78	Collagen alpha-1[143] chain OS=Homo sapiens GN=COL4A1 PE=1 SV=3 - [CO4A1_HUMAN]
P12109	50.29	90	37	397.55	Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=3 - [CO6A1_HUMAN]
P08123	57.32	168	49	694.57	Collagen alpha-2(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A2 PE=1 SV=7 - [CO1A2_HUMAN]
P08572	2.92	5	4	22.42	Collagen alpha-2[143] chain OS=Homo sapiens GN=COL4A2 PE=1 SV=4 - [CO4A2_HUMAN]
P05997	16.28	19	15	81.91	Collagen alpha-2(V) chain OS=Homo sapiens GN=COL5A2 PE=1 SV=3 - [CO5A2_HUMAN]
P12110	28.85	42	24	166.8	Collagen alpha-2(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A2 PE=1 SV=4 - [CO6A2_HUMAN]
P12111	47.84	162	122	685.7	Collagen alpha-3(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A3 PE=1 SV=5 - [CO6A3_HUMAN]
B2ZZ86	6.31	10	7	37.12	Collagen type V alpha 1 OS=Homo sapiens GN=COL5A1 PE=2 SV=1 - [B2ZZ86_HUMAN]
D3DXT7	59.1	69	33	275.05	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=4 SV=1 - [D3DXT7_HUMAN]
Q5VVF2	18.93	6	3	18.73	Colony stimulating factor 1 (Macrophage) (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CSF1 PE=2 SV=1 - [Q5VVF2_HUMAN]
P00751	18.72	20	12	67.08	Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2 - [CFAB_HUMAN]
P05156	29.85	28	15	101.49	Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2 - [CFAI_HUMAN]
Q5M8T4	33.81	22	10	81.54	Connective tissue growth factor OS=Homo sapiens GN=CTGF PE=2 SV=1 - [Q5M8T4_HUMAN]
P04080	24.49	3	2	15.37	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]
P01034	37.67	20	7	90.08	Cystatin-C OS=Homo sapiens GN=CST3 PE=1 SV=1 - [CYTC_HUMAN]
P28838	9.06	4	4	10.81	Cytosol aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=LAP3 PE=1 SV=3 - [AMPL_HUMAN]
P07585	39.83	29	16	120.55	Decorin OS=Homo sapiens GN=DCN PE=1 SV=1 - [PGS2_HUMAN]
Q13011	9.45	2	2	8.46	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ECH1 PE=1 SV=2 - [ECH1_HUMAN]
Q07507	50.75	21	7	80.43	Dermatopontin OS=Homo sapiens GN=DPT PE=2 SV=2 - [DERM_HUMAN]
P81605	35.45	12	4	39.52	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]
P17661	10	16	7	53.44	Desmin OS=Homo sapiens GN=DES PE=1 SV=3 - [DESM_HUMAN]
B4DYA6	14.86	3	2	9.82	Destrin (Actin depolymerizing factor), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=DSTN PE=2 SV=1 - [B4DYA6_HUMAN]
Q14118	8.04	5	5	18.81	Dystroglycan OS=Homo sapiens GN=DAG1 PE=1 SV=2 - [DAG1_HUMAN]
Q6IQ15	8.16	5	4	13.12	EEF1A1 protein OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=2 SV=1 - [Q6IQ15_HUMAN]
P30040	28.74	7	6	23.53	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=4 - [ERP29_HUMAN]
Q9UNN8	12.61	2	2	10.26	Endothelial protein C receptor OS=Homo sapiens GN=PROCR PE=1 SV=1 - [EPCR_HUMAN]
P61916	51.66	13	9	52.19	Epididymal secretory protein E1 OS=Homo sapiens GN=NPC2 PE=1 SV=1 - [NPC2_HUMAN]
O14602	28.47	4	4	13.39	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal OS=Homo sapiens GN=EIF1AY PE=1 SV=4 - [IF1AY_HUMAN]
P14324	7.88	3	3	14.95	Farnesyl pyrophosphate synthase OS=Homo sapiens GN=FDPS PE=1 SV=4 - [FPPS_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
D2JYH6	15.26	37	32	144.95	<i>Fibrillin 1</i> OS=Homo sapiens GN=FBN1 PE=4 SV=1 - [D2JYH6_HUMAN]
P35556	9.44	24	21	103.6	<i>Fibrillin-2</i> OS=Homo sapiens GN=FBN2 PE=1 SV=3 - [FBN2_HUMAN]
B7ZLF0	61.35	288	89	1248.12	<i>Fibronectin 1</i> OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=1 - [B7ZLF0_HUMAN]
Q59G22	35.91	62	19	268.48	<i>Fibronectin 1 variant (Fragment)</i> OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q59G22_HUMAN]
P02751	58.34	293	93	1272.82	<i>Fibronectin</i> OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4 - [FINC_HUMAN]
P23142	46.37	43	24	176.98	<i>Fibulin-1</i> OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4 - [FBLN1_HUMAN]
Q9UBX5	8.04	6	3	27.38	<i>Fibulin-5</i> OS=Homo sapiens GN=FBLN5 PE=1 SV=1 - [FBLN5_HUMAN]
Q60FE7	3.05	8	6	29.28	<i>Filamin B</i> OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=2 SV=1 - [Q60FE7_HUMAN]
P21333	22.86	54	39	232.85	<i>Filamin-A</i> OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4 - [FLNA_HUMAN]
Q14315	3.05	11	7	35.13	<i>Filamin-C</i> OS=Homo sapiens GN=FLNC PE=1 SV=3 - [FLNC_HUMAN]
Q12841	61.04	60	22	222.17	<i>Follistatin-related protein 1</i> OS=Homo sapiens GN=FSTL1 PE=1 SV=1 - [FSTL1_HUMAN]
O95633	19.01	4	3	21.74	<i>Follistatin-related protein 3</i> OS=Homo sapiens GN=FSTL3 PE=1 SV=1 - [FSTL3_HUMAN]
P04075	42.31	13	13	47.13	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i> OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2 - [ALDOA_HUMAN]
Q86TY5	52.89	8	5	26.89	<i>Full-length cDNA clone CS0DI041YE05 of Placenta of Homo sapiens (human)</i> OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q86TY5_HUMAN]
P16930	7.64	3	3	7.87	<i>Fumarylacetoacetase</i> OS=Homo sapiens GN=FAH PE=1 SV=2 - [FAAA_HUMAN]
Q6P587	20.09	2	2	8.47	<i>Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1</i> OS=Homo sapiens GN=FAHD1 PE=1 SV=2 - [FAHD1_HUMAN]
P09382	37.04	7	4	32.59	<i>Galectin-1</i> OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2 - [LEG1_HUMAN]
Q08380	33.16	27	16	105.77	<i>Galectin-3-binding protein</i> OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP PE=1 SV=1 - [LG3BP_HUMAN]
O75223	18.62	4	3	10.34	<i>Gamma-glutamylcyclotransferase</i> OS=Homo sapiens GN=GGCT PE=1 SV=1 - [GGCT_HUMAN]
C8KIM0	11.82	4	4	15.08	<i>Glutathione reductase delta8+9 alternative splicing variant</i> OS=Homo sapiens GN=GSR PE=2 SV=1 - [C8KIM0_HUMAN]
P09211	21.9	3	3	13.18	<i>Glutathione S-transferase P</i> OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]
C7DJS2	25.17	2	2	10.03	<i>Glutathione S-transferase pi (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=2 SV=1 - [C7DJS2_HUMAN]
B6F210	4.96	2	2	5.81	<i>Glutathione synthetase</i> OS=Homo sapiens GN=GSS PE=2 SV=1 - [B6F210_HUMAN]
Q9UE37	31.71	2	2	6.22	<i>Glutathione transferase (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=GSTmu3 PE=4 SV=1 - [Q9UE37_HUMAN]
P04406	25.37	6	6	23.67	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 - [G3P_HUMAN]
Q6LBL5	23.81	4	4	16.82	<i>GM2 activator protein</i> OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q6LBL5_HUMAN]
O60565	63.59	13	9	50.85	<i>Gremlin-1</i> OS=Homo sapiens GN=GREM1 PE=1 SV=1 - [GREM1_HUMAN]
Q8NCC3	23.54	7	7	25.46	<i>Group XV phospholipase A2</i> OS=Homo sapiens GN=PLA2G15 PE=1 SV=2 - [PAG15_HUMAN]
Q8N4P3	22.91	4	4	18.86	<i>Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase MESH1</i> OS=Homo sapiens GN=HDDC3 PE=1 SV=3 - [MESH1_HUMAN]
B2RDM2	21.3	8	7	22.07	<i>HCG1811539, isoform CRA_b</i> OS=Homo sapiens GN=hCG_1811539 PE=2 SV=1 - [B2RDM2_HUMAN]
P04792	45.37	10	8	33.79	<i>Heat shock protein beta-1</i> OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 - [HSPB1_HUMAN]
Q6LAM1	32.4	19	10	77.62	<i>Heavy chain of factor I (Fragment)</i> OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q6LAM1_HUMAN]
P68871	36.05	11	4	37.17	<i>Hemoglobin subunit beta</i> OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 - [HBB_HUMAN]
P02790	65.15	158	29	707.65	<i>Hemopexin</i> OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2 - [HEMO_HUMAN]
P17096	41.12	2	2	11.39	<i>High mobility group protein HMG-I/HMG-Y</i> OS=Homo sapiens GN=HMGA1 PE=1 SV=3 - [HMGA1_HUMAN]
P62805	21.36	2	2	8.87	<i>Histone H4</i> OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]
P01892	17.26	6	4	20.79	<i>HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain</i> OS=Homo sapiens GN=HLA-A PE=1 SV=1 - [1A02_HUMAN]
P30460	7.18	2	2	9.16	<i>HLA class I histocompatibility antigen, B-8 alpha chain</i> OS=Homo sapiens GN=HLA-B PE=1 SV=1 - [1B08_HUMAN]
Q0VAC5	24.5	7	7	25.42	<i>HP protein</i> OS=Homo sapiens GN=HP PE=2 SV=1 - [Q0VAC5_HUMAN]
Q96IS6	6.98	4	4	15.01	<i>HSPA8 protein (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=2 SV=2 - [Q96IS6_HUMAN]
P01876	32.01	12	7	41.34	<i>Ig alpha-1 chain C region</i> OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]
P01857	50.3	21	10	75.55	<i>Ig gamma-1 chain C region</i> OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [IGHG1_HUMAN]
P01860	13.79	13	4	43.36	<i>Ig gamma-3 chain C region</i> OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2 - [IGHG3_HUMAN]
P01861	27.83	15	6	51.7	<i>Ig gamma-4 chain C region</i> OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1 - [IGHG4_HUMAN]
P01625	23.68	3	2	14.19	<i>Ig kappa chain V-IV region Len</i> OS=Homo sapiens PE=1 SV=2 - [KV402_HUMAN]
Q5FWF9	18.97	4	3	20.93	<i>IGL@ protein</i> OS=Homo sapiens GN=IGL@ PE=1 SV=1 - [Q5FWF9_HUMAN]
Q6GMW4	30.9	11	6	41.36	<i>IGL@ protein</i> OS=Homo sapiens GN=IGL@ PE=1 SV=1 - [Q6GMW4_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
Q8N5F4	42.49	13	7	53.78	<i>IGL@ protein</i> OS=Homo sapiens GN=IGL@ PE=2 SV=1 - [Q8N5F4_HUMAN]
Q0KKI6	45.66	19	7	81.35	<i>Immunoglobulin light chain (Fragment)</i> OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q0KKI6_HUMAN]
P08476	14.79	7	6	24.08	<i>Inhibin beta A chain</i> OS=Homo sapiens GN=INHBA PE=1 SV=2 - [INHBA_HUMAN]
P18065	32	11	9	45.44	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i> OS=Homo sapiens GN=IGFBP2 PE=1 SV=2 - [IBP2_HUMAN]
P22692	27.52	12	7	47.89	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i> OS=Homo sapiens GN=IGFBP4 PE=1 SV=2 - [IBP4_HUMAN]
P24592	27.5	11	5	47.13	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 6</i> OS=Homo sapiens GN=IGFBP6 PE=1 SV=1 - [IBP6_HUMAN]
Q16270	53.9	34	16	148.23	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 7</i> OS=Homo sapiens GN=IGFBP7 PE=1 SV=1 - [IBP7_HUMAN]
O95965	25.1	11	8	46.77	<i>Integrin beta-like protein 1</i> OS=Homo sapiens GN=ITGBL1 PE=2 SV=1 - [ITGBL_HUMAN]
Q0QER2	11.05	3	3	10.06	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=IDH1 PE=2 SV=1 - [Q0QER2_HUMAN]
Q13907	23.79	4	4	11	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1</i> OS=Homo sapiens GN=IDI1 PE=1 SV=2 - [IDI1_HUMAN]
Q96910	8.22	14	4	48.63	<i>KRT8 protein (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=2 SV=2 - [Q96910_HUMAN]
P00338	33.13	14	12	46.43	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i> OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 - [LDHA_HUMAN]
P07195	29.94	11	11	41.52	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i> OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 - [LDHB_HUMAN]
Q6UYC3	28.5	28	17	114.95	<i>Lamin A/C</i> OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=2 SV=1 - [Q6UYC3_HUMAN]
P07942	16.63	23	23	92.23	<i>Laminin subunit beta-1</i> OS=Homo sapiens GN=LAMB1 PE=1 SV=2 - [LAMB1_HUMAN]
P11047	15.72	18	18	66.18	<i>Laminin subunit gamma-1</i> OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3 - [LAMC1_HUMAN]
E1P559	10.68	14	14	56.19	<i>Laminin, alpha 4, isoform CRA_b</i> OS=Homo sapiens GN=LAMA4 PE=4 SV=1 - [E1P559_HUMAN]
Q14767	4.72	8	6	40.5	<i>Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2</i> OS=Homo sapiens GN=LTBP2 PE=1 SV=3 - [LTBP2_HUMAN]
Q6NVH9	25.6	7	5	24.72	<i>Lectin, galactoside-binding, soluble, 3</i> OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=2 SV=1 - [Q6NVH9_HUMAN]
P31025	12.5	2	2	9.06	<i>Lipocalin-1</i> OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [LCN1_HUMAN]
B7ZLY3	12.79	18	12	81.17	<i>LTBP1 protein</i> OS=Homo sapiens GN=LTBP1 PE=2 SV=1 - [B7ZLY3_HUMAN]
P51884	35.21	23	12	92.32	<i>Lumican</i> OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2 - [LUM_HUMAN]
P10253	5.57	4	4	15.62	<i>Lysosomal alpha-glucosidase</i> OS=Homo sapiens GN=GAA PE=1 SV=4 - [LYAG_HUMAN]
Q08397	9.06	4	3	19.17	<i>Lysyl oxidase homolog 1</i> OS=Homo sapiens GN=LOXL1 PE=2 SV=2 - [LOXL1_HUMAN]
Q7Z7M4	41.78	11	8	55.18	<i>Manganese-containing superoxide dismutase (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=SOD2 PE=2 SV=1 - [Q7Z7M4_HUMAN]
P33908	12.71	6	6	23.64	<i>Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA</i> OS=Homo sapiens GN=MAN1A1 PE=1 SV=3 - [MA1A1_HUMAN]
Q86Y04	5.72	5	4	29.85	<i>MAP4 protein (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=1 SV=1 - [Q86Y04_HUMAN]
P55145	51.4	10	10	37.21	<i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i> OS=Homo sapiens GN=MANF PE=1 SV=2 - [MANF_HUMAN]
P16035	59.09	29	15	132.02	<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i> OS=Homo sapiens GN=TIMP2 PE=1 SV=2 - [TIMP2_HUMAN]
P62072	32.22	3	3	12.67	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10</i> OS=Homo sapiens GN=TIMM10 PE=1 SV=1 - [TIM10_HUMAN]
Q0QF37	60.98	23	16	80.48	<i>Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD (Fragment)</i> OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=2 SV=1 - [Q0QF37_HUMAN]
P26038	18.72	11	9	46.98	<i>Moesin</i> OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3 - [MOES_HUMAN]
Q8NG19	17.62	3	3	14.1	<i>Multi-functional protein MFP</i> OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q8NG19_HUMAN]
P60660	25.17	5	4	16.7	<i>Myosin light polypeptide 6</i> OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2 - [MYL6_HUMAN]
P20933	19.08	6	4	23.65	<i>N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase</i> OS=Homo sapiens GN=AGA PE=1 SV=2 - [ASPG_HUMAN]
O95865	18.6	3	3	12.47	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2</i> OS=Homo sapiens GN=DDAH2 PE=1 SV=1 - [DDAH2_HUMAN]
Q5TD07	15.54	2	2	8	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2</i> OS=Homo sapiens GN=NQO2 PE=2 SV=1 - [Q5TD07_HUMAN]
Q09666	0.66	3	3	9.63	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i> OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2 - [AHNK_HUMAN]
P12036	1.75	5	2	17.74	<i>Neurofilament heavy polypeptide</i> OS=Homo sapiens GN=NEFH PE=1 SV=4 - [NFH_HUMAN]
P14543	22.21	21	21	90.59	<i>Nidogen-1</i> OS=Homo sapiens GN=NID1 PE=1 SV=3 - [NID1_HUMAN]
Q14112	2.84	3	3	10.21	<i>Nidogen-2</i> OS=Homo sapiens GN=NID2 PE=1 SV=3 - [NID2_HUMAN]
D3DQX5	11.43	11	5	34.65	<i>Nucleobindin 2, isoform CRA_a</i> OS=Homo sapiens GN=NUCB2 PE=4 SV=1 - [D3DQX5_HUMAN]
P15531	42.11	10	6	41.08	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i> OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1 - [NDKA_HUMAN]
P22392	46.05	11	7	44.33	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i> OS=Homo sapiens GN=NME2 PE=1 SV=1 - [NDKB_HUMAN]
P26022	43.31	65	15	245.37	<i>Pentraxin-related protein PTX3</i> OS=Homo sapiens GN=PTX3 PE=1 SV=3 - [PTX3_HUMAN]
P62937	74.55	24	13	88.45	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i> OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2 - [PPIA_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
P23284	60.19	31	16	141.01	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2 - [PPIB_HUMAN]
P30405	11.11	2	2	5.51	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PPIF PE=1 SV=1 - [PPIF_HUMAN]
P26885	23.24	3	3	8.86	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 OS=Homo sapiens GN=FKBP2 PE=1 SV=2 - [FKBP2_HUMAN]
Q92626	2.43	3	3	10.64	Peroxidasin homolog OS=Homo sapiens GN=PXDN PE=1 SV=2 - [PXDN_HUMAN]
Q06830	68.34	15	13	63.84	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 - [PRDX1_HUMAN]
Q13162	51.66	11	10	46.77	Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1 - [PRDX4_HUMAN]
P30041	14.29	3	3	10.84	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3 - [PRDX6_HUMAN]
P30086	63.64	11	9	46.26	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3 - [PEBP1_HUMAN]
P00558	29.02	8	8	30.62	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3 - [PGK1_HUMAN]
P18669	20.87	9	5	40.22	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 PE=1 SV=2 - [PGAM1_HUMAN]
Q9Y617	23.78	7	7	19.67	Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens GN=PSAT1 PE=1 SV=2 - [SERC_HUMAN]
P36955	21.77	6	6	22.5	Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4 - [PEDF_HUMAN]
Q9BTY2	15.2	6	6	22.79	Plasma alpha-L-fucosidase OS=Homo sapiens GN=FUCA2 PE=1 SV=2 - [FUOCO2_HUMAN]
Q9Y646	4.24	2	2	6.52	Plasma glutamate carboxypeptidase OS=Homo sapiens GN=PGCP PE=1 SV=1 - [PGCP_HUMAN]
P05121	74.88	293	27	1163.97	Plasminogen activator inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=SERPINE1 PE=1 SV=1 - [PAI1_HUMAN]
Q15149	1.69	7	7	24.15	Plectin OS=Homo sapiens GN=PLEC PE=1 SV=3 - [PLEC_HUMAN]
D4YW74	0.51	3	2	16.94	Polytrophin OS=Homo sapiens GN=TROPH PE=2 SV=1 - [D4YW74_HUMAN]
P07602	16.22	15	9	64.22	Proactivator polypeptide OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2 - [SAP_HUMAN]
Q8WUW1	28	2	2	9.78	Probable protein BRICK1 OS=Homo sapiens GN=C3orf10 PE=1 SV=1 - [BRK1_HUMAN]
Q15113	38.53	20	11	65.3	ProCollagen C-endopeptidase enhancer 1 OS=Homo sapiens GN=PCOLCE PE=1 SV=2 - [PCOC1_HUMAN]
P07737	55.71	17	9	60.88	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]
P12273	21.23	4	3	11.36	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
Q07954	1.65	6	6	24.67	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=LRP1 PE=1 SV=2 - [LRP1_HUMAN]
Q8NBP7	11.27	6	5	23.11	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 OS=Homo sapiens GN=PCSK9 PE=1 SV=3 - [PCSK9_HUMAN]
P25786	32.7	7	7	25.24	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1 - [PSA1_HUMAN]
P25787	35.9	7	6	26.99	Proteasome subunit alpha type-2 OS=Homo sapiens GN=PSMA2 PE=1 SV=2 - [PSA2_HUMAN]
P25788	22.35	8	5	22.13	Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMA3 PE=1 SV=2 - [PSA3_HUMAN]
P25789	15.33	4	4	15.73	Proteasome subunit alpha type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMA4 PE=1 SV=1 - [PSA4_HUMAN]
P28066	15.77	4	3	18.11	Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMA5 PE=1 SV=3 - [PSA5_HUMAN]
P60900	28.05	6	5	27.19	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMA6 PE=1 SV=1 - [PSA6_HUMAN]
P20618	24.9	6	6	20.01	Proteasome subunit beta type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMB1 PE=1 SV=2 - [PSB1_HUMAN]
P49721	22.89	4	4	17.73	Proteasome subunit beta type-2 OS=Homo sapiens GN=PSMB2 PE=1 SV=1 - [PSB2_HUMAN]
P49720	23.9	4	4	15.67	Proteasome subunit beta type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMB3 PE=1 SV=2 - [PSB3_HUMAN]
P28070	21.21	5	5	16.88	Proteasome subunit beta type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMB4 PE=1 SV=4 - [PSB4_HUMAN]
P28074	31.56	13	8	40.63	Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1 SV=3 - [PSB5_HUMAN]
P28072	17.57	4	4	15.76	Proteasome subunit beta type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMB6 PE=1 SV=4 - [PSB6_HUMAN]
O00622	25.98	16	7	53.2	Protein CYR61 OS=Homo sapiens GN=CYR61 PE=1 SV=1 - [CYR61_HUMAN]
P07237	50.79	27	23	111.72	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3 - [PDIA1_HUMAN]
Q99497	54.5	9	8	41.62	Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2 - [PARK7_HUMAN]
Q6UWF9	20.23	3	3	6.96	Protein FAM180A OS=Homo sapiens GN=FAM180A PE=2 SV=1 - [F180A_HUMAN]
Q92520	33.04	6	6	25.39	Protein FAM3C OS=Homo sapiens GN=FAM3C PE=1 SV=1 - [FAM3C_HUMAN]
Q9UFN0	19.84	3	3	16.54	Protein NipSnap homolog 3A OS=Homo sapiens GN=NIPSNAP3A PE=1 SV=2 - [NPS3A_HUMAN]
P31949	32.38	5	4	18.24	Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2 - [S10AB_HUMAN]
P06703	25.56	4	3	10.17	Protein S100-A6 OS=Homo sapiens GN=S100A6 PE=1 SV=1 - [S10A6_HUMAN]
Q05DH1	36.97	10	6	37.1	PSMA7 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PSMA7 PE=2 SV=1 - [Q05DH1_HUMAN]
P00491	16.26	4	4	16.38	Purine nucleoside phosphorylase OS=Homo sapiens GN=PNP PE=1 SV=2 - [PNPH_HUMAN]
Q9UG16	1.74	2	2	7.98	Putative uncharacterized protein DKFZp686A03134 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DKFZp686A03134 PE=2 SV=1 - [Q9UG16_HUMAN]
Q6AWA9	5.76	2	2	12.09	Putative uncharacterized protein DKFZp686A03134 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DKFZp686A03134 PE=2 SV=1 - [Q6AWA9_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
Q6N084	36.07	69	21	297.02	Putative uncharacterized protein DKFZp686L11144 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DKFZp686L11144 PE=2 SV=1 - [Q6N084_HUMAN]
Q6MZM7	47.74	232	68	982.78	Putative uncharacterized protein DKFZp686O12165 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DKFZp686O12165 PE=1 SV=1 - [Q6MZM7_HUMAN]
Q68CX6	58.71	145	40	634.04	Putative uncharacterized protein DKFZp686O13149 OS=Homo sapiens GN=DKFZp686O13149 PE=2 SV=1 - [Q68CX6_HUMAN]
Q4W5K9	12.17	4	3	11.55	Putative uncharacterized protein LIM (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LIM PE=2 SV=1 - [Q4W5K9_HUMAN]
Q6GMV8	22.22	4	3	20.41	Putative uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q6GMV8_HUMAN]
Q6YL38	7.42	2	2	6.2	Putative uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q6YL38_HUMAN]
Q53QE9	14.84	5	5	17.46	Putative uncharacterized protein UGP2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UGP2 PE=2 SV=1 - [Q53QE9_HUMAN]
Q53FA7	9.34	3	3	8.92	Quinone oxidoreductase PIG3 OS=Homo sapiens GN=TP53I3 PE=1 SV=2 - [QORX_HUMAN]
P50395	42.47	16	15	60.72	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 PE=1 SV=2 - [GDIB_HUMAN]
A8KA46	15.63	3	3	7.64	Ras suppressor protein 1 OS=Homo sapiens GN=RSU1 PE=2 SV=1 - [A8KA46_HUMAN]
P61026	11.5	2	2	5.73	Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1 SV=1 - [RAB10_HUMAN]
Q15293	9.67	2	2	7.25	Reticulocalbin-1 OS=Homo sapiens GN=RCN1 PE=1 SV=1 - [RCN1_HUMAN]
Q96D15	30.79	8	8	31.12	Reticulocalbin-3 OS=Homo sapiens GN=RCN3 PE=1 SV=1 - [RCN3_HUMAN]
P52565	19.61	8	5	38.67	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGDI1 PE=1 SV=3 - [GDIR1_HUMAN]
P34096	19.73	3	3	8.32	Ribonuclease 4 OS=Homo sapiens GN=RNASE4 PE=1 SV=3 - [RNAS4_HUMAN]
Q6NSF2	9.06	2	2	6.09	RPLP0 protein OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=2 SV=1 - [Q6NSF2_HUMAN]
O75326	9.31	6	6	23.82	Semaphorin-7A OS=Homo sapiens GN=SEMA7A PE=1 SV=1 - [SEM7A_HUMAN]
Q5UGI6	15.32	4	4	18.27	Serine/cysteine proteinase inhibitor clade G member 1 splice variant 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=2 SV=1 - [Q5UGI6_HUMAN]
P02787	86.25	2036	88	8517.14	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]
P35237	26.33	8	8	43.84	Serpin B6 OS=Homo sapiens GN=SERPINB6 PE=1 SV=3 - [SPB6_HUMAN]
P35542	33.08	9	4	31.1	Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4 PE=1 SV=2 - [SAA4_HUMAN]
O75368	26.32	4	3	12.95	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein OS=Homo sapiens GN=SH3BGR1 PE=1 SV=1 - [SH3L1_HUMAN]
P09486	62.05	96	17	410.82	SPARC OS=Homo sapiens GN=SPARC PE=1 SV=1 - [SPRC_HUMAN]
D3DVN9	26.28	15	7	56.1	Spondin 2, extracellular matrix protein, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SPON2 PE=4 SV=1 - [D3DVN9_HUMAN]
B5BU83	22.82	6	4	18.66	Stathmin 1 OS=Homo sapiens GN=STMN1 PE=2 SV=1 - [B5BU83_HUMAN]
Q5U0B9	37.77	14	11	54.39	Stem cell growth factor; lymphocyte secreted C-type lectin OS=Homo sapiens GN=CLEC11A PE=2 SV=1 - [Q5U0B9_HUMAN]
B1AME6	16.95	5	5	18.55	Stromal cell derived factor 4 OS=Homo sapiens GN=SDF4 PE=4 SV=1 - [B1AME6_HUMAN]
P00441	49.35	5	5	19.56	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens GN=SOD1 PE=1 SV=2 - [SODC_HUMAN]
Q4LDE5	1.96	6	6	22.03	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=SVEP1 PE=1 SV=3 - [SVEP1_HUMAN]
Q7Z7G0	17.58	12	12	58.57	Target of Nesh-SH3 OS=Homo sapiens GN=ABI3BP PE=1 SV=1 - [TARSH_HUMAN]
Q08629	6.15	3	3	13.45	Testican-1 OS=Homo sapiens GN=SPOCK1 PE=1 SV=1 - [TICN1_HUMAN]
P05452	29.21	7	5	28.16	Tetranectin OS=Homo sapiens GN=CLEC3B PE=1 SV=3 - [TETN_HUMAN]
Q9BRA2	21.14	4	2	16.23	Thioredoxin domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens GN=TXNDC17 PE=1 SV=1 - [TXD17_HUMAN]
P30048	8.2	2	2	6.63	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 PE=1 SV=3 - [PRDX3_HUMAN]
P07996	33.93	104	41	380.12	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1 PE=1 SV=2 - [TSP1_HUMAN]
P35442	2.39	4	2	22.53	Thrombospondin-2 OS=Homo sapiens GN=THBS2 PE=1 SV=2 - [TSP2_HUMAN]
Q5H9A7	91.61	61	11	280.65	TIMP metalloproteinase inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=TIMP1 PE=2 SV=1 - [Q5H9A7_HUMAN]
P37837	19.58	6	6	19.36	Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=2 - [TALDO_HUMAN]
Q53H26	80.8	1986	85	8221.44	Transferrin variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q53H26_HUMAN]
P01137	5.9	2	2	11.66	Transforming growth factor beta-1 OS=Homo sapiens GN=TGFB1 PE=1 SV=2 - [TGFB1_HUMAN]
B9ZVW9	12.26	5	4	15.55	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=TGFB1 PE=4 SV=1 - [B9ZVW9_HUMAN]
Q01995	65.67	26	14	100.5	Transgelin OS=Homo sapiens GN=TAGLN PE=1 SV=4 - [TAGL_HUMAN]
P37802	56.28	15	10	51.85	Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3 - [TAGL2_HUMAN]
P13693	28.49	6	5	22.92	Translationally-controlled tumor protein OS=Homo sapiens GN=TPT1 PE=1 SV=1 - [TCTP_HUMAN]

accession	coverage	# PSMs	# peptides	score	description
P60174	83.53	27	17	128.32	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=2 - [TPIS_HUMAN]
D9YZV5	27.11	16	10	63.97	Tropomyosin 1 (Alpha) isoform 4 OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=4 SV=1 - [D9YZV5_HUMAN]
D9YZV8	35.21	35	15	130.72	Tropomyosin 1 (Alpha) isoform 7 OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=4 SV=1 - [D9YZV8_HUMAN]
B7Z722	43.15	35	15	137.54	Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_i OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=2 SV=1 - [B7Z722_HUMAN]
C9IZA2	33.1	35	15	134.66	Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_o OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=4 SV=1 - [C9IZA2_HUMAN]
Q1ZYL5	36.33	16	10	61.52	Tropomyosin 1 alpha variant 6 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q1ZYL5_HUMAN]
Q5VU66	49.19	34	16	134.27	Tropomyosin 3 OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=2 SV=1 - [Q5VU66_HUMAN]
Q5VU72	55.47	50	22	193.3	Tropomyosin 3 OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=2 SV=1 - [Q5VU72_HUMAN]
P06753	41.55	38	16	142.23	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=1 - [TPM3_HUMAN]
P67936	41.13	38	16	136.04	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3 - [TPM4_HUMAN]
P07951	23.94	30	12	106.17	Tropomyosin beta chain OS=Homo sapiens GN=TPM2 PE=1 SV=1 - [TPM2_HUMAN]
C8CHS3	33	12	9	45.42	Truncated extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=ECM1 PE=4 SV=1 - [C8CHS3_HUMAN]
P30530	4.03	3	3	9.02	Tyrosine-protein kinase receptor UFO OS=Homo sapiens GN=AXL PE=1 SV=3 - [UFO_HUMAN]
Q9UPI5	9.96	2	2	6.82	U-plasminogen activator receptor form 2-human [AA 1-206] (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PLAUR PE=2 SV=1 - [Q9UPI5_HUMAN]
Q96C32	65.57	13	4	52.11	UBC protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q96C32_HUMAN]
Q96FW1	7.01	2	2	5.24	Ubiquitin thioesterase OTUB1 OS=Homo sapiens GN=OTUB1 PE=1 SV=2 - [OTUB1_HUMAN]
P61088	19.74	2	2	9.25	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N OS=Homo sapiens GN=UBE2N PE=1 SV=1 - [UBE2N_HUMAN]
Q13404	23.81	5	3	24.24	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 OS=Homo sapiens GN=UBE2V1 PE=1 SV=2 - [UB2V1_HUMAN]
D6RHD5	34.42	22	13	89.9	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=ALB PE=4 SV=1 - [D6RHD5_HUMAN]
A6NLG9	55.37	19	14	82.46	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=BGN PE=2 SV=1 - [A6NLG9_HUMAN]
A6NG18	9.68	10	5	45.1	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=C1S PE=4 SV=2 - [A6NG18_HUMAN]
C9J813	19.61	10	8	37.32	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=CALD1 PE=4 SV=1 - [C9J813_HUMAN]
C9JQ41	21.54	2	2	6.45	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=CCDC58 PE=4 SV=1 - [C9JQ41_HUMAN]
D6RGG3	17.34	41	41	159.76	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=COL12A1 PE=4 SV=1 - [D6RGG3_HUMAN]
C9JFR7	38.61	10	7	42.14	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=4 SV=1 - [C9JFR7_HUMAN]
B8ZZ37	17.67	5	4	19	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=4 SV=1 - [B8ZZ37_HUMAN]
C9JXX4	21.89	4	3	14.6	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=IGFBP5 PE=4 SV=1 - [C9JXX4_HUMAN]
D6RIU4	18.23	3	3	11.57	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=4 SV=1 - [D6RIU4_HUMAN]
C9J592	26.67	3	3	9.36	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=4 SV=1 - [C9J592_HUMAN]
C9K0U8	27.27	3	3	11.29	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=4 SV=1 - [C9K0U8_HUMAN]
E5RIW3	67.86	10	7	34.53	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=TBCA PE=4 SV=1 - [E5RIW3_HUMAN]
D6RE83	27.54	5	5	15.71	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=UCHL1 PE=4 SV=1 - [D6RE83_HUMAN]
C9JCD7	8.61	3	2	12.55	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=4 SV=1 - [C9JCD7_HUMAN]
Q969H8	27.75	6	4	24.06	UPF0556 protein C19orf10 OS=Homo sapiens GN=C19orf10 PE=1 SV=1 - [CS010_HUMAN]
Q96N03	30.39	5	4	21.89	V-set and transmembrane domain-containing protein 2-like protein OS=Homo sapiens GN=VSTM2L PE=2 SV=1 - [VTM2L_HUMAN]
P01185	12.2	30	5	97.85	Vasopressin-neurophysin 2-copeptin OS=Homo sapiens GN=AVP PE=1 SV=2 - [NEU2_HUMAN]
Q6EMK4	7.88	6	4	26.7	Vasorin OS=Homo sapiens GN=VASN PE=1 SV=1 - [VASN_HUMAN]
P08670	62.66	80	37	287.41	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 - [VIME_HUMAN]
P18206	29.1	25	24	88.43	Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL PE=1 SV=4 - [VINC_HUMAN]
Q86Y38	2.29	2	2	7.54	Xylosyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=XYLT1 PE=1 SV=1 - [XYLT1_HUMAN]

accession: uniprot accession numbers of identified proteins
coverage: % coverage of sequence counted by related peptides
description: protein informations obtained from uniprot
PSMs: Peptide Spectrum Matches
Peptides: unique peptides

Literaturverzeichnis

1. Kreienberg R, Möbus V, Jonat W, Kühn T: **Mammakarzinom: Interdisziplinär**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH; 2010.
2. Koch-Institut R. In.; 2010.
3. Hennighausen L, Robinson GW: **Signaling pathways in mammary gland development**. *Dev Cell* 2001, **1**(4):467-475.
4. Fantozzi A, Christofori G: **Mouse models of breast cancer metastasis**. *Breast Cancer Res* 2006, **8**(4):212.
5. Wiseman BS, Werb Z: **Stromal effects on mammary gland development and breast cancer**. *Science* 2002, **296**(5570):1046-1049.
6. Nelson CM, Bissell MJ: **Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation**. *Semin Cancer Biol* 2005, **15**(5):342-352.
7. Fellner F, Waldhör I, Grafinger-Witt E, Schrenk P: **Mammakarzinom**. *Radiopraxis* 2008.
8. Barcellos-Hoff MH, Aggeler J, Ram TG, Bissell MJ: **Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane**. *Development* 1989, **105**(2):223-235.
9. Plachot C, Chaboub LS, Adissu HA, Wang L, Urazaev A, Sturgis J, Asem EK, Lelievre SA: **Factors necessary to produce basoapical polarity in human glandular epithelium formed in conventional and high-throughput three-dimensional culture: example of the breast epithelium**. *BMC Biol* 2009, **7**:77.
10. Slade MJ, Coope RC, Gomm JJ, Coombes RC: **The human mammary gland basement membrane is integral to the polarity of luminal epithelial cells**. *Exp Cell Res* 1999, **247**(1):267-278.
11. Polyak K, Hu M: **Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression?** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005, **10**(3):231-247.
12. Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Petersen OW: **Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition**. *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 1):39-50.
13. Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ: **Myoepithelial cells: good fences make good neighbors**. *Breast Cancer Res* 2005, **7**(5):190-197.
14. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ: **Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction**. *Physiol Rev* 1996, **76**(1):69-125.
15. Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ: **Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(19):9064-9068.
16. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
17. Bissell MJ, Hines WC: **Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression**. *Nat Med* 2011, **17**(3):320-329.
18. Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, e Ferreira EN, Torres CH, Katayama ML, Roela RA, Lyra EC *et al*: **Reciprocal changes in**

- gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts.** *Int J Cancer* 2009, **125**(12):2767-2777.
19. Beliveau A, Mott JD, Lo A, Chen EI, Koller AA, Yaswen P, Muschler J, Bissell MJ: **Raf-induced MMP9 disrupts tissue architecture of human breast cells in three-dimensional culture and is necessary for tumor growth in vivo.** *Genes Dev* 2010, **24**(24):2800-2811.
 20. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR: **Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels.** *J Exp Med* 1991, **174**(5):1275-1278.
 21. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM: **The extracellular matrix at a glance.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 24):4195-4200.
 22. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ: **Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity.** *J Cell Biol* 1991, **115**(5):1383-1395.
 23. Paulsson M: **Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992, **27**(1-2):93-127.
 24. Kalluri R: **Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(6):422-433.
 25. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I: **Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis.** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**(3):197-207.
 26. Iozzo RV, Zoeller JJ, Nystrom A: **Basement membrane proteoglycans: modulators of cancer growth and angiogenesis.** *Mol Cells* 2009, **27**(5):503-513.
 27. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA: **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(5):349-363.
 28. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, Salmon M, Buckley CD: **A stromal address code defined by fibroblasts.** *Trends Immunol* 2005, **26**(3):150-156.
 29. Kalluri R, Zeisberg M: **Fibroblasts in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(5):392-401.
 30. Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schurch W, Gabbiani G: **Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues.** *Int J Cancer* 1988, **41**(5):707-712.
 31. Schor SL, Haggie JA, Durning P, Howell A, Smith L, Sellwood RA, Crowther D: **Occurrence of a fetal fibroblast phenotype in familial breast cancer.** *Int J Cancer* 1986, **37**(6):831-836.
 32. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M: **Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth.** *Int J Cancer* 2008, **123**(10):2229-2238.
 33. Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A: **Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast.** *Oncogene* 2010, **29**(12):1732-1740.
 34. Matrisian LM, Cunha GR, Mohla S: **Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and future directions.** *Cancer Res* 2001, **61**(9):3844-3846.
 35. Erickson AC, Barcellos-Hoff MH: **The not-so innocent bystander: the microenvironment as a therapeutic target in cancer.** *Expert Opin Ther Targets* 2003, **7**(1):71-88.

36. Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, Pan CC, Shew JY, Chang KJ, Lee EY, Lee WH: **Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis.** *PLoS One* 2011, **6**(1):e15313.
37. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR: **Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium.** *Cancer Res* 1999, **59**(19):5002-5011.
38. Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L: **Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression.** *Cancer Res* 2001, **61**(4):1320-1326.
39. Jedeszko C, Victor BC, Podgorski I, Sloane BF: **Fibroblast hepatocyte growth factor promotes invasion of human mammary ductal carcinoma in situ.** *Cancer Res* 2009, **69**(23):9148-9155.
40. Bissell MJ, Radisky D: **Putting tumours in context.** *Nat Rev Cancer* 2001, **1**(1):46-54.
41. Joyce JA: **Therapeutic targeting of the tumor microenvironment.** *Cancer Cell* 2005, **7**(6):513-520.
42. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ: **Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies.** *J Cell Biol* 1997, **137**(1):231-245.
43. Pinto MP, Badtke MM, Dudevoir ML, Harrell JC, Jacobsen BM, Horwitz KB: **Vascular endothelial growth factor secreted by activated stroma enhances angiogenesis and hormone-independent growth of estrogen receptor-positive breast cancer.** *Cancer Res* 2010, **70**(7):2655-2664.
44. Place AE, Jin Huh S, Polyak K: **The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**(6):227.
45. Olayioye MA: **Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members.** *Breast Cancer Res* 2001, **3**(6):385-389.
46. Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ: **Targeting the tumor microenvironment.** *Front Biosci* 2007, **12**:3468-3474.
47. Liotta LA, Kohn EC: **The microenvironment of the tumour-host interface.** *Nature* 2001, **411**(6835):375-379.
48. Cheng JD, Dunbrack RL, Jr., Valianou M, Rogatko A, Alpaugh RK, Weiner LM: **Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model.** *Cancer Res* 2002, **62**(16):4767-4772.
49. Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA: **Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin.** *J Clin Invest* 1995, **96**(4):1815-1822.
50. Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, Cheresh DA: **Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(8):3056-3061.
51. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, Squadrito ML, Segura I, Li X, Knevels E *et al*: **HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PIGF.** *Cancer Cell* 2011, **19**(1):31-44.
52. Colombo PE, Milanezi F, Weigelt B, Reis-Filho JS: **Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer**

- classification, prognostication and prediction.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**(3):212.
53. Pawitan Y, Bjohle J, Amler L, Borg AL, Egyhazi S, Hall P, Han X, Holmberg L, Huang F, Klaar S *et al*: **Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(6):R953-964.
 54. Mello-Grand M, Singh V, Ghimenti C, Scatolini M, Regolo L, Grosso E, Zambelli A, Da Prada GA, Villani L, Fregoni V *et al*: **Gene expression profiling and prediction of response to hormonal neoadjuvant treatment with anastrozole in surgically resectable breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **121**(2):399-411.
 55. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC *et al*: **Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer.** *Lancet* 2003, **362**(9381):362-369.
 56. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT *et al*: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**(6871):530-536.
 57. Arai T, Matsumoto K, Maegawa M, Nishio K: **What can and cannot be done using a microarray analysis? Treatment stratification and clinical applications in oncology.** *Biol Pharm Bull* 2011, **34**(12):1789-1793.
 58. Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, Koornstra RH, Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, van 't Veer LJ: **The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**(3):655-661.
 59. Lee JJ, Shen J: **Is the Oncotype DX assay necessary in strongly estrogen receptor-positive breast cancers?** *Am Surg* 2011, **77**(10):1364-1367.
 60. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder ME, Yu J *et al*: **Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer.** *Lancet* 2005, **365**(9460):671-679.
 61. Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A *et al*: **Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer.** *Cancer Cell* 2004, **6**(1):17-32.
 62. Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC: **Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**(1):R7.
 63. Troester MA, Lee MH, Carter M, Fan C, Cowan DW, Perez ER, Pirone JR, Perou CM, Jerry DJ, Schneider SS: **Activation of host wound responses in breast cancer microenvironment.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(22):7020-7028.
 64. Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sorlie T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H *et al*: **Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(10):3738-3743.
 65. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A *et al*: **Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer.** *Nat Med* 2008, **14**(5):518-527.
 66. Li S, Lao J, Chen BP, Li YS, Zhao Y, Chu J, Chen KD, Tsou TC, Peck K, Chien S: **Genomic analysis of smooth muscle cells in 3-dimensional collagen matrix.** *Faseb J* 2003, **17**(1):97-99.
 67. Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ: **HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is**

- dependent strongly on the 3D microenvironment.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **122**(1):35-43.
68. Itoh M, Nelson CM, Myers CA, Bissell MJ: **Rap1 integrates tissue polarity, lumen formation, and tumorigenic potential in human breast epithelial cells.** *Cancer Res* 2007, **67**(10):4759-4766.
69. Li Q, Mullins SR, Sloane BF, Mattingly RR: **p21-Activated kinase 1 coordinates aberrant cell survival and pericellular proteolysis in a three-dimensional culture model for premalignant progression of human breast cancer.** *Neoplasia* 2008, **10**(4):314-329.
70. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR: **Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma.** *Biochemistry* 1982, **21**(24):6188-6193.
71. McCave EJ, Cass CA, Burg KJ, Booth BW: **The normal microenvironment directs mammary gland development.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010, **15**(3):291-299.
72. Briand P, Petersen OW, Van Deurs B: **A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium.** *In Vitro Cell Dev Biol* 1987, **23**(3):181-188.
73. Briand P, Nielsen KV, Madsen MW, Petersen OW: **Trisomy 7p and malignant transformation of human breast epithelial cells following epidermal growth factor withdrawal.** *Cancer Res* 1996, **56**(9):2039-2044.
74. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA: **Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(14):4966-4971.
75. Briand P, Lykkesfeldt AE: **An in vitro model of human breast carcinogenesis: epigenetic aspects.** *Breast Cancer Res Treat* 2001, **65**(2):179-187.
76. Blaschke RJ, Howlett AR, Desprez PY, Petersen OW, Bissell MJ: **Cell differentiation by extracellular matrix components.** *Methods Enzymol* 1994, **245**:535-556.
77. Bauer M, Su G, Beebe DJ, Friedl A: **3D microchannel co-culture: method and biological validation.** *Integr Biol (Camb)* 2010, **2**(7-8):371-378.
78. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J *et al*: **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.** *Genome Biol* 2004, **5**(10):R80.
79. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ *et al*: **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *N Engl J Med* 2002, **347**(25):1999-2009.
80. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
81. Scheler C, Lamer S, Pan Z, Li XP, Salnikow J, Jungblut P: **Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS).** *Electrophoresis* 1998, **19**(6):918-927.
82. McGee SF, Lanigan F, Gilligan E, Groner B: **Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression.** *EMBO Rep* 2006, **7**(11):1084-1088.
83. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS: **Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**(6):753-762.

84. Lopez-Knowles E, Zardawi SJ, McNeil CM, Millar EK, Crea P, Musgrove EA, Sutherland RL, O'Toole SA: **Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**(1):301-309.
85. Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, Bissell MJ: **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**(3):1526-1535.
86. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(6):442-454.
87. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW: **The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.** *J Cell Biol* 2006, **172**(7):973-981.
88. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M: **Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo.** *Cells Tissues Organs* 2007, **185**(1-3):191-203.
89. Alcaraz J, Xu R, Mori H, Nelson CM, Mroue R, Spencer VA, Brownfield D, Radisky DC, Bustamante C, Bissell MJ: **Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia.** *Embo J* 2008, **27**(21):2829-2838.
90. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: **TNM Classification of Malignant Tumours.** *Uicc International Union Against Cancer* 2009, **7th Edition**(Wiley-Blackwell).
91. Remmele W, Stegner HE: **[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue].** *Pathologe* 1987, **8**(3):138-140.
92. Boyd NF, Lockwood GA, Martin LJ, Knight JA, Byng JW, Yaffe MJ, Tritchler DL: **Mammographic densities and breast cancer risk.** *Breast Dis* 1998, **10**(3-4):113-126.
93. Guo YP, Martin LJ, Hanna W, Banerjee D, Miller N, Fishell E, Khokha R, Boyd NF: **Growth factors and stromal matrix proteins associated with mammographic densities.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, **10**(3):243-248.
94. Roeder BA, Kokini K, Sturgis JE, Robinson JP, Voytik-Harbin SL: **Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure.** *J Biomech Eng* 2002, **124**(2):214-222.
95. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D *et al*: **Tensional homeostasis and the malignant phenotype.** *Cancer Cell* 2005, **8**(3):241-254.
96. Wozniak MA, Desai R, Solski PA, Der CJ, Keely PJ: **ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix.** *J Cell Biol* 2003, **163**(3):583-595.
97. Danowski BA: **Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors.** *J Cell Sci* 1989, **93 (Pt 2)**:255-266.
98. Pujuguet P, Simian M, Liaw J, Timpl R, Werb Z, Bissell MJ: **Nidogen-1 regulates laminin-1-dependent mammary-specific gene expression.** *J Cell Sci* 2000, **113 (Pt 5)**:849-858.
99. Eshchenko TY, Rykova VI, Chernakov AE, Sidorov SV, Grigorieva EV: **Expression of different proteoglycans in human breast tumors.** *Biochemistry (Mosc)* 2007, **72**(9):1016-1020.

100. Kelemen LE, Couch FJ, Ahmed S, Dunning AM, Pharoah PD, Easton DF, Fredericksen ZS, Vierkant RA, Pankratz VS, Goode EL *et al*: **Genetic variation in stromal proteins decorin and lumican with breast cancer: investigations in two case-control studies.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**(6):R98.
101. Ishiwata T, Cho K, Kawahara K, Yamamoto T, Fujiwara Y, Uchida E, Tajiri T, Naito Z: **Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer.** *Oncol Rep* 2007, **18**(3):537-543.
102. Leonoudakis D, Singh M, Mohajer R, Mohajer P, Fata JE, Campbell KP, Muschler JL: **Dystroglycan controls signaling of multiple hormones through modulation of STAT5 activity.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 21):3683-3692.
103. Gehler S, Baldassarre M, Lad Y, Leight JL, Wozniak MA, Riching KM, Eliceiri KW, Weaver VM, Calderwood DA, Keely PJ: **Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension.** *Mol Biol Cell* 2009, **20**(14):3224-3238.
104. Spemann H: **Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryonen.** *Zool Jahr Supp* 1918, **15**:1-48.
105. Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS: **The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini.** *Cell* 2002, **111**(1):29-40.
106. Harkin DG, Hay ED: **Effects of electroporation on the tubulin cytoskeleton and directed migration of corneal fibroblasts cultured within collagen matrices.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1996, **35**(4):345-357.
107. Walpita D, Hay E: **Studying actin-dependent processes in tissue culture.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(2):137-141.
108. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM: **Cell interactions with three-dimensional matrices.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**(5):633-639.
109. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA: **Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture.** *Proteomics* 2010, **10**(9):1886-1890.
110. Harris J, Lippman M, Morrow M, Osborne C: **Diseases of the Breast Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins** 1999.
111. Poincloux R, Lizarraga F, Chavrier P: **Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia.** *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 17):3015-3024.
112. Howlett AR, Bailey N, Damsky C, Petersen OW, Bissell MJ: **Cellular growth and survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma.** *J Cell Sci* 1995, **108** (Pt 5):1945-1957.
113. Sadlonova A, Novak Z, Johnson MR, Bowe DB, Gault SR, Page GP, Thottassery JV, Welch DR, Frost AR: **Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(1):R46-59.
114. Su G, Blaine SA, Qiao D, Friedl A: **Shedding of syndecan-1 by stromal fibroblasts stimulates human breast cancer cell proliferation via FGF2 activation.** *J Biol Chem* 2007, **282**(20):14906-14915.
115. Weaver VM, Howlett AR, Langton-Webster B, Petersen OW, Bissell MJ: **The development of a functionally relevant cell culture model of progressive human breast cancer.** *Semin Cancer Biol* 1995, **6**(3):175-184.
116. Krause S, Maffini MV, Soto AM, Sonnenschein C: **The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures.** *BMC Cancer* 2010, **10**:263.
117. Durkin ME, Chakravarti S, Bartos BB, Liu SH, Friedman RL, Chung AE: **Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor.** *J Cell Biol* 1988, **107**(6 Pt 2):2749-2756.

118. Forbes EG, Cronshaw AD, MacBeath JR, Hulmes DJ: **Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix.** *FEBS Lett* 1994, **351**(3):433-436.
119. Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV: **De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(15):7016-7020.
120. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV: **Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.** *J Cell Biol* 1997, **136**(3):729-743.
121. Goldoni S, Seidler DG, Heath J, Fassan M, Baffa R, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV: **An antimetastatic role for decorin in breast cancer.** *Am J Pathol* 2008, **173**(3):844-855.
122. Pogany G, Vogel KG: **The interaction of decorin core protein fragments with type I collagen.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **189**(1):165-172.
123. Kufer TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA: **Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle.** *J Cell Biol* 2002, **158**(4):617-623.
124. Goto GH, Mishra A, Abdulle R, Slaughter CA, Kitagawa K: **Bub1-mediated adaptation of the spindle checkpoint.** *PLoS Genet* 2011, **7**(1):e1001282.
125. Androic I, Kramer A, Yan R, Rodel F, Gatje R, Kaufmann M, Strebhardt K, Yuan J: **Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol.** *BMC Cancer* 2008, **8**:391.
126. Tobin NP, Sims AH, Lundgren KL, Lehn S, Landberg G: **Cyclin D1, Id1 and EMT in breast cancer.** *BMC Cancer* 2011, **11**:417.
127. Singh J, Murata K, Itahana Y, Desprez PY: **Constitutive expression of the Id-1 promoter in human metastatic breast cancer cells is linked with the loss of NF-1/Rb/HDAC-1 transcription repressor complex.** *Oncogene* 2002, **21**(12):1812-1822.
128. Sadi AM, Wang DY, Youngson BJ, Miller N, Boerner S, Done SJ, Leong WL: **Clinical relevance of DNA microarray analyses using archival formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer specimens.** *BMC Cancer* 2011, **11**:253:251-213.
129. Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt F: **Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(5):R788-795.
130. Hu R, Tian C, Meng WJ, Zhang JH, Li L, Zhang PR, Long QM, Tao P: **[The expression and clinical significance of Wnt-1 induced secreted protein-1 in breast carcinoma].** *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010, **41**(2):231-234.
131. Fournier MV, Martin KJ, Kenny PA, Xhaja K, Bosch I, Yaswen P, Bissell MJ: **Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer.** *Cancer Res* 2006, **66**(14):7095-7102.
132. Dai H, van't Veer L, Lamb J, He YD, Mao M, Fine BM, Bernards R, van de Vijver M, Deutsch P, Sachs A *et al*: **A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients.** *Cancer Res* 2005, **65**(10):4059-4066.
133. Khaled W, Reichling S, Bruhns OT, Boese H, Baumann M, Monkman G, Egersdoerfer S, Klein D, Tunayar A, Freimuth H *et al*: **Palpation imaging using a haptic system for virtual reality applications in medicine.** *Stud Health Technol Inform* 2004, **98**:147-153.
134. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Wenginger W *et al*: **Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling.** *Cell* 2009, **139**(5):891-906.

135. Emerman JT, Pitelka DR: **Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes.** *In Vitro* 1977, **13**(5):316-328.
136. Streuli CH, Bissell MJ: **Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum.** *J Cell Biol* 1990, **110**(4):1405-1415.
137. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM: **The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**(5):463-471.
138. Su G, Sung KE, Beebe DJ, Friedl A: **Functional screen of paracrine signals in breast carcinoma fibroblasts.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e46685.
139. Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, Mukherjee S, Duncan VE, Page GP, Frost AR: **Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts.** *Cancer Microenviron* 2009, **2**(1):9-21.
140. Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubitz AP, Roskelley C, Bissell MJ: **Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia.** *J Cell Biol* 1995, **129**(3):591-603.
141. Monticone M, Panfoli I, Ravera S, Puglisi R, Jiang MM, Morello R, Candiani S, Tonachini L, Biticchi R, Fabiano A *et al*: **The nuclear genes *Mtfr1* and *Dufd1* regulate mitochondrial dynamic and cellular respiration.** *J Cell Physiol* 2010, **225**(3):767-776.
142. Schmandt R, Liu SK, McGlade CJ: **Cloning and characterization of mPAL, a novel Shc SH2 domain-binding protein expressed in proliferating cells.** *Oncogene* 1999, **18**(10):1867-1879.
143. Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN *et al*: **A Phase I dose-escalation study of sibtuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(5):1639-1647.

Danksagung

Allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen. Insbesondere bedanke ich mich bei:

Prof. Dr. Thomas Kunze für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu können, die stetige Diskussionsbereitschaft und viele hilfreiche Denkanstöße.

Prof. Dr. Walter Jonat für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel.

Dr. Maret Bauer für die hervorragende Betreuung und immer engagierte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, den motivierenden Beistand in manchmal scheinbar ausweglosen Situationen sowie für viele persönliche Gespräche.

Prof. Dr. Christoph Mundhenke, Prof. Dr. Nicolai Maass und Prof. Dr. Norbert Arnold für die Möglichkeit, die praktischen Arbeiten im Onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel durchführen zu können.

Prof. Dr. Susanne Sebens für die Übernahme des Korreferats sowie zahlreiche sehr hilfreiche Diskussionen und Lösungsvorschläge.

All meinen lieben Laborkollegen für die immer freundliche und familiäre Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft sowie zahlreiche wohlthuende persönliche Gespräche. Für die besondere Unterstützung beim Erlernen von Methoden, die Durchführung zahlreicher Versuche und hilfreiche Diskussionen möchte ich mich insbesondere bei Anna, Frank und Regina bedanken.

Prof. Dr. Andreas Tholey und Dr. Thorsten Overath für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Überstandsanalysen.

Dr. Andreas Klein, Prof. Dr. Heike Pospisil und Christoph Standfuß für die statistischen Analysen der Genchipdaten.

Dr. Robert Häsler und Dorina Oelsner für die Unterstützung bei der Erstellung der Genchips.

Dr. Hans-Heinrich Oberg, Prof. Dr. Sabine Adam und Frau Sandra Ussat für die Möglichkeit der Benutzung der FACS-Geräte sowie die Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen.

Prof. Dr. Dieter Kabelitz für die Möglichkeit, das Laserscanmikroskop nutzen zu können, und Dr. Uwe Bertsch für die Einarbeitung in den Umgang mit dem Laserscanmikroskop.

Den Mitarbeitern der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel, insbesondere bei PD Dr. Felix Hilpert und Dr. Antonia Wenners für Ihre Hilfsbereitschaft.

Den Patientinnen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel, die durch ihre bereitwilligen Spenden von Gewebeproben Teile dieser Forschungsarbeit erst möglich gemacht haben.

Meiner Familie und meinen Freunden für ihre grenzenlose Unterstützung sowie ihr großes Verständnis und ihre Geduld während der Erstellung dieser Arbeit.

Eigene Publikationen

Originalarbeiten

Inke Lühr, Andreas Friedl, Thorsten Overath, Andreas Tholey, Thomas Kunze, Felix Hilpert, Susanne Sebens, Norbert Arnold, Frank Roesel, Hans-Heinrich Oberg, Nicolai Maass, Christoph Mundhenke, Walter Jonat, Maret Bauer: Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. Cancer letters 2012

Inke Lühr, Andreas Klein, Heike Pospisil, Christoph Standfuß, Felix Hilpert, Thomas Kunze, Norbert Arnold, Christoph Mundhenke, Walter Jonat, Maret Bauer: Gene expression signatures induced by stromal factors are a predictor of survival in breast cancer. 2012 (in Bearbeitung)

Anna Maria Römer, Inke Lühr, Andreas Klein, Andreas Friedl, Frank Roesel, Norbert Arnold, Andreas Strauss, Walter Jonat, Maret Bauer: Normal mammary fibroblasts induce reversion of the malignant phenotype in human primary breast cancer. 2012 (unter Begutachtung)

Gieseler F, Lühr I, Kunze T, Mundhenke C, Maass N, Erhart T, Denker M, Beckmann D, Tiemann M, Schulte C, Dohrmann P, Cavallé F, Godeau F, Gespach C: Activated coagulation factors in human malignant effusions and their contribution to cancer cell metastasis and therapy. Thromb Haemost. 2007

Posterpräsentationen/Abstracts

Lühr I, Friedl A, Overath T, Tholey A, Kunze T, Hilpert F, Sebens S, Arnold N, Rösel N, Oberg HH, Maass N, Mundhenke C, Jonat W, Bauer M: Evaluation des Einflusses primärer tumorassoziiierter und normaler Mammafibroblasten auf Wachstum und Morphogenese der gesunden Brustdrüse. Posterpräsentation 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2012

Lühr I, Friedl A, Overath T, Tholey A, Kunze T, Hilpert F, Sebens S, Arnold N, Rösel N, Oberg HH, Maass N, Mundhenke C, Jonat W, Bauer M: Mammafibroblasten regulieren die Morphogenese von normalen und tumorigenen Mammaepithelzellen durch mechanische und parakrine Signale. Posterpräsentation 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2012

Lühr I, Hilpert F, Jonat W, Bauer M: Evaluation des Einflusses primärer tumorassoziierter und normaler Mammafibroblasten auf Wachstum und Morphogenese der gesunden Brustdrüse. Posterpräsentation 128. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfen 2012.

Lühr I, Klein A, Pospisil H, Standfuß C, Hilpert F, Mundhenke C, Kunze T, Jonat W, Bauer M: Stromal induzierte Genexpressionssignaturen als prognostischer Faktor bei Brustkrebs. Posterpräsentation 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2010

Lühr I, Klein A, Pospisil H, Standfuß C, Hilpert F, Mundhenke C, Kunze T, Friedl A, Jonat W, Bauer M: Evaluation of gene expression signatures induced by stromal factors as a predictor of survival in breast cancer. 2010 ASCO Annual Meeting.

Anna Maria Römer, Inke Lühr, Walter Jonat, Maret Bauer: Normale Mammastromafibroblasten induzieren eine Reversion des malignen Phänotyps primärer Mammakarzinomzellen. Posterpräsentation 128. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfen 2012.

Anna Maria Römer, Inke Lühr, Andreas Klein, Andreas Friedl, Frank Roesel, Norbert Arnold, Andreas Strauss, Walter Jonat, Maret Bauer: Reversion des malignen Phänotyps beim Mammakarzinom durch Stromafaktoren. Posterpräsentation 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2010

Vorträge

Normale Mammastromafibroblasten induzieren eine Reversion des malignen Phänotyps primärer Mammakarzinomzellen. 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2012

Tumorinteraktion Stroma – Mammakarzinom. 4. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie 2012

Mammafibroblasten regulieren die Morphogenese von normalen und tumorigenen Mammaepithelzellen durch mechanische und parakrine Signale. 128. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfen 2012 (Bester Vortrag der Session Leuchtfieber des Nordens)

Lebenslauf

Inke Lühr

Ohmstraße 45

24537 Neumünster

E-Mail: inkeluehr@web.de

Geburtsdatum: 19.01.1980

Geburtsort: Lübeck

Nationalität: deutsch

Berufliche Tätigkeiten

seit 01/2008 Wissenschaftliche Angestellte der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe; Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Organisation des Online Mammakarzinom Tumorboards der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe; Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

seit 11/2007 Promotion in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe; Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

10/2005 – 10/2010 Anstellung als Apothekerin; Phönix-Apotheke, Lübeck

01/2007 – 12/2007 Anstellung als Apothekerin; Apotheke Kopperpahl, Kiel

Studium

04/2000 – 05/2004 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

10/2005 – 09/2006 Studium der Diplompharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Schulischer Werdegang

1986 – 1990 Brockeschule Lübeck (Grundschule)

1991 – 1999 Carl-Jakob-Burckhardt-Gymnasium, Lübeck

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit

Einfluss stromaler Faktoren auf die Differenzierung humaner Mammaepithelzellen

nach Inhalt und Form – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – selbstständig von mir erstellt wurde und ihre Inhalte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden sind. Diese Arbeit wurde weder vollständig noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, 13.11.2012

Inke Lühr