

**Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Fehm

**Zusammenhang zwischen BRCA1-Status und RHAMM-Expression in
mammären Epithelzellen und Mammakarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Frozan Sadat

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Markus Fleisch

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Widmung

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei der Frau. Bei ca. 25% besteht eine familiäre Belastung. *BRCA1*-Mutationsträgerinnen haben ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Neben seinen bekannten Funktionen im Rahmen der DNA-Reparatur spielt das Tumorsuppressorgen *BRCA1* eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Zellen der Brustdrüse. Mutationen im *BRCA1*-Gen und die Inaktivierung des *BRCA1*-Proteins führen zur Akkumulation von unreifen Vorläuferzellen und dem typischen undifferenzierten basal-like Phänotyp *BRCA1*-mut Mammakarzinome. Die terminale Differenzierung einer individuellen Zelle und die Zellproliferation setzt eine intakte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und Regulation der Bindung von Mikrotubuli an den Zentrosomen voraus, woran eine Vielzahl sog. Mikrotubulus-assoziiierter Proteine wie z.B. der Hyaluronsäurerezeptor (RHAMM) und sein Hauptaktivator Aurora Kinase (AURKA) beteiligt sind.

Es konnte gezeigt werden, dass eine *BRCA1* abhängige Expression von RHAMM besteht, die bei Degradation von *BRCA1* zum Ungleichgewicht von Differenzierung und Proliferation führt. Der genomische Verlust von *BRCA1* bzw. inaktivierende *BRCA1*-Mutationen führen zu einer Dysregulation der Expression von RHAMM *in vitro* und *in vivo*.

Das Ziel dieser Arbeit ist, den Zusammenhang zwischen *BRCA1*-Status und RHAMM Expression in mammären Epithelzellen und Mammakarzinomen zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke wurde FFPE-Gewebe von differenzierten (*brca1-wt*), triple-negativen sporadischen (*TN-brca1-wt*) und Mammakarzinomen von *BRCA1* Mutationsträgerinnen (*brca1-mut*) immunhistochemisch, MCF-12a (*brca1-wt*), HCC1937 (*brca1-mut*) und HCC1937-Transfektanten (*brca1-wt*) bzw. immunzytologisch bzgl. RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA Expression untersucht. Das Wachstumsverhalten von MCF-12a (*brca1-wt*) und HCC1937 (*brca1-mut*) wurde in einem 3D-Medium untersucht.

Die Expression von RHAMM war stärker in Triple-negativen und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen als in den *BRCA1*-wt Mammakarzinomen. Entsprechend fand sich eine starke pT703-RHAMM Expression in den *BRCA1*-mut und Triple-negativen Mammakarzinomen im Vergleich zu den *BRCA1*-wt Mammakarzinomen. Der RHAMM-Hauptaktivator AURKA zeigte eine schwächere Expression in den *BRCA1*-mut als in den *BRCA1*-wt und Triple-negativen Mammakarzinomen.

pT703-RHAMM zeigte bei den *BRCAl*-wt MCF-12a Zellen eine Lokalisation in den Kernen. In den *brca1*-mut HCC1937 Zellen war eine starke Expression von pT703-RHAMM an der Kernmembran nachweisbar, dagegen war pT703-RHAMM in HCC1937/*brca1*-wt-Transfektanten nukleär lokalisiert.

HCC1937 (*brca1*-mut) Zellen waren im Gegensatz zu den MCF-12a (*brca1*-wt) Zellen nicht in der Lage eine traubenförmige/beerenförmige 3D-Struktur zu entwickeln.

Die HCC1937 Zellen zeigten eine gestörte Differenzierung von für die Brust typische beerenförmige Zell-Cluster der Drüsenendstücke/ Azini. Zudem hatten sie eine doppelthohe Proliferationsrate wie die MCF-12a Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen eine *BRCAl*-abhängige Expression und Lokalisation des RHAMM- und des phosphorylierten RHAMM-Proteins. Sie belegen damit den Einfluss von *BRCAl* auf die Mikrotubulus-assoziierten Prozesse in der Zelldifferenzierung von mammären Epithelzellen und Mammakarzinomen *in vitro* und *in vivo*.

Summary

Breast cancer is the most common malignancy in women worldwide. Approximately 25% of these cases are associated with a familial risk. Breast cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*) mutation carriers have a high risk for breast cancer. Next to its known function as a DNA-damage repair gene *BRCA1* plays an important role in differentiation of mammary epithelial cells. *BRCA1*-mutation and depletion of BRCA1-protein lead to accumulation of progenitor cells and the typical undifferentiated basal-like phenotype of *BRCA1*-mutant breast cancer. Terminal differentiation of an individual cell and cell proliferation require functional cell-cell-contacts and regulation of microtubuli in centrosoms, where a number of microtubuli-associated proteins like hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM) and its activator aurora kinase (AURKA) participate. It has been demonstrated, that RHAMM expression is *BRCA1* dependent, and depletion of BRCA1 can cause an imbalance in differentiation and proliferation.

BRCA1 gene loss or inactivating *BRCA1* mutations lead to dysregulation of RHAMM expression in vitro and in vivo.

This thesis analyses the connection between *BRCA1*-status and RHAMM expression in mammary epithelial cells and breast cancer tissue.

Tumor tissue of triple-negative, sporadic and *BRCA1*-mut breast cancers as well as mammary epithelial cells of (*brca1-wt*) MCF-12a and (*brca1-mut*) HCC1937 cell lines with (*brca1-wt*) HCC1937 transfectants were examined with respect to RHAMM, pT703-RHAMM and AURKA expression by immunochemistry/immunocytology.

Cell growth and morphology of MCF-12a (*brca1-wt*) and HCC1937 (*brca1-mut*) was analyzed in 3D-medium.

RHAMM expression was higher in triple-negative and *BRCA1*-mut than in sporadic breast cancers. In correlation pT703-RHAMM expression was high in tumor tissue of triple-negative and *BRCA1*-mut breast cancer and low in tumor tissues of sporadic breast cancers. AURKA had a lower expression in *BRCA1*-mut tumors than in *BRCA1*-wt or triple-negative breast cancer.

In *brca1-wt* MCF-12a pT703-RHAMM was localised in the cell nucleus.

HCC1937 (*brca1-mut*) cells showed a strong expression of pT703-RHAMM at the nuclear envelope, whereas in *brca1-wt* HCC1937 transfectants pT703-RHAMM was expressed in the nuclei.

In contrast to MCF-12a (*brca1-wt*) cells HCC1937 (*brca1-mut*) cells failed to form a grape-shaped 3D-structure. HCC1937 (*brca1-mut*) cells showed a disturbed differentiation without the typical acini-structure in mammary epithelial cells. In addition the cell division rate/ proliferation was twice as high in HCC1937 (*brca1-mut*) cells as in MCF-12a (*brca1-wt*) cells.

These results show a *brca1*-dependent expression of RHAMM and demonstrate the role of *BRCAl* in the regulation of microtubuli-associated processes during differentiation and proliferation in mammary epithelial cells in vitro and in vivo.

Abkürzungsverzeichnis

ANKLE1	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 1
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
AURKA	Aurora Kinase
BARD1	BRCA1-assozierte Ringdomäne 1
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
BRCA1-mut	Breast Cancer 1 - mutiert
BRCT	BRCA1 C Terminus Domäne
BRIP1	BRCA1 interacting helicase 1
CAMK1D	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase 1D
CASP8	Caspase 8
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
CHICA	Spindelapparat Protein (spanisch für „Mädchen“)
CD168	Cluster of Differentiation 168
CD44	Cluster of Differentiation 44
COX11	Cytochrome C Oxydase 11
cTNM	clinical Tumor/Node/Metastasis
CTX	Chemotherapie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DCIS	Duktales Carcinoma in situ

DAB	Diaminobenzidin
DYNLL1	Dynein light chain 1
EGRF	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Estrogen-Receptor
ESR1	Estrogen Receptor 1
ET	Endokrine Therapie
FAM84B	Family with Sequence Similarity 84 B
c-MYC	„Myelocytomatose“-Gen
FGFR2	Fibroblasten Growth Factor Receptor 2
TUBG1	γ -Tubulin 1
γ-TuRC	γ -Tubulin Ringkomplex
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IRS	Immunreaktiver Score
Ki-67	Proliferationsmarker
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin - Methode
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LSP1	Lymphozyten-spezifisches Protein 1
MAP	Mikrotubulus-assoziiertes Protein
MAP3K1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 1
MERIT40	Mediator of RAP80 Interactions and Targeting subunit of 40 kDa

MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum
OLA1	Obg-like ATPase1
PALB2	Partner and Localizer of BRCA2
PARP-Inhibitor	Poly (ADP-ribose) Polymerase - Inhibitor
PBS	Phosphat buffered saline/ Phosphat gepufferte Salzlösung
PCM	Perizentrioläre Matrix
PLK1	Polo-like Kinase 1
PP	Positivpopulation
PR	Progesteron Receptor
pT703-RHAMM	phosphoryliertes RHAMM
PTEN	Phosphatase and Tensin – Syndrom/ Cowden-Syndrom
pTNM	pathological Tumor/Node/Metastasis
RACK1	Rezeptor for Activated C Kinase 1
RAD51	DNA Repair Protein Homolog 1
RAD51C	RAD51 Homolog C
Ran-GTP	Ras-related nuclear protein - Guanosintriphosphat
RHAMM	Hyaloronan Mediated Motility Receptor
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
SI	Staining Intensitiy

STK11/LKB1	Serin-Threonin Kinase 11/ Leberkinase B1
TDLE	Terminalduktutulus-Lobulus Einheit
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TOX3	Thymocyte selection-associated high mobility group box protein 3
TP53	Tumorsuppressor Protein 53
TPX2	Targeting Protein for Xklp2
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
XKlp2	Xenopus Kinesin-like protein 2
yTNM	nach Chemotherapie TNM

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.3	Pathologie.....	2
1.4	Einteilung und Klassifikation des Mammakarzinoms.....	5
1.4.1	Triple-negatives Mammakarzinom (TNBC).....	7
1.4.2	Hereditäres Mammakarzinom.....	9
1.5	<i>BRCA1</i> -Mutation.....	10
1.5.1	Molekulare Grundlagen und Funktion von <i>BRCA1</i>	10
1.5.2	<i>BRCA1</i> -Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Proliferation.....	11
1.6	Rolle von Zentrosomen und Mikrotubuli während der Zellteilung.....	13
1.7	Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP).....	15
1.7.1	Hyaluronsäure-Rezeptor - RHAMM.....	16
1.7.2	Interaktionen zwischen RHAMM, TPX2 und AURKA.....	17
1.8	Zusammenhang zwischen <i>BRCA1</i> und RHAMM.....	18
1.9	Ziele der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Immunhistochemie.....	22
2.2	Zellkulturen.....	26
2.3	Zellkultur in 3D-Medium (Matrigel™).....	30
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Ergebnisse der Immunhistochemie (Gewebe).....	32
3.1.1	Ergebnisse <i>BRCA1</i> -wt Mammakarzinom.....	32
3.1.2	Ergebnisse <i>BRCA1</i> -mut Mammakarzinom.....	37
3.1.3	Ergebnisse Triple- negatives Mammakarzinom (TNBC).....	42
3.1.4	Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit dem Chi-Quadrat-Test.....	47
3.2	Ergebnisse der Immunzytologie (Zelllinien).....	53

3.2.1	Lokalisation der RHAMM-, pT703-RHAMM- und AURKA-Expression in <i>BRCAl</i> -wt mammären Epithelzellen am Beispiel der MCF-12a Zelllinie.....	54
3.2.2	Differentielle Lokalisation der pT703-RHAMM-Expression in <i>BRCAl</i> -mut mammären Epithelzellen am Beispiel der HCC1937 Zelllinie	56
3.3	Ergebnisse der 3D-Zellkultur	60
3.3.1	MCF-12a Zellen.....	60
3.3.2	HCC1937 Zellen.....	62
3.4	Zusammenfassung ex-vivo Ergebnisse	63
3.5	Zusammenfassung in-vitro Ergebnisse	64
4	Diskussion.....	67
5	Literaturverzeichnis	76
6	Anhang.....	83
	Abbildungsverzeichnis.....	84
	Tabellenverzeichnis	86
7	Danksagung	87

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die weltweit häufigste Krebserkrankung sowie die häufigste krebsbedingte Todesursache bei der Frau. 2018 sind weltweit 627.000 Frauen an Brustkrebs verstorben. Die Inzidenz ist in den Industriestaaten höher, in den Entwicklungsländern überwiegt die Mortalität (Ghoncheh, Pournamdar, & Salehiniya, 2016).

In Deutschland lag 2018 die Anzahl der Neuerkrankungen bei 71.888 Fällen (WHO). Nach dem Robert-Koch-Institut erkrankt ca. jede achte Frau zeitlebens an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter der Frau liegt bei 64 Jahren. Pro Jahr sterben ca. 18.000 Frauen an Brustkrebs. Männer erkranken sehr selten an Brustkrebs. Unter 1 % der Neuerkrankungen betrifft Männer. Aufgrund von Früherkennungsprogrammen und Fortschritte in der Therapie sind die Überlebenschancen verbessert (Bleyer & Welch, 2012). Die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland beträgt 87% (RKI).

1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist komplex. Die Mehrheit der Mammakarzinome entsteht sporadisch. Eine familiäre Belastung besteht bei ca. 25% der Mammakarzinome (Sun et al., 2017). Davon sind bei ca. 5-10% eine Genmutation nachzuweisen (hereditäres Mammakarzinom) (Rojas & Stuckey, 2016).

Es sind eine Reihe von Risikofaktoren für das Mammakarzinom bekannt. Die wichtigsten Faktoren sind das weibliche Geschlecht und zunehmendes Alter. Die Brust ist ein hormonsensibles Organ, 2/3 der Mammakarzinome sind hormonrezeptor-positive Tumoren. Somit besteht ein erhöhtes Krebsrisiko bei längerer Fertilität, also bei früher Menarche und später Menopause, Nulliparität sowie höheres Alter (>30J) bei Geburt des ersten Kindes mit keiner bzw. kurzer Stillperiode. Protektiv wirkt eine Stillperiode von mind. 12 Monaten insbesondere bei triple-negativen Mammakarzinomen (Anderson, Schwab, & Martinez, 2014).

Eine langjährige Einnahme von kombinierten oralen Kontrazeptiva sowie postmenopausale Hormontherapie erhöht das Brustkrebsrisiko, aber nicht das Risiko an Brustkrebs zu versterben (Beral, 2003; Chlebowski et al., 2015; Rojas & Stuckey, 2016). Zudem zählen Lifestyle-Faktoren wie mangelnde Bewegung, Übergewicht (BMI > 25, besonders BMI > 40), Alkohol und Nikotinabusus zu den Risikofaktoren (Rojas & Stuckey, 2016; Tamimi et al., 2016).

Höheres Alter	Familiäre Krebsanamnese
Genetisches Risiko	Mütterliche Schwangerschaftsfaktoren
Anzahl der Menstruationszyklen (frühe Menarche, späte Menopause)	Geringe Geburtenzahl, keine Schwangerschaften, höheres Alter bei erster Geburt
Persönliche Brustanamnese	Keine/ kurze Stillperiode
Brustdichte	Schlafmangel
Thoraxbestrahlung	Verminderte körperliche Aktivität
Typ II Diabetes mellitus	Endokrine Disruptoren während fetaler und frühkindlicher Entwicklung
Hyperthyreose	Kanzerogene Substanzen
Postmenopausaler BMI < 18,5 oder > 25, besonders > 40 (Adipositas)	Ionisierende Strahlung
Nahrungszusammensetzung	Alkoholkonsum
Hormontherapie	Nikotinabusus

Tabelle 1: Risiken für Brustkrebs nach AGO Mamma, Guidelines Breast Version 2022.1D

1.3 Pathologie

Die Brustdrüse besteht aus in Fett- und Bindegewebe eingebettete Drüsenlappen (Lobi). Diese bestehen aus ungefähr 10-20 Drüsenläppchen (Lobuli) die in einen Milchgang münden (terminale ductulo-lobuläre Einheit = TDLE). Die Milchgänge (Ductuli lactiferi) münden wiederum in die Mamille. Sowohl die Milchgänge als auch die Drüsenläppchen bestehen aus epithelialen Brustzellen mit einer inneren luminalen Schicht umgeben von Myoepithelzellen einer äußeren Basalschicht. Zudem enthält die Brust Blut- und

Lymphgefäße, Lymphknoten und Nerven. Das Mammakarzinom geht zu 85-90 % aus dem Epithel der Ductuli oder terminalen Ductuli aus. Ist die Basalmembran noch erhalten, wird es als duktales Carcinoma in situ (DCIS) definiert. Bei Infiltration des umliegenden Gewebes liegt ein invasives duktales Karzinom vor. 10-15 % der Karzinome gehen vom Epithel der Lobuli aus. Die Vorstufe ist das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS), bei Stromainvasion besteht ein invasives lobuläres Karzinom.

Das Mammakarzinom kommt meist einseitig und bevorzugt in der linken Brust vor (links 53 %, rechts 47 %). Die Einteilung nach Lokalisation erfolgt in vier Quadranten. Das Mammakarzinom findet sich am häufigsten im oberen äußeren Quadranten (ca. 55 %). Gefolgt vom oberen inneren Quadranten (15 %) und retromamillär (15 %). Zu 10 % befindet sich das Karzinom im unteren äußeren Quadranten und zu 5 % im unteren inneren Quadranten. Der Begriff „multizentrische Wachstum“ (5-25 %) beschreibt ein Mammakarzinom, das 2 oder mehr Quadranten überschreitet. Beim multifokalen Wachstum befinden sich 2 oder mehr Herdbefunde in einem Quadranten. Ca. 1-3 % der Mammakarzinome kommen primär bilateral vor. Eine Metastasierung erfolgt meist frühzeitig über Lymph- und Blutbahnen und korreliert mit der Tumorgöße (bei einem 5 mm Carcinom besteht in 8 % und bei einem 30 mm Carcinom in 50 % eine Fernmetastasierung) (Sopik & Narod, 2018). Die lymphogene Metastasierung erfolgt in die regionären Lymphknoten in der Axilla, die hämatogene Metastasierung erfolgt ossär (35 %), pulmonal und pleural (20 %), gemischt (20 %), cerebral, viszeral (meist hepatisch 5 %), seltener ovariell.

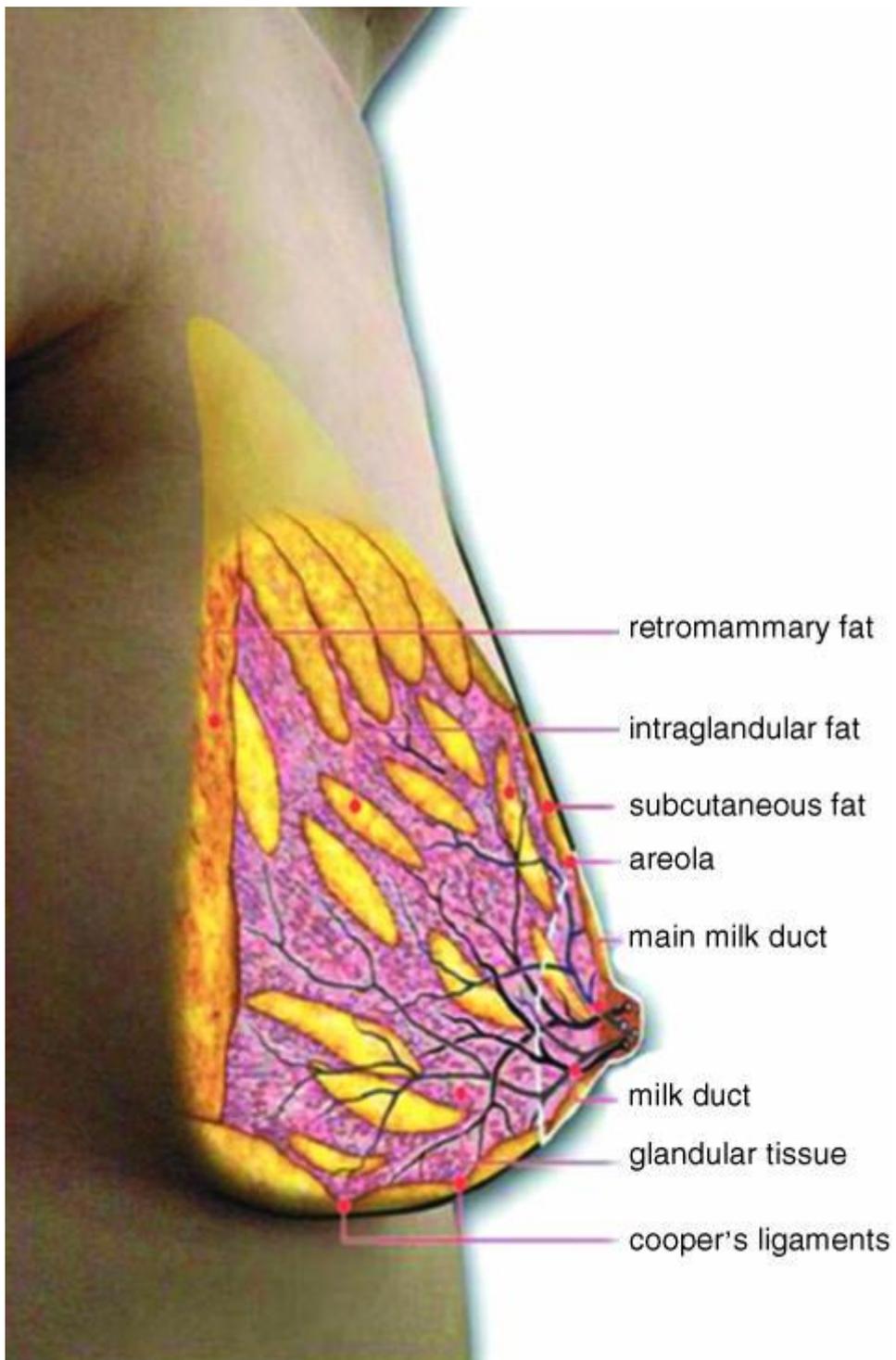


Abb. 1: Zeichnung einer weiblichen Brust (Ramsay et al, 2005), Lizenznummer: 5304971185759

1.4

Einteilung und Klassifikation des Mammakarzinoms

Die Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt einerseits nach Größe des Tumors mit lokaler Ausdehnung, Lymphknotenbefall und Metastasen und andererseits nach histopathologischer Tumorbiologie.

Histologischer Malignitätsgrad der Mammakarzinome nach Elston und Ellis

Das histologische Grading von Bloom-Richardson modifiziert nach Elston und Ellis (Tabelle 1) erfolgt nach Anteil der tubulären Strukturen, nach Kernpolymorphien und Mitosezahl in drei Differenzierungsgrade (G1 – G3).

Tubuläre Strukturen	➤ 75 %	10 – 75 %	< 10 %
Kernpolymorphie	gering	mittelgradig	hochgradig
Mitosezahl (HPF)*	≤ 1 HPF	2/HPF	≥ 3/HPF
Punktzahl	1	2	3

Tabelle 2: Histologischer Malignitätsgrad

G 1 (3-5 Punkte): gut differenziert, geringer Malignitätsgrad

G 2 (6-7 Punkte): mäßig differenziert, mäßiger Malignitätsgrad

G 3 (8-9 Punkte): schlecht differenziert, hoher Malignitätsgrad

(*HPF: High Power Field (Hauptgesichtsfeld))

WHO- Klassifikation des Mammakarzinoms

I) nicht invasiv:

- duktales Carcinoma in situ (DCIS)
- lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)

II) invasiv:

- invasiv duktales Karzinom
- invasiv lobuläres Carcinom
- muzinöses Karzinom
- medulläres Karzinom

- papilläres Karzinom
- tubuläres Karzinom
- adenoid-zystisches Karzinom
- sekretorisches Karzinom
- apokrines Karzinom
- Karzinom mit Metaplasie (squamöser Typ, Spindelzelltyp, kartilaginärer und ossärer Typ, gemischt Typ)
- Andere (inflammatorisches Mammakarzinom)

III) Morbus Paget

Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach dem TNM-System

Das TNM-System wurde von Pierre Denoix 1946 zur Klassifizierung von malignen Tumoren eingeführt und wird seit 1950 von der *Union for International Cancer Control* (UICC) weitergeführt und aktualisiert. Es findet eine Kategorisierung des Primärtumors (T), des Lymphknotenstatus (N) und der Metastasierung (M) statt.

Die klinische Klassifikation wird mit cTNM angegeben, die postoperative histopathologische Klassifikation mit pTNM und die Klassifikation nach neoadjuvanter Therapie mit yTNM.

Einteilung des Mammakarzinoms nach der Tumorbiologie (St.-Gallen-Klassifikation)

Der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor), der HER2-Status und der Proliferationsfaktor Ki-67 gehören zu den wichtigsten prädiktiven Markern. Sie werden immunhistochemisch ermittelt. Anhand dieser Tumorbiologie findet eine Einteilung in Subtypen mit unterschiedlichen Risiken statt. Hieraus kann die (neo-) adjuvante systemische Therapieempfehlung abgeleitet werden.

Luminal A: Hormonrezeptor positiv (Östrogen- und/ oder Progesteronrezeptor), HER2 negativ mit niedrigem Ki-67. Luminal A Karzinome sind gut differenziert mit einem langsamen Wachstum und haben die beste Prognose.

Luminal B: Hormonrezeptor positiv (Östrogen- und/ oder Progesteronrezeptor), HER2-negativ oder HER2-positiv, mit hohem Ki-67.

HER2-positiv: Hormonrezeptor negativ (Östrogen- und Progesteronrezeptor), HER2 positiv mit niedrigem oder hohem Ki-67. Dieser Subtyp hat eine schlechtere Prognose als die Luminal Karzinome, hat aber gute systemische Therapiemöglichkeiten mit einer Anti-HER2-Therapie z.B. mit Herceptin (Trastuzumab).

Basal-like/ Triple-negativ: Hormonrezeptor negativ (Östrogen- und Progesteronrezeptor), HER2-negativ mit niedrigem oder hohem Ki-67 (Tabelle 2).

Triple-negative Karzinome kommen gehäuft bei jungen Frauen mit einer *BRCA1*-Mutation vor (Prat et al., 2015).

Subtypen	ER und/oder PR	HER2	Ki-67	Therapie
Luminal A	positiv	negativ	niedrig (<14%)	ET
Luminal B (HER2-negativ)	positiv	negativ	hoch (>14%)	ET mit/ohne CTX
Luminal B (HER2-positiv)	positiv	positiv	hoch oder niedrig	CTX + Trastuzumab + ET
HER2-positiv (non-luminal)	negativ	positiv	jeder Wert	CTX + Trastuzumab
Basal-like/ Triple-negativ	negativ	negativ	jeder Wert	CTX

Tabelle 3: St.-Gallen-Konsensus 2011, ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, HER2 = human epidermal growth factor receptor 2, ET = Endokrine Therapie, CTX = Chemotherapie

1.4.1 Triple-negatives Mammakarzinom (TNBC)

Das triple-negative Mammakarzinom ist definiert durch das Fehlen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie eine mangelnde Expression des Wachstumsfaktor-Rezeptors HER2.

Häufig werden die Begriffe basaler Typ und triple-negatives Mammakarzinom synonym verwendet. Jedoch gibt es eine genaue Abgrenzung anhand der Untersuchungstechnik. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen kann der molekulare Phänotyp eines Tumors als „basal-like“ klassifiziert werden. Wohin gegen die Klassifizierung des triple-negativen Mammakarzinoms sich auf immunhistochemische Untersuchungen stützt.

Das „basal-like“ und das triple-negative Mammakarzinom überschneiden sich zum großen Teil. Nach einer Studie von Bertucci et al zeigten sich ca 71% der triple-negativen Mammakarzinome vom basalen Typ. Andersherum können aber basal-like Mammakarzinome auch Hormonrezeptor-positive Eigenschaften aufweisen und sind somit nicht triple-negativ (Bertucci et al., 2008).

10-20% aller Mammakarzinome sind vom triple-negativen Subtyp. Das mittlere Erkrankungsalter ist mit 57 Jahren kleiner als beim Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom. Häufiger sind Frauen afroamerikanischer Abstammung davon betroffen (Bernstein & Lacey, 2011). Protektiv wirkt eine Stillperiode über mindestens 12 Monaten (Anderson et al., 2014). Das triple-negative Mammakarzinom betrifft meist junge Frauen, hat einen hohen Malignitätsgrad (G3), eine hohe Rezidivrate und zeigt eine frühe Metastasierung (Kumar & Aggarwal, 2016). Das TNBC hat eine hohe Proliferationsrate und die Gesamtüberlebensrate ist niedriger als beim sporadischen hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom (Nishimura & Arima, 2008; Stevens et al., 2012).

Triple-negative Mammakarzinome kommen bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gehäuft vor. Einige Studien zeigen, dass bis zu 90% der *BRCA1*-mut Mammakarzinome triple-negativ sind (Mersin, Yildirim, Berberoglu, & Gülben, 2008). Jedoch sind ungefähr nur 15 % der triple-negativen Mammakarzinome *BRCA1/2* assoziiert. Es wird vermutet, dass eine familiäre Disposition bei einem großen Anteil der TNBC vorhanden ist, die ähnlich wie bei einem *BRCA*-Gendefekt zur Krebsentstehung führen kann. Es werden Untersuchungen zur Überprüfung der „*BRCAness*“ von triple-negativen Mammakarzinomen durchgeführt. Unter anderem für therapeutische Zwecke mit z.B. PARP-Inhibitoren, die bei *BRCA*-Mutationsträgerinnen mittlerweile ein wichtiger Aspekt der Therapie sind (Domagala, Hybiak, Cybulski, & Lubinski, 2017).

1.4.2 Hereditäres Mammakarzinom

Bei ca. 25% aller Mammakarzinome liegt eine familiäre Belastung vor. Besteht eine familiäre Risikokonstellation kann eine Genanalyse durchgeführt werden. Bei bis zu 5-10% aller Mammakarzinome kann eine Genmutation nachgewiesen werden (Cipollini et al., 2004). Die Mehrheit dieser hereditären Mammakarzinome ist durch eine Mutation in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* (breast cancer gene 1) und *BRCA2* (breast cancer gene 2) bedingt (Rojas & Stuckey, 2016). Frauen mit einer *BRCA1*-Mutation haben ein Risiko von 60% und Frauen mit einer *BRCA2*-Mutation von 55% bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken (Mavaddat et al., 2013) und ein Lebenszeitrisiko von 87% (Atchley et al., 2008; Kuchenbaecker et al., 2017). Sie haben auch ein höheres Risiko für ein Rezidiv, ein Ovarialkarzinom oder ein kontralaterales Mammakarzinom (Easton, Ford, & Bishop, 1995). Als weiteres Brustkrebs-Risikogen wurde das Tumorsuppressorgen *RAD51C* entdeckt (Meindl et al., 2010). Für die Entstehung hereditärer Mammakarzinome sind noch andere Gene unterschiedlicher Penetranz prädisponierend wie z.B. das *TP53*- (Li-Fraumeni-Syndrom), das *ATM*- (Ataxia-Telangiektasia-Syndrom) oder das *PTEN*-Gen (Cowden-Syndrom) (Tabelle 3).

Risikogene	Risiko-modifikation	Gene/Syndrome
Hoch penetrante Gene	5-20fach	<i>BRCA1/2, RAD51C</i> : Hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom <i>TP53</i> : Li-Fraumeni-Syndrom <i>STK11/LKB1</i> : Peutz-Jeghers-Syndrom <i>PTEN</i> : Cowden-Syndrom
Moderat penetrante Gene	1,5-5fach	<i>CHEK2, PALB2, BRIP1, ATM</i>
Niedrig penetrante Gene	0,7-1,5fach	<i>FGFR2, TOX3, MAP3K1, CAMK1D, SNRPB, FAM84B/c-MYC, COX11, LSP1, CASP8, ESRI, ANKLE1, MERIT40, u.a.</i>

Tabelle 4: Risikomodifikation durch Brustkrebsgene Meindl, 2011

1.5 *BRCA1*-Mutation

Die Vererbung der *BRCA*-Mutationen folgt einem autosomal-dominanten Erbgang mit hoher Penetranz. Für Nachkommen besteht ein Risiko von 50% die Mutation zu erben. Bei zwei Allelen des Tumorsuppressorgens einer Zelle reicht ein Allel aus, um die Funktion des Gens zu erhalten. Kommt es nun zum Funktionsverlust des zweiten Allels („loss of heterozygosity“), den Knudson et al 1971 zur Studie des Retinoblastoms in der „second hit“ Theorie beschreibt, führt das zur Geninaktivierung. Unterschiedliche Ursachen wie Lebensführung, Umwelteinflüsse, Strahlung oder toxische Schäden können für einen „second hit“ verantwortlich sein (Levy-Lahad & Plon, 2003). Kennzeichnend für die Keimbahnmutation des *BRCA1*-Gens ist ein frühes Erkrankungsalter, bilaterales Mammakarzinom, eine vertikale Ausbreitung durch maternale oder paternale Linie, das Mammakarzinom beim Mann sowie Assoziation mit Tumoren der Eierstöcke, des Dickdarms, der Leber, der Bauchspeicheldrüse und der Gebärmutter (Cipollini et al., 2004). Neuere Studien zeigen bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen auch einen Antizipationseffekt, bei dem das mittlere Erkrankungsalter von Generation zu Generation abnimmt (Litton et al., 2012; Martinez-Delgado et al., 2011). Zur Bestimmung der Prävalenz von *BRCA*-Mutationen wurden Daten aus dem Deutschen Konsortium für Brust- und Eierstockkrebs ausgewertet. In 21.401 Familien wurden in 24% *BRCA1/2*-Mutationen nachgewiesen (Kast et al., 2016). Histopathologisch sind *BRCA1*-mut Mammakarzinome meist duktal-invasive Karzinome mit einem hohen Malignitätsgrad (G3) und hohem Proliferationsmarker sowie triple-negativem (Hormonrezeptor-negativ) Phänotyp.

1.5.1 Molekulare Grundlagen und Funktion von *BRCA1*

Das *BRCA1*-Gen liegt auf Chromosom 17q21, besteht aus 24 Exons und einer Länge von 100kb und kodiert für ein aus 1863 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Gewicht von 210 kD (Miki et al., 1994). Das Genprodukt, *BRCA1*, ist ein 7,8 kb großes Polypeptid, das in zahlreichen proliferierenden Geweben v.a. in der G1- und S-Phase exprimiert wird (Rajan, Wang, Marquis, & Chodosh, 1996). Am Amino-Ende besitzt *BRCA1* eine Zink-bindende RING-Finger Domäne, die an Ubiquitinierungen beteiligt ist (Hashizume et al., 2001). Über diese Domäne werden Protein-Protein- und Protein-DNA-

Interaktionen gesteuert (Cipollini et al., 2004). Eine Mutation in diesem Bereich führt zur Störung der Ubiquitin-Ligase-Aktivität und kann krankheitsfördernd sein (Ruffner, Joazeiro, Hemmati, Hunter, & Verma, 2001). Am Carboxylende verfügt BRCA1 über zwei BRCA1-C-terminale Domänen (BRCT). Diese Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der Transkription und DNA-Reparatur (Glover, Williams, & Lee, 2004).

Als Tumorsuppressor verhindert BRCA1 eine unkontrollierte Zellproliferation und Tumorwachstum (Miki et al., 1994). Weitere Funktionen von BRCA1 sind die eines Sensors für DNA-Schäden, DNA-Reparatur und Induktion von Apoptose (Venkitaraman, 2009). Bei DNA-Schäden werden zunächst Reparaturvorgänge eingeleitet. Dazu bildet BRCA1 Komplexe mit anderen Proteinen bzw. interagiert über komplexe Signalwege z.B. RAD51 und BARD1 (Cousineau, Abaji, & Belmaaza, 2005; Hashizume et al., 2001). Bekannte Reparaturmechanismen zur Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen sind homologe Rekombination und nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung (Chapman, Taylor, & Boulton, 2012). Eine Mutation im *BRCA1*-Gen ist mit einem Ausfall der o.g. Funktionen und einem hohen Risiko für Krebsentstehung verbunden.

Neuere Studien haben ergeben, dass BRCA1 neben der wichtigen Funktion der Transkription und DNA-Reparatur auch an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist. In dieser Arbeit geht es um den Einfluss von BRCA1 auf den Zellzyklus und um die Interaktion mit dem Mikrotubulusapparat-assoziierten Protein RHAMM im Rahmen der Zellteilung.

1.5.2 BRCA1-Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Proliferation

Die menschliche Brustdrüse enthält Stammzellen, die fortlaufend durch Zellproliferation und Differenzierung lumbale und basale/myoepitheliale Vorläuferzellen und schließlich terminale mamäre Epithelzellen bilden (Shackleton et al., 2006).

Die Brustdrüse besteht im Wesentlichen aus zwei Zelltypen. Die Alveolen (ER-negativ) und Ductuli (ER positiv, ER-negativ) entstammen beide aus luminalen Vorläuferzellen und bilden die innere lumbale Schicht. Myoepithelzellen bilden die äußere basale Schicht und entstammen aus basale Vorläuferzellen (Sleeman, Kendrick, Ashworth, Isacke, & Smalley, 2006).

Um die typische Struktur und Funktion der Brustdrüse zu erhalten, weisen die inneren luminalen Zellen eine apiko-basale Zellpolarität auf (Maxwell et al., 2011).

Die Zell-Zell-Kontakte werden durch „tight junctions“, „adherens junction“ und unterstützend durch Zytoskelettstrukturen wie Aktin und Intermediärfilamenten geformt. Sowohl bei der apikalen Polarität der Zellen als auch bei den Zell-Zell-Kontakten haben Mikrotubuli eine wichtige Rolle (Meng, Mushika, Ichii, & Takeichi, 2008).

Diese apiko-basale Polarität der luminalen Epithelzellen ist für die Zellproliferation in der Brustdrüse von Bedeutung. Eine Störung ist mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert (Maxwell et al., 2011).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass sich der typische ER-negative, „basal-like“ Phänotyp des *BRCA1*-mut Mammakarzinoms aus luminalen Vorläuferzellen entwickelt und nicht wie vorher angenommen aus basalen Progenitorzellen (Molyneux & Smalley, 2011).

Diese Eigenschaften (basal-like, ER-negativ) des Mammakarzinoms bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen lässt vermuten, dass der *BRCA1*-Status Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung in der Brustdrüse hat.

Rajan untersuchte die BRCA1 und BRCA2 Expression während des Zellzyklus. Er konnte durch mRNA-Analysen und Western Blots eine erhöhte, mit BRCA1 koordinierte BRCA2 Expression insbesondere in der G1/S-Phase des Zellzyklus nachweisen. Er stellte die These, dass BRCA1 und BRCA2 eine Funktion bei der Regulierung des Zellzyklus haben (Rajan et al., 1996).

Der richtige Ablauf des Zellzyklus und damit der Zellteilung ist für die Differenzierung und Proliferation der Zellen von großer Bedeutung. Eine Studie mit nicht malignen Brustzellen (MCF10) zeigte nach Ausschalten des *BRCA1*-Gens eine Abnahme differenzierter Zellen und Zunahme der Zellproliferation mit Anhäufung von luminalen epithelialen Vorläuferzellen. BRCA1 scheint damit die Zelldifferenzierung zu kontrollieren. Bei einer *BRCA1*-Mutation kommt es zur vermehrten Zellproliferation undifferenzierter Zellen und folglich erhöhtem Risiko für Brustkrebs (Furuta et al., 2005).

Dem entsprechend konnte auch Lim eine Abnahme differenzierter Zellen mit Zunahme proliferierender luminaler Vorläuferzellen bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen feststellen (Lim et al., 2009).

Weitere Studien untersuchten die Funktion des BRCA1-Proteins auf zellulärer Ebene. Der heterodimere Komplex BRCA1/BARD1 ist an der Regulation von Zentrosomen involviert, die bei der Bildung des Spindelapparats eine entscheidende Rolle spielen (Takaoka & Miki, 2018). Dazu bindet BRCA1/BARD1 an ein Zentrosom und

ubiquitiniert Zentrosomproteine wie OLA1 (Obg-like ATPase1) und RACK1 (rezeptor for activated C kinase) mithilfe der E3 Ubiquitin Ligase und reguliert darüber den Zellzyklus (Otsuka, Yoshino, Qi, & Chiba, 2020).

Maxwell untersuchte die Interaktionen zwischen BRCA1 und dem Mikrotubulus-assoziierten Protein (MAP) RHAMM und dessen Hauptaktivator Aurora Kinase A (AURKA) (Maxwell et al., 2011). BRCA1 scheint über Regulation von RHAMM und AURKA einen Einfluss auf die Mitose und damit dem Zellzyklus zu haben (Maxwell, McCarthy, & Turley, 2008).

1.6 Rolle von Zentrosomen und Mikrotubuli während der Zellteilung

Das Zentrosom ist ein wichtiger Bestandteil des Mikrotubulus-Organisationszentrums (MTOC). Es hat zwei Zentriolen (Mutter- und Tochterzentriolen) und ist umgeben von einer Perizentriolen-Matrix (PCM) mit γ -Tubulin Ringkomplexen (γ -TuRCs), die zur Verankerung, Stabilisierung und Positionierung der Mikrotubuli dienen (Otsuka et al., 2020). Mikrotubuli sind Proteinkomplexe. Sie bestehen aus Einheiten mit einem α -Tubulin (minus Ende) und einem β -Tubulin (plus Ende). Die Mikrotubuli sind über ein γ -Tubulin gebunden und Teil des Mikrotubulus-Organisationszentrums (MTOC). Sie bilden zusammen mit den Mikro- und Intermediärfilamenten das Zytoskelett der Zelle. Das Zytoskelett ist sowohl für die Stabilisierung als auch für Zellbewegung und Transporte innerhalb der Zelle zuständig. Die Mikrotubuli sind radiär ausgerichtet mit dem minus-Ende am Zentrosom verankert und dem plus-Ende Richtung Zellperipherie. Zudem sind auch nicht am Zentrosom-gebundene Mikrotubuli in terminal differenzierten Epithelzellen beschrieben (Bartolini & Gundersen, 2006). Diese Mikrotubuli scheinen entsprechend einer apiko-basalen Achse aufgestellt zu sein mit dem minus-Ende nach apikal und dem plus-Ende Richtung basal. In polarisierten Epithelzellen spielen die Organisation und apiko-basale Ausrichtung der Mikrotubuli eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Kontakten (Meng et al., 2008).

In der G1/S Phase befindet sich ein singuläres Zentrosom in der Nähe des Zellkerns.

Abbildung 1 stellt den Zentrosom-Zyklus dar. Vor der Zellteilung verdoppelt sich das Zentrosom. Dabei trennen sich Mutter- und Tochterzentriole. In der S Phase wird zu jeder dieser Zentriolen perpendikulär eine Prozentriole gebildet. In der S bis G2 Phase

wachsen diese Prozentriolen zu neuen Tochterzentriolen. Hierbei nimmt auch die Perizentriole Matrix zu. Am Ende der G2 Phase trennt sich das Zentrosom mit nun je einer Mutter- und Tochterzentriole umgeben von Perizentrioler Matrix (Fujita, Yoshino, & Chiba, 2016).

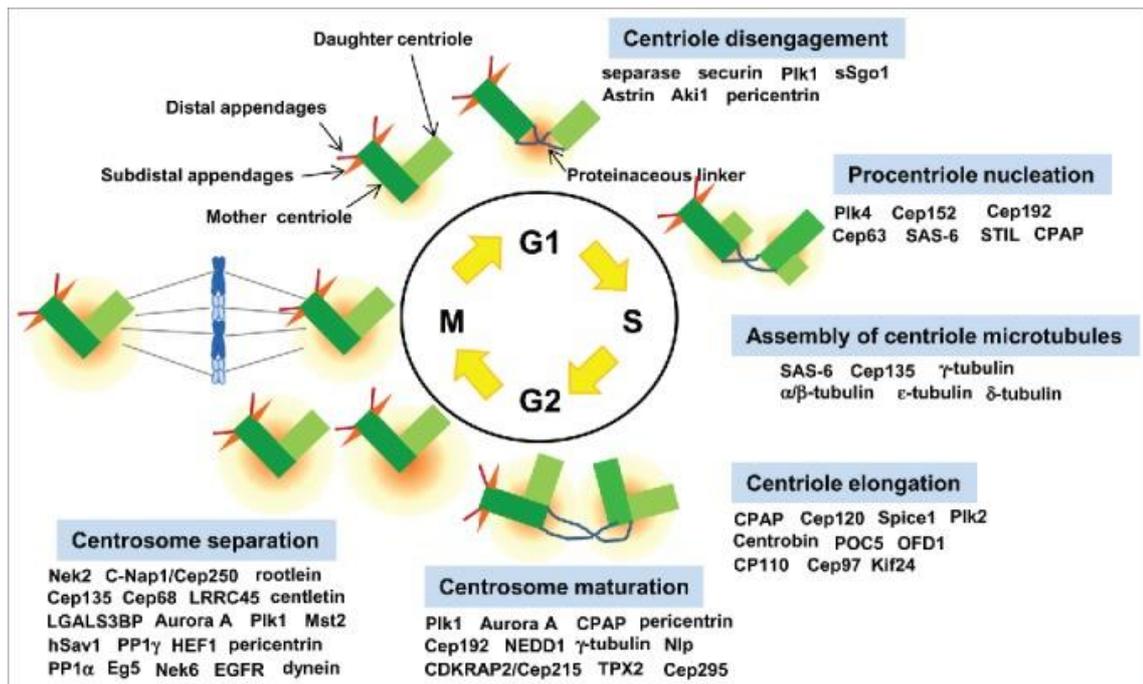


Abb. 2: Zentrosom Zyklus entnommen aus Regulation of centrosom cycle, Fujita et al., 2016:

Centriole disengagement: Mutter – und Tochterzentriole trennen sich

Procentriole nucleation: Prozentriolen binden sich am proximalen Ende der Mutterzentriole

Assembly of centriole microtubules/ centriole elongation: Prozentriole wachsen zu Tochterzentriolen heran

Centrosome maturation: Heranreifung der Zentrosomen und Zunahme der Perizentriolen Matrix (PCM)

Centrosome separation: Zentrosomtrennung/ Teilung und Bildung des bipolaren Spindelapparats

(Fujita et al., 2016), DOI: 10.1080/23723556.2015.1075643

Während der Mitose wandern die Zentrosomen an die Pole der Zelle und bilden den Mikrotubulus-basierenden Spindelapparat. Die Mikrotubuli, die sternförmig um die Zentrosomen angeordnet sind werden auch Aster-Mikrotubuli genannt. Die Mitose beschreibt den Prozess der Kernteilung und ist aufgeteilt in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Während der Prophase wird die DNA im Zellkern zu Chromosomen kondensiert. Die Kernhülle löst sich auf. Die bipolaren Zentrosome

bilden den Spindelapparat. Die Chromosomen organisieren sich in der Prometaphase in Richtung Zellmitte/Äquatorialachse. In der Metaphase werden die Chromosomen in der Äquatorialachse der Zelle durch den Spindelapparat aufgefangen. In der Anaphase sorgen Kinetochore-Mikrotubuli für eine genaue Aufteilung der DNA und ziehen die Chromatiden jeweils zu den bipolaren Zentrosomen. Anschließend wird in der Telophase die Teilung der Zelle vorbereitet. Hierzu bildet die Mutterzelle um die aufgeteilten Chromosomen jeweils eine Kernhülle. Die Chromosomen wickeln sich wieder ab. Der Spindelapparat löst sich auf. Nach der Mitose erfolgt die Zytokinese. Hierbei teilt sich die Mutterzelle in zwei Tochterzellen (Janssen & Medema, 2011; Walczak, Cai, & Khodjakov, 2010).

Folglich ist der Mikrotubulus-basierte Spindelapparat ein wichtiger Bestandteil einer mammären Epithelzelle. Eine Störung der Organisation und Regulation des Mikrotubulusapparats spielt bei der Zellteilung und Entstehung von Mammakarzinomen eine entscheidende Rolle (Maxwell et al., 2011).

1.7 Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP)

Die Zellteilung ist abhängig vom zentrosomgesteuerten Spindelapparat mit den Mikrotubuli.

Zum Ausführen ihrer Funktion sind die Mikrotubuli von zahlreichen Proteinen, den sog. Mikrotubulus-assoziierten Proteinen (MAP), abhängig. Bei der Organisation dieser Mikrotubulus-assoziierten Proteine sind Aurora Kinase A (AURKA) und Polo-like-Kinase (PLK) beteiligt. Durch Phosphorylierungsprozesse werden die MAP aktiviert und können die Mikrotubuli während der Mitose stabilisieren und Positionieren (Fujita et al., 2016; Lee & Rhee, 2011).

RHAMM ist ein solches Mikrotubulus-assoziiertes Protein (MAP) und ist an der Stabilisierung des Spindelapparats beteiligt. Hierzu bindet RHAMM Mikrotubuli direkt am Aminoende (N-Terminus) und indirekt am Carboxylende (C-Terminus) über einen Komplex mit dem Motorprotein Dynein (H. Chen et al., 2014). Die RHAMM-Expression einer Zelle ist während der G2/M-Phase am höchsten und reguliert darüber die Zellproliferation (He, Mei, Connell, & Maxwell, 2020).

1.7.1 Hyaluronsäure-Rezeptor - RHAMM

Hyaluronsäure ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und hat die Fähigkeit Flüssigkeit im Gewebe zu speichern. Die Verwendung von Hyaluronsäure in Cremes oder bei kosmetischen Eingriffen ist allgemein bekannt. Hyaluronsäure hat aber auch andere wichtige Funktionen, die über Hyaluronsäure-Rezeptoren vermittelt werden.

Der Hyaluronsäure-Rezeptor, Cluster of Differentiation (CD44), hat extrazelluläre Funktionen wie Regulation der Zellmotilität, der Signaltransduktion und der Wundheilung (Esguerra et al., 2015; Sohr & Engeland, 2008). Ein weiterer bekannter Hyaluronsäure-Rezeptor ist der Rezeptor für Hyaluronsäure-vermittelte-Motilität (RHAMM/ CD168).

RHAMM hat als Mikrotubulusapparat-assoziiertes Protein (MAP) intrazelluläre Funktionen und ist an der Zellteilung beteiligt (Buttermore et al., 2017; Maxwell et al., 2008).

Aufgrund dieser Funktion und bei dessen Störung wird RHAMM mit der Entstehung von Brustkrebs sowie anderer Tumoren assoziiert (He et al., 2020).

1.7.1.1 Molekulare Grundlagen und Funktionen zu RHAMM

Der Rezeptor für Hyaluronsäure-vermittelte-Motilität (RHAMM/ CD168) ist ein 95 kDa schweres Glycosaminoglycan. Das Gen für RHAMM ist auf dem Chromosom 5q33.2 kodiert und besitzt 18 Exons. Bisher sind 4 Isoformen bekannt (He et al., 2020).

In einer Studie konnte Hofmann zeigen, dass RHAMM nur intrazellulär vorkommt im Gegensatz zum extrazellulären Hyaluronsäure-Rezeptor CD44. Hofmann schlug für RHAMM den Namen Intracellular hyaluronan binding protein (IHAB) vor (Hofmann et al., 1998).

RHAMM interagiert mit Hyaluron über ein aus 35 Aminosäuren bestehendem Carboxyl-Ende (C-Terminal), das wiederum aus zwei Domänen mit basischen Aminosäuren besteht (Yang, Zhang, & Turley, 1993). Aufgrund der wiederholt vorkommenden Aminosäure Leucin wird diese Domäne auch *basic leucine zipper (bZip) motif* genannt (He et al., 2020). Mit diesem C-Terminal Leucin Zipper kann RHAMM mit dem Zentrosom interagieren (Maxwell et al., 2003).

Am Amino-Ende (N-Terminal) befindet sich die Mikrotubuli-bindende Eigenschaft von RHAMM. Assmann hat zwei Domänen (Aminosäuren 40-59 und von Exon 4 kodierende Aminosäuren 76-90) untersucht, die direkt am Mikrotubulus binden können. Eine Hemmung von Exon 4 führte zu Störung der Interphase Mikrotubuli zu Beginn der Zellteilung (Assmann, Jenkinson, Marshall, & Hart, 1999; He et al., 2020).

Die Proteinmitte (Aminosäuren 69-681) hat eine Coiled-Coil-Struktur (Doppelhelix) und dient wahrscheinlich als Bindungsstelle für weitere Proteine. Eines dieser Proteine ist CHICA. Über die Interaktion mit CHICA kann RHAMM einen Komplex mit DYNLL1 (dynein light chain 1) am Spindelapparat bilden. Diese Proteinkomplexe spielen eine wichtige Rolle für die Integration und Organisation des Spindelapparats im Rahmen der Zellteilung (Fulcher et al., 2019; He et al., 2020).

RHAMM hat zudem Einfluss auf die Zentrosomenfunktion über die Rekrutierung von γ -Tubulin (TUBG1) im Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC) während der Interphase (Maxwell et al., 2011).

Die aktivierte phosphorylierte Form von RHAMM ist pT703-RHAMM und ist im Zellkern lokalisiert. Für den Transport in den Zellkern ist pT703-RHAMM auf TPX2 (targeting protein for Xklp2) und AURKA (Aurora Kinase A) angewiesen (Chu et al., 2018).

1.7.2 Interaktionen zwischen RHAMM, TPX2 und AURKA

Die Mikrotubulus Aktivität während der Mitose ist u.a. reguliert durch Aurora Kinase A (AURKA). AURKA ist an der Organisation des Spindelapparats in eine bipolare Struktur über Proteinkomplexe mit RHAMM und Motorproteine wie Dynein und Kinesin beteiligt (H. Chen et al., 2014). AURKA wird aktiviert durch eine Komplexbildung mit TPX2 (targeting protein for Xklp2). Durch Ran-GTP wird TPX2 von Importin- α , einem Zellkernimport-Rezeptor, gelöst. TPX2 bildet dann einen heterodimeren Komplex mit AURKA. Dieser Schritt wird durch RHAMM begünstigt. Beim XRHAMM (XenopusRHAMM vom Krallenfrosch; ortholog zu humanem RHAMM) befindet sich an der bZIP-Domäne am C-Terminal ein Xenopus kinesin-like Protein 2 (Xklp2). Xklp2 bildet einen Komplex mit dem Motorprotein Dynein und dem Target-Protein für Xklp2 (TPX2). Auch im humanem RHAMM findet sich am C-Terminus das Xklp2 wieder. RHAMM ist sowohl bei humanen als auch bei Xenopus Mitosezellen ein Partner Protein

des TPX2. Der Proteinkomplex aus RHAMM/Dynein/TPX2 spielt für die Bildung und Stabilisierung des Spindelapparats eine wichtige Rolle (H. Chen et al., 2014).

RHAMM wird durch AURKA in seine phosphorylierte Form pT703-RHAMM aktiviert. pT703-RHAMM wiederum interagiert mit TPX2 für den Transport in den Zellkern (Chu et al., 2018). TPX2 ist ein Ko-Faktor von AURKA und wirkt damit aktivierend und regulierend auf AURKA (H. Chen et al., 2014; Groen et al., 2004).

1.8 Zusammenhang zwischen BRCA1 und RHAMM

Eine *BRCA1*-Mutation scheint die Zelldifferenzierung und Zellproliferation in der normalen Brustdrüse zu verändern. Es kommt zu einer Anhäufung von undifferenzierten Vorläuferzellen (Foulkes et al., 2004).

Der Einfluss von BRCA1 auf den Zellzyklus spielt hierbei eine wichtige Rolle (He et al., 2017).

Einige Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen BRCA1 und die Organisation der Mikrotubuli im Spindelapparat während der Zellteilung (Joukov et al., 2006) und andere untersuchten die Interaktion von BRCA1 mit Zentrosomen (Pujana et al., 2007). BRCA1 kann über den BRCA1/BARD1 Komplex die Zentrosom-Funktion regulieren. Eine Störung in diesem Komplex führt vermehrt zu Zentrosom-Amplifikationen. Diese Zentrosom-Amplifikationen mit gehäuftem Auftreten von Zentrosom-Hypertrophie und Aneuploidie scheint typisch für das Mammakarzinom zu sein (Chan, 2011; Takaoka & Miki, 2018).

RHAMM ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein und an der Bildung des Spindelapparats während der Zellteilung beteiligt mit höchster Aktivität in der G2/M-Phase (Y. T. Chen, Chen, & Du, 2018). Hierfür interagiert RHAMM wie bereits beschrieben mit AURKA und TPX2.

Eine Studie über Multiples Myelom zeigt eine Überexpression von RHAMM in malignen Zellen (Crainie, Belch, Mant, & Pilarski, 1999).

Weitere Studien zeigen ebenfalls bei Krebserkrankungen und bei Entzündungsprozessen eine erhöhte RHAMM Expression (Buttermore et al., 2017; Esguerra et al., 2015). In 56% aller Mammakarzinome ist eine Überexpression von Hyaluron festgestellt worden und mit einer Progression der Erkrankung assoziiert (Heldin et al., 2013).

Des Weiteren ist eine Interaktion zwischen RHAMM und dem Tumorsupressor p53 festgestellt worden. Bei Überexpression von RHAMM wird über p53 eine Herunterregulation und eine Zellzykluskontrolle bzw. Apoptose eingeleitet (Sohr & Engeland, 2008). Bei AURKA Überexpression wird auch ein Krankheitsprogress, hohe Rate für Metastasen und schlechter Prognose bei Brustkrebs beobachtet (Zheng et al., 2016).

Das erhöhte Risiko für Brustkrebs bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen ist bekannt und mehrfach in Studien untersucht. Jedoch ist der Zusammenhang mit der BRCA1 Funktion auf Zellzyklus-Ebene insbesondere hinsichtlich der Interaktion mit Mikrotubulus-assoziierten Proteinen nicht gänzlich erforscht.

In dieser Dissertation soll der Zusammenhang zwischen dem *BRCA1*-Status und der RHAMM Expression in mammären Epithelzellen und Mammakarzinomen untersucht werden.

Bei differentieller RHAMM Expression in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom könnte RHAMM als Modifikator für das Brustkrebsrisiko bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen fungieren.

1.9 Ziele der Arbeit

Die Funktion von BRCA1 als Sensor für DNA-Schäden und bei der DNA-Doppelstrang-Reparatur ist bekannt. Aktuellere Arbeiten zeigen zudem eine neue Rolle des BRCA1 im Rahmen des Zellzyklus und Organisation des Zytoskeletts bei der Zelldifferenzierung. Hierbei scheint die Interaktion zwischen BRCA1 und mikrotubulus-assoziierte Proteine wie RHAMM von besonderer Bedeutung zu sein. Eine Mutation im *BRCA1*-Gen könnte dem entsprechend durch fehlende oder veränderte Interaktion mit RHAMM die Organisation des Zytoskeletts im Rahmen der Zellteilung beeinträchtigen. Dies spielt bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wird untersucht, ob der *BRCA1*-Status Einfluss auf die Expression des Mikrotubulus-assoziierten Protein RHAMM in *BRCA1*-kompetenten (*BRCA1*-wt) bzw. *BRCA*-mutierten (*BRCA1*-mut) mammären Epithelzellen *in vitro* und in Mammakarzinomen *ex vivo* hat. Dies wird anhand der Proteinexpression und Proteinlokalisierung von RHAMM immunhistochemisch/-zytologisch untersucht und abhängig vom *BRCA1*-Status ausgewertet. Es wird ein direkter Vergleich gestellt zwischen RHAMM-Expression in *BRCA1*-wt und RHAMM-Expression in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen und benignen sowie malignen mammären Epithelzellen. Eine differentielle RHAMM-Expression abhängig vom BRCA1-Status würde den Einfluss von BRCA1 auf die Mikrotubulusorganisation bestätigen.

Zu diesem Zweck werden im einzelnen immunhistochemische Färbungen mit RHAMM, seiner aktivierten Form pT703-RHAMM und dem RHAMM-Hauptaktivator AURKA in *BRCA1*-wt sowie in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen durchgeführt. Es wird untersucht, wie sich die RHAMM Expression in *BRCA1*-wt Mammakarzinomen verhält und ob sich immunhistochemisch ein Unterschied zu *BRCA1*-mut Mammakarzinomen zeigt.

Die immunhistochemischen Färbungen werden auch in Triple-negativen Mammakarzinomen (TNBC) durchgeführt, um einen Vergleich der RHAMM Expression zwischen *BRCA1*-mut und Triple-negativem Status zu sehen. Zudem wird untersucht, ob sich die pT703-RHAMM und AURKA Expression in Mammakarzinomen abhängig vom *BRCA1*-Status ändert.

Anschließend wird die RHAMM-, pT703-RHAMM- und AURKA-Expression auf zellulärer Ebene in *BRCA1*-wt und *BRCA1*-mut mammären Epithelzellen immunzytologisch untersucht. Hier wird anhand des Expressionsmusters in der Zelle die

Lokalisation (Zytoplasma, perinukleär, Kern) der Mikrotubulus-assoziierten Proteine abhängig vom *BRCA1*-Status beurteilt.

Zuletzt wird das Wachstumsverhalten von mammären Epithelzellen im 3D-Medium abhängig vom *BRCA1*-Status beurteilt.

Mit den o.g. Versuchen soll gezeigt werden, dass BRCA1 an der Organisation des Zytoskeletts über Mikrotubulus-assoziierte Proteine wie RHAMM im Rahmen des Zellzyklus beteiligt ist, indem die RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA Expression und Lokalisation abhängig vom *BRCA1*-Status untersucht wird. Zudem soll untersucht werden, ob sich das Wachstums- und Teilungsverhalten von mammären Epithelzellen abhängig vom *BRCA1*-Status ändert und somit BRCA1 bei der Zelldifferenzierung und Proliferation eine Rolle spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Immunhistochemie

Das Gewebe zur immunhistologischen Untersuchung ist durch die Universitätsfrauenklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt worden.

Die Universitätsfrauenklinik Düsseldorf ist eines von 12 universitären Zentren des Deutschen Konsortiums für hereditäres Brust- und Eierstockkrebs (German Consortium of Hereditary Breast and Ovarian Cancer, GCHBOC). In einem interdisziplinärem Setting von Gynäkologen, Humangenetikern, Pathologen und Psycho-Onkologen werden Patientinnen und Patienten auf eine a-priori Risikoerhöhung für genetisch-bedingtem Brust- und Eierstockkrebs gescreent. Je nach Risikoprofil wird eine Gentestung auf z.B. *BRCA1/2*, *PALP2*, *RAD51C* und *CHEK2*-Genmutationen angeboten. Mittlerweile wurden über 1300 Familien getestet und 327 *BRCA1*-Mutationsträgerinnen identifiziert und behandelt. Im Rahmen des *BRCA1/2* Projekts der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf ist FFPE-Material von 7 *BRCA1*-mut, 15 *BRCA1*-wt und 9 Triple-negativen Mammakarzinomen für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt worden.

Ethikvotum

Für das *BRCA1/2* Projekt in der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf als ein Zentrum des Deutschen Konsortiums für familiären Brust-/Eierstockkrebs (GCHBOC) liegt ein Ethikvotum vor. Die Studiennummer ist 3260.

Forschungsförderung

Die Arbeiten in diesem Projekt wurden durch eine interne Forschungsförderung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mitunterstützt.

Projektnummer: 9772484

Gewebe:

Paraffinschnitte von 15 *BRCA1*-wt Mammakarzinomen

Paraffinschnitte von 9 Triple-negativen Mammakarzinomen

Paraffinschnitte von 7 *BRCA1*-mut Mammakarzinomen

Antikörper:

RHAMM	CD168/RHAMM	Epitomics, 3139-1 Santa Cruz Biotechnology, sc-25488
pT703-RHAMM	pT703-RHAMM	von der Arbeitsgruppe Maxwell zur Verfügung gestellt (Maxwell et al, 2011)
AURKA	Aurora Kinase 2	Leica, NCL-L-AK2

Tabelle 5: Primärantikörper

Herstellung von Paraffinschnitten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen werden aus Paraffintumorblöcken mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (RM2035, Leica, Solms) 1 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte werden auf Objektträgern (Super Frost Plus, Microm, Waldorf) aufgebracht. Zum weiteren Bearbeiten des Gewebes wird das Paraffin im Wärmeschrank (Functionline T12, Hereaus, Hanau) über 12 Stunden bei 58° geschmolzen.

Grundlagen der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf eine Antigen-Antikörper-Reaktion.

Ein Antikörper bindet über ein oder mehrere Epitope spezifisch mit einem Antigen.

In der direkten Methode reagiert der an ein Enzym oder Fluorophor gekoppelte Antikörper mit dem Antigen und wird über ein weiteres Substrat gefärbt.

Bei der indirekten Methode bindet ein Primärantikörper an dem Antigen. Es wird ein an Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper hinzugefügt, der an dem Primärantikörper bindet und nach Hinzugabe eines Substrats eine Farbreaktion zeigt.

Immunhistochemie für Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte werden zur Paraffinlösung zunächst für 20 Minuten in ein Xylobad (Xylene UN1307, JT Baker, Phillipsburg, USA) gestellt und dann für je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe mit Ethanol 99 %, Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 % (Herbeta, Berlin). Anschließend erfolgt ein 5-minütiges Bad im destillierten Wasser. Zum Sättigen der gewebeeigenen Peroxidase werden die Paraffinschnitte für 15

Minuten in 3 % Wasserstoffperoxid (Merck Best.Nr.8597) gestellt. Danach erfolgt ein weiteres 5-minütiges Bad im destillierten Wasser.

Als Nächstes erfolgt eine Behandlung in Zitratpuffer mit einem pH von 6. Hierfür wird das Zitratpuffer bestehend aus 21g Zitronensäure (Merck Best.Nr.242) mit 25ml Natriumhydroxid (2mol, R.d.H. Best.Nr.38212) und ein Liter destilliertes Wasser zum Kochen gebracht und dann die Paraffinschnitte für 15 Minuten hineingestellt. Nach dem Kochvorgang werden die Schnitte für 5 Minuten abgekühlt und mit destilliertem Wasser geflutet.

Durchführung der Immunhistochemie mit der Labeled-Streptavidin-Biotin (LSAB)-Methode Die Paraffinschnitte werden entsprechend der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB) behandelt. Nach jedem der folgenden Schritte werden die Paraffinschnitte für 3-5 Minuten in ein Wasserbad gestellt. Zunächst werden die Schnitte für 15 Minuten in Avidin (eigene Herstellung mit Eiweiß von zwei mittelgroßen Eiern in 200ml destilliertes Wasser vermischt) gestellt. Dieser Schritt wird zum Binden des gewebeeigenen Biotins durch Avidin durchgeführt. Um alle Bindungsstellen des Avidins mit Biotin zu besetzen, werden die Schnitte im nächsten Schritt für 15 Minuten in ein Biotin-Bad (0,02% d-Biotin in TBS-Puffer, Sigma Best.Nr. 4501) gestellt.

Nun wird der Primärantikörper mit einer Verdünnung von 1:50 auf die Schnitte aufgetragen. Die Negativkontrolle wird an dieser Stelle nur mit Wasser behandelt.

Nach 30 Minuten wird der Sekundärantikörper (Brückenantikörper Biotin, ScyTek ABN 999) für 15 Minuten aufgetragen. Als drittes wird dann für weitere 15 Minuten eine Tertiärreagenz (Avidin, ScyTek ABL999) auf die Schnitte aufgetragen. Die chemische Farbereaktion wird durch Auftragen mit Diaminobenzidin (DAB + DAB-Substrate, ScyTek ACK999) verursacht. Nach fünf Minuten Einwirkzeit kommt es bei Reaktion mit dem Primärantikörper zu einer Braunfärbung der Schnitte. Die Negativkontrolle zeigt bei diesem Schritt keine Braunfärbung.

Als Gegenfärbung erfolgt ein 5minütiges Hämalaun-Bad zum Bläuen aller Kerne. Hiernach werden die Schnitte für 10 Minuten in ein Wasserbad gestellt. Anschließend erfolgt eine aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol 70 %, Ethanol 80 %, Ethanol 96 % und Ethanol 99 % und zuletzt Xylol. Die Schnitte werden eingedeckt (Eindeckmedium (Aquatex, Merck, Darmstadt, Deckgläser 24x46mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) und unter einem Lichtmikroskop analysiert.

Histologische Auswertung

Die Histologische Auswertung ist mit einem Lichtmikroskop (DMRBE, Leica, Solms) unter Verwendung des sog. „Remmele-Scores“ (s.u.) erfolgt.

Auswertung nach dem Immunreaktiven Score (IRS)

Zur histologischen Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte hat sich der „Immunreaktive Score (IRS)“ etabliert. Der IRS modifiziert nach dem Remmele Score (Remmele et al.1987) wird bestimmt durch die Prozentzahl der Positivpopulation (PP) und der Färbeintensität (Staining Intensity SI) (Tabelle 5).

Für beide Parameter werden wie folgt Punkte vergeben:

Positivpopulation (PP)		Staining Intensity (SI)	
0	0% gefärbt	0	keine Färbung
1	< 10% gefärbt	1	schwache Färbung
2	10 - 50% gefärbt	2	mäßige Färbung
3	51 - 80% gefärbt	3	starke Färbung
4	80 - 100% gefärbt		

Tabelle 6: Histologische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Der Immunreaktive Score errechnet sich aus der Formel: $PP \times SI = IRS$.

Für jeden Schnitt können somit zwischen 0 und 12 Punkte vergeben werden.

Immunreaktiver Score	
0 - 1	negativ
2 - 3	schwach positiv
4 - 8	mäßig positiv
9 - 12	stark positiv

Tabelle 7: Der Immunreaktive Score

Auswertung nach Lokalisation der Färbung/Proteinlokalisierung

Zusätzlich zum Immunreaktiven Score wird das Färbungsverhalten der einzelnen Zellkompartimente wie Färbung des Zytoplasmas, perinukleäre Färbung oder Färbung im Kern beurteilt. Daraus lässt sich ableiten, in welchem Zellkompartiment das jeweilige Protein exprimiert wird.

Statistische Auswertung mit dem Chi-Quadrat-Test

Zum Vergleichen der immunhistochemischen Färbeargebnisse von RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA in den unterschiedlichen Mammakarzinomen (*BRCA1-wt*, *BRCA1-mut* und Triple-negativ) erfolgt eine statistische Auswertung mit dem Chi-Quadrat-Test.

Die Auswertung wird zum einen nach dem Ergebnis aus dem Immunreaktiven Score (Proteinexpression schwach positiv, mäßig positiv, stark positiv) sowie zum anderen nach der Proteinlokalisierung (Proteinexpression im Zytoplasma, perinukleär oder Kern) durchgeführt.

2.2 Zellkulturen

Die Arbeiten an den Zellkulturen erfolgen unter sterilen Bedingungen.

Die Versuche werden mit den MCF-12a und HCC1937 sowie verschiedenen HCC1937-Transfektanten durchgeführt (Tabelle 7).

HCC 1937	Duktales Mammakarzinom einer 23-jährigen kaukasischen Frau mit BRCA1-Mutation	ATCC-Nr: CRL-2336
MCF 12a	Benignes mastopathisches Brustdrüsengewebe einer 60-jährigen kaukasischen Frau	ATCC-Nr: CRL-10782

Tabelle 8: Zelllinien

Medium

Unter einer Sterilbank werden die Zellen der o.g. Zelllinien in 50ml Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt und mit einem Vollmedium aus DMEM Medium (Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium, GIBCO, Karlsruhe) mit 1000 mg/L Glucose, 110 mg/L Natriumpyruvat (GIBCO, Karlsruhe) und folgenden Zusätzen versetzt: 10 % fötales Kälberserum (FCS Gold Mycoplex, PAA, Pasching, Österreich), 1 % L-Glutamin (100x; GIBCO), 1 % MEM Vitamin-Lösung (100x; GIBCO), 0,1 % Gentamycin (10mg/ml; GIBCO). Die Kulturflaschen werden in ein Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Mediumwechsel

2-3mal pro Woche findet ein Mediumwechsel statt. Hierzu wird das Medium unter Schonung der am Flaschenboden adhärenen Zellen aus der Kulturflasche pipettiert und mit neuem Medium versetzt. Je nach Kulturflaschengröße (50, 75 oder 250ml) wird entsprechend viel Medium (5, 10 oder 20ml) hinzugegeben.

Passage der Zellen

Bei 80 % Besiedlung des Bodens der Kulturflasche werden die Zellen umgesetzt. Hierzu werden die Zellen gesät und in größere, 75ml oder 250ml Gewebekulturflaschen subkultiviert. Dafür wird das Medium verworfen. In die Kulturflaschen wird PBS zum Spülen der adhärenen Zellen gegeben und wieder heraus pipettiert. Anschließend wird zum Lösen der adhärenen Zellen vom Kulturflaschenboden mit 1 % Trypsin (1ml Aliquot + 9ml PBS) für 5min (höchstens 10min.) bei 37°C im Brutschrank inkubiert bis alle Zellen gelöst sind. Das Trypsin wird mit der gleichen Menge Medium geblockt und die gesamte Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner) pipettiert. Das Röhrchen wird anschließend in eine Zentrifuge (Megafuge 1.0, Heraeus) gestellt und für 5min. bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Das Pellet wird in 1ml Medium resuspendiert und in eine größere Gewebekulturflasche überführt oder auf zwei bis vier 50ml Kulturflaschen verteilt.

Kryokonservierung

Das beim Umsetzen der Zellen entstandene Pellet wird mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Medium mit 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen (Greiner, 2 ml) überführt. Die Zellen werden zunächst bei -20°C und nach 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Nach weiteren 24 Stunden werden die Kryoröhrchen im flüssigen Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen werden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad aufgetaut. Anschließend werden die Zellen in eine Gewebekulturflasche überführt und je nach Größe der Gewebekulturflasche mit entsprechend viel Medium versetzt. Die Kulturflasche wird dann im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Bestimmung der Zelltiters

Die Bestimmung des Zelltiters erfolgt mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

Das beim Umsetzen der Zellen abzentrifugierte Pellet wird mit 1ml Medium resuspendiert. 10µl dieser Zellsuspension werden mit Trypanblau gemischt und die Neubauerkammer pipettiert. Die Zellen werden diagonal in vier Kleinquadraten (1mm²) ausgezählt. Der Titer berechnet sich nach der folgenden Formel:

Gezählte Zellen

----- = Zellen/µl

Ausgezählte Fläche (mm²) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung

Stabile Transfektion von HCC 1937 Zellen

Bei der stabilen Transfektion werden mit Hilfe von gentechnisch veränderten lentiviralen Vektoren, die Zellen mit verschiedenen *BRCA1* Gen-Konstrukten transfiziert.

In der HCC1937 Zelllinie liegt homozygot, d.h. auf beiden Allelen, die bekannte pathogene *BRCA1*-Mutation c.5266dupC p.Gln1756fs und damit ein *BRCA1*-Null-Geno-/Phänotyp vor. Mit viraler Transfektion kann das *BRCA1*-Gen in den HCC1937-Zellen eingebracht werden zur Komplementation des *BRCA1*^{mut/mut} Genotyps und zur Herstellung eines *BRCA1*-Wildtyp Phänotyps der HCC1937 Zellen. Als Kontrollen

dienen Transfektanten (Tabelle 8) mit einer *BRCA1*-Exon11-Deletion und damit einem inaktiven *BRCA1*-Gen sowie Transfektanten mit dem S11-IN- Leervektor ohne *BRCA1*-Gen

Zellen /Transfektanten	Genotyp
HCC1937	<i>BRCA1</i> ^{mut/mut}
HCC1937-wt	<i>BRCA1</i> ^{wt}
HCC1937 ΔExon11	<i>BRCA1</i> ^{ΔExon11}
HCC1937 S11-IN	<i>BRCA1</i> ^{mut/mut}

Tabelle 9: Zelllinie HCC1937 mit Transfektanten

Immunzytologie für Zellkulturen

Ein Tag vor Durchführung der immunzytochemischen Versuchsreihe werden die Zellen direkt auf Objektträgern kultiviert. Am Folgetag wird das Medium entfernt und die Objektträger mit den adhären Zellen für die immunzytochemische Untersuchung vorbereitet.

Hierfür werden die Schnitte zunächst bei 37° über 5 Minuten in einem Wärmeschrank (Functionline T12, Hereaus, Hanau) getrocknet und anschließend zum Rehydrieren in eine Kochsalzlösung getaucht. Danach erfolgt die Fixierung in 4 % gepufferten Formalin für 10 Minuten. Die Schnitte werden in TBS-Puffer 10 Minuten gewaschen und sind jetzt vorbereitet für die immunzytochemischen Versuche entsprechend der bereits beschriebenen Labeled-Streptavidin-Biotin- (LSAB-) Methode.

2.3 Zellkultur in 3D-Medium (Matrigel™)

Die 3D-Kultivierung erfolgt mit MCF-12a Zellen und nativen HCC1937-Zellen.

Es wird das gleiche Medium wie bei der 2D-Zellkultur verwendet.

Das Matrigel™ ist von BD Biosciences bezogen (BD Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, 10ml vial, Catalog number 354230).

Ablösen der Zellen aus der Kulturflasche

Das Medium aus der Kulturflasche wird abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wird zum Lösen der adhärenen Zellen vom Kulturflaschenboden die Kultur mit 1% Trypsin (1ml Aliquot + 9ml PBS) für 5 Minuten (höchstens 10 Minuten) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis alle Zellen gelöst sind. Das Trypsin wird mit der gleichen Menge Medium geblockt und die gesamte Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner) pipettiert. Das Röhrchen wird anschließend für 5 Minuten bei 1000rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Das Pellet wird in 1ml Medium resuspendiert.

Bestimmung des Zellvolumens

Das beim Umsetzen der Zellen gewonnene Pellet wird in 1ml Medium resuspendiert. 50µl dieser Zellsuspension werden mit 450µl Medium resuspendiert. Damit wird eine 1:10 Verdünnung erreicht.

Die Bestimmung der Gesamtzahl der Zellen erfolgt mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wie oben bereits beschrieben.

Aus diesem Zellpellet wird ein bestimmtes Volumen zur Kultivierung im Matrigel™ verwendet. Dieses Volumen wird mit Hilfe folgender Formel errechnet:

$$\text{Volumen} = 1,8 \times 10^4 \times 10^3 / G \text{ (Gesamtzahl der Zellen)}$$

Kultivierung der Zellen in Matrigel™

Das Matrigel wird am Vortag auf Eis aufgetaut. Eine 24-Well-Platte wird im Gefrierschrank vorgekühlt. 150µl aufgetautes Matrigel wird auf den Boden der Wells mittig pipettiert. Dabei befindet sich die 24-Well-Platte ständig auf Eis. Danach folgt ein Erhitzen über 15 Minuten im Brutschrank. 250µl einer Zellsuspension bestehend aus dem errechneten Zellpellet-Volumen und Medium (Volumen + Medium = 250µl) werden pro Well pipettiert. Danach wird für weitere 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zuletzt werden 250µl Medium-Matrigel™-Gemisch (225µl Medium + 25µl Matrigel) mittig in jedes Well pipettiert.

Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel wird alle 2 Tage durchgeführt. Dabei wird das flüssige Medium aus der 24-Well-Platte abpipettiert und verworfen. 500µl frisches Medium-Matrigel-Gemisch (450µl Medium + 50 µl Matrigel) werden mittig in jedes Well pipettiert.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt über tägliche Beobachtung und Fotodokumentation.
Die Beurteilung erfolgt mit einem Lichtmikroskop (DMRBE, Leica, Solms).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Immunhistochemie (Gewebe)

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen *BRCA1*-Status und dem Mikrotubulus-assoziiertem Protein RHAMM werden immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten von Mammakarzinomgeweben durchgeführt. Zunächst wird die RHAMM-Expression an einem *BRCA1*-wt Mammakarzinom untersucht. Vergleichsweise werden Paraffinschnitte eines *BRCA1*-mut Mammakarzinoms mit RHAMM immunhistochemisch angefärbt. Zusätzlich untersuchen wir die RHAMM-Expression an Gewebe eines Triple-negativen Mammakarzinoms (TNBC). Wie in der Einleitung erwähnt, bestehen zwischen dem TNBC und dem *BRCA1*-mut Mammakarzinom tumorbiologische Ähnlichkeiten (Hormonrezeptorstatus, hohes Grading, Metastasierungsverhalten). Wir untersuchen, ob die RHAMM-Expression bei diesen beiden Geweben ein ähnliches Verhalten zeigt. Zusätzlich untersuchen wir das Expressionsmuster des aktivierten RHAMM, nämlich pT703-RHAMM und sowie dessen Hauptaktivator AURKA in allen oben genannten Karzinomen. Untersucht wird das Färbemuster von RHAMM, AURKA und pT703-RHAMM in den unterschiedlichen Geweben bezüglich Proteinlokalisierung (Zytoplasma, Kern oder perinukleär) und Proteinexpression anhand der Farbstärke (Färbeintensität: schwach, mittel, stark). Die Auswertung erfolgt am Mikroskop mit dem im Methodenteil beschriebenen Immunreaktiven-Score. Zusätzlich werden Negativkontrollen mit Auslassen der o.g. Antikörper durchgeführt.

3.1.1 Ergebnisse *BRCA1*-wt Mammakarzinom

In dieser Versuchsreihe werden Paraffinschnitte von 15 *BRCA1*-wt Mammakarzinomen mit den Antikörpern RHAMM, AURKA und pT703-RHAMM immunhistochemisch gefärbt. Darunter sind 13 duktale Karzinome und 2 lobuläre Karzinome. Der Hormonrezeptorstatus ist bei allen 15 Karzinomen positiv.

3.1.1.1 RHAMM

Tabelle 10 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung des *BRCA1*-wt Mammakarzinoms mit dem RHAMM-Antikörper. Die Farblokalisierung ist bei allen

Präparaten im Zytoplasma (s. Abb. 3). Die Auswertung der Präparate zeigt einen Immunreaktive-Score in einem Präparat von eins, in sechs Präparaten von drei, in fünf Präparaten von vier und in drei Präparaten von sechs. Insgesamt wird bei 14/15 Präparaten des *BRCAl*-wt Mammakarzinoms eine schwache bis mäßig positive, homogene RHAMM Expression im Zytoplasma festgestellt.

Nr.	Tumor	Probe	Histo	Auswertung Färbung					
				Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	IRS	Negativ- Kontrolle
1	<i>BRCAl</i> -wt	49/99	IDC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
2	<i>BRCAl</i> -wt	536/97b	IDC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
3	<i>BRCAl</i> -wt	591/98	IDC	Zytoplasma	++	3	2	6	-
4	<i>BRCAl</i> -wt	665/97	ILC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
5	<i>BRCAl</i> -wt	676/98b5	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
6	<i>BRCAl</i> -wt	750/97	ILC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
7	<i>BRCAl</i> -wt	757/99	IDC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
8	<i>BRCAl</i> -wt	1169/99	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
9	<i>BRCAl</i> -wt	1287/99b2	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
10	<i>BRCAl</i> -wt	1386/99	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
11	<i>BRCAl</i> -wt	1387/97	IDC	Zytoplasma	-	1	1	1	-
12	<i>BRCAl</i> -wt	1430/99a	IDC	Zytoplasma	++	3	2	6	-
13	<i>BRCAl</i> -wt	1528/99	IDC	Zytoplasma	++	3	2	6	-
14	<i>BRCAl</i> -wt	7787/00	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
15	<i>BRCAl</i> -wt	7947/00d2	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-

Tabelle 10: Auswertung Immunhistochemie *BRCAl*-wt Mammakarzinom mit RHAMM-Antikörper: schwache bis mäßig positive homogene Färbung des Zytoplasmas in 14/15 Präparaten

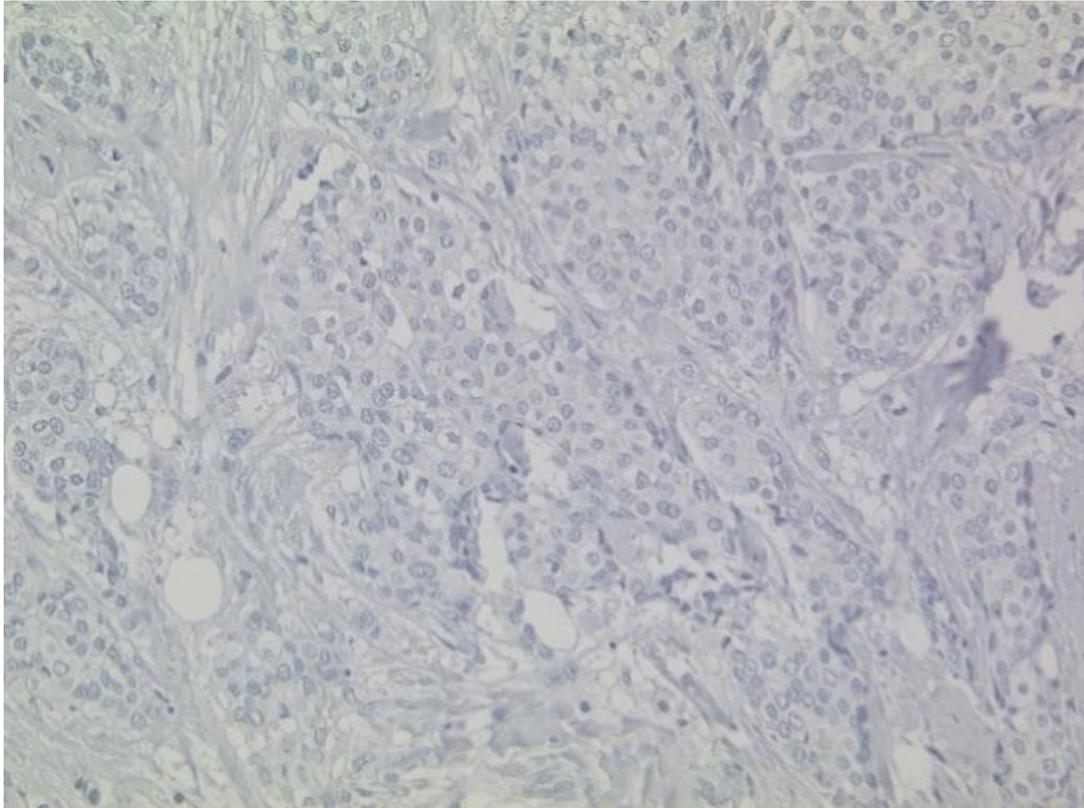


Abb. 3: Immunhistochemische Darstellung der RHAMM-Expression im *BRCA1*-wt Mammakarzinom, 10-fache Vergrößerung: schwache Färbung des Zytoplasmas, IRS 4

3.1.1.2 pT703-RHAMM

In der nächsten Versuchsreihe werden weitere Paraffinschnitte der 15 Hormonrezeptorpositiven *BRCA1*-wt Mammakarzinome mit dem pT703-RHAMM-Antikörper gefärbt (Tabelle 11). pT703-RHAMM zeigt eine Proteinlokalisierung im Kern (s. Abb. 4). Der Immunreaktive-Score ist in einem Präparat bei zwei in sechs Präparaten bei vier und in weiteren sechs Präparaten bei sechs. Zwei Präparate zeigen keine Färbung. Mehrheitlich zeigt sich bei 12/15 Präparaten eine mäßig positive homogene pT703-RHAMM Expression im Kern bei den *BRCA1*-wt Mammakarzinomen.

Nr.	Tumor	Probe	Histo	Auswertung Färbung					
				Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	ISR	Negativ- Kontrolle
1	<i>BRCA1</i> -wt	49/99	IDC	Kern	+	2	1	2	-
2	<i>BRCA1</i> -wt	536/97b	IDC	Kern	++	2	2	4	-
3	<i>BRCA1</i> -wt	591/98	IDC	Kern	++	3	2	6	-

4	<i>BRCA1</i> -wt	665/97	ILC	Kern	++	3	2	6	-
5	<i>BRCA1</i> -wt	676/98b5	IDC	Kern	++	2	2	4	-
6	<i>BRCA1</i> -wt	750/97	ILC	Kern	++	3	2	6	-
7	<i>BRCA1</i> -wt	757/99	IDC	Kern	++	3	2	6	-
8	<i>BRCA1</i> -wt	1169/99	IDC	/	-	0	0	0	-
9	<i>BRCA1</i> -wt	1287/99b2	IDC	Kern	++	2	2	4	-
10	<i>BRCA1</i> -wt	1386/99	IDC	Kern	++	2	2	4	-
11	<i>BRCA1</i> -wt	1387/97	IDC	Kern	++	2	2	4	-
12	<i>BRCA1</i> -wt	1430/99a	IDC	Kern	++	3	2	6	-
13	<i>BRCA1</i> -wt	1528/99	IDC	Kern	++	3	2	6	-
14	<i>BRCA1</i> -wt	7787/00	IDC	Kern	++	2	2	4	-
15	<i>BRCA1</i> -wt	7947/00d2	IDC	/	-	0	0	0	-

Tabelle 11: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von *BRCA1*-wt Mammakarzinom mit dem pT703-RHAMM-Antikörper: mäßig positive Proteinexpression im Kern in 12/15 Präparaten.

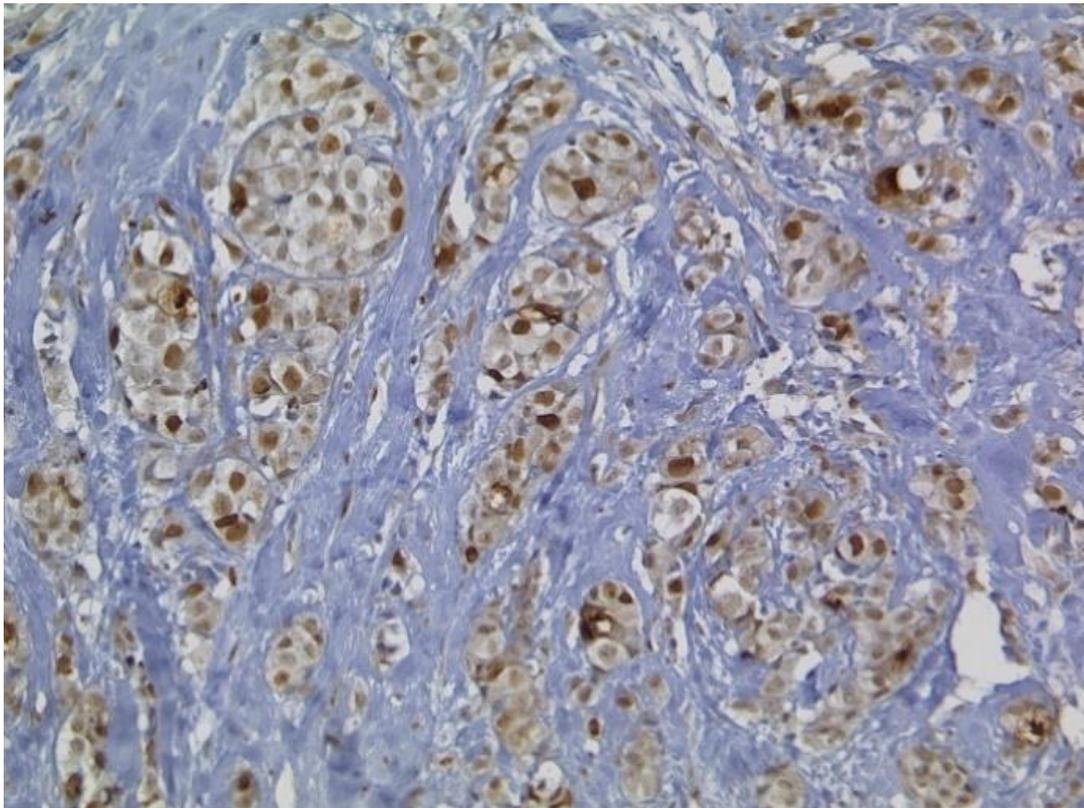


Abb. 4: Immunhistochemische Darstellung der pT703-RHAMM-Expression im *BRCA1*-wt Mammakarzinom, 10-fache Vergrößerung: mäßig starke Proteinexpression in den Kernen, IRS 6

3.1.1.3 AURKA

Als drittes werden die Schnitte der *BRCA1*-wt Mammakarzinomreihe mit dem AURKA-Antikörper immunhistochemisch gefärbt (Tabelle 12). AURKA zeigt wie RHAMM eine zytoplasmatische Proteinlokalisierung (Abb. 5). Der Immunreaktive-Score beträgt bei drei Präparaten drei, bei drei Präparaten vier, bei vier Präparaten sechs und bei fünf Präparaten neun. AURKA wird somit in 12/15 *BRCA1*-wt Mammakarzinomen mäßig bis stark exprimiert.

Nr.	Tumor	Probe	Histo	Auswertung Färbung					
				Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	IRS	Negativ- Kontrolle
1	<i>BRCA1</i> -wt	49/99	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
2	<i>BRCA1</i> -wt	536/97b	IDC	Zytoplasma	++	3	2	6	-
3	<i>BRCA1</i> -wt	591/98	IDC	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
4	<i>BRCA1</i> -wt	665/97	ILC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
5	<i>BRCA1</i> -wt	676/98b5	IDC	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
6	<i>BRCA1</i> -wt	750/97	ILC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
7	<i>BRCA1</i> -wt	757/99	IDC	Zytoplasma	++	3	2	6	-
8	<i>BRCA1</i> -wt	1169/99	IDC	Zytoplasma	++	3	2	6	-
9	<i>BRCA1</i> -wt	1287/99b2	IDC	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
10	<i>BRCA1</i> -wt	1386/99	IDC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
11	<i>BRCA1</i> -wt	1387/97	IDC	Zytoplasma	++	2	2	4	-
12	<i>BRCA1</i> -wt	1430/99a	IDC	Zytoplasma	++	3	2	6	-
13	<i>BRCA1</i> -wt	1528/99	IDC	Zytoplasma	+	3	1	3	-
14	<i>BRCA1</i> -wt	7787/00	IDC	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
15	<i>BRCA1</i> -wt	7947/00d2	IDC	Zytoplasma	+++	3	3	9	-

Tabelle 12: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von *BRCA1*-wt Mammakarzinom mit dem AURKA-Antikörper: mäßige bis starke zytoplasmatische Proteinexpression in 12/15 Präparaten

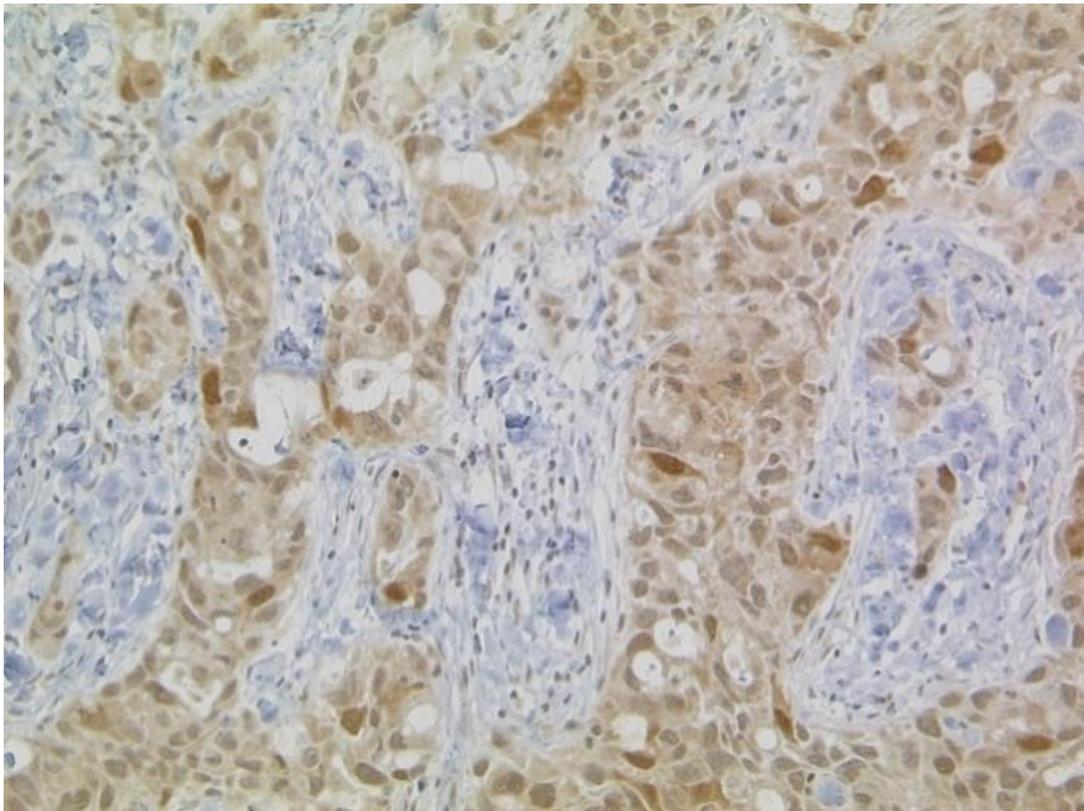


Abb. 5: Darstellung der AURKA-Expression im *BRCA1*-wt Mammakarzinom, 10-fache Vergrößerung: starke Expression im Zytoplasma, IRS 9

3.1.2 Ergebnisse *BRCA1*-mut Mammakarzinom

In dieser Gruppe wird das Expressionsmuster von RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA in sieben verschiedenen *BRCA1*-mut Mammakarzinomen immunhistochemisch untersucht.

3.1.2.1 RHAMM

Tabelle 13 zeigt die immunhistochemische Färbung der *BRCA1*-mut Mammakarzinome mit dem RHAMM-Antikörper. Die Lokalisation des RHAMM-Proteins ist wie beim *BRCA1*-wt Karzinom im Zytoplasma (Abb. 6). Die Auswertung zeigt einen Immunreaktiven-Score von sechs bei drei Präparaten und von neun bei vier Präparaten. Insgesamt werden bei 4/7 Präparaten eine starke RHAMM Expression im Zytoplasma festgestellt.

Nr.	Tumor	Probe	Auswertung Färbung					
			Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	IRS	Negativ- Kontrolle
1	<i>BRCA1</i> -mut	15939/95	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
2	<i>BRCA1</i> -mut	2126/94	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
3	<i>BRCA1</i> -mut	23247	Zytoplasma	++	3	2	6	-
4	<i>BRCA1</i> -mut	5613/1b	Zytoplasma	++	3	2	6	-
5	<i>BRCA1</i> -mut	23722/90	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
6	<i>BRCA1</i> -mut	3828786	Zytoplasma	++	3	2	6	-
7	<i>BRCA1</i> -mut	9305/96	Zytoplasma	+++	3	3	9	-

Tabelle 13: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von *BRCA1*-mut Mammakarzinom mit dem RHAMM-Antikörper: starke Färbung des Zytoplasmas in 4/7 Präparaten

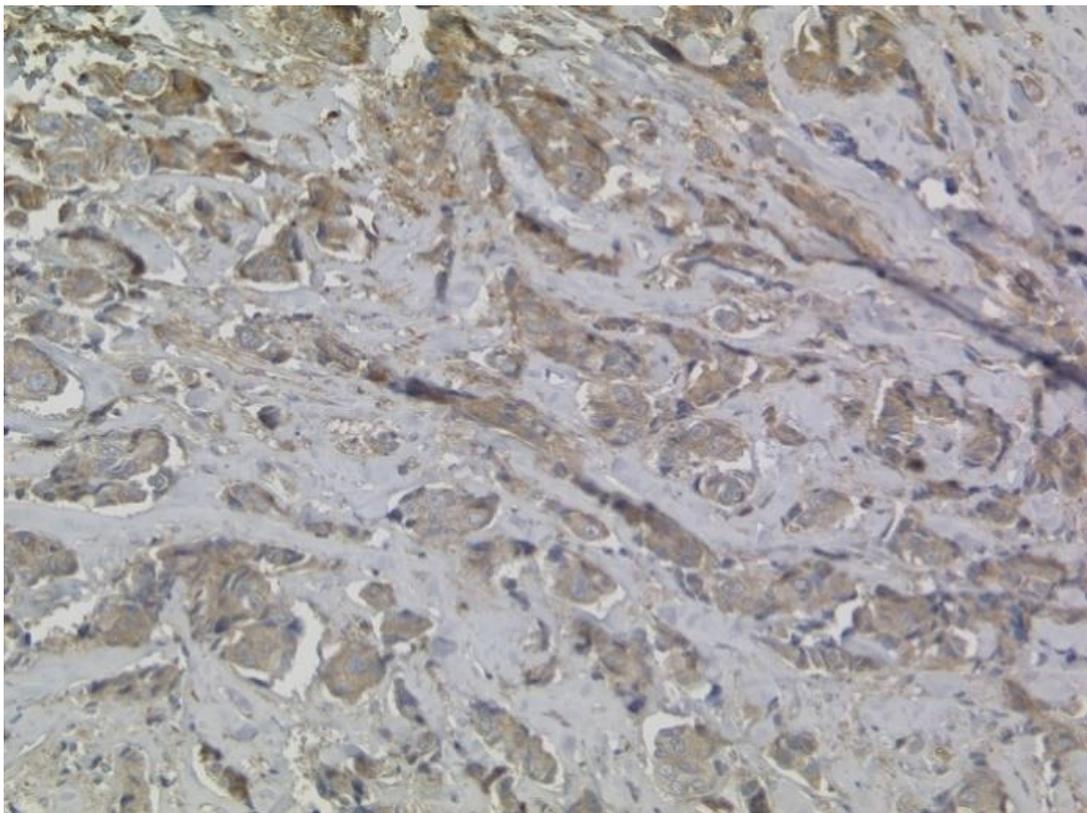


Abb. 6: Darstellung der RHAMM-Expression im *BRCA1*-mut Mammakarzinom, 10-fache Vergrößerung: starke Proteinexpression im Zytoplasmas, IRS 9

3.1.2.2 pT703-RHAMM

Anders als beim *BRCA1*-wt Mammakarzinom zeigt die immunhistochemische Färbung des *BRCA1*-mut Mammakarzinoms mit dem pT703-RHAMM-Antikörper die Proteinlokalisierung hauptsächlich im Zytoplasma mit Färbung mancher Kerne. Bei vielen Kernen zeigt sich eine Farbanreicherung um die Kernmembran und spricht damit für eine perinukleäre Proteinlokalisierung (Abb.7). Der Immunreaktive-Score beträgt bei einem Präparat sechs und bei sechs Präparaten 12. pT703-RHAMM zeigt in 6/7 *BRCA1*-mut Mammakarzinome eine starke Expression im Zytoplasma/perinukleär (Tabelle 14).

Nr.	Tumor	Probe	Auswertung Färbung					
			Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	IRS	Negativ- Kontrolle
1	<i>BRCA1</i> -mut	15939/95	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
2	<i>BRCA1</i> -mut	2126/94	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
3	<i>BRCA1</i> -mut	23247	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
4	<i>BRCA1</i> -mut	5613/1b	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
5	<i>BRCA1</i> -mut	23722/90	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
6	<i>BRCA1</i> -mut	3828786	Zytoplasma/ perinukleär	++	3	2	6	-
7	<i>BRCA1</i> -mut	9305/96	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-

Tabelle 14: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von *BRCA1*-mut Mammakarzinom mit dem pT703-RHAMM-Antikörper: starke Proteinexpression im Zytoplasma/perinukleär in 6/7 Präparaten.

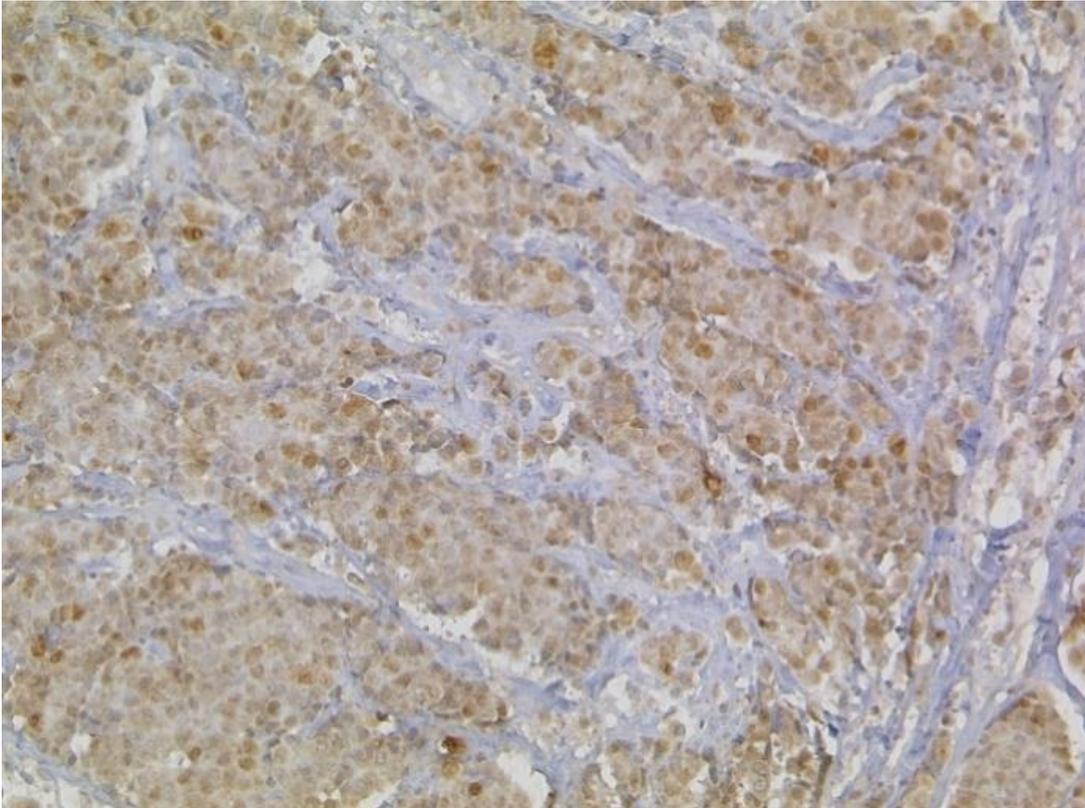


Abb. 7: Darstellung der pT703-RHAMM-Expression im *BRCA1*-mut Mammakarzinom, 10-fache Vergrößerung: starke Expression im Zytoplasma/perinukleär, IRS 12

3.1.2.3 AURKA

Tabelle 15 zeigt die immunhistochemische Färbung des *BRCA1*-mut Mammakarzinoms mit dem AURKA-Antikörper. Die Proteinlokalisierung ist auch beim *BRCA1*-mut Mammakarzinom im Zytoplasma (Abb.8). Die Auswertung mit dem Immunreaktivenscore ergibt bei einem Präparat zwei, bei zwei Präparaten drei und bei drei Präparaten vier. In nur einem Präparat zeigt sich eine starke AURKA-Expression mit einem IRS von neun. Damit ist in 6/7 Präparaten eine schwache Expression im Zytoplasma zu sehen. Anders als beim *BRCA1*-wt Mammakarzinom ist die AURKA-Expression beim *BRCA1*-mut Mammakarzinom überwiegend schwächer.

Nr.	Tumor	Probe	Auswertung Färbung					
			Lokalisation	Remmele-Score	PP	SI	IRS	Negativ-Kontrolle
1	<i>BRCA1</i> -mut	15939/95	Zytoplasma	+	3	1	3	-
2	<i>BRCA1</i> -mut	2126/94	Zytoplasma	+	3	1	3	-
3	<i>BRCA1</i> -mut	23247	Zytoplasma	++	2	2	4	-
4	<i>BRCA1</i> -mut	5613/1b	Zytoplasma	++	2	2	4	-
5	<i>BRCA1</i> -mut	23722/90	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
6	<i>BRCA1</i> -mut	3828786	Zytoplasma	+	2	1	2	-
7	<i>BRCA1</i> -mut	9305/96	Zytoplasma	++	2	2	4	-

Tabelle 15: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von *BRCA1*-mut Mammakarzinom mit dem AURKA-Antikörper: größtenteils schwache AURKA-Expression im Zytoplasma in 6/7 Präparaten.

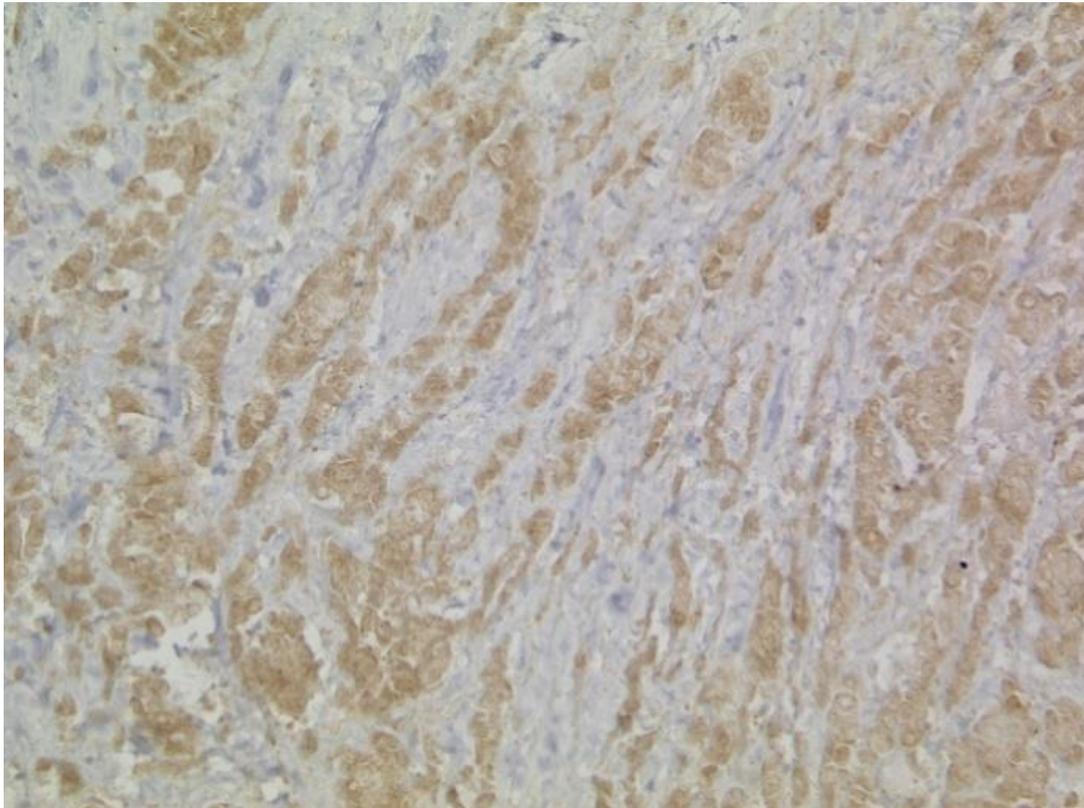


Abb. 8: Darstellung der AURKA-Expression im *BRCA1*-mut Mammakarzinom, 10-fache Vergrößerung: in 1/7 Präparaten starke Expression im Zytoplasma, IRS 9

3.1.3 Ergebnisse Triple- negatives Mammakarzinom (TNBC)

In der Gruppe der TNBC werden Paraffinschnitte aus neun verschiedenen Tumorblöcken mit jeweils RHAMM-, AURKA- und pT703-RHAMM-Antikörper immunhistochemisch gefärbt.

3.1.3.1 RHAMM

Auch beim TNBC ist die immunhistochemische Färbung mit dem RHAMM-Antikörper im Zytoplasma zu sehen (Abb. 9). Der Immunreaktive-Score beträgt bei einem Präparat sechs und bei acht Präparaten 12. RHAMM zeigt in TNBC in 8/9 Präparaten eine besonders starke Expression im Zytoplasma (Tabelle 16).

Nr.	Tumor	Probe	Auswertung Färbung					
			Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	IRS	Negativ- Kontrolle
1	TNBC	363/97b4	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
2	TNBC	450/98a	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
3	TNBC	474/95a5	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
4	TNBC	500/98b3	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
5	TNBC	836/97a	Zytoplasma	++	2	3	6	-
6	TNBC	1218/96b2	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
7	TNBC	1313/98a5	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
8	TNBC	8044/00	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
9	TNBC	8271/00a	Zytoplasma	+++	4	3	12	-

Tabelle 16: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von TNBC mit dem RHAMM-Antikörper: starke Expression im Zytoplasma in 8/9 Präparaten

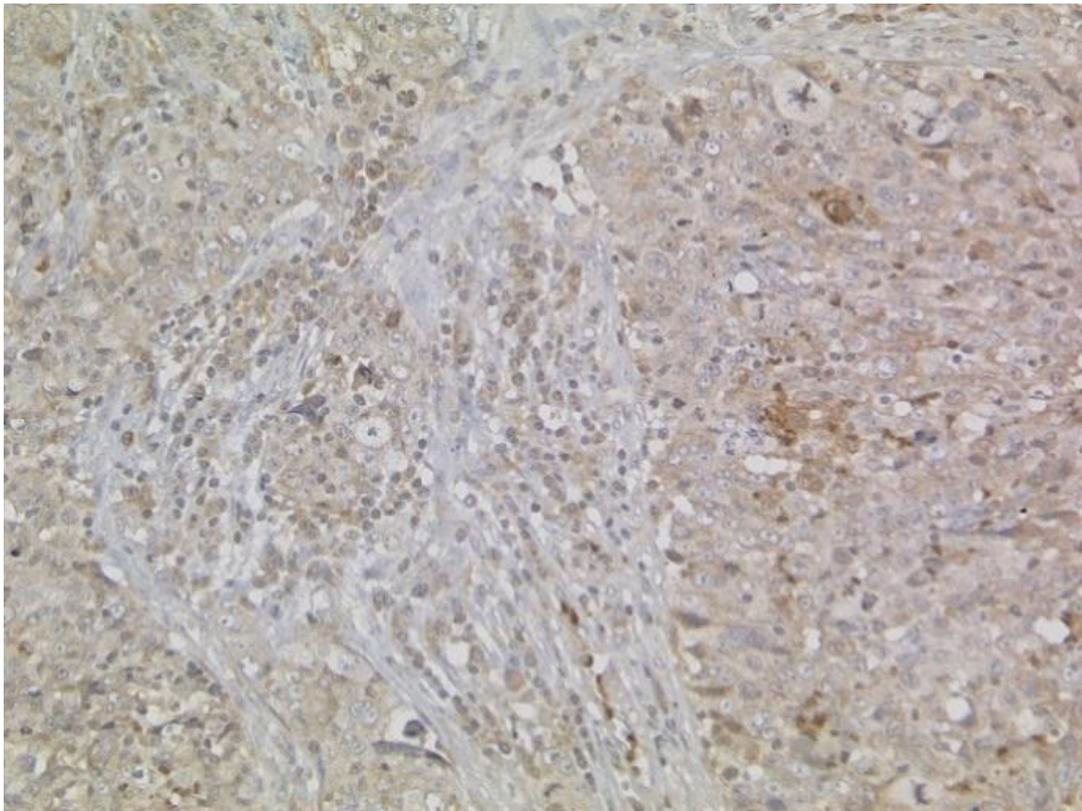


Abb. 9: Darstellung der RHAMM-Expression im TNBC, 10-fache Vergrößerung: starke Proteinexpression im Zytoplasma, IRS 12

3.1.3.2 pT703-RHAMM

Ähnlich wie beim *BRCA1*-mut Mammakarzinom zeigt die immunhistochemische Färbung des TNBC mit dem pT703-RHAMM-Antikörper eine Proteinlokalisierung im Zytoplasma, aber auch die Kernmembran hat eine starke Farbanreicherung (Abb. 10). Die Auswertung zeigt einen Immunreaktiven-Score von sechs bei einem Präparat und 12 bei den weiteren acht Präparaten. Bei 8/9 der TNBC wird eine starke pT703-RHAMM-Expression im Zytoplasma/perinukleär nachgewiesen (Tabelle 16).

Nr.	Tumor	Probe	Auswertung Färbung					
			Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	IRS	Negativ- Kontrolle
1	TNBC	363/97b4	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
2	TNBC	450/98a	Zytoplasma/	+++	4	3	12	-

			perinukleär					
3	TNBC	474/95a5	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
4	TNBC	500/98b3	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
5	TNBC	836/97a	Zytoplasma/ perinukleär	++	2	3	6	-
6	TNBC	1218/96b2	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
7	TNBC	1313/98a5	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
8	TNBC	8044/00	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-
9	TNBC	8271/00a	Zytoplasma/ perinukleär	+++	4	3	12	-

Tabelle 17: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von TNBC mit dem pT703-RHAMM-Antikörper: starke pT703-RHAMM-Expression im Zytoplasma/perinukleär in 8/9 Präparaten.

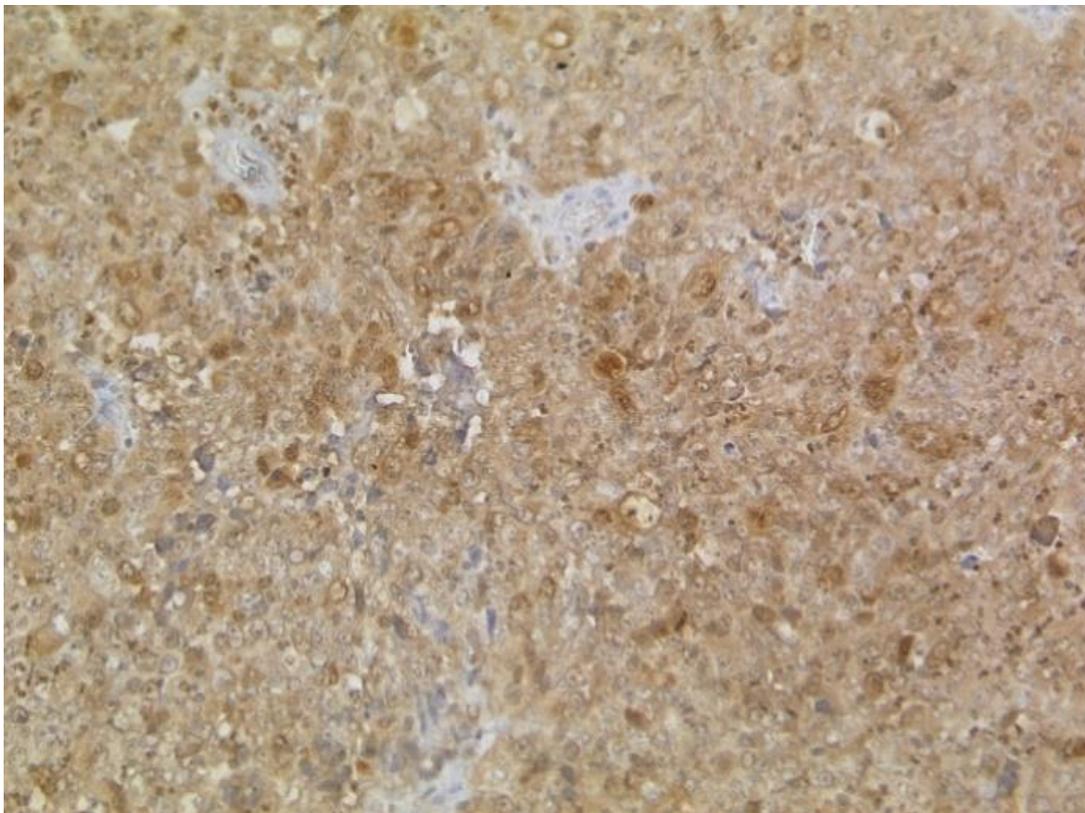


Abb. 10: Darstellung der pT703-RHAMM-Expression im Triple-negativen Mammakarzinom, 10-fache Vergrößerung: Färbung des Zytoplasmas/perinukleär, IRS 12

3.1.3.3 AURKA

Die AURKA wird nach immunhistochemischer Färbung des TNBC im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 11). Der Immunreaktive-Score beträgt bei einem Präparat drei, bei einem Präparat vier, bei einem Präparat sechs, bei einem Präparat neun und bei drei Präparaten 12. Bei drei Paraffinschnitten wird keine Expression festgestellt (Tabelle 18). Insgesamt sind in 6/9 Präparaten eine mittelstarke bis starke AURKA-Expression im Zytoplasma zu sehen. Die weiteren Präparate zeigen bei zwei Präparaten keine Expression und bei einem Präparat eine schwache Proteinexpression von drei.

AURKA zeigt beim TNBC ein ähnliches Expressionsmuster wie beim *BRCAl*-wt Mammakarzinom.

Nr.	Tumor	Probe	Auswertung Färbung					
			Lokali- sation	Remmele- Score	PP	SI	IRS	Negativ- Kontrolle
1	TNBC	363/97b4	/	-	0	0	0	-
2	TNBC	450/98a	Zytoplasma	+++	3	4	12	-
3	TNBC	474/95a5	Zytoplasma	++	3	2	6	-
4	TNBC	500/98b3	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
5	TNBC	836/97a	Zytoplasma	+++	4	3	12	-
6	TNBC	1218/96b2	Zytoplasma	+++	3	3	9	-
7	TNBC	1313/98a5	Zytoplasma	++	2	2	4	-
8	TNBC	8044/00	/	-	0	0	0	-
9	TNBC	8271/00a	Zytoplasma	+	3	1	3	-

Tabelle 18: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von TNBC mit dem AURKA-Antikörper: mäßige bis starke Expression im Zytoplasma in 6/9 Präparaten

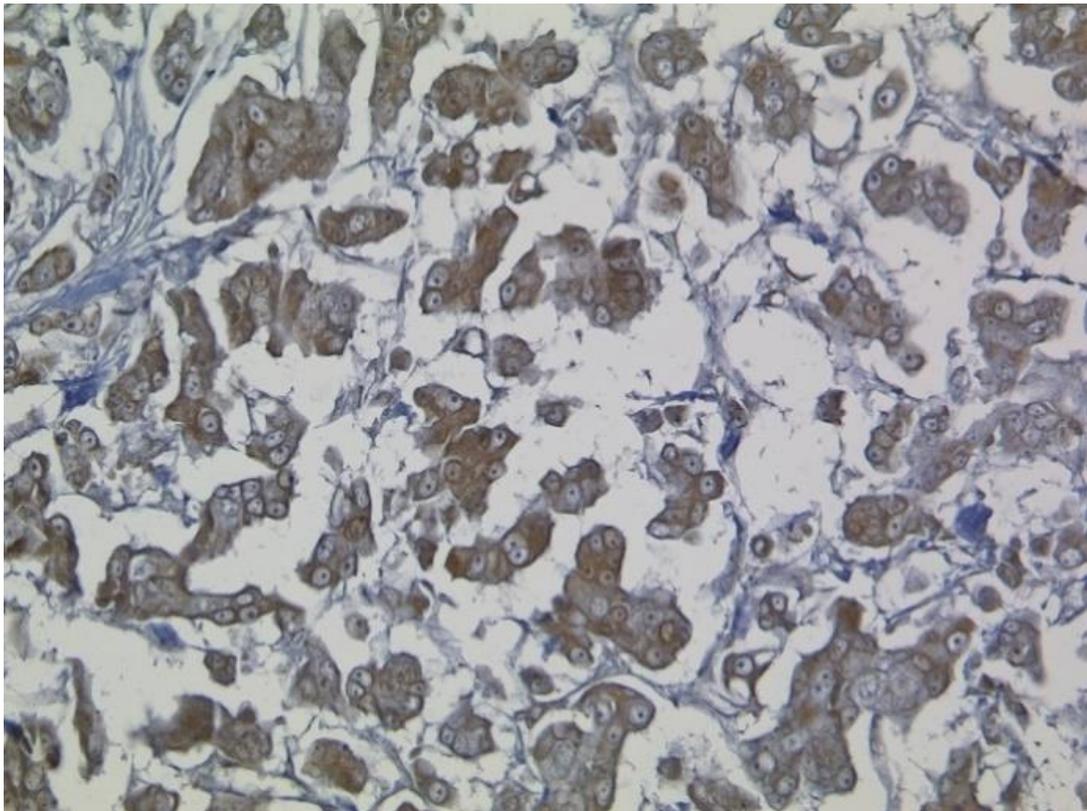


Abb. 11: Darstellung der AURKA-Expression im TNBC, 15-fache Vergrößerung: starke AURKA-Expression im Zytoplasma, IRS 9

3.1.4 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit dem Chi-Quadrat-Test

Die immunhistochemischen Ergebnisse der RHAMM-, pT703-RHAMM- und AURKA-Expression in den unterschiedlichen Mammakarzinomen (*BRCAl*-wt, *BRCAl*-mut und TNBC) werden mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch ausgewertet.

Dabei wird die Proteinexpression anhand des Immunreaktiven-Scores (Expression schwach positiv, mäßig positiv, stark positiv) verglichen und die Proteinlokalisierung (Expression im Zytoplasma, perinukleär, Kern) in Bezug auf den *BRCAl*-Status in den untersuchten Mammakarzinomen ausgewertet.

3.1.4.1 Vergleichende Auswertung der Proteinexpression nach dem Immunreaktiven Score

Proteinexpression von RHAMM

Die Tabelle 19 und Abbildung 12 zeigen die RHAMM-Expression in *BRCAl*-wt und *BRCAl*-mut Mammakarzinomen sowie in TNBC. Die Auswertung des Immunreaktiven Scores aus den immunhistochemischen Färbungen erfolgt mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests. RHAMM zeigt eine schwache bis mäßig positive Expression in 93% der *BRCAl*-wt Mammakarzinomen. In den anderen beiden Mammakarzinomen zeigt RHAMM eine starke Expression in 57% der *BRCAl*-mut sowie in 89% der TNBC. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen *BRCAl*-wt und *BRCAl*-mut Mammakarzinomen bzw. TNBC bezüglich der Expressionsstärke des Proteins (p-Wert < 0,001). Abb. 12 zeigt, dass RHAMM stärker exprimiert wird in *BRCAl*-mut und TNBC als in *BRCAl*-wt Mammakarzinomen.

Gewebe * RHAMM Kreuztabelle

Anzahl		RHAMM				Gesamt
		0-1 negativ	2-3 schwach pos	4-8 mäßig pos	9-12 stark pos	
Gewebe	BRCA1-wt	1	6	8	0	15
	BRCA1-mut	0	0	3	4	7
	TNBC	0	0	1	8	9
Gesamt		1	6	12	12	31

Tabelle 19: Immunreaktiver Score von RHAMM: Auswertung der RHAMM Expression in *BRCA1*-wt (n=15), *BRCA1*-mut (n=7) und TNBC (n=9)

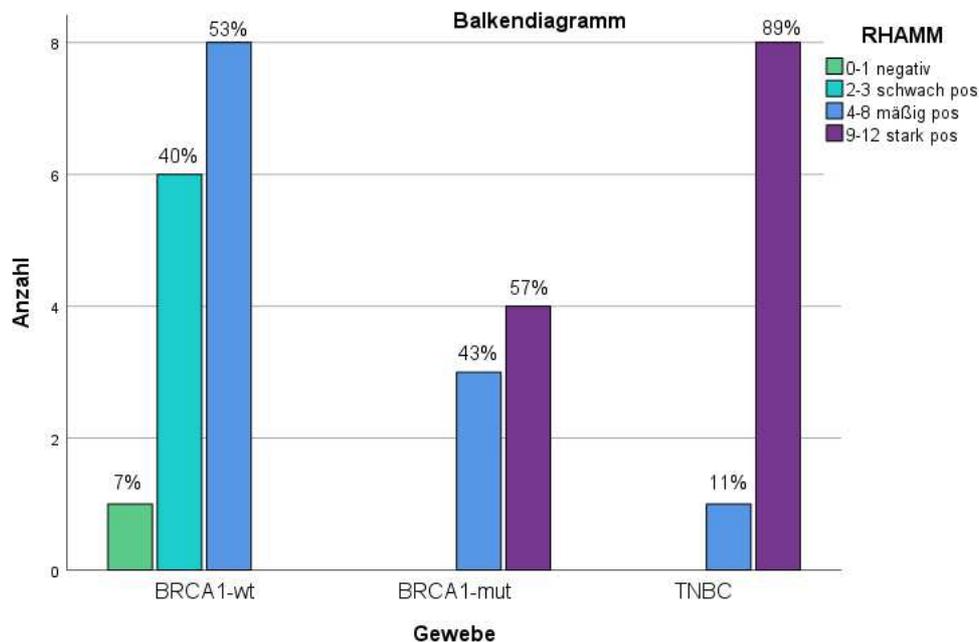


Abb. 12: RHAMM: Balkendiagramm mit RHAMM Expression in den *BRCA1*-wt und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen sowie in TNBC

Proteinexpression von pT703-RHAMM

Die statistische Auswertung der Proteinexpression von pT703-RHAMM in *BRCA1*-wt, *BRCA1*-mut und TNBC nach dem Immunreaktiven Score wird in Tabelle 20 und Abbildung 13 veranschaulicht. pT703-RHAMM zeigt eine überwiegend (in 80%) mäßig positive Expression in den *BRCA1*-wt Mammakarzinomen, während in den *BRCA1*-mut Mammakarzinomen (in 86%) und TNBC (in 89%) eine starke pT703-

RHAMM-Expression zu sehen ist. Bei der Auswertung mit dem Chi-Quadrat-Test zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der pT703-RHAMM Expression abhängig vom *BRCA1*-Status (p -Wert $< 0,01$). Ähnlich wie bei RHAMM ist auch die pT703-RHAMM Expression stärker in *BRCA1*-mut und TNBC als in den *BRCA1*-wt Mammakarzinomen.

Gewebe * pT703-RHAMM Kreuztabelle

Anzahl

		pT703-RHAMM				Gesamt
		0-1 negativ	2-3 schwach pos	4-8 mäßig pos	9-12 stark pos	
Gewebe	BRCA1-wt	2	1	12	0	15
	BRCA1-mut	0	0	1	6	7
	TNBC	0	0	1	8	9
Gesamt		2	1	14	14	31

Tabelle 20: Immunreaktiver Score von pT703-RHAMM: Auswertung der pT703-RHAMM Expression in *BRCA1*-wt (n=15) und *BRCA1*-mut (n=7) Mammakarzinomen sowie in TNBC (n=9)

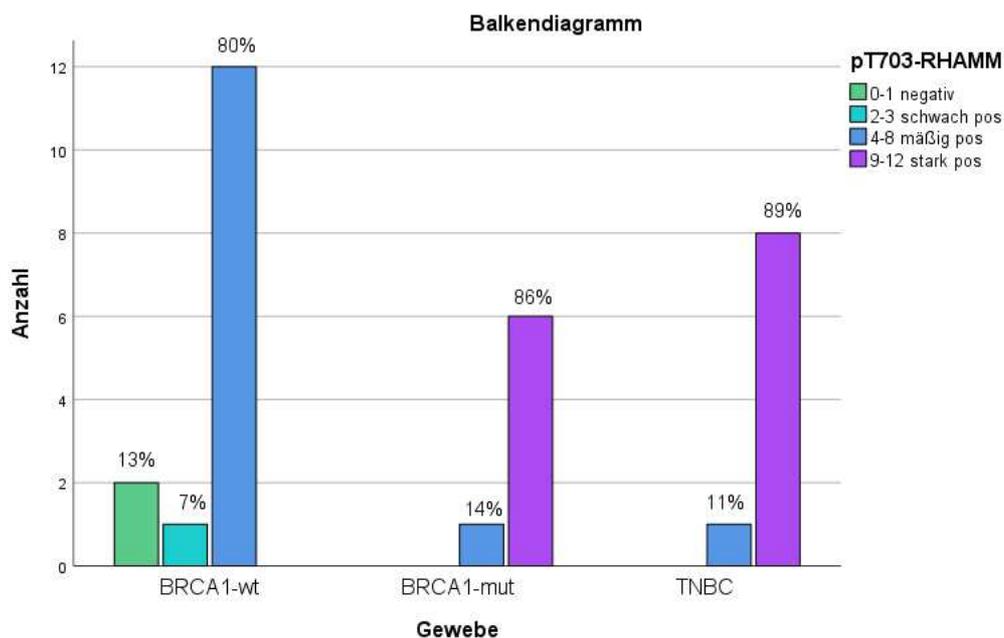


Abb. 13: pT703-RHAMM: Balkendiagramm mit pT703-RHAMM-Expression in den *BRCA1*-wt und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen sowie in TNBC

Proteinexpression von AURKA

Die Tabelle 21 und die Abbildung 14 zeigen die Expression von AURKA in *BRCA1*-wt, *BRCA1*-mut und TNBC nach dem Immunreaktiven Score. AURKA zeigt ein überwiegend mäßig bis stark positive Expression in *BRCA1*-wt Mammakarzinomen (80%) und TNBC (66%). Die Expression in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen ist überwiegend mäßig positiv (57%) ohne statistische Signifikanz (p-Wert 0,249). Wir können jedoch feststellen, dass AURKA anders als RHAMM und pT703RHAMM in *BRCA1*-wt stärker exprimiert wird als in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen.

Gewebe * AURKA Kreuztabelle

Anzahl

		AURKA				Gesamt
		0-1 negativ	2-3 schwach pos	4-8 mäßig pos	9-12 stark pos	
Gewebe	BRCA1-wt	0	3	7	5	15
	BRCA1-mut	1	2	3	1	7
	TNBC	2	1	2	4	9
Gesamt		3	6	12	10	31

Tabelle 21: Immunreaktiver Score von AURKA: Auswertung der AURKA Expression in *BRCA1*-wt (n=15), *BRCA1*-mut (n=7) und TNBC (n=9)

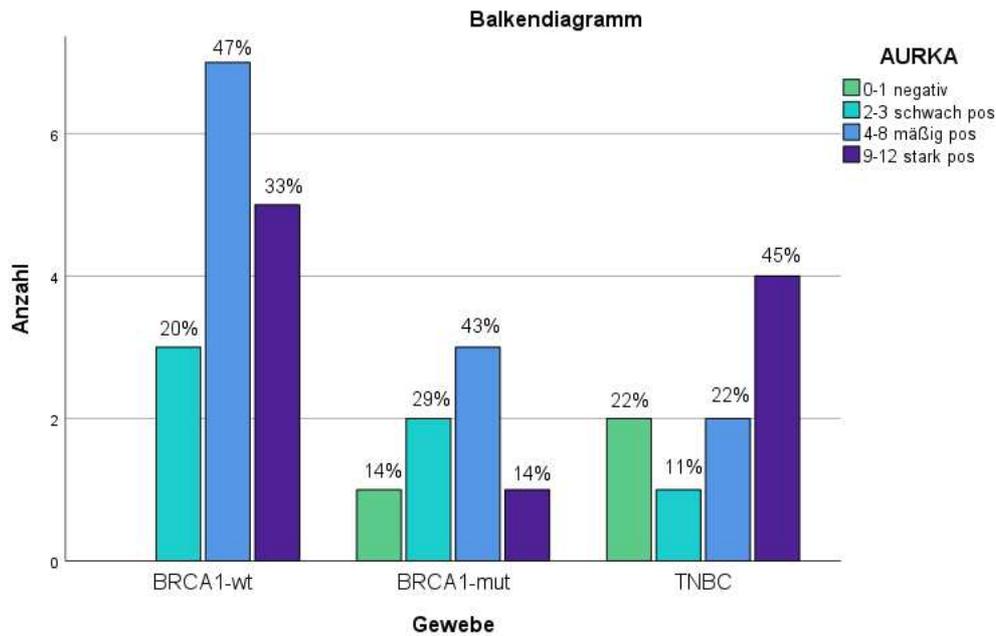


Abb. 14: AURKA: Balkendiagramm mit AURKA-Expression in den *BRCA1*-wt und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen sowie in TNBC

3.1.4.2 Auswertung der Proteinlokalisierung

Diese Auswertung (Abbildung 15) erfolgt zur Untersuchung der Proteinlokalisierung von RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA in *BRCA1*-wt und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen und TNBC. Aus den immunhistochemischen Färbungen können wir entnehmen in welchem Zellkompartiment die o.g. Proteine lokalisiert sind. Lichtmikroskopisch kann je nach untersuchtem Protein eine Lokalisation im Zytoplasma, perinukleär oder im Kern der Zellen festgestellt werden. Die Versuche zeigen, dass ein Protein in einem bestimmten Gewebe in allen untersuchten Präparaten die gleiche Lokalisation hat, z.B. wurde RHAMM in allen *BRCA1*-wt Mammakarzinomen (n=15) im Zytoplasma nachgewiesen, also zu 100% (Y-Achse 1,0). Es wird untersucht, ob sich bei den Proteinen abhängig vom *BRCA1*-Status eine veränderte Lokalisation zeigt. In Abbildung 15 sind Lokalisationen von RHAMM, AURKA und pT703-RHAMM in den verschiedenen Geweben dargestellt.

Proteinlokalisierung von RHAMM

RHAMM wird in allen Mammakarzinomen (*BRCA1*-wt, *BRCA1*-mut und TNBC) im Zytoplasma exprimiert. Eine Änderung der Proteinlokalisierung abhängig vom *BRCA1*-Status wird nicht festgestellt.

Proteinlokalisierung von AURKA

Gemäß den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung wird AURKA ebenfalls in allen Geweben im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert. Der *BRCA1*-Status beeinflusst die Proteinlokalisierung von AURKA nicht.

Proteinlokalisierung vom pT703-RHAMM

Im *BRCA1*-wt Mammakarzinom wird die pT703-RHAMM Expression im Zellkern immunhistochemisch nachgewiesen. Unterschiedlich hierzu ist pT307-RHAMM im *BRCA1*-mut Mammakarzinom und im TNBC nicht im Kern, sondern im Zytoplasma/perinukleär lokalisiert. pT703-RHAMM scheint die Fähigkeit zur Translokation in den Kern in den *BRCA1*-mut Mammakarzinomen zu verlieren und sammelt sich im Zytoplasma und in Form eines perinukleären Ringes um den Kern an. Abhängig vom *BRCA1*-Status sehen wir eine differentielle Lokalisation von pT703-RHAMM.

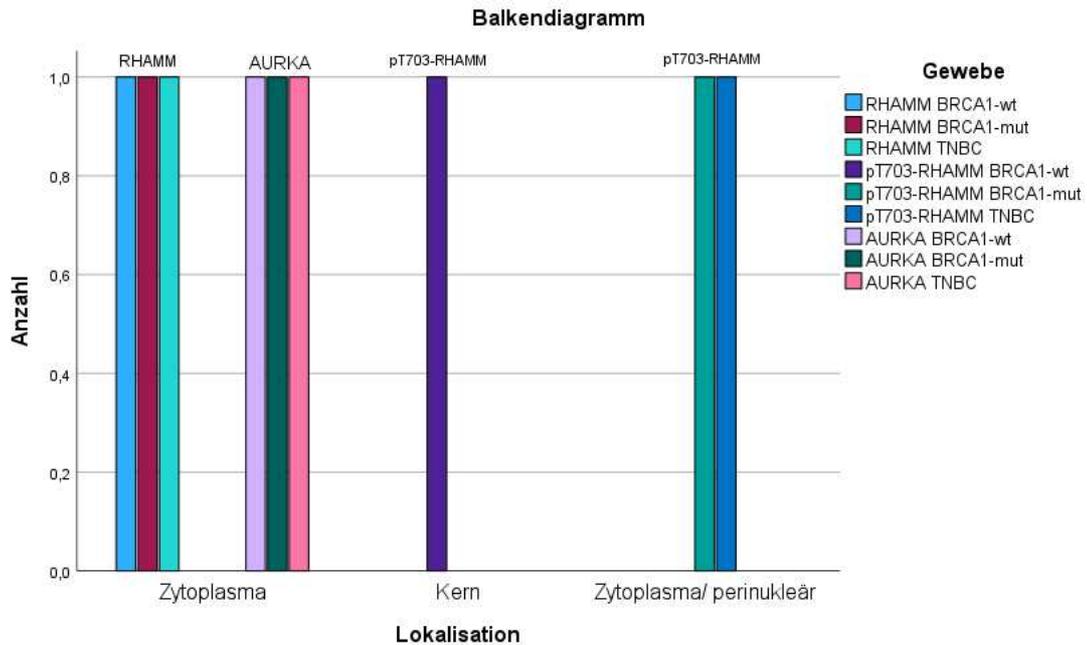


Abb. 15: Balkendiagramm mit Darstellung der Proteinlokalisierung von RHAMM, AURKA und pT703-RHAMM in *BRCA1*-wt und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen sowie TNBC

3.2 Ergebnisse der Immunzytologie (Zelllinien)

Wir können abhängig vom *BRCA1*-Status u.a. eine differentielle pT703-RHAMM Lokalisation feststellen. Während RHAMM und AURKA sowohl in *BRCA1*-wt als auch in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen im Zytoplasma nachgewiesen werden, ist die pT703-RHAMM Lokalisation in den *BRCA1*-wt Mammakarzinomen im Kern und in den *BRCA1*-mut Tumoren im Zytoplasma/perinukleär. Die folgende Versuchsreihe mit Zellkulturen von mammären Epithelzellen soll diese Eigenschaft von pT703-RHAMM abhängig vom *BRCA1*-Status genauer untersuchen.

Die Proteinlokalisierung wird zunächst an den benignen *BRCA1*-wt MCF-12a Mammazellen untersucht. Es werden immunzytologische Färbungen mit RHAMM-, pT703-RHAMM- und AURKA-Antikörper durchgeführt. Mit Hilfe der Färbeergebnisse kann beurteilt werden, in welchem Zellkompartiment die Mikrotubulusapparat-assoziierten Proteine RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA in benignen Brustdrüsenzellen (MCF-12a-brca1-wt) exprimiert werden und ob dies den Ergebnissen der Immunhistochemie entspricht.

Als nächstes wird die Proteinlokalisierung von pT703-RHAMM an *BRCA1*-mut mammären Epithelzellen der HCC 1937 Zelllinie untersucht, um festzustellen, ob sich die differentielle Proteinlokalisierung des pT703-RHAMM abhängig vom *BRCA1*-Status bestätigt.

3.2.1 Lokalisation der RHAMM-, pT703-RHAMM- und AURKA-Expression in *BRCA1*-wt mammären Epithelzellen am Beispiel der MCF-12a Zelllinie

Die Gewinnung der MCF-12a Zelllinie erfolgte ursprünglich aus einem benignen, mastopathischen Brustdrüsengewebe einer 60-jährigen kaukasischen Frau. In diesen Zellen liegt keine *BRCA1*-Mutation vor. Wie im Methodenteil beschrieben erfolgt nach der Zellkultivierung der *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen die immunzytochemische Untersuchung mit RHAMM-, pT703-RHAMM- und AURKA-Antikörper.

Die immunzytochemische Färbung der MCF-12a Zellen mit dem RHAMM-Antikörper zeigt eine mittelstarke Färbung (Braunfärbung) im Zytoplasma (Abb. 16). Das heißt, in der benignen Brustzelle ohne *BRCA1*-Mutation (MCF 12a) zeigt sich anhand der Färbung die Expression von RHAMM im Zytoplasma. Die Immunzytologie mit dem AURKA-Antikörper stellt ebenfalls eine Färbung im Zytoplasma der Zellen (Abb. 17) dar. Es ist somit von einer AURKA-Expression im Zytoplasma auszugehen. Die immunzytochemische Färbung der MCF-12a Zellen mit dem pT703-RHAMM-Antikörper weist eine starke Färbung aller Kerne (Abb.18) auf. Das zeigt, dass pT703-RHAMM in der benignen *BRCA1*-wt Brustzelle im Kern lokalisiert ist. Die Proteinlokalisationen in den mammären Epithelzellen der *BRCA1*-wt MCF12a entsprechen den Proteinlokalisationen in den *BRCA1*-wt Mammakarzinomen.

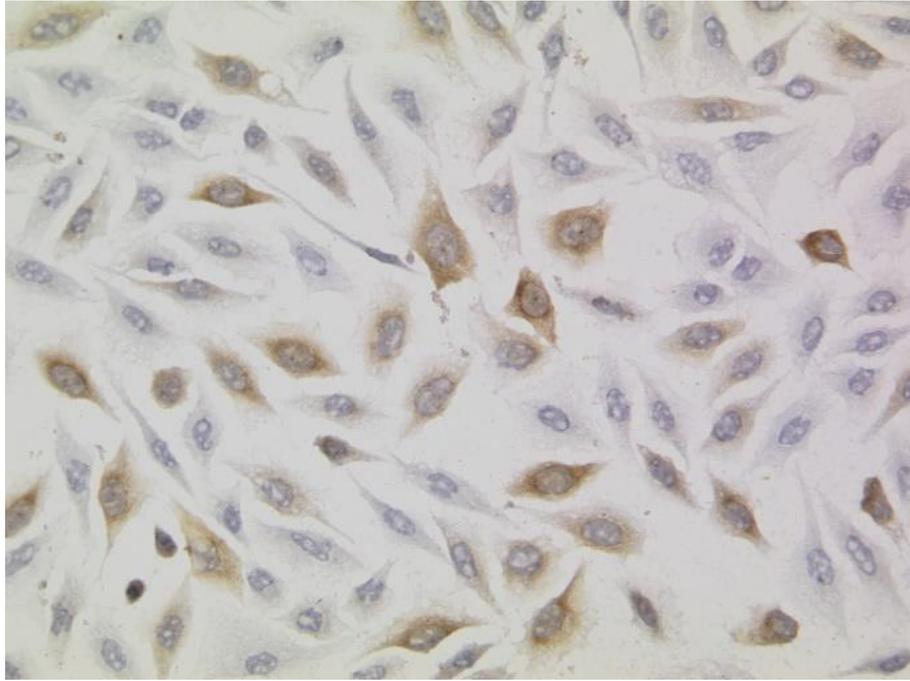


Abb. 16: *BRCA1*-wt MCF-12a: Immunzytochemische Darstellung der RHAMM-Expression durch Braunfärbung im Zytoplasma, 10-fache Vergrößerung

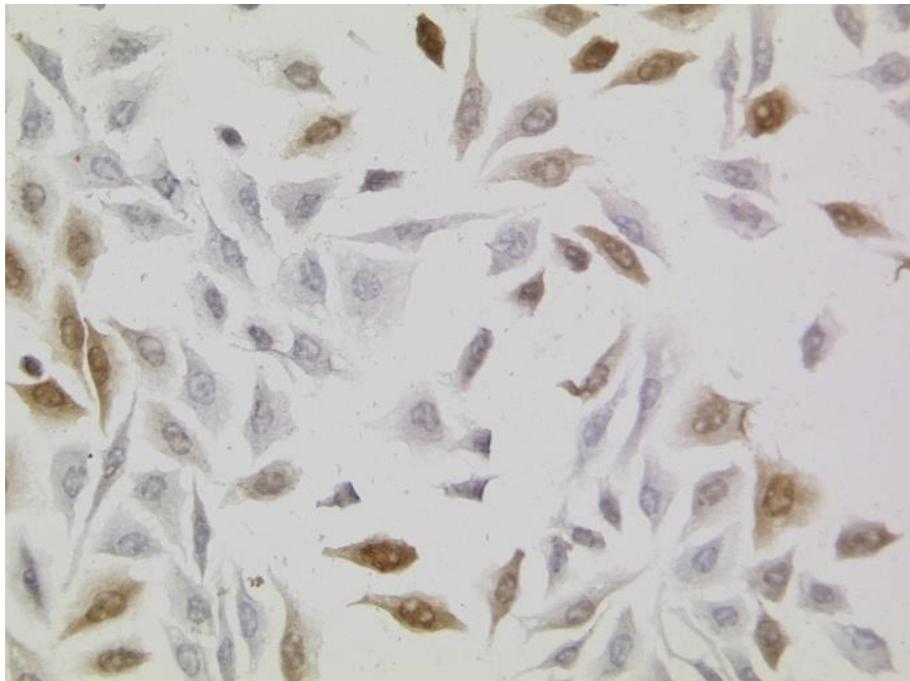


Abb. 17: *BRCA1*-wt MCF-12a: Immunzytochemische Darstellung der AURKA-Expression durch Braunfärbung im Zytoplasma der Zellen, 10-fache Vergrößerung

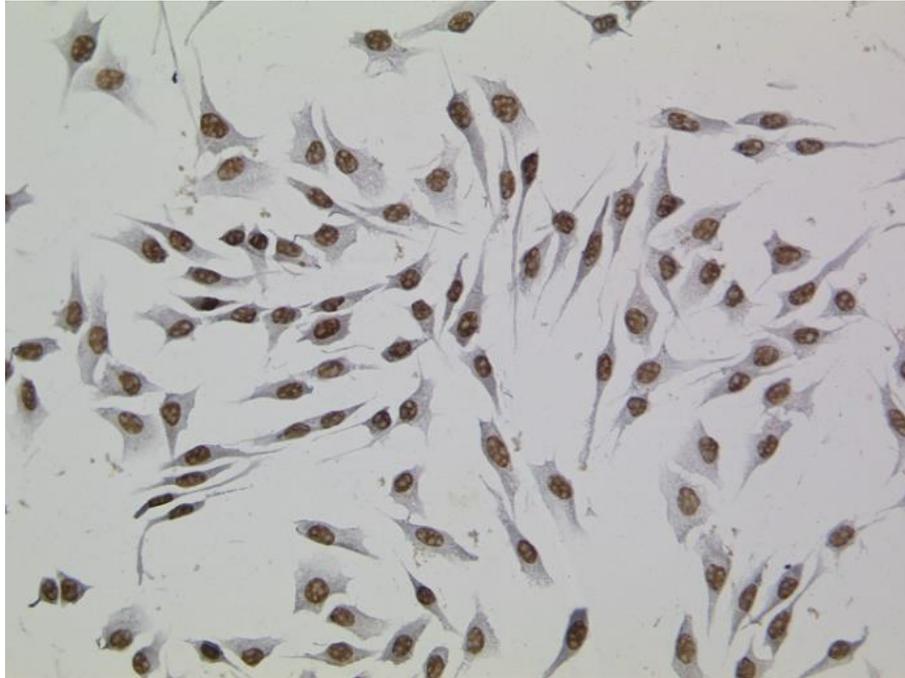


Abb. 18: *BRCA1*-wt MCF-12a: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM-Expression durch Braunfärbung der Kerne, 10-fache Vergrößerung

3.2.2 Differentielle Lokalisation der pT703-RHAMM-Expression in *BRCA1*-mut mammären Epithelzellen am Beispiel der HCC1937 Zelllinie

Die Gewinnung der HCC1937 Zelllinie erfolgte ursprünglich aus einem duktalem Mammakarzinom, TNM-Stadium IIB, Grad 3 einer 23-jährigen kaukasischen Frau. Bei diesen Zellen liegt eine homozygote *BRCA1* c.5266dupC Mutation vor. Die Zellen weisen einen negativen Hormonrezeptorstatus, sowie keine Her2 Überexpression auf. Zudem wird eine TP53 Mutation nachgewiesen.

Nach oben beschriebener Zellkultivierung erfolgt die immunzytochemische Färbung der *BRCA1*-mut HCC 1937 Zellen mit dem pT703-RHAMM-Antikörper. Hier wird die Lokalisation der pT703-RHAMM-Expression in einem *BRCA1*-mut Mammakarzinom untersucht.

Die immunzytologische Färbung der *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen mit dem pT703-RHAMM-Antikörper zeigt eine starke perinukleäre Färbung (Abb. 19). Das pT703-RHAMM befindet sich beim *BRCA1*-mut Mammakarzinom nicht im Kern. Anders als bei den MCF-12a Zellen kommt es zur pT703-RHAMM Anreicherung um den Kern herum und Bildung einer membranösen Ringstruktur in den HCC 1937 Zellen.

Um den Zusammenhang vom *BRCA1*-Status und pT703-RHAMM-Expression genauer zu untersuchen, werden Transfektanten der HCC 1937 Zelllinie hergestellt: *BRCA1*-wt-Transfektanten, *BRCA1* Δ *Exon11*-Transfektanten und S11-IN-Transfektanten, wobei die letzten zwei Transfektanten den *BRCA1*-mut Phänotyp der HCC1937 Zellen beibehalten. Bei den *BRCA1*-mut Transfektanten HCC 1937-*BRCA1* Δ Exon11 und HCC 1937-S11IN wird ebenfalls eine perinukleäre Färbung festgestellt (Abb. 20 und Abb. 21).

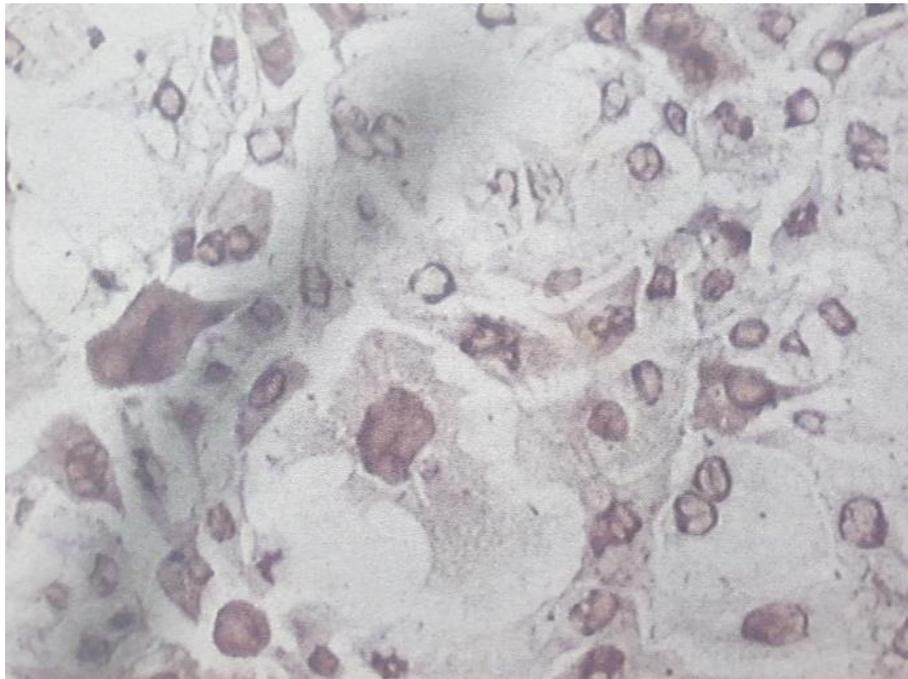


Abb. 19: *BRCA1*-mut HCC1937: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM-Expression mit perinukleärer Färbung, 10-fache Vergrößerung

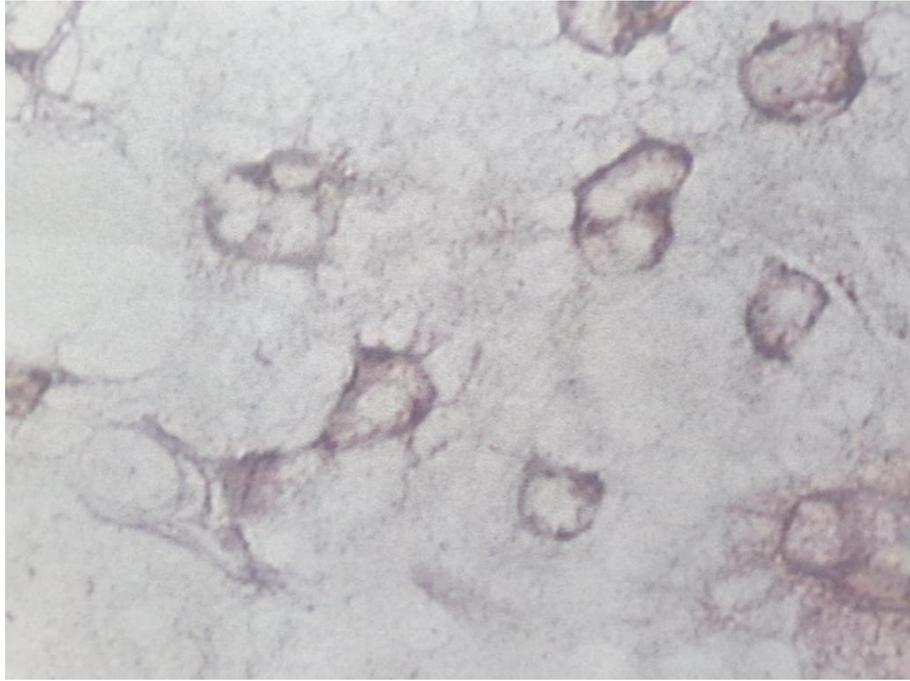


Abb. 20: *BRCA1*-mut HCC1937 Δ Exon11 Transfektant: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM-Expression mit perinukleärer Färbung, 15-fache Vergrößerung

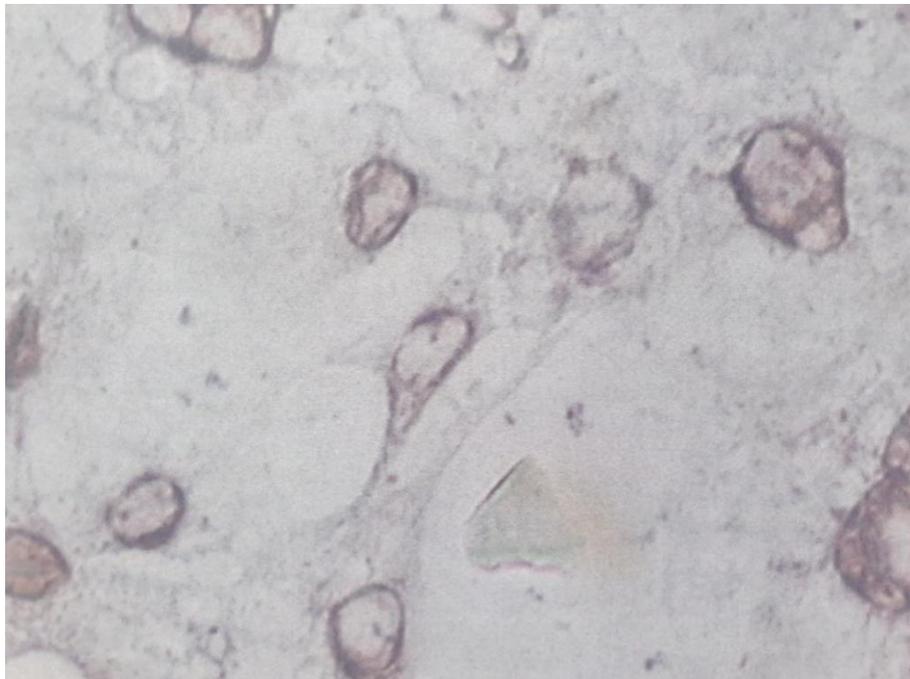


Abb. 21: *BRCA1*-mut HCC1937-S11-IN Transfektant: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM-Expression mit perinukleärer Färbung, 15-fache Vergrößerung

3.2.3 Wiederherstellung der pT703-RHAMM-Expression im Kern der HCC1937 Zellen durch Änderung des BRCA1-Status mit BRCA1-wt Transfektanten

In den zuvor durchgeführten Versuchen kann gezeigt werden, dass die pT703-RHAMM-Expression abhängig vom *BRCA1*-Status im Kern (*BRCA1*-wt MCF12a) oder im Zytoplasma/perinukleär (*BRCA1*-mut HCC 1937) lokalisiert ist. Um ein Zelllinien-spezifisches Expressionsmuster auszuschließen, werden *BRCA1*-wt HCC1937 Transfektanten untersucht. Die immunzytologische Färbung der *BRCA1*-wt HCC1937 Transfektanten mit dem pT703-RHAMM-Antikörper zeigt eine Färbung der Kerne (Abb. 22) ähnlich wie bei den mammären Epithelzellen der *BRCA1*-wt MCF12a Zelllinie. Somit wird abhängig vom *BRCA1*-Status in der gleichen Zelllinie eine unterschiedliche Lokalisation der pT703-RHAMM-Expression festgestellt. Anhand dieser immunzytologischen Versuchsreihe wird eine differentielle pT703-RHAMM-Expression abhängig vom *BRCA1*-Status der mammären Epithelzellen bestätigt.

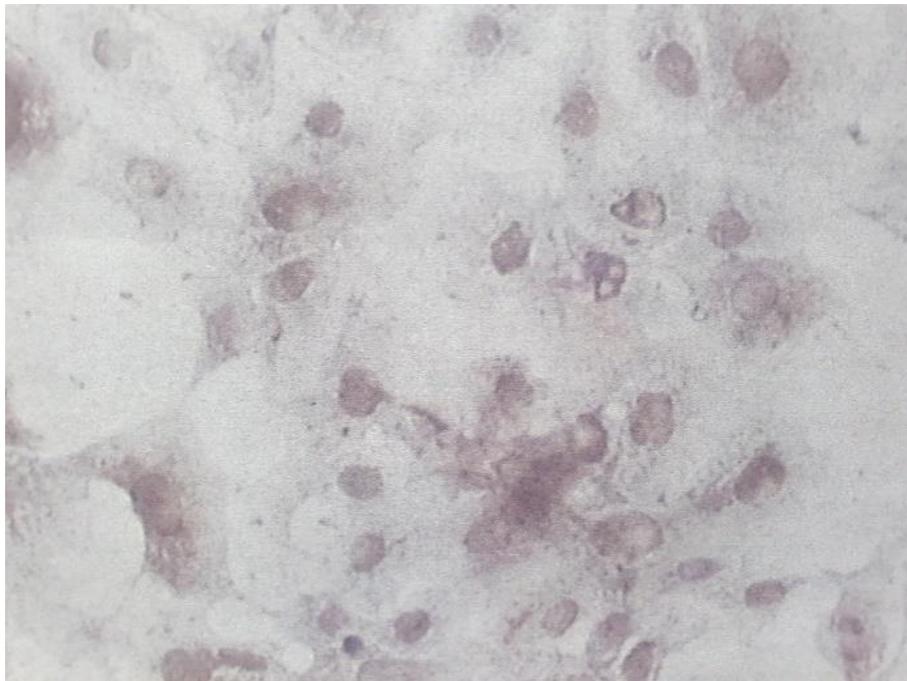


Abb. 22: *BRCA1*-wt HCC1937-Transfektanten: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM-Expression mit Färbung der Kerne, 10-fache Vergrößerung

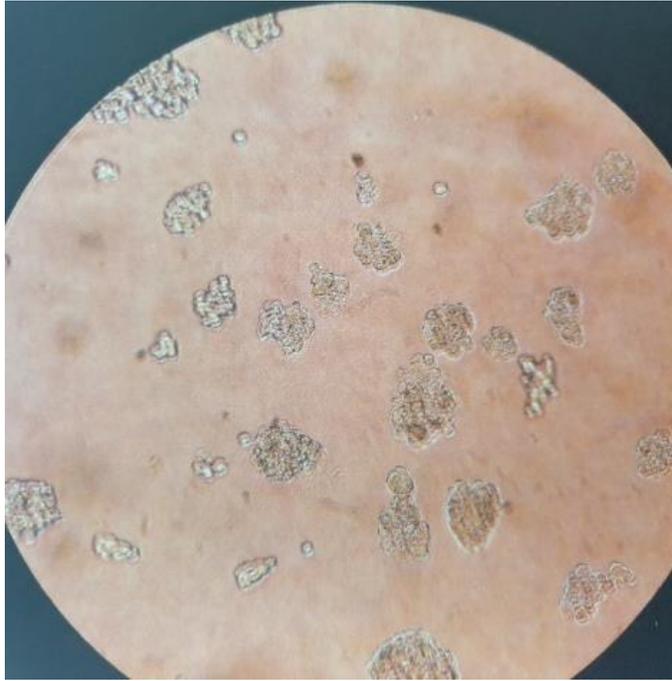
3.3 Ergebnisse der 3D-Zellkultur

Zur Beurteilung des Wachstums- und Teilungsverhaltens mammärer Epithelzellen werden *BRCA1*-wt MCF-12a und *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen in einem 3D-Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in einer 24-Well-Platte. Der Zelltitel wird vorher in einer Neubauer-Kammer bestimmt und daraus aus dem Zellpellet jeder Zelllinie ein Volumen mit einer bestimmten Anzahl an Zellen errechnet, das in jedes Well pipettiert wird. Das Wachstum und die Form der Zellen werden täglich beobachtet. Nach sieben Tagen werden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben abgelöst und mit Hilfe der Neubauer-Kammer ausgezählt. Damit wird das Teilungsverhalten untersucht.

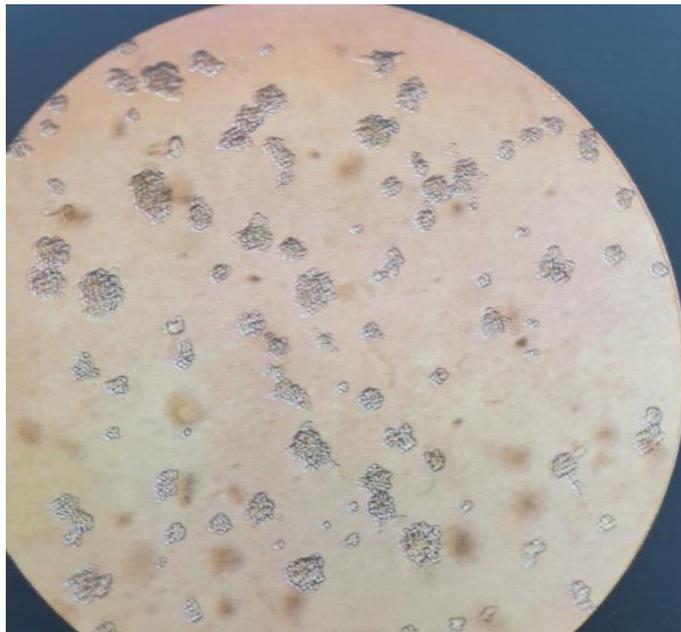
Parallel werden weitere Kulturen über 14 Tage angelegt.

3.3.1 MCF-12a Zellen

Die benignen *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen zeigen im 3D-Medium schon nach drei Tagen ein Wachstum in Zell-Cluster. Sie entwickeln im Verlauf eine traubenförmige/beerenförmige Architektur (Abb. 23). Die Auszählung nach sieben Tagen ergibt eine ca. 2,5-fach höhere Gesamtzahl an Zellen. Eine Teilung hat somit zumindest einmal stattgefunden und die MCF-12a-Zellen haben sich nach sieben Tagen im 3D-Medium verdoppelt. Nach 14 Tagen haben sich die Zell-Cluster vervielfacht und teilweise miteinander verbunden. Die 3D-Struktur bleibt weiterhin mit der typischen traubenförmigen Architektur erhalten (Abb. 24).



Tag 7; 15-fache Vergrößerung



Tag 14; 10-fache Vergrößerung

Abb. 23 und 24: *BRCA1*-wt MCF-12a Kultur in 3D-Matrigel, Darstellung von traubenförmigen Zell-Clustern mit 3D-Struktur (Abb. oben), nach 14 Tagen Verbindung zu benachbarten Zell-Cluster mit Strukturerthalt (Abb. unten)

3.3.2 HCC1937 Zellen

Die malignen *BRCA1-mut* HCC1937 Zellen zeigen im 3D-Medium ein zweidimensionales Wachstum auf dem Boden des MatrigelsTM. Auch hier entwickeln sich Zell-Ansammlungen nach drei Tagen. Eine Trauben- oder Beerenform ist jedoch nicht erkennbar (Abb. 25). Die Auszählung der Zellen nach sieben Tagen ergibt eine Vervielfachung um den Faktor 5.

Auch nach 14 Tagen sind die HCC1937 Zellen nicht in der Lage eine 3D-Struktur zu bilden. Die Architektur bleibt gestört (Abb. 26). Auffällig ist die deutlich vermehrte Zellzahl, die für eine hohe Teilungsrate spricht.



Abb. 25: *BRCA1-mut* HCC1937 Kultur in 3D-Matrigel, Tag 7. Zellen sind auf dem Boden des MatrigelTM in 2D-Form. Eine traubenförmige 3D-Struktur wird nicht gebildet, 15-fache Vergrößerung

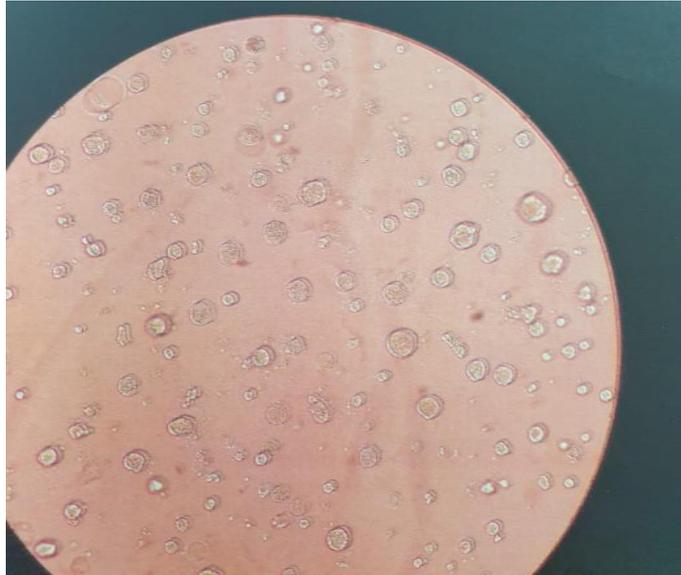


Abb. 26: *BRCA1*-mut HCC1937 Kultur in 3D-Matrigel, Tag 14. Zellen bilden weiterhin keine traubenförmige Zell-Cluster in 3D-Struktur. Benachbarte Zell-Cluster konfluieren miteinander, bleiben jedoch weiterhin in 2D-Form, 10-fache Vergrößerung

3.4 Zusammenfassung ex-vivo Ergebnisse

Es wird der Einfluss des *BRCA1*-Status auf das Mikrotubulus-assoziierte Protein RHAMM, seiner aktivierten Form, pT703-RHAMM und sein Hauptaktivator AURKA untersucht. Hierzu führen wir immunhistochemische Färbungen mit RHAMM-, pT703-RHAMM und AURKA-Antikörper an Paraffinschnitten von *BRCA1*-wt, *BRCA1*-mut und Triple-negative Mammakarzinomen durch. Durch die Anfärbung der Präparate mit den o.g. Antikörpern kann das Vorkommen bzw. die Expression von RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA in den untersuchten Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Beurteilt wird die Expression von RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA anhand von Farbergebnis (schwach, mäßig, stark positiv) und Farblokalisation (Zytoplasma, perinukleär oder Kern). Die Auswertung erfolge nach dem Immunreaktiven Score mittels Lichtmikroskop sowie statistisch mit dem Chi-Quadrat-Test.

Verglichen wird die Färbung im *BRCA1*-wt Mammakarzinom zu *BRCA1*-mut Karzinom. Zudem untersuchen wir das Triple-negative Karzinom in Bezug auf Parallele zum *BRCA1*-mut Karzinom

Wir können zeigen, dass RHAMM in allen Mammakarzinomen (*BRCAl*-wt, *BRCAl*-mut und Triple negativ) exprimiert wird, jedoch stärker in *BRCAl*-mut und Triple negativ. Ähnlich ist die pT703-RHAMM-Expression stärker in *BRCAl*-mut und Triple-negativen als in den *BRCAl*-wt Mammakarzinomen.

Anders zeige sich die Expression von AURKA. Obwohl eine statistische Signifikanz mit dem Chi-Quadrat-Test nicht festgestellt werden kann, ist die AURKA-Expression nach dem Immunreaktiven-Score stärker in *BRCAl*-wt (in 80% mäßig bis stark positiv) als in *BRCAl*-mut (in 57% mäßig positiv) Mammakarzinomen. Auch die Triple-negativen Mammakarzinome zeigen eine stärkere AURKA-Expression (in 66% mäßig bis stark positiv) als die *BRCAl*-mut.

Abgeleitet von diesen immunhistochemischen Färbungen scheint der *BRCAl*-Status bei der RHAMM-Expression eine Rolle zu spielen. Sowohl RHAMM als auch pT703-RHAMM werden in *BRCAl*-mut Mammakarzinomen stärker exprimiert als in den *BRCAl*-wt Mammakarzinomen. Überraschenderweise zeigt der RHAMM-Hauptaktivator AURKA eine schwächere Expression in *BRCAl*-mut Mammakarzinomen.

Die Auswertung der Farblokalisation untersucht ebenfalls den Einfluss des *BRCAl*-Status auf die Mikrotubulus-assoziierten Proteine. Sowohl RHAMM und als auch AURKA sind in allen Mammakarzinomen (*BRCAl*-wt, *BRCAl*-mut und Triple-negativ) immer im Zytoplasma nachzuweisen. pT703-RHAMM zeigt durch immunhistochemische Anfärbung der Kerne in den *BRCAl*-wt Mammakarzinomen eine Lokalisation im Kern. Bei den *BRCAl*-mut und bei den Triple-negativen Mammakarzinomen wird pT703-RHAMM jedoch im Zytoplasma/perinukleär angefärbt. Dies zeigt, dass bei den *BRCAl*-mut und Triple-negativen Mammakarzinomen der Transport von pT703-RHAMM in den Zellkern gestört zu sein scheint. pT703-RHAMM gelangt nicht in den Zellkern und sammelt sich perinukleär um die Kernmembran an. Abhängig vom *BRCAl*-Status zeigt sich hier eine differentielle pT703-RHAMM Lokalisation.

3.5 Zusammenfassung in-vitro Ergebnisse

Um die RHAMM-, pT703-RHAMM- und AURKA-Expression in gesunden mammären Epithelzellen zu untersuchen, haben wir zunächst *BRCAl*-wt MCF-12a Zellen einer

benignen Brust mit RHAMM-, AURKA- und pT703-RHAMM-Antikörper angefärbt. Anhand der Farblokalisation kann die Expression der Mikrotubulus-assoziierten Proteine innerhalb der Zelle abgeleitet werden. Immunzytologisch zeige sich bei RHAMM eine Färbung des Zytoplasmas der benignen *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen. Die Färbung mit dem RHAMM-Hauptaktivator AURKA war in den *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen ebenfalls im Zytoplasma zu sehen. Daraus können wir schließen, dass die Expression sowohl von RHAMM als auch von AURKA im Zytoplasma der Zelle erfolgt. Auffallen ist die Färbung des aktivierten RHAMM, pT703-RHAMM, im Kern der *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen. RHAMM wird demzufolge zu pT703-RHAMM aktiviert und translociert vom Zytoplasma in den Zellkern.

In der immunhistochemischen Versuchsreihe kann gezeigt werden, dass sich die pT703-RHAMM Lokalisation abhängig vom *BRCA1*-Status ändert. Ob sich diese differentielle Farblokalisation des pT703-RHAMM abhängig vom *BRCA1*-Status reproduzieren lässt, wird als nächstes immunzytologisch die pT703-RHAMM Lokalisation in der *BRCA1*-mut HCC1937 Zelllinie untersucht.

Es wird bestätigt, dass sowohl in den *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen als auch den *BRCA1*-mut HCC1937 Transfektanten (HCC1937 Δ Exon11, HCC1937 S11-IN) die Farblokalisation und damit das Vorkommen von pT703-RHAMM im Zytoplasma/perinukleär ist und nicht wie bei den *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen im Kern. Eine weitere Bestätigung erfolgt durch die immunzytologische Färbung der *BRCA1*-wt HCC1937-Transfektanten mit pT703-RHAMM. Durch virale Transfektion haben diese HCC1937 Zellen einen *BRCA1*-wt-Status erreicht. In diesen Zellen werden ähnlich wie bei den *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen die Kerne gefärbt und somit wird die Farblokalisation des pT703-RHAMM im Kern nachgewiesen. Damit kann gezeigt werden, dass die pT703-RHAMM Lokalisation vom *BRCA1*-Status abhängt. In den *BRCA1*-wt Zellen ist pT703-RHAMM im Kern vorzufinden. In den *BRCA1*-mut Zellen ist pT703-RHAMM nicht in der Lage in den Kern zu wandern. Lichtmikroskopisch fällt eine pT703-RHAMM Ansammlung um den Kern auf, es bildet sich eine sogenannte perinukleäre Ringstruktur um die Kernmembran. Wie in der Einleitung beschrieben hat RHAMM als Mikrotubulus-assoziiertes Protein wichtige Funktion im Rahmen der Zellteilung. Die aktivierte Form von RHAMM, pT703-RHAMM, fungiert im Zellkern. BRCA1 scheint hier mit pT703-RHAMM zu interagieren. Es ist anzunehmen, dass bei einer *BRCA1*-Mutation und der daraus resultierenden fehlenden Fähigkeit von pT703-RHAMM in den Zellkern zu wandern, eine Störung im Rahmen der Zellteilung entstehen kann.

Um den Einfluss des *BRCA1*-Status auf die Zellteilung und Zellproliferation zu untersuchen, wird eine Kultivierung von *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen und *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen im 3D-Matrigel™ durchgeführt. Es werden die Teilungsrate und das Wachstum observiert. Bei der Kultivierung im 3D-Matrigel™ zeigen die MCF-12a Zellen ein traubenförmiges Wachstum mit einer Teilungsrate um 2,5-fach, also eine Verdopplung nach sieben Tagen. Die *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen sind nicht in der Lage eine traubenförmige 3D-Struktur zu entwickeln. Die Zellen bilden Cluster auf dem Boden der Kulturflasche. Auffällig ist der 5-fach hohe Zelltitel nach sieben Tagen. Die *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen zeigen im Vergleich zu den MCF-12a Zellen eine gestörte Architektur bei fehlendem traubenförmigem Wachstum und eine höhere Teilungsrate.

4 Diskussion

BRCA1-Mutationsträgerinnen haben ein hohes Risiko an Brustkrebs zu erkranken. BRCA1-mut Mammakarzinome haben häufig einen hohen Malignitätsgrad, ein frühes Erkrankungsalter und einen progressiven Verlauf. Histologisch sind vermehrt undifferenzierte Vorläuferzellen für *BRCA1*-mut Tumoren ein typisches Merkmal. Auf molekularer Ebene ist der Einfluss von BRCA1 auf den Zellzyklus von Bedeutung.

Hier spielt die Bildung und Organisation des aus Mikrotubuli bestehenden Spindelapparats vor der Zellteilung eine zentrale Rolle und ist bis dato wenig erforscht. Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss des *BRCA1*-Status auf die Mikrotubulus-assoziierten Proteine RHAMM, pT703-RHAMM und AURKA zu untersuchen.

In dieser Dissertation können wir folgende wichtige Erkenntnisse erlangen:

1. RHAMM zeigt in TNBC und in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen eine stärkere Expression als in sporadischen Mammakarzinomen
2. AURKA ist geringer in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen exprimiert als in TNBC und sporadischen Mammakarzinomen
3. pT703-RHAMM zeigt abhängig vom *BRCA1*-Status eine differentielle Lokalisation in mammären Epithelzellen
4. Mammäre Epithelzellen zeigen abhängig vom *BRCA1*-Status eine unterschiedliche Differenzierung und Proliferation

RHAMM zeigt in TNBC und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen eine stärkere Expression als in sporadischen Mammakarzinomen

In der Literatur ist eine verstärkte Expression von RHAMM in Karzinomen gegenüber normalem Gewebe beschrieben und mit einer ungünstigen Prognose verbunden (Y. T. Chen et al., 2018; Du, Chou, Klimstra, & Varmus, 2011).

Wir haben immunhistologisch die RHAMM Expression in *BRCA1*-wt-Mammakarzinomen und *BRCA1*-mut Mammakarzinomen sowie TNBC untersucht und können unterschiedliche RHAMM-Expressionen feststellen. Die Expression von RHAMM ist stärker in Triple-negativen Mammakarzinomen als in *BRCA1*-mut

Mammakarzinomen. Die *BRCAl*-wt Mammakarzinome hingegen zeigen eine vergleichsweise schwache Expression von RHAMM.

Entsprechend findet sich eine hohe pT703-RHAMM-Expression in den Tumoren der *BRCAl*-Mutationsträgerinnen bzw. Triple-negativen Tumoren jedoch nur in 30% der sporadischen *BRCAl*-wt Tumoren.

Hier scheint eine Assoziation zwischen Hormonrezeptorstatus und Organisation des Zytoskelett zu bestehen. Karzinome von *BRCAl*-Mutationsträgerinnen sind typischerweise Hormonrezeptor-negativ. Während sporadische *BRCAl*-wt Mammakarzinome in der Regel Hormonrezeptor-positiv sind. Da bei den Triple-negativen und *BRCAl*-mut Mammakarzinomen eine höhere RHAMM Expression zu sehen ist, könnte eine RHAMM-Überexpression ein Hinweis auf das typische basal-like Phänotyp des *BRCAl*-mut Mammakarzinoms sein (Maxwell et al., 2011). Blanco untersucht diesen Aspekt in einer Studie in 2015. Er hat keine Assoziation zwischen RHAMM und Östrogenrezeptorstatus bei *BRCAl*-Mutationsträgerinnen gefunden. Der Zusammenhang zwischen RHAMM und Hormonstatus in Tumoren ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt und müsste in größeren Studien genauer erforscht werden (Blanco et al., 2015).

Die bei den *BRCAl*-mut Mammakarzinomen immunhistologisch festgestellte RHAMM Überexpression könnte an eine gestörte Zellteilung mit folgender Tumorentstehung beteiligt sein. Das zeigen auch weitere Studien.

Eine Untersuchung mit benignen mammären Epithelzellen (MCF-10) zeigt bei Ausschalten von *BRCAl* eine Überexpression von RHAMM und wird mit einer in Folge gestörten Zellpolarisation und Differenzierung assoziiert (Maxwell et al., 2011).

RHAMM spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation der Mikrotubuli im Spindelapparat. Dazu kann RHAMM Mikrotubuli direkt über sein Amino-Ende binden und indirekt über sein Carboxyl-Ende nach Komplexbildung mit Dynein (H. Chen et al., 2014). Dynein ist ein Motorprotein und ist an der Positionierung der Mikrotubuli beteiligt. Dynein bildet über DYNLL1 (dynein light chain 1) einen Komplex mit Mikrotubulus-assoziierte Proteine wie CHICA und RHAMM. Dunsch zeigt, dass bei Ausschalten von RHAMM oder CHICA die Spindelapparatbildung nicht korrekt ausgeführt werden kann (Dunsch et al., 2012).

Eine von He et al. durchgeführte Studie analysiert mittels Western Blot die RHAMM Expression abhängig vom *BRCAl*-Status. Hierzu werden *BRCAl*-wt MCF-10 Zellen mit

BRCA1-mut MCF-10 Zellen verglichen. In den MCF-10 Zellen mit ausgeschaltetem BRCA1 wird eine Überexpression von RHAMM festgestellt. Diese Zellen haben in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine Unfähigkeit bei der Positionierung des Spindelapparats und Bildung einer Zellteilungsachse während der Mitose gezeigt (He et al., 2017).

Diese Studien zeigen, dass sowohl eine RHAMM Überexpression als auch eine RHAMM Unterexpression die Bildung des Spindelapparats und damit die Zellteilung stört.

BRCA1 scheint eine stabilisierende und regulierende Wirkung auf RHAMM zu haben (He et al., 2017).

AURKA zeigt eine geringere Expression in *BRCA1*-mut als in Triple-negativen und sporadischen Mammakarzinomen

AURKA ist ein Zellzyklusprotein und hat wichtige Funktionen bei der Zentrosomregulation, Mitoseeinleitung, Bildung des bipolaren Spindelapparats und Zytokinese. Eine AURKA-Überexpression ist assoziiert mit Tumorentstehung, Aneuploidie, Zentrosomdysregulation, defektem Spindelapparat und Apoptoseresistenz (Nikonova, Astsaturov, Serebriiskii, Dunbrack, & Golemis, 2013).

Zudem ist AURKA der Hauptaktivator von RHAMM und spielt eine wichtige Rolle in der BRCA1/RHAMM/AURKA/TPX2 Kaskade.

Mehrere Studien beschreiben die AURKA Lokalisation im Zytoplasma (Royce et al., 2004; Tanaka et al., 1999). Eine immunhistochemische Untersuchung von Burum-Auensen über die Lokalisation von AURKA zeigt, dass AURKA sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommt (Borum-Auensen et al., 2007).

Wir haben die AURKA-Expression in benignen mammären Epithelzellen und in Mammakarzinomen untersucht. In unseren Versuchen zeigt AURKA eine zytoplasmatische Expression in den Mammakarzinomen. In den benignen Epithelzellen der MCF-12a Zelllinie sind sowohl Kerne als auch Zytoplasma angefärbt.

Neuere Studien zeigen, dass AURKA neben der Kinase-Aktivität im Zytoplasma auch als Transkriptionsfaktor im Zellkern vorkommt (Zheng et al., 2016).

Couch untersucht den Zusammenhang zwischen AURKA und das Risiko für Brustkrebs bei *BRCA1/2* Mutationsträgerinnen. Das Ergebnis der Studie ist, dass AURKA kein Modifikator für Brustkrebs bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen ist. Jedoch gibt Couch an, dass AURKA in *BRCA1/2*-mut Tumoren höher exprimiert ist als in sporadischen

Mammakarzinomen und damit eine AURKA Überexpression mit der Tumorentstehung bei *BRCA1/2*-Mutationen in Zusammenhang steht (Couch et al., 2007).

Diese Aussage wird von Bodvarsdottir widerlegt (Bodvarsdottir, Vidarsdottir, & Eyfjord, 2007). Die Literaturrecherche ergibt, dass eine AURKA-Überexpression in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen bislang nicht festgestellt worden ist. Eine weitere Untersuchung zeigt, dass eine AURKA Überexpression mit einem größeren Risiko für sporadische Mammakarzinome als für *BRCA1*-mut Mammakarzinome in Zusammenhang steht (Vidarsdottir, Bodvarsdottir, Hilmarsdottir, Tryggvadottir, & Eyfjord, 2007).

Entsprechend dieser Studie zeigen auch unsere Versuche eine geringe AURKA Expression in den *BRCA1*-mut Mammakarzinome und eine mittelstarke bis starke AURKA-Expression in den sporadischen und Triple-negativen Mammakarzinomen.

Untersuchungen zeigen, dass die AURKA Aktivität in der G2-Phase am höchsten ist. AURKA ist an der Transition von der G2 in die M-Phase und damit der Einleitung der Mitose beteiligt. Dazu interagiert AURKA mit anderen Proteinen wie PLK1 (Polo-like kinase). Nach Interaktion mit PLK1 tritt AURKA in der späten G2-Phase mit dem Zentrosom in Kontakt. AURKA stimuliert die Zentrosomduplikation. Dazu aktiviert AURKA die CDK-aktivierende Phosphatase (CDC25B, cell division cycle 25B) und ist damit an der Mitoseeinleitung beteiligt (Dutertre et al., 2004; Nikonova et al., 2013).

Als Tumorsuppressor hemmt BRCA1 die Zentrosomduplikation über die E3 Ubiquitin Ligase. Durch Hemmung von Zentrosomduplikationen verhindert BRCA1 eine unkontrollierte Zentrosomvermehrung innerhalb eines Zellzyklus und damit Zentrosom-Amplifikationen mit Störungen bei der Zellproliferation und Differenzierung (Otsuka et al., 2020). Die Interaktion zwischen AURKA und BRCA1 erfolgt über das Carboxyl-Ende von BRCA1. AURKA phosphoryliert BRCA1 und hemmt dadurch die E3 Ubiquitin Ligase (Maxwell et al., 2011). Damit ermöglicht AURKA die Zentrosomvermehrung zur Bildung eines bipolaren Spindelapparats. Sankaran stellt die These auf, dass diese hemmende Wirkung von AURKA auf BRCA1 über eine Proteinphosphatase 1a (PPIa) aufgehoben werden kann. Demnach dephosphoryliert PPIa BRCA1 und hat zudem eine hemmende Wirkung auf AURKA (Sankaran, Crone, Palazzo, & Parvin, 2007).

Die negative Rückkopplung zwischen BRCA1 und AURKA ist noch nicht ausreichend untersucht und bedarf weiterer Studien. Jedoch zeigen sowohl die Studie von Couch als auch von Bodvarsdottir, dass AURKA nicht ein Modifikator für erhöhtes Brustkrebsrisiko bei einer *BRCA1*-Mutation ist.

pT703-RHAMM zeigt abhängig vom *BRCA1*-Status eine differentielle Lokalisation in mammären Epithelzellen

Die Zellproliferation und Differenzierung ist von einem Mikrotubulus-basierten Spindelapparat während der Zellteilung abhängig. RHAMM ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, das über komplexe Signalkaskaden an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt ist.

Am Carboxyl-Ende hat RHAMM eine Leucin-Zipper Domäne (bZIP), die homolog zu dem Carboxyl-Ende beim *Xenopus* an dieser Stelle ein XKlp2 (*Xenopus* kinesin-like protein 2) besitzt. Darüber bildet RHAMM einen Komplex mit dem Motorprotein Dynein und Spindelapparatprotein TPX2 (targeting protein for XKlp2). Dieser Komplex ist an der Bildung der Spindelapparat-Einheit mit Positionierung der Pole beteiligt. TPX2 ist zudem auch Ko-Faktor von AURKA und aktiviert und reguliert die Kinase-Aktivität. Die aktivierte AURKA kann dann durch ein Phosphorylierungsschritt RHAMM aktivieren. Nach Phosphorylierung von RHAMM zu pT703-RHAMM trennt sich TPX2 von Importin- α an der Kernmembran und transportiert pT703-RHAMM in den Zellkern (H. Chen et al., 2014; Chu et al., 2018).

Wir haben diese Signalkaskade anhand der RHAMM-Expression in den benignen mammären Epithelzellen der MCF-12a Zelllinie untersucht. Die RHAMM-Expression stellt sich im Zytoplasma dar. Während die aktivierte phosphorylierte Form von RHAMM, pT703-RHAMM, im Zellkern nachgewiesen wird.

In den *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen zeigt pT703-RHAMM eine differentielle Expression. Lichtmikroskopisch zeigt sich eine Ringstruktur um den Zellkern. Die pT703-RHAMM Lokalisation ist in diesen Zellen zytoplasmatisch mit Ansammlung um die Kernmembran herum. Im Zellkern kann kein pT703-RHAMM dargestellt werden. Da wir eine pT703-RHAMM-Expression in den nativen HCC1937 nachweisen können, scheint die Aktivierung von RHAMM durch AURKA in *BRCA1*-mut Zellen weiterhin zu funktionieren. Der nach Komplexbildung mit TPX2 bedingte Transport von pT703-RHAMM in den Zellkern scheint bei *BRCA1*-mut mammären Epithelzellen gestört zu sein.

Die Kontrolle mit *BRCA1*-wt HCC1937 Zellen zeigt wiederum die pT703-RHAMM-Expression im Zellkern. Damit können wir zeigen, dass die unterschiedliche Lokalisation der pT703-RHAMM-Expression abhängig vom *BRCA1*-Status der HCC1937 Zellen ist.

Die *BRCA1*-Mutation scheint die Interaktion zwischen pT703-RHAMM/TPX2 in mammären Epithelzellen zu beeinflussen.

Dieses Ergebnis erzielt auch eine Untersuchung von Joukov. Um einen Zusammenhang zwischen BRCA1 und der, an der Organisation des Spindelapparats beteiligten Proteine NuMA, γ -Tubulin, XRHAMM und TPX2 zu untersuchen, schaltet er den heterodimeren BRCA1/BARD1 Komplex aus. Er untersucht das Verhalten der genannten Mikrotubulusapparat-assoziierten Proteinen mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop. Die BRCA1/BARD1 Entfernung führt zu einer veränderten Lokalisation von TPX2 am Mikrotubulusapparat. TPX2 kann die radialen Mikrotubuli um die Spindelpole (Aster-Mikrotubuli) nicht mehr erreichen. XRHAMM zeigt immunfluoreszenzmikroskopisch auch eine diffuse Verteilung am Mikrotubulusapparat. Beide Proteine zeigen nach Wiederherstellung von BRCA1/BARD1 ihre normale Konzentration in den Aster-Mikrotubuli (Joukov et al., 2006).

Mammäre Epithelzellen zeigen abhängig vom *BRCA1*-Status eine unterschiedliche Differenzierung und Proliferation im 3D-Medium

Die typische Architektur der Brust ist für ihre Funktion als Drüsenorgan sehr wichtig. Hier sind Zell-Zell-Kontakte zur Signalweitergabe und die Struktur der einzelnen mammären Epithelzelle mit apiko-basaler Polarisation von Bedeutung. Nicht-Zentrosom-gebundene Mikrotubuli spielen dabei eine wichtige Rolle (Meng et al., 2008). Eine Balance zwischen Zelldifferenzierung und Proliferation ist für die Struktur der Brustdrüse entscheidend. Tumore mit gehäuft undifferenzierten luminalen Vorläuferzellen sind typisch für *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Molyneux et al., 2011).

Furuta untersucht den Einfluss von BRCA1 auf die Zelldifferenzierung und Proliferation und kommt zu dem Ergebnis, dass ein BRCA1-Defekt die Zelldifferenzierung beeinträchtigt, jedoch Zellproliferation verstärkt (Furuta et al., 2005).

Anlehnend an Furutas Studie haben wir das Wachstumsverhalten von *BRCA1*-wt MCF-12a Zellen im Vergleich zu *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen in einem 3D-Medium untersucht. Im Gegensatz zu den MCF-12a Zellen sind die *BRCA1*-mut HCC1937 Zellen nicht in der Lage eine traubenförmige/beerenförmige 3D-Struktur zu entwickeln.

Die HCC1937 Zellen zeigen eine gestörte Differenzierung von für die Brust typische beerenförmige Zell-Cluster der Drüsenendstücke/ Azini. Zudem haben sie eine doppelthohe Proliferationsrate wie die MCF-12a Zellen.

Die terminale Differenzierung einer individuellen Zelle und die Zellproliferation setzt eine intakte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und Regulation der Bindung von Mikrotubuli an den Zentrosomen voraus.

Eine Studie von Maxwell untersucht den Einfluss von BRCA1, RHAMM, AURKA und TPX2 in benignen mammären Epithelzellen der MCF-10 Zelllinie in Bezug auf Zellwachstum und Zellpolarität. Nach individuellem Ausschalten von TPX2 und AURKA zeigt sich keine bis wenig Veränderung im Zellwachstum der MCF-10 Zellen. Jedoch wird nach Ausschalten von *BRCA1* und RHAMM ein deutlich gestörtes Zellwachstum mit veränderter Architektur der Azini festgestellt. Die Studie zeigt, dass eine Interaktion zwischen BRCA1 und RHAMM die Zellpolarisation reguliert. Eine gestörte Zellpolarisation ist mit erhöhtem Risiko für Brustkrebsentstehung assoziiert (Maxwell et al., 2011).

Wir haben den Zusammenhang zwischen *BRCA1*-Status und dem Mikrotubulusapparat-assoziiertem Protein RHAMM untersucht.

Wir haben in *BRCA1*-mut Mammakarzinomen eine RHAMM Überexpression festgestellt. Immunzytologisch können wir eine differentielle RHAMM- und pT703-RHAMM-Expression abhängig vom BRCA1-Status in mammären Epithelzellen nachweisen. Wir können in einer 3D-Kultur zeigen, dass der *BRCA1*-Status die Zelldifferenzierung und Proliferation mammärer Epithelzellen beeinflusst.

Diese gestörte Zellteilung steht in Zusammenhang mit einer RHAMM-Überexpression in *BRCA1*-mut Tumoren (He et al., 2017).

Limitation der Studie

Das Ziel der Arbeit ist den Zusammenhang zwischen *BRCA1*-Status und dem Mikrotubulusapparat-assoziierten Protein RHAMM zu untersuchen. Durch unsere Versuche haben wir immunhistologisch und immunzytologisch relevante Ergebnisse erzielt und unsere Fragestellung beantwortet. Jedoch ist die Anzahl der *BRCA1*-mut Mammakarzinome mit denen wir unsere immunhistochemischen Färbungen

durchgeführt haben auf sieben begrenzt. Die Durchführung der Immunhistochemie an einer größeren Anzahl an *BRCA1*-mut Mammakarzinomen wäre als nächstes anzustreben.

Perspektive: RHAMM als Modifikator für eine *BRCA1*-Mutation

Beim *BRCA1*-mut Mammakarzinom sind bestimmte histopathologische Eigenschaften bekannt, die sich vom *BRCA1*-wt Mammakarzinom unterscheiden, wie z.B. häufig schlechter Differenzierungsgrad (G3), medullärer Subtyp mit hoher Mitoserate, hoher Anteil an triple-negativen Karzinomen sowie frühe Metastasierung (Spurdle et al., 2014). Aufgrund dieser bekannten Eigenschaften beim *BRCA1*-mut Mammakarzinom können bestimmte immunhistochemische Marker als Modifikator/ Prädiktor für eine *BRCA1*-Mutation verwendet werden. Besteht ein erhöhtes Risiko für eine *BRCA1*-Mutation, kann im Folgenden eine Gentestung durchgeführt werden und bei Nachweis einer *BRCA1*-Genmutation Screening und frühzeitige, prophylaktische Maßnahmen eingeleitet werden (Mavaddat et al., 2012).

Die Arbeitsgemeinschaft CIMBA (Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA) ist ein Konsortium, das nach eben diesen Modifikatoren für *BRCA1* und *BRCA2* sucht und in großen Studien deren Validität prüft (Antoniou et al., 2008). CIMBA wurde 2005 gegründet und ist weltweit tätig mit Hauptsitz in Cambridge. Untersucht wurden Daten von über 80000 Frauen und Männer mit registrierten *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen. Das Risiko für eine *BRCA*-Mutation scheint mit Hormonrezeptorstatus, HER2-Status, Tumorsuppressorgen p53, Cytokeratin 5/6, Cytokeratin 14, Cytokeratin 17 und Wachstumsfaktor EGRF in Zusammenhang zu stehen (Spurdle et al., 2014). Hoch signifikante Modifikatoren/ Prädiktoren für eine *BRCA1*-Mutation sind laut Spurdle et al der Östrogenrezeptorstatus, der Triple-negativ-Status und das Grading.

Bisher sind 41 Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) in 15252 *BRCA1*- und 8211 *BRCA2*-Mutationsträgerinnen bestimmt (Blanco et al., 2015).

Bei einer Studie mit aschkenasischen Juden wurde im RHAMM-Gen ein Allel entdeckt, dass mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen assoziiert wurde (Pujana et al., 2007).

Eine große Studie mit im CIMBA erfassten Daten von 11609 *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationsträgerinnen ergab eine signifikante Modifikation von Brustkrebs in RHAMM-

Gen SNP299290 Variante bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen, aber nicht bei *BRCA2*-Mutationsträgerinnen. Obwohl das SNP299290 Allel im RHAMM-Gen als benigne Missens-Mutation gewertet wird, besteht ein Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium) mit dem Allel SNP299284, das schädlich zu sein scheint. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Allelen müsste noch genauer untersucht werden (Blanco et al., 2015; Maxwell et al., 2011). Neue Erkenntnisse in diesem Bereich könnten RHAMM als Modifikator in der klinischen Routine zur Abklärung einer *BRCA1*-Mutation etablieren.

Schlussfolgerung

BRCA1 (breast cancer gene 1) beeinflusst die Zelldifferenzierung und Proliferation. Auf molekularer Ebene haben Mikrotubulus-assoziierte Proteine wie RHAMM bei der Bildung des bipolaren Spindelapparats während der Zellteilung eine wichtige Funktion. Abhängig vom *BRCA1*-Status zeigt sich eine differentielle RHAMM-Expression in mammären Epithelzellen und Mammakarzinomen. Die Interaktion zwischen BRCA1 und RHAMM hat Einfluss auf das Brustkrebsrisiko bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen.

5 Literaturverzeichnis

- Anderson, K. N., Schwab, R. B., & Martinez, M. E. (2014). Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*, *144*(1), 1-10. doi:10.1007/s10549-014-2852-7
- Antoniou, A. C., Spurdle, A. B., Sinilnikova, O. M., Healey, S., Pooley, K. A., Schmutzler, R. K., . . . Easton, D. F. (2008). Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet*, *82*(4), 937-948. doi:10.1016/j.ajhg.2008.02.008
- Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J. F., & Hart, I. R. (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J Cell Sci*, *112* (Pt 22), 3943-3954.
- Atchley, D. P., Albarracin, C. T., Lopez, A., Valero, V., Amos, C. I., Gonzalez-Angulo, A. M., . . . Arun, B. K. (2008). Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, *26*(26), 4282-4288. doi:10.1200/jco.2008.16.6231
- Bartolini, F., & Gundersen, G. G. (2006). Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci*, *119*(Pt 20), 4155-4163. doi:10.1242/jcs.03227
- Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, *362*(9382), 419-427. doi:10.1016/s0140-6736(03)14065-2
- Bernstein, L., & Lacey, J. V., Jr. (2011). Receptors, associations, and risk factor differences by breast cancer subtypes: positive or negative? *J Natl Cancer Inst*, *103*(6), 451-453. doi:10.1093/jnci/djr046
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., & Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*, *123*(1), 236-240. doi:10.1002/ijc.23518
- Blanco, I., Kuchenbaecker, K., Cuadras, D., Wang, X., Barrowdale, D., de Garibay, G. R., . . . Pujana, M. A. (2015). Assessing associations between the AURKA-HMMR-TPX2-TUBG1 functional module and breast cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers. *PLoS One*, *10*(4), e0120020. doi:10.1371/journal.pone.0120020
- Bleyer, A., & Welch, H. G. (2012). Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *N Engl J Med*, *367*(21), 1998-2005. doi:10.1056/NEJMoa1206809
- Bodvarsdottir, S. K., Vidarsdottir, L., & Eyfjord, J. E. (2007). AURKA and breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *16*(11), 2517. doi:10.1158/1055-9965.Epi-07-0669
- Burum-Auensen, E., De Angelis, P. M., Schjølberg, A. R., Kravik, K. L., Aure, M., & Clausen, O. P. (2007). Subcellular localization of the spindle proteins Aurora A, Mad2, and BUBR1 assessed by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, *55*(5), 477-486. doi:10.1369/jhc.6A7077.2007
- Buttermore, S. T., Hoffman, M. S., Kumar, A., Champeaux, A., Nicosia, S. V., & Kruk, P. A. (2017). Increased RHAMM expression relates to ovarian cancer progression. *J Ovarian Res*, *10*(1), 66. doi:10.1186/s13048-017-0360-1
- Chan, J. Y. (2011). A clinical overview of centrosome amplification in human cancers. *Int J Biol Sci*, *7*(8), 1122-1144. doi:10.7150/ijbs.7.1122

- Chapman, J. R., Taylor, M. R., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, *47*(4), 497-510. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029
- Chen, H., Mohan, P., Jiang, J., Nemirovsky, O., He, D., Fleisch, M. C., . . . Maxwell, C. A. (2014). Spatial regulation of Aurora A activity during mitotic spindle assembly requires RHAMM to correctly localize TPX2. *Cell Cycle*, *13*(14), 2248-2261. doi:10.4161/cc.29270
- Chen, Y. T., Chen, Z., & Du, Y. N. (2018). Immunohistochemical analysis of RHAMM expression in normal and neoplastic human tissues: a cell cycle protein with distinctive expression in mitotic cells and testicular germ cells. *Oncotarget*, *9*(30), 20941-20952. doi:10.18632/oncotarget.24939
- Chlebowski, R. T., Rohan, T. E., Manson, J. E., Aragaki, A. K., Kaunitz, A., Stefanick, M. L., . . . Prentice, R. L. (2015). Breast Cancer After Use of Estrogen Plus Progestin and Estrogen Alone: Analyses of Data From 2 Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol*, *1*(3), 296-305. doi:10.1001/jamaoncol.2015.0494
- Chu, T. L. H., Connell, M., Zhou, L., He, Z., Won, J., Chen, H., . . . Maxwell, C. A. (2018). Cell Cycle-Dependent Tumor Engraftment and Migration Are Enabled by Aurora-A. *Mol Cancer Res*, *16*(1), 16-31. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-17-0417
- Cipollini, G., Tommasi, S., Paradiso, A., Aretini, P., Bonatti, F., Brunetti, I., . . . Caligo, M. A. (2004). Genetic alterations in hereditary breast cancer. *Ann Oncol*, *15 Suppl 1*, I7-i13. doi:10.1093/annonc/mdh651
- Couch, F. J., Sinilnikova, O., Vierkant, R. A., Pankratz, V. S., Fredericksen, Z. S., Stoppa-Lyonnet, D., . . . Antoniou, A. C. (2007). AURKA F31I polymorphism and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a consortium of investigators of modifiers of BRCA1/2 study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *16*(7), 1416-1421. doi:10.1158/1055-9965.Epi-07-0129
- Cousineau, I., Abaji, C., & Belmaaza, A. (2005). BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer Res*, *65*(24), 11384-11391. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-2156
- Crainie, M., Belch, A. R., Mant, M. J., & Pilarski, L. M. (1999). Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants. *Blood*, *93*(5), 1684-1696.
- Domagala, P., Hybiak, J., Cybulski, C., & Lubinski, J. (2017). BRCA1/2-negative hereditary triple-negative breast cancers exhibit BRCAness. *Int J Cancer*, *140*(7), 1545-1550. doi:10.1002/ijc.30570
- Du, Y. C., Chou, C. K., Klimstra, D. S., & Varmus, H. (2011). Receptor for hyaluronan-mediated motility isoform B promotes liver metastasis in a mouse model of multistep tumorigenesis and a tail vein assay for metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(40), 16753-16758. doi:10.1073/pnas.1114022108
- Dunsch, A. K., Hammond, D., Lloyd, J., Schermelleh, L., Gruneberg, U., & Barr, F. A. (2012). Dynein light chain 1 and a spindle-associated adaptor promote dynein asymmetry and spindle orientation. *J Cell Biol*, *198*(6), 1039-1054. doi:10.1083/jcb.201202112
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., . . . Ducommun, B. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the

- centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*, 117(Pt 12), 2523-2531. doi:10.1242/jcs.01108
- Easton, D. F., Ford, D., & Bishop, D. T. (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 56(1), 265-271. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1801337/pdf/ajhg00027-0273.pdf>
- Esguerra, K. V., Tolg, C., Akentieva, N., Price, M., Cho, C. F., Lewis, J. D., . . . Luyt, L. G. (2015). Identification, design and synthesis of tubulin-derived peptides as novel hyaluronan mimetic ligands for the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM/HMMR). *Integr Biol (Camb)*, 7(12), 1547-1560. doi:10.1039/c5ib00222b
- Fujita, H., Yoshino, Y., & Chiba, N. (2016). Regulation of the centrosome cycle. *Mol Cell Oncol*, 3(2), e1075643. doi:10.1080/23723556.2015.1075643
- Fulcher, L. J., He, Z., Mei, L., Macartney, T. J., Wood, N. T., Prescott, A. R., . . . Sapkota, G. P. (2019). FAM83D directs protein kinase CK1 α to the mitotic spindle for proper spindle positioning. *EMBO Rep*, 20(9), e47495. doi:10.15252/embr.201847495
- Furuta, S., Jiang, X., Gu, B., Cheng, E., Chen, P. L., & Lee, W. H. (2005). Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(26), 9176-9181. doi:10.1073/pnas.0503793102
- Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., & Salehiniya, H. (2016). Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(S3), 43-46. doi:10.7314/apjcp.2016.17.s3.43
- Glover, J. N., Williams, R. S., & Lee, M. S. (2004). Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem Sci*, 29(11), 579-585. doi:10.1016/j.tibs.2004.09.010
- Groen, A. C., Cameron, L. A., Coughlin, M., Miyamoto, D. T., Mitchison, T. J., & Ohi, R. (2004). XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly. *Curr Biol*, 14(20), 1801-1811. doi:10.1016/j.cub.2004.10.002
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., . . . Ohta, T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem*, 276(18), 14537-14540. doi:10.1074/jbc.C000881200
- He, Z., Kannan, N., Nemirovsky, O., Chen, H., Connell, M., Taylor, B., . . . Maxwell, C. A. (2017). BRCA1 controls the cell division axis and governs ploidy and phenotype in human mammary cells. *Oncotarget*, 8(20), 32461-32475. doi:10.18632/oncotarget.15688
- He, Z., Mei, L., Connell, M., & Maxwell, C. A. (2020). Hyaluronan Mediated Motility Receptor (HMMR) Encodes an Evolutionarily Conserved Homeostasis, Mitosis, and Meiosis Regulator Rather than a Hyaluronan Receptor. *Cells*, 9(4). doi:10.3390/cells9040819
- Heldin, P., Basu, K., Olofsson, B., Porsch, H., Kozlova, I., & Kahata, K. (2013). Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J Biochem*, 154(5), 395-408. doi:10.1093/jb/mvt085
- Hofmann, M., Fieber, C., Assmann, V., Göttlicher, M., Sleeman, J., Plug, R., . . . Herrlich, P. (1998). Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *J Cell Sci*, 111 (Pt 12), 1673-1684.

- Janssen, A., & Medema, R. H. (2011). Mitosis as an anti-cancer target. *Oncogene*, *30*(25), 2799-2809. doi:10.1038/onc.2011.30
- Joukov, V., Groen, A. C., Prokhorova, T., Gerson, R., White, E., Rodriguez, A., . . . Livingston, D. M. (2006). The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell*, *127*(3), 539-552. doi:10.1016/j.cell.2006.08.053
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., . . . Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Jama*, *317*(23), 2402-2416. doi:10.1001/jama.2017.7112
- Kumar, P., & Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*, *293*(2), 247-269. doi:10.1007/s00404-015-3859-y
- Lee, K., & Rhee, K. (2011). PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J Cell Biol*, *195*(7), 1093-1101. doi:10.1083/jcb.201106093
- Levy-Lahad, E., & Plon, S. E. (2003). Cancer. A risky business--assessing breast cancer risk. *Science*, *302*(5645), 574-575. doi:10.1126/science.1091465
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., . . . Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*, *15*(8), 907-913. doi:10.1038/nm.2000
- Litton, J. K., Ready, K., Chen, H., Gutierrez-Barrera, A., Etzel, C. J., Meric-Bernstam, F., . . . Arun, B. K. (2012). Earlier age of onset of BRCA mutation-related cancers in subsequent generations. *Cancer*, *118*(2), 321-325. doi:10.1002/cncr.26284
- Martinez-Delgado, B., Yanowsky, K., Inglada-Perez, L., Domingo, S., Urioste, M., Osorio, A., & Benitez, J. (2011). Genetic anticipation is associated with telomere shortening in hereditary breast cancer. *PLoS Genet*, *7*(7), e1002182. doi:10.1371/journal.pgen.1002182
- Mavaddat, N., Barrowdale, D., Andrulis, I. L., Domchek, S. M., Eccles, D., Nevanlinna, H., . . . Antoniou, A. C. (2012). Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *21*(1), 134-147. doi:10.1158/1055-9965.Epi-11-0775
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., . . . Easton, D. F. (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*, *105*(11), 812-822. doi:10.1093/jnci/djt095
- Maxwell, C. A., Benítez, J., Gómez-Baldó, L., Osorio, A., Bonifaci, N., Fernández-Ramires, R., . . . Pujana, M. A. (2011). Interplay between BRCA1 and RHAMM regulates epithelial apicobasal polarization and may influence risk of breast cancer. *PLoS Biol*, *9*(11), e1001199. doi:10.1371/journal.pbio.1001199
- Maxwell, C. A., Keats, J. J., Crainie, M., Sun, X., Yen, T., Shibuya, E., . . . Pilarski, L. M. (2003). RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol Biol Cell*, *14*(6), 2262-2276. doi:10.1091/mbc.e02-07-0377
- Maxwell, C. A., McCarthy, J., & Turley, E. (2008). Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci*, *121*(Pt 7), 925-932. doi:10.1242/jcs.022038

- Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., . . . Hanenberg, H. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*, *42*(5), 410-414. doi:10.1038/ng.569
- Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., & Takeichi, M. (2008). Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell*, *135*(5), 948-959. doi:10.1016/j.cell.2008.09.040
- Mersin, H., Yildirim, E., Berberoglu, U., & Gülben, K. (2008). The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. *Breast*, *17*(4), 341-346. doi:10.1016/j.breast.2007.11.031
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., . . . et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, *266*(5182), 66-71. doi:10.1126/science.7545954
- Molyneux, G., & Smalley, M. J. (2011). The cell of origin of BRCA1 mutation-associated breast cancer: a cautionary tale of gene expression profiling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *16*(1), 51-55. doi:10.1007/s10911-011-9202-8
- Nikonova, A. S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I. G., Dunbrack, R. L., Jr., & Golemis, E. A. (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci*, *70*(4), 661-687. doi:10.1007/s00018-012-1073-7
- Nishimura, R., & Arima, N. (2008). Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? *Breast Cancer*, *15*(4), 303-308. doi:10.1007/s12282-008-0042-3
- Otsuka, K., Yoshino, Y., Qi, H., & Chiba, N. (2020). The Function of BARD1 in Centrosome Regulation in Cooperation with BRCA1/OLA1/RACK1. *Genes (Basel)*, *11*(8). doi:10.3390/genes11080842
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., . . . Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, *24 Suppl 2*, S26-35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008
- Pujana, M. A., Han, J. D., Starita, L. M., Stevens, K. N., Tewari, M., Ahn, J. S., . . . Vidal, M. (2007). Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet*, *39*(11), 1338-1349. doi:10.1038/ng.2007.2
- Rajan, J. V., Wang, M., Marquis, S. T., & Chodosh, L. A. (1996). Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(23), 13078-13083. doi:10.1073/pnas.93.23.13078
- Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*, *59*(4), 651-672. doi:10.1097/grf.0000000000000239
- Royce, M. E., Xia, W., Sahin, A. A., Katayama, H., Johnston, D. A., Hortobagyi, G., . . . Hung, M. C. (2004). STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis. *Cancer*, *100*(1), 12-19. doi:10.1002/cncr.11879
- Ruffner, H., Joazeiro, C. A., Hemmati, D., Hunter, T., & Verma, I. M. (2001). Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(9), 5134-5139. doi:10.1073/pnas.081068398
- Sankaran, S., Crone, D. E., Palazzo, R. E., & Parvin, J. D. (2007). Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation. *Cancer Res*, *67*(23), 11186-11194. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-2578

- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M. L., . . . Visvader, J. E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, *439*(7072), 84-88. doi:10.1038/nature04372
- Sleeman, K. E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C. M., & Smalley, M. J. (2006). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res*, *8*(1), R7. doi:10.1186/bcr1371
- Sohr, S., & Engeland, K. (2008). RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle*, *7*(21), 3448-3460. doi:10.4161/cc.7.21.7014
- Sopik, V., & Narod, S. A. (2018). The relationship between tumour size, nodal status and distant metastases: on the origins of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *170*(3), 647-656. doi:10.1007/s10549-018-4796-9
- Spurdle, A. B., Couch, F. J., Parsons, M. T., McGuffog, L., Barrowdale, D., Bolla, M. K., . . . Goldgar, D. E. (2014). Refined histopathological predictors of BRCA1 and BRCA2 mutation status: a large-scale analysis of breast cancer characteristics from the BCAC, CIMBA, and ENIGMA consortia. *Breast Cancer Res*, *16*(6), 3419. doi:10.1186/s13058-014-0474-y
- Stevens, K. N., Fredericksen, Z., Vachon, C. M., Wang, X., Margolin, S., Lindblom, A., . . . Couch, F. J. (2012). 19p13.1 is a triple-negative-specific breast cancer susceptibility locus. *Cancer Res*, *72*(7), 1795-1803. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-3364
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., . . . Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, *13*(11), 1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635
- Takaoka, M., & Miki, Y. (2018). BRCA1 gene: function and deficiency. *Int J Clin Oncol*, *23*(1), 36-44. doi:10.1007/s10147-017-1182-2
- Tamimi, R. M., Spiegelman, D., Smith-Warner, S. A., Wang, M., Pazaris, M., Willett, W. C., . . . Hunter, D. J. (2016). Population Attributable Risk of Modifiable and Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Breast Cancer. *Am J Epidemiol*, *184*(12), 884-893. doi:10.1093/aje/kww145
- Tanaka, T., Kimura, M., Matsunaga, K., Fukada, D., Mori, H., & Okano, Y. (1999). Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res*, *59*(9), 2041-2044. Retrieved from <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/59/9/2041.full.pdf>
- Venkitaraman, A. R. (2009). Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*, *4*, 461-487. doi:10.1146/annurev.pathol.3.121806.151422
- Vidarsdottir, L., Bodvarsdottir, S. K., Hilmarsdottir, H., Tryggvadottir, L., & Eyfjord, J. E. (2007). Breast cancer risk associated with AURKA 91T -->A polymorphism in relation to BRCA mutations. *Cancer Lett*, *250*(2), 206-212. doi:10.1016/j.canlet.2006.10.003
- Walczak, C. E., Cai, S., & Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(2), 91-102. doi:10.1038/nrm2832
- Yang, B., Zhang, L., & Turley, E. A. (1993). Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. *J Biol Chem*, *268*(12), 8617-8623.

Zheng, F., Yue, C., Li, G., He, B., Cheng, W., Wang, X., . . . Liu, Q. (2016). Nuclear AURKA acquires kinase-independent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype. *Nat Commun*, 7, 10180. doi:10.1038/ncomms10180

6 Anhang

Publikation

Im Rahmen des BRCA1/2 Projekts der Universitätsfrauenklinik fand eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Maxwell et al. statt. Die Ergebnisse dieser Zusammenarbeit wurden zum Teil im PLoS Biology: Interplay between BRCA1 and RHAMM Regulates Epithelial Apicobasal Polarization and May Influence Risk of Breast Cancer (Maxwell et al., 2011) publiziert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zeichnung einer weiblichen Brust (Ramsay et al, 2005), Lizenznummer: 5304971185759	4
Abb. 2: Zentrosom Zyklus entnommen aus Regulation of centrosom cycle, Fujita et al., 2016:	14
Abb. 3: Immunhistochemische Darstellung der RHAMM Expression im BRCA1-wt Mammakarzinom , 10-fache Vergrößerung: schwache Färbung des Zytoplasmas, IRS 4	34
Abb. 4: Immunhistochemische Darstellung der pT703-RHAMM-Expression im BRCA1-wt Mammakarzinom , 10-fache Vergrößerung: mäßig starke Proteinexpression in den Kernen, IRS 6	35
Abb. 5: Darstellung der AURKA Expression im BRCA1-wt Mammakarzinom , 10-fache Vergrößerung: starke Expression im Zytoplasma, IRS 9	37
Abb. 6: Darstellung der RHAMM-Expression im BRCA1-mut Mammakarzinom , 10-fache Vergrößerung: starke Proteinexpression im Zytoplasmas, IRS 9	38
Abb. 7: Darstellung der pT703-RHAMM Expression im BRCA1-mut Mammakarzinom , 10-fache Vergrößerung: starke Expression im Zytoplasma/perinukleär, IRS 12	40
Abb. 8: Darstellung der AURKA-Expression im BRCA1-mut Mammakarzinom , 10-fache Vergrößerung: in 1/7 Präparaten starke Expression im Zytoplasma, IRS 9 ...	41
Abb. 9: Darstellung der RHAMM Expression im TNBC , 10-fache Vergrößerung: starke Proteinexpression im Zytoplasma, IRS 12	43
Abb. 10: Darstellung der pT703-RHAMM-Expression im Triple-negativen Mammakarzinom , 10-fache Vergrößerung: Färbung des Zytoplasmas/perinukleär, IRS 12	44
Abb. 11: Darstellung der AURKA-Expression im TNBC , 15-fache Vergrößerung: starke AURKA-Expression im Zytoplasma, IRS 9	46
Abb. 12: RHAMM: Balkendiagramm mit RHAMM Expression in den <i>BRCA1</i> -wt und <i>BRCA1</i> -mut Mammakarzinomen sowie in TNBC	48
Abb. 13: pT703-RHAMM: Balkendiagramm mit pT703-RHAMM Expression in den <i>BRCA1</i> -wt und <i>BRCA1</i> -mut Mammakarzinomen sowie in TNBC	49
Abb. 14: AURKA: Balkendiagramm mit AURKA Expression in den <i>BRCA1</i> -wt und <i>BRCA1</i> -mut Mammakarzinomen sowie in TNBC	51
Abb. 15: Balkendiagramm mit Darstellung der Proteinlokalisierung von RHAMM, AURKA und pT703-RHAMM in <i>BRCA1</i> -wt und <i>BRCA1</i> -mut Mammakarzinomen sowie TNBC	53
Abb. 16: BRCA1-wt MCF-12a: Immunzytochemische Darstellung der RHAMM Expression durch Braunfärbung im Zytoplasma, 10-fache Vergrößerung	55
Abb. 17: BRCA1-wt MCF-12a: Immunzytochemische Darstellung der AURKA Expression durch Braunfärbung im Zytoplasma der Zellen, 10-fache Vergrößerung ...	55
Abb. 18: BRCA1-wt MCF-12a: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM Expression durch Braunfärbung der Kerne, 10-fache Vergrößerung	56
Abb. 19: BRCA1-mut HCC1937: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM Expression mit perinukleärer Färbung, 10-fache Vergrößerung	57
Abb. 20: BRCA1-mut HCC1937 Exon11Transfektant: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM Expression mit perinukleärer Färbung, 15-fache Vergrößerung	58

Abb. 21: BRCA1-mut HCC1937-S11-IN Transfektant: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM Expression mit perinukleärer Färbung, 15-fache Vergrößerung	58
Abb. 22: BRCA1-wt HCC1937-Transfektanten: Immunzytochemische Darstellung der pT703-RHAMM Expression mit Färbung der Kerne, 10-fache Vergrößerung	59
Abb. 23 und 24: BRCA1-wt MCF-12a Kultur in 3D-Matrigel, Darstellung von traubenförmigen Zell-Clustern mit 3D-Struktur (Abb. oben), nach 14 Tagen Verbindung zu benachbarten Zell-Cluster mit Strukturerehalt (Abb. unten)	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risiken für Brustkrebs nach AGO Mamma, Guidelines Breast Version 2022.1D	2
Tabelle 2: Histologischer Malignitätsgrad	5
Tabelle 3: St.-Gallen-Konsensus 2011, ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor,	7
Tabelle 4: Risikomodifikation durch Brustkrebsgene Meindl, 2011	9
Tabelle 5: Primärantikörper	23
Tabelle 6: Histologische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	25
Tabelle 7: Der Immunreaktive Score	25
Tabelle 8: Zelllinien	26
Tabelle 9: Zelllinie HCC1937 mit Transfektanten	29
Tabelle 10: Auswertung Immunhistochemie <i>BRCA1</i>-wt Mammakarzinom mit RHAMM-Antikörper: schwache bis mäßig positive homogene Färbung des Zytoplasmas in 14/15 Präparaten	33
Tabelle 11: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von <i>BRCA1</i>-wt Mammakarzinom mit dem pT703-RHAMM-Antikörper: mäßig positive Proteinexpression im Kern in 12/15 Präparaten	35
Tabelle 12: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von <i>BRCA1</i>-wt Mammakarzinom mit dem AURKA-Antikörper: mäßige bis starke zytoplasmatische Proteinexpression in 12/15 Präparaten	36
Tabelle 13: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von <i>BRCA1</i>-mut Mammakarzinom mit dem RHAMM-Antikörper: starke Färbung des Zytoplasmas in 4/7 Präparaten	38
Tabelle 14: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von <i>BRCA1</i>-mut Mammakarzinom mit dem pT703-RHAMM-Antikörper: starke Proteinexpression im Zytoplasma/perinukleär in 6/7 Präparaten	39
Tabelle 15: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von <i>BRCA1</i>-mut Mammakarzinom mit dem AURKA-Antikörper: größtenteils schwache AURKA-Expression im Zytoplasma in 6/7 Präparaten	41
Tabelle 16: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von TNBC mit dem RHAMM-Antikörper: starke Expression im Zytoplasma in 8/9 Präparaten	42
Tabelle 17: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von TNBC mit dem pT703-RHAMM-Antikörper: starke pT703-RHAMM-Expression im Zytoplasma/perinukleär in 8/9 Präparaten	44
Tabelle 18: Auswertung der immunhistochemischen Färbung von TNBC mit dem AURKA-Antikörper: mäßige bis starke Expression im Zytoplasma in 6/9 Präparaten	45
Tabelle 19: Immunreaktiver Score von RHAMM: Auswertung der RHAMM Expression in <i>BRCA1</i>-wt (n=15), <i>BRCA1</i>-mut (n=7) und TNBC (n=9)	48
Tabelle 21: Immunreaktiver Score von pT703-RHAMM: Auswertung der pT703-RHAMM Expression in <i>BRCA1</i>-wt (n=15) und <i>BRCA1</i>-mut (n=7) Mammakarzinomen sowie in TNBC (n=9)	49
Tabelle 23: Immunreaktiver Score von AURKA: Auswertung der AURKA Expression in <i>BRCA1</i>-wt (n=15), <i>BRCA1</i>-mut (n=7) und TNBC (n=9)	50

7 Danksagung

Ich möchte mich bei den nachstehenden Menschen bedanken, ohne die diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Fleisch, meinem Doktorvater, und Herrn Dr. Dieter Niederacher, meinem Betreuer, für ihre wissenschaftliche Leitung, hilfsbereite Betreuung und mühevollen Durchsicht meiner Arbeit ganz herzlich bedanken,

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Herrn Dr. med. Stephan Baldus und Frau Dr. Inga Boeck vom Pathologischen Institut der Universitätsklinik Düsseldorf für Ihre Beratung bei der Auswertung und Hilfe beim Erstellen der lichtmikroskopischen Bilder.

Des Weiteren möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf und insbesondere Frau Ulla Grolik für ihre Unterstützung und Mithilfe bei meinem Promotionsvorhaben bedanken.

Mein außerordentlicher Dank geht schließlich an meine Familie für ihre liebevolle und geduldige Unterstützung und insbesondere meinen Eltern, Said F. Sadat und Sima Sadat, denen ich diese Arbeit widme.